

12. Rodriguez, J. A., Valentine, J. S., Eggers, D. K., Roe, J. A., Tiwari, A., Brown, R. H., Jr., and Hayward, L. J. (2002) *J. Biol. Chem.* **277**, 15932–15937
13. Lindberg, M. J., Tibell, L., and Oliveberg, M. (2002) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **99**, 16607–16612
14. Johnston, J. A., Dalton, M. J., Gurney, M. E., and Kopito, R. R. (2000) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **97**, 12571–12576
15. Urushitani, M., Kurisu, J., Tateno, M., Hatakeyama, S., Nakayama, K., Kato, S., and Takahashi, R. (2004) *J. Neurochem.* **90**, 231–244
16. Shinder, G. A., Lacourse, M. C., Minotti, S., and Durham, H. D. (2001) *J. Biol. Chem.* **276**, 12791–12796
17. Wilson, D. M., and Binder, L. I. (1997) *Am. J. Pathol.* **150**, 2181–2195
18. Sharon, R., Goldberg, M. S., Bar-Josef, I., Betensky, R. A., Shen, J., and Selkoe, D. J. (2001) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **98**, 9110–9115
19. Sharon, R., Bar-Josef, I., Froesch, M. P., Walsh, D. M., Hamilton, J. A., and Selkoe, D. J. (2003) *Neuron* **37**, 583–595
20. Urushitani, M., Kurisu, J., Tsukita, K., and Takahashi, R. (2002) *J. Neurochem.* **83**, 1030–1042
21. Fried, R. (1975) *Biochimie (Paris)* **57**, 657–660
22. Crow, J. P., Sampson, J. B., Zhuang, Y., Thompson, J. A., and Beckman, J. S. (1997) *J. Neurochem.* **69**, 1936–1944
23. Boissinot, M., Karnas, S., Lepock, J. R., Cabelli, D. E., Tainer, J. A., Getzoff, E. D., and Hallewell, R. A. (1997) *EMBO J.* **16**, 2171–2178
24. Bartnikas, T. B., and Gitlin, J. D. (2003) *J. Biol. Chem.* **278**, 33602–33608
25. Peters, T., Jr., Taniuchi, H., and Anfinsen, C. B., Jr. (1973) *J. Biol. Chem.* **248**, 2447–2451
26. Bucciantini, M., Giannoni, E., Chiti, F., Baroni, F., Formigli, L., Zurdo, J., Taddei, N., Ramponi, G., Dobson, C. M., and Stefani, M. (2002) *Nature* **416**, 507–511
27. Kaye, R., Head, E., Thompson, J. L., McIntire, T. M., Milton, S. C., Cotman, C. W., and Glabe, C. G. (2003) *Science* **300**, 486–489
28. Kato, S., Saito, M., Hirano, A., and Ohama, E. (1999) *Histol. Histopathol.* **14**, 973–989
29. Walsh, D. M., Hartley, D. M., Kusumoto, Y., Fezoui, Y., Condron, M. M., Lomakin, A., Benedek, G. B., Selkoe, D. J., and Teplow, D. B. (1999) *J. Biol. Chem.* **274**, 25945–25952
30. Walsh, D. M., Walsh, D. M., Ye, C. P., Diehl, T., Vasquez, S., Vassilev, P. M., Teplow, D. B., and Selkoe, D. J. (1999) *J. Neurosci.* **19**, 8876–8884
31. Tateno, M., Sadakata, H., Tanaka, M., Itohara, S., Shin, R. M., Miura, M., Masuda, M., Aozaki, T., Urushitani, M., Misawa, H., and Takahashi, R. (2004) *Hum. Mol. Genet.* **13**, 2183–2196
32. Rakhit, R., Cunningham, P., Furtos-Matei, A., Dahan, S., Qi, X. F., Crow, J. P., Cashman, N. R., Kondejewski, L. H., and Chakrabarty, A. (2002) *J. Biol. Chem.* **277**, 47551–47556
33. Gamblin, T. C., King, M. E., Kuret, J., Berry, R. W., and Binder, L. I. (2000) *Biochemistry* **39**, 14203–14210
34. Necula, M., Chirita, C. N., and Kuret, J. (2003) *J. Biol. Chem.* **278**, 46674–46680
35. Chirita, C. N., Necula, M., and Kuret, J. (2003) *J. Biol. Chem.* **278**, 25644–25650
36. Elam, J. S., Taylor, A. B., Strange, R., Antonyuk, S., Doucette, P. A., Rodriguez, J. A., Hasnain, S. S., Hayward, L. J., Valentine, J. S., Yeates, T. O., and Hart, P. J. (2003) *Nat. Struct. Biol.* **10**, 461–467
37. Strange, R. W., Antonyuk, S., Hough, M. A., Doucette, P. A., Rodriguez, J. A., Hart, P. J., Hayward, L. J., Valentine, J. S., and Hasnain, S. S. (2003) *J. Mol. Biol.* **328**, 877–891
38. Caughey, B., and Lansbury, P. T. (2003) *Annu. Rev. Neurosci.* **26**, 267–298
39. Kaye, R., Sokolov, Y., Edmonds, B., McIntire, T. M., Milton, S. C., Hall, J. E., and Glabe, C. G. (2004) *J. Biol. Chem.* **279**, 46363–46366

Inactivation of *Drosophila* DJ-1 leads to impairments of oxidative stress response and phosphatidylinositol 3-kinase/Akt signaling

Yufeng Yang^{*†}, Stephan Gehrke^{*†}, Md. Emdadul Haque^{*}, Yuzuru Imai^{*}, Jon Kosek^{*}, Lichuan Yang[‡], M. Flint Beal[‡], Isao Nishimura[§], Kazumasa Wakamatsu[¶], Shosuke Ito[¶], Ryosuke Takahashi^{||}, and Bingwei Lu^{*,**}

^{*}Department of Pathology, Stanford University School of Medicine, and Geriatric Research, Education and Clinical Center/Veterans Affairs Palo Alto Health Care System, Palo Alto, CA 94304; [‡]Department of Neurology, Cornell University Medical College, 525 East 68th Street, New York, NY 10021; [§]Division of Regulation of Macromolecular Functions, Institute for Protein Research, Osaka University, 3-2 Yamadaoka, Suita, Osaka 565-0871, Japan; [¶]Department of Chemistry, Fujita Health University School of Health Sciences, Toyoake, Aichi 470-1192, Japan; and ^{||}Laboratory for Motor System Neurodegeneration, RIKEN Brain Science Institute, 2-1 Hirosawa, Wako-shi, Saitama 351-0198, Japan

Edited by Tak Wah Mak, University of Toronto, Toronto, Canada, and approved July 29, 2005 (received for review June 3, 2005)

Parkinson's disease (PD) is the most common movement disorder characterized by dopaminergic dysfunction and degeneration. The cause of most PD cases is unknown, although postmortem studies have implicated the involvement of oxidative stress. The identification of familial PD-associated genes offers the opportunity to study mechanisms of PD pathogenesis in model organisms. Here, we show that DJ-1A, a *Drosophila* homologue of the familial PD-associated gene DJ-1, plays an essential role in oxidative stress response and neuronal maintenance. Inhibition of DJ-1A function through RNA interference (RNAi) results in cellular accumulation of reactive oxygen species, organismal hypersensitivity to oxidative stress, and dysfunction and degeneration of dopaminergic and photoreceptor neurons. To identify other genes that may interact with DJ-1A in regulating cell survival, we performed genetic interaction studies and identified components of the phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K)/Akt-signaling pathway as specific modulators of DJ-1A RNAi-induced neurodegeneration. PI3K signaling suppresses DJ-1A RNAi phenotypes at least in part by reducing cellular reactive oxygen species levels. Consistent with the genetic interaction results, we also found reduced phosphorylation of Akt in DJ-1A RNAi animals, indicating an impairment of PI3K/Akt signaling by DJ-1A down-regulation. Together with recent findings in mammalian systems, these results implicate impairments of PI3K/Akt signaling and oxidative stress response in DJ-1-associated disease pathogenesis. We also observed impairment of PI3K/Akt signaling in the fly *parkin* model of PD, hinting at a common molecular event in the pathogenesis of PD. Manipulation of PI3K/Akt signaling may therefore offer therapeutic benefits for the treatment of PD.

Parkinson's disease | PI3K/PTEN/Akt signaling | reactive oxygen species

Parkinson's disease (PD) is the most common movement disorder and the second most common neurodegenerative disease. The movement abnormality in PD arises from deficiency of brain dopamine (DA) contents and the degeneration of dopaminergic neurons in the substantia nigra. The most common forms of PD are sporadic with no known cause. Nevertheless, postmortem studies have identified common features associated with sporadic PD, including defects in mitochondrial complex I function, oxidative damage, and abnormal protein aggregation (1).

The contribution of genetic factors in the pathogenesis of PD, although initially controversial, has been firmly established by recent human genetic studies. At least 10 distinct loci (PARK1 to -11) have been linked to rare familial forms of PD (2). It is anticipated that understanding the molecular lesions associated with these familial PD (FPD) genes will shed light on the pathogenesis of the sporadic forms of the disease. To date, five unequivocal FPD genes have been molecularly cloned. These include α -Synuclein (α -Syn), Parkin, DJ-1, PINK-1, and dardarin. Biochem-

ical and biophysical studies of α -Syn and Parkin have primarily linked dysfunction of these genes to aberrant protein folding and ubiquitin-proteasome dysfunction. Intriguingly, *in vivo* genetic and *in vitro* cell culture studies have revealed their connection to mitochondrial dysfunction and oxidative stress, reinforcing the involvement of these processes in PD pathogenesis in general (3).

DJ-1 encodes a conserved protein belonging to the ThiJ/PfpI/DJ-1 superfamily. The exact molecular function of DJ-1 is still unclear. Human DJ-1 was initially discovered as a candidate oncoprotein that could transform cells in cooperation with activated *ras* (4), and it was later found as a component of an RNA-binding protein complex and was associated with male infertility (4–6). Under oxidative stress conditions, DJ-1 was modified by oxidation, and the modified form associated with mitochondria in cultured cells (7–10). Knocking down DJ-1 expression with small interfering RNA (siRNA) resulted in susceptibility to oxidative stress, endoplasmic reticulum stress, and proteasome inhibition (11). Recent analyses of DJ-1 knockout mice have shed light on the physiological function of DJ-1 in mammals. DJ-1-deficient mice were found to have nigrostriatal dopaminergic dysfunction, motor deficits, and hypersensitivity to the neurotoxin 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP) and oxidative stress stimuli (12–14). In mammalian cells, DJ-1 was found to regulate the phosphorylation status of protein kinase B (PKB)/Akt through the tumor suppressor PTEN (15). The relevance of this novel finding of DJ-1 function to PD pathogenesis remains to be explored.

As an alternative approach to understanding the role of DJ-1 dysfunction in PD pathogenesis, we have used *Drosophila* as a model system. We inhibited the function of a *Drosophila* DJ-1 homologue (DJ-1A) by transgenic RNA interference (RNAi). DJ-1A RNAi flies show cellular accumulation of reactive oxygen species (ROS), hypersensitivity to oxidative stress, and degeneration of dopaminergic and photoreceptor neurons. Genetic interaction studies with candidate genes and pathways previously implicated in survival signaling led to the identification of genes in the PI3K/Akt-signaling pathway as specific modifiers of DJ-1A-associated cell death phenotype. Consistent with the genetic interaction results, PI3K signaling was found to regulate cellular ROS levels, and we found that DJ-1A down-regulation leads to impairment of PI3K/Akt signaling. Significantly, we found that dysfunction of *parkin*, another PD-associated gene, also led to impaired

This paper was submitted directly (Track II) to the PNAS office.

Abbreviations: DA, dopamine; DMC, dorsomedial cluster; PD, Parkinson's disease; RNAi, RNA interference; ROS, reactive oxygen species; TH, tyrosine hydroxylase; PKB, protein kinase B; PI3K, phosphatidylinositol 3-kinase; *Da*, *daughterless*; 3-AT, 3-amino-triazole; DCFH-DA, 2,7-dichlorofluorescein diacetate; DN, dominant-negative.

[†]Y.Y. and S.G. contributed equally to this work.

^{**}To whom correspondence should be addressed. E-mail: blngwei@stanford.edu.

© 2005 by The National Academy of Sciences of the USA

PI3K/Akt signaling. Our results implicate oxidative stress and impairment of PI3K/Akt signaling as a general feature of PD pathogenesis and suggest new avenues for therapeutic intervention.

Experimental Procedures

Drosophila Genetics. Fly culture and crosses were performed according to standard procedures and raised at indicated temperatures. All general fly stocks and *GAL4* lines were obtained from the Bloomington *Drosophila* Stock Center. The other fly stocks have been described: *UAS-Akt* (16); *UAS-PI3K^{p110}* and *UAS-PI3K^{p110} DN* (17); *UAS-PTEN* (18); and *UAS- τ V337M* (19). To generate *UAS-dsDJ-1A* and *UAS-dsDJ-1B* transgenics, genomic DNA/cDNA hybrid constructs were generated as described (20). To make *UAS-DJ-1A*, *UAS-DJ-1B*, and *UAS-hDJ-1* transgenics, corresponding full-length cDNA was cloned into the *pUAST* vector. Details of the cloning steps are available upon request. Approximately 9 μ g of *pUAST* transgenic construct was mixed with 3 μ g of helper plasmid in 20 μ l of injection buffer. Standard procedures were followed for embryo injection and recovery of transgenic lines.

Molecular Biology. For RT/PCR analysis, 2nd to 3rd instar larvae from the cross between *UAS-dsDJ-1A* and *Da-GAL4* were used to prepare total RNA by using an RNeasy Kit (Qiagen, Valencia, CA). Details of the quantitative RT/PCR procedure were essentially as described (21). Antibodies against DJ-1A and DJ-1B were elicited in rabbits with recombinant proteins purified from bacteria culture expressing *pGEX-6P-1-DJ-1A* or *pGEX-6P-1-DJ-1B* vectors, which contain corresponding full-length cDNA inserts. Western blot analysis using these antibodies was performed as described (21), with each primary antibody used at 1:5,000 dilution. For Western blot analysis of Akt, *Da-GAL4/+* and *Da-GAL4>DJ-1A RNAi* animals were raised at 18°C from the larvae stage to obtain viable *Da-GAL4>DJ-1A RNAi* adult animals, because these animals die at larvae stage when raised at 25°C. Newly eclosed adult flies were transferred to 29°C to induce stronger RNAi. *Da-GAL4>dParkin RNAi* flies were raised at 29°C constantly. Fly head extracts were prepared for Western blot analysis with anti-Akt and anti-p-Akt (S505) antibodies (Cell Signaling Technology, Beverly, MA).

Histology and Immunohistochemistry. Sections of paraffin-embedded adult fly heads were prepared and processed as described (21). The sections were incubated in primary antibody overnight at 4°C, and subsequently processed by using the Vectastain Universal Elite ABC Kit (Vector Laboratories). The primary antibody used was anti-tyrosine hydroxylase (TH) polyclonal antibody (Pel-Freez Biologicals, 1:100). For the analysis of adult retina, eye sectioning and staining with toluidine blue was performed as described (22). Between four and five fly heads for each genotype per time point were examined, and each experiment was repeated at least once. The neuronal culture system was established and processed for immunofluorescence staining as described (21). For ROS staining of neuronal culture and adult fly brain, 2,7-dichlorofluorescein diacetate (DCFH-DA) (Molecular Probes) was used following the manufacturer's instructions.

DA Measurement. HPLC analysis of catecholamine levels was performed as described (23, 24). For sample preparation, adult male fly heads were dissected out and homogenized in 0.1 M perchloric acid (generally 50 μ l per four or five heads) by using a motorized hand-held tissue grinder. The homogenate was frozen immediately on dry ice and stored at -80°C before HPLC analysis.

Oxidative Stress Assay. For oxidative stress assay, flies were kept in plastic vials with a piece of Kimwipe paper soaked with 1% H₂O₂ or 100 mM 3-amino-triazole (3-AT) in Schneider's Medium. The vials were kept at 25°C in a shielded box. Fresh H₂O₂ or 3-AT was added to the paper daily with a syringe. Mortality was recorded every 12 h or at shorter intervals.

Results

Specific Knockdown of *Drosophila DJ-1A* Expression by Transgenic RNAi. In the sequenced *Drosophila* genome, there are two previously uncharacterized genes, *CG6646* and *CG1349* (referred to as *DJ-1A* and *DJ-1B*, respectively), which are homologous to human *DJ-1*. Sequence alignment shows that DJ-1A contains the three conserved amino acids proposed to form a putative catalytic triad in human DJ-1 (25), whereas DJ-1B lacks one of the three amino acids. This finding suggests that DJ-1A may be more closely related to human DJ-1. As a first step toward addressing the function of DJ-1A in *Drosophila*, we used the transgenic RNAi approach to knockdown DJ-1A expression (20). To confirm that the expression of *DJ-1A* dsRNA resulted in a down-regulation of endogenous *DJ-1A* transcripts, we used quantitative RT-PCR to measure *DJ-1A* mRNA levels after ubiquitous induction of DJ-1A RNAi. A dramatic reduction of *DJ-1A* mRNA was observed, whereas *DJ-1B* mRNA was relatively unchanged (Fig. 1A). We next tested the effect of RNAi on endogenous DJ-1 protein expression using DJ-1A- and DJ-1B-specific antibodies. As shown in Fig. 1B, ubiquitous DJ-1A RNAi resulted in a significant reduction of endogenous DJ-1A protein expression on Western blots. In contrast, the level of DJ-1B protein was relatively unaffected. Taken together, these results show that RNAi causes a specific knockdown of DJ-1A RNA and protein expression.

Targeted Inhibition of DJ-1A in the Eye Results in Photoreceptor Loss.

We next analyzed the physiological consequence of inhibiting DJ-1A function. Ubiquitous expression of *DJ-1A* dsRNA with *actin-GAL4* or *daughterless (Da)-GAL4* resulted in larval lethality. This finding suggests that DJ-1A is an essential gene in *Drosophila*. To circumvent the lethality problem, we used well characterized *GAL4* drivers to inhibit DJ-1A expression in specific tissues and cell types and at different stages. Induction of DJ-1A RNAi in the developing eye using *GMR-GAL4* driver produced a rough eye phenotype (Fig. 1D and H). *GMR-GAL4* directs gene expression in postmitotic cells posterior to the morphogenetic furrow and a small group of premitotic cells in the developing eye. Staining of eye sections revealed loss of photoreceptor neurons in some ommatidia (Fig. 1J), indicating that the rough eye phenotype is caused at least in part by photoreceptor cell loss. This RNAi effect is dosage-dependent, because increasing the copy number of *GAL4* and *UAS* transgenes caused a more severe degeneration of the eye (Fig. 1K). Several lines of evidence suggest that this eye phenotype is caused by specific inhibition of DJ-1A. First, overexpression of *white* or *dParkin* control dsRNAs using the same *GAL4* driver had no effect on eye morphology (data not shown), suggesting that the eye phenotype was not due to a nonspecific effect of dsRNA expression. Second, in a *DJ-1A* heterozygous genetic background, the eye phenotype was significantly enhanced (Fig. 1F), consistent with the RNAi effect being dosage dependent. Finally, we could rescue the RNAi phenotype with increased expression of *DJ-1A*. Given that the RNAi effect is dosage-dependent, we reasoned that, by raising the basal level of *DJ-1A* transcripts, the RNAi effect would be dampened. Indeed, coexpression of *UAS-DJ-1A* transgenes partially suppressed the eye degeneration phenotype induced by strong RNAi (Fig. 1, compare M with K). Coexpression of a human DJ-1 transgene could also partially rescue (Fig. 1, compare N with K), suggesting that human DJ-1 and fly DJ-1A may possess similar properties. In contrast, coexpression of a *GFP* transgene had no effect (Fig. 1, compare L with K), suggesting that the rescue is not due to titration of *GAL4* by added expression of a *UAS*-transgene. We conclude that the abnormal eye phenotype is specifically caused by inhibition of DJ-1A expression.

Inhibition of DJ-1A in Dopaminergic Neurons Leads to Decreases of TH⁺ Neuron Number and Brain DA Content. We next analyzed the effects of inhibiting DJ-1A function in dopaminergic neurons by

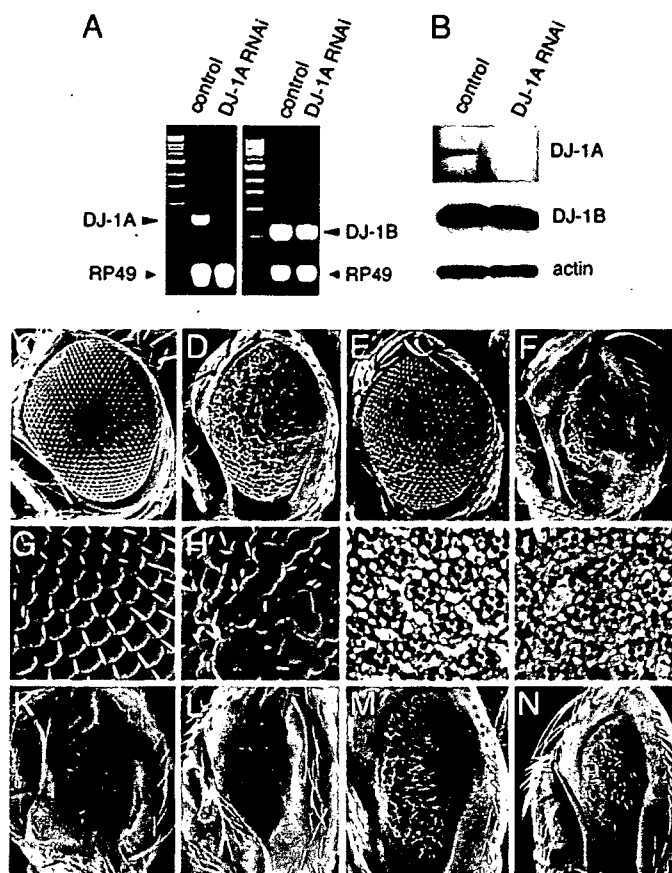


Fig. 1. Inhibition of *DJ-1A* expression by RNAi leads to photoreceptor neuron loss and eye degeneration. (A) Quantitative RT/PCR analysis of *DJ-1A* mRNA level after RNAi. *DJ-1B* and *RP49* serve as controls. (B) Western blot analysis of *DJ-1A* protein level after RNAi. *DJ-1B* and actin serve as controls. (C–H) SEM images of *GMR-GAL4/+* (C), *GMR-GAL4>UAS-DJ-1A-RNAi* (D), *GMR-GAL4/Df(2R)CX1* (E), and *GMR-GAL4>UAS-DJ-1A-RNAi/Df(2R)CX1* (F) eyes. *Df(2R)CX1* is a chromosomal deficiency that deletes *DJ-1A*. G and H are magnified views of C and D, respectively. (I and J) Staining of photoreceptor neurons in *GMR-GAL4/+* (I), and *GMR-GAL4>UAS-DJ-1A-RNAi* (J) eyes. Arrows in J mark ommatidia with photoreceptor loss. (K–N) Rescue of *DJ-1A* RNAi phenotypes by overexpressing *DJ-1A* or human *DJ-1*. All flies are homozygous for a recombinant *GMR-GAL4;UAS-DJ-1A-RNAi* chromosome and thus have a stronger phenotype than the one shown in B. In addition, the flies coexpress *UAS-GFP* (L), *UAS-DJ-1A* (M), *UAS-hDJ-1* (N), or no other transgene (K).

inducing RNAi with the *Ddc-GAL4* driver. We focused on the dopaminergic neurons in the dorsomedial clusters (DMC), which are known to be susceptible under disease conditions (26). Immunostaining of paraffin brain sections of *Ddc-GAL4>DJ-1A RNAi* flies revealed an age-dependent reduction in the number of TH⁺ neurons in the DMC. In 1-day-old flies, a normal complement of TH⁺ neurons (≈ 18) was present (Fig. 2C), but, in 35-day and older flies, only 10–12 of these neurons could be detected immunohistochemically (Fig. 2B and C). Control flies showed no significant change in the number of these neurons during aging (Fig. 2A and C). Induction of *DJ-1A* RNAi with another dopaminergic GAL4 driver, *TH-GAL4*, or the pan-neuronal *elav-GAL4* driver also resulted in reduction of TH⁺ neurons in the DM clusters (Fig. 2C).

To further confirm that loss of *DJ-1A* leads to dopaminergic dysfunction, we measured brain DA levels using head extracts prepared from control and *DJ-1A RNAi* flies. In newly eclosed flies, DA content was comparable between control and RNAi flies (Fig. 2D). However, 1 day after eclosion, *DJ-1A RNAi* flies showed significantly reduced DA level than control flies. At 4, 7, and 10 days of age, control and *DJ-1A RNAi* flies both showed age-dependent

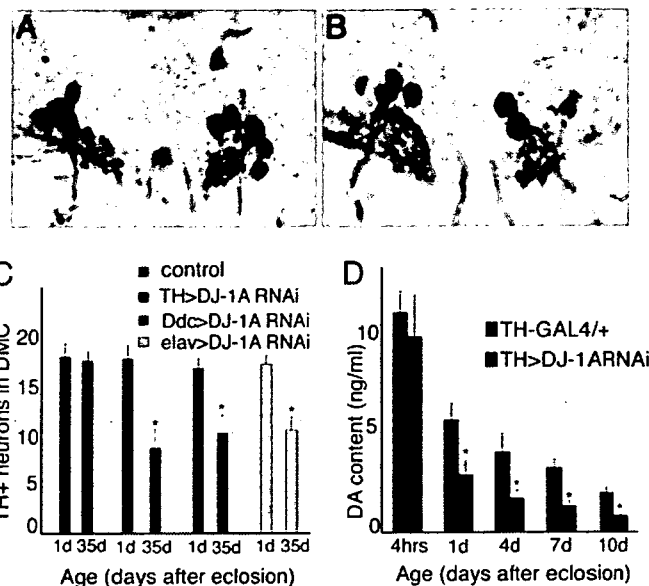


Fig. 2. Dopaminergic defects in *DJ-1A RNAi* flies. (A and B) TH immunostaining of DMC dopaminergic neurons in 35-day-old control *Ddc-GAL4/+* (A) and *Ddc-GAL4>DJ-1A RNAi* (B) male flies. Sections containing most of the DMC dopaminergic neurons are shown. (C) Quantification of TH⁺ neurons in the DMC of control flies and *DJ-1A RNAi* flies directed with *TH-GAL4*, *Ddc-GAL4*, or *elav-GAL4* drivers. The difference in cell count between 1-day-old and 35-day-old *DJ-1A RNAi* flies is significant. *, $P < 0.01$ in Student's *t* test. (D) Quantification of head DA levels in *TH-GAL4/+* and *TH-GAL4>DJ-1A RNAi* flies. *, $P < 0.01$ in Student's *t* test.

decline of DA, but *DJ-1A RNAi* flies consistently exhibited more reduction than the controls (Fig. 2D). Because a normal complement of TH⁺ dopaminergic neurons was present in 1-day old flies, the reduction of brain DA content at this early stage could not be attributed to neuronal loss. This result suggests that, in addition to promoting dopaminergic neuron survival, *Drosophila* *DJ-1A* may play an early role in regulating brain DA levels.

***DJ-1A RNAi* Flies Show Elevated ROS Accumulation and Hypersensitivity to Oxidative Stress.**

We further characterized the *DJ-1A RNAi* animals to learn *DJ-1A* function *in vivo*. Human DJ-1 was previously found to respond to oxidative stress (8). This finding prompted us to analyze the response of *DJ-1A RNAi* flies under oxidative conditions. We used the *elav-GAL4* driver to systematically induce *DJ-1A* RNAi in postmitotic neurons of transgenic flies and examined the response of these flies to treatment with exogenous H₂O₂. When treated with 1% H₂O₂, the time to reach 50% mortality was shortened by 27% in *DJ-1A RNAi* flies than control flies (Fig. 3A). This finding suggests that neuronal DJ-1A is important in fending off H₂O₂-induced lethality. To further confirm the sensitivity of *DJ-1A RNAi* flies to intracellular H₂O₂ levels, we treated *DJ-1A RNAi* flies with 3-AT, a known inhibitor of catalase, which converts H₂O₂ to H₂O. *DJ-1A RNAi* flies were found to be more sensitive to 3-AT treatment than the control flies (Fig. 3B). To test whether *DJ-1A* may be actively involved in ROS scavenging, we also overexpressed *DJ-1A* ubiquitously with the *Da-GAL4* driver and observed that *DJ-1A* overexpression was sufficient to confer resistance against 3-AT treatment (Fig. 6, which is published as supporting information on the PNAS web site).

If *DJ-1A* normally plays a critical role in sensing cellular ROS levels and eliciting protective responses to remove these toxic agents, one would predict that inhibiting *DJ-1A* function would lead to elevated levels of endogenous ROS. We tested this possibility by staining cultured neurons with DCFH-DA, which is an indicator of hydroxyl free radicals. Compared with control neuronal culture,

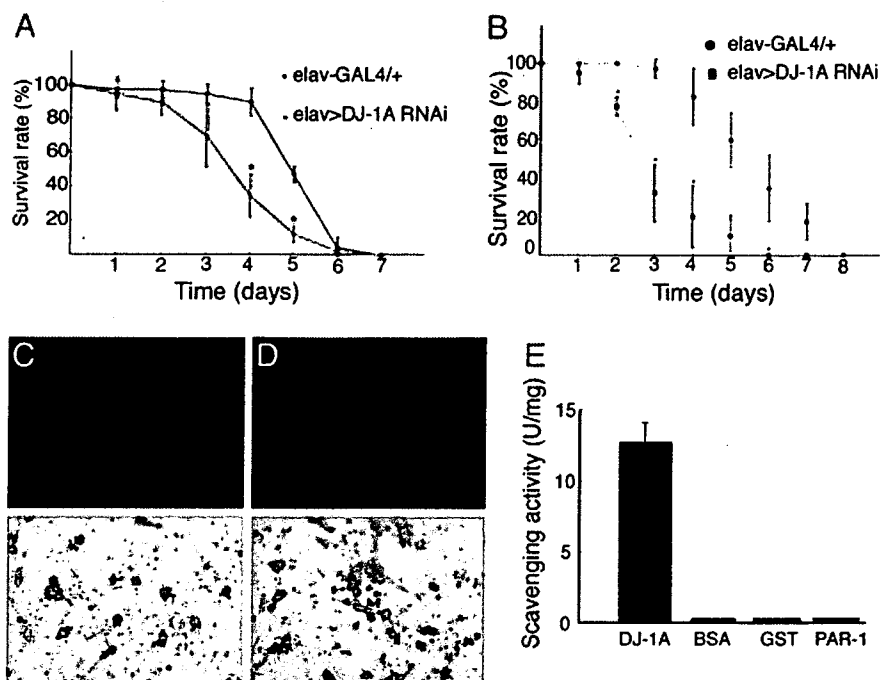


Fig. 3. DJ-1A RNAi leads to ROS accumulation and hypersensitivity to oxidative stress. (A and B) Comparison of survival curves of *elav-GAL4/+* flies with *elav-GAL4>DJ-1A RNAi* flies that are treated with 1% H₂O₂ (A) or 100 mM 3-AT (B). (C and D) DCFH-DA staining of cultured *Da-GAL4/+* (C) and *Da-GAL4>DJ-1A RNAi* (D) neurons. (Upper) Fluorescent DCFH-DA staining in green. (Lower) Black and white images of the neuronal culture being analyzed. (E) Recombinant DJ-1A protein exhibits detectable *in vitro* H₂O₂ scavenging activity, whereas the control proteins BSA, GST, and PAR-1 have no such activity.

which only showed weak ROS staining in a small percentage of neurons, *DJ-1A RNAi* neuronal culture had more neurons stained by this dye, and the staining intensity was much higher (Fig. 3, compare D with C).

Human DJ-1 protein was previously shown to be able to eliminate H₂O₂ *in vitro* by oxidizing itself at specific Cys residues (10, 27). To test whether *Drosophila* DJ-1A has similar H₂O₂ scavenging activity, we incubated bacterially expressed recombinant DJ-1A protein with H₂O₂ in test tubes and measured the conversion of H₂O₂. DJ-1A protein was found to have a specific activity in scavenging H₂O₂, whereas a control BSA protein has no such activity (Fig. 3E). This activity may not be simply attributed to nonspecific reaction of H₂O₂ with Cys residues, because the amino acid composition of BSA has a higher percentage of Cys residues than DJ-1A. Instead, this result indicates that DJ-1A may possess a specific activity in eliminating H₂O₂. In addition to BSA, which is normally resides in an extracellular environment, two intracellular proteins, GST and the Ser/Thr protein kinase PAR-1, also showed no H₂O₂ scavenging activity. It should be noted that the H₂O₂ scavenging activity of DJ-1A was two orders of magnitude lower than that of catalase in the same assay (20 units/mg vs. 2,300 units/mg), suggesting that degrading H₂O₂ may not be the main function of DJ-1A.

Modulation of DJ-1A RNAi-Induced Cell Death by the PI3K/Akt-Signaling Pathway. In an effort to understand how DJ-1A dysfunction leads to neuronal death, we tested possible genetic modification of DJ-1A RNAi-induced eye phenotypes by candidate genes and signaling pathways previously implicated in cell survival regulation. To see the genetic interaction more clearly, we used the weak RNAi phenotype induced by one copy each of the *GMR-GAL4* and *DJ-1A RNAi* transgenes to score for enhancement; the stronger RNAi phenotype induced by two copies of the *GMR-GAL4* and *DJ-1A RNAi* transgenes was used to score for suppression whenever possible.

The EGF receptor (EGFR)/Ras1/mitogen-activated protein kinase (MAPK) signaling pathway has previously been shown to directly target the *Drosophila* proapoptotic gene *head involution defective* (*hid*) in the eye through MAPK-mediated phosphorylation and inactivation of HID (28). By using loss-of-function and gain-of-function alleles of *rolled* (*MAPK*) and loss-of-function alleles of

hid, we did not detect clear genetic interaction with DJ-1A RNAi flies (data not shown). Similarly, we could not detect clear genetic interaction between DJ-1A RNAi and loss-of-function or overexpression alleles of genes in the JNK pathway, which has also been shown to induced cell death in the eye when activated (29).

In contrast, a clear genetic interaction was detected between DJ-1A and the *Drosophila* PI3K/Akt pathway genes. A dramatic enhancement of DJ-1A RNAi-induced eye degeneration was observed when *PTEN* was coexpressed with the DJ-1A RNAi transgene (Fig. 4D). The resulting fly eyes were dramatically reduced in size, with collapsed and fused ommatidia and necrotic spots, which were not present in DJ-1A RNAi only flies. Staining of photoreceptor neurons revealed a near complete loss of photoreceptor neurons in *PTEN* coexpression fly eyes (data not shown). Overexpression of this *UAS-PTEN* transgene alone with *GMR-GAL4* driver had little effect on the regular organization of the ommatidia and photoreceptor number per ommatidium, although the overall size of the eye was moderately reduced (Fig. 4L). When we tested with a mutant form of human PTEN that contains an inactivating C124S mutation (18), no effect on DJ-1A RNAi phenotype was observed (data not shown). Similar to the effect of *Drosophila* *PTEN*, an enhancement of the DJ-1A RNAi phenotype was observed when a dominant-negative (DN) form of PI3K catalytic subunit *Dp110* (*PI3K DN*) was coexpressed (17) (Fig. 4C), although expression of this *PI3K DN* transgene alone had little effect on eye morphology (Fig. 4K).

A clear suppression of DJ-1A RNAi phenotype was observed when the wild-type form of PI3K catalytic subunit *Dp110* was coexpressed. The eyes were restored to normal size, and the organization of the ommatidia was significantly improved (Fig. 4B). Overexpression of a *UAS-Akt* transgene had similar effect as *PI3K* in suppressing DJ-1A RNAi-induced toxicity in the eye (Fig. 4A), consistent with Akt/PKB being a key downstream effector component in the PI3K-signaling pathway (16).

Given the known pleiotropic function of the PI3K-signaling pathway in regulating cell size and cell number in *Drosophila* and its potential role in regulating cell survival, we next tested the effect of manipulating PI3K pathway gene activity on an eye degeneration phenotype caused by a different mechanism. Overexpression of human *tau* in the fly eye also led to a reduction in eye size and loss of photoreceptor neurons (19, 22). In contrast to the *DJ-1A RNAi*

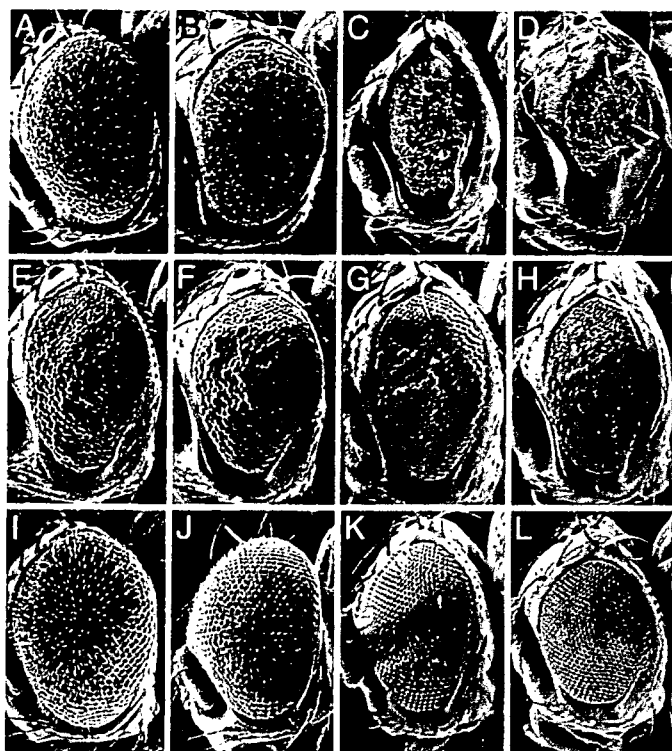


Fig. 4. Modification of DJ-1A RNAi phenotypes by altered expression of genes in the PI3K/Akt pathway. (A–D) SEM eye images of DJ-1A RNAi flies coexpressing *UAS-Akt* (A), *UAS-PI3K Dp110* (B), *UAS-PI3K Dp110DN* (C), or *UAS-PTEN* (D). (E–H) SEM eye images of human tauV337M transgenic flies coexpressing *UAS-GFP* (E), *UAS-PI3K Dp110* (F), *UAS-PI3K Dp110DN* (G), or *UAS-PTEN* (H). (I–L) SEM eye images of flies expressing *UAS-Akt* (I), *UAS-PI3K Dp110* (J), *UAS-PI3K Dp110DN* (K), or *UAS-PTEN* (L) transgenes alone. *GMR-GAL4* was used to direct *UAS* transgene expression in all panels.

situation, coexpression of wild-type *PI3K*, *PI3K DN*, or *PTEN* showed little effect on human tau-induced toxicity in the eye (Fig. 4, compare F, G, and H, respectively, with E). The genetic interaction between DJ-1A and PI3K pathway genes in the eye thus seems to be rather specific.

We next tested the effects of modulating PI3K signaling on the dopaminergic degeneration phenotype induced by DJ-1A RNAi. Coexpression of PI3K completely suppressed the reduction of TH⁺ DA neuron phenotype induced by DJ-1A RNAi. The number of DA neurons in the DMCs was maintained at the wild-type level in all of the transgenic flies and at all ages examined (Fig. 5A), indicating that coexpression of PI3K blocked DJ-1A RNAi-induced age-dependent dopaminergic degeneration. Conversely, coexpression of PI3K DN showed a statistically significant enhancement of DJ-1A RNAi toxicity in dopaminergic neurons (Fig. 5A).

We next examined the effect of PI3K signaling on DJ-1A RNAi-induced ROS accumulation. We found that, in adult fly brain, induction of DJ-1A RNAi within dopaminergic neurons led to an elevation of ROS levels, consistent with neuronal culture studies described earlier (Fig. 7A, which is published as supporting information on the PNAS web site). Inhibition of PI3K signaling in these neurons by means of overexpression of PI3K DN also led to elevation of ROS levels (Fig. 7B), whereas flies overexpressing wild-type PI3K showed basal ROS levels (Fig. 7C). Strikingly, in DJ-1A RNAi flies coexpressing PI3K, cellular ROS levels are reduced to baseline levels as in wild-type controls (Fig. 7G). Together, these results indicate that PI3K signaling specifically suppresses DJ-1A RNAi-induced neurotoxicity and that this suppression is correlated with a reduction of cellular ROS levels.

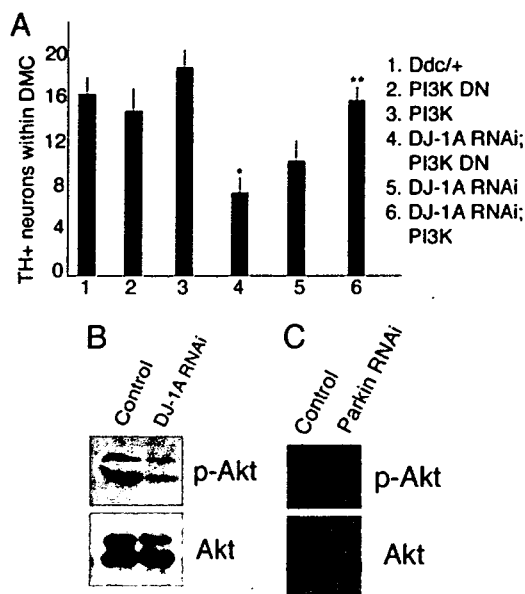


Fig. 5. Modification of DJ-1A RNAi-induced dopaminergic phenotype by altered expression of *PI3K/Akt* pathway genes and Western blot analysis showing reduced Akt phosphorylation after DJ-1A or Parkin down-regulation. (A) Quantification of TH⁺ DA neurons in the DMC of *Ddc-GAL4*/+ control flies, *DJ-1A RNAi* flies, *PI3K* or *PI3K DN* single overexpression flies, and *DJ-1A RNAi* flies coexpressing *PI3K* or *PI3K DN* transgenes. *, *P* < 0.01 in Student's *t* test. *Ddc-GAL4* was used to direct transgene expression. (B and C) Western blot analysis of fly head extracts prepared from *Da-GAL4*/+ and *Da-GAL4*>*DJ-1A RNAi* (B) or *Da-GAL4*/+ and *Da-GAL4*>*Parkin RNAi* (C) genotyped flies. Blots were probed with anti-phospho-Akt and anti-Akt antibodies, respectively.

DJ-1A RNAi Flies and Parkin Mutant Flies Exhibit Impaired PI3K/Akt Signaling. The fact that increased PI3K/Akt signaling specifically suppressed DJ-1A RNAi-induced cell death suggests that the cell death in DJ-1A RNAi animals may be caused by a reduction of PI3K/Akt signaling. To test this possibility, we examined the phosphorylation status of Akt, an indicator of PI3K/Akt signaling, in DJ-1A RNAi animals. Head extracts from *Da-GAL4*/+ and *Da-GAL4*>*DJ-1A RNAi* animals were analyzed by Western blot analysis by using anti-phospho-Akt and anti-Akt antibodies. As shown in Fig. 5B, although the level of total Akt protein was comparable between control and DJ-1A RNAi fly heads, the amount of phospho-Akt was significantly reduced in *DJ-1A RNAi* animals. This result indicates that DJ-1A down-regulation leads to hypophosphorylation of Akt and impairment of PI3K/Akt signaling in the fly brain. To test whether impairment of PI3K/Akt signaling is a general feature of PD models, we analyzed the *Drosophila parkin* model. As shown in Fig. 5C, inhibition of Parkin function also led to a reduction of phospho-Akt levels. These results implicate reduced PI3K/Akt signaling as a common molecular event in the pathogenic cascade of PD.

Discussion

Loss-of-function mutations in human DJ-1 are linked to familial Parkinson's disease. The exact molecular function of DJ-1 that is relevant to disease pathogenesis is not well understood. Our results suggest that *Drosophila* DJ-1A plays an important role in cellular ROS homeostasis and protection against oxidative stress. This conclusion is consistent with previous studies in mammalian cell culture and DJ-1 knockout mice (13, 27, 30). Human DJ-1 was found to have H₂O₂-scavenging activity *in vitro*. (10) (27). Our analysis of *Drosophila* DJ-1A protein supported this notion. However, the H₂O₂-converting activity of DJ-1A is rather low compared with catalase, suggesting that the main molecular function of DJ-1 may not be limited to degrading H₂O₂. It is possible that the ability

to react with H₂O₂ by means of oxidation-sensitive Cys residues may allow DJ-1 to act as a "sensor" of cellular ROS levels, and the oxidized DJ-1 may subsequently acquire a new function to defend against ROS-induced cellular damages. This result would be analogous to the switch of two yeast peroxiredoxins from peroxidase to molecular chaperone under oxidative stress (31). The recent description of human DJ-1 gaining molecular chaperone activity *in vitro* under oxidative conditions is consistent with this model (32).

To understand the cellular processes that mediated DJ-1A dysfunction-induced cell death, we performed genetic interaction studies with genes and signaling pathways that are involved in cell survival and identified components of the PI3K/PEN/Akt pathway as modulators of DJ-1 RNAi-induced cell death phenotype. Increase of PI3K/Akt-signaling capacity showed suppression, whereas decreased PI3K/Akt signaling enhanced DJ-1A RNAi phenotypes. The effects of modulating PI3K/Akt signaling on DJ-1A RNAi-induced toxicity hold true in both photoreceptor neurons in the retina and dopaminergic neurons in the central brain, suggesting that the connection between DJ-1 and PI3K/Akt signaling is a general phenomenon. The finding that DJ-1A RNAi animals showed decreased phosphorylation of Akt indicate that DJ-1 is a regulator of PI3K/Akt signaling. A recent study by Kim *et al.* (15) identified DJ-1A as a suppressor of PTEN function in the fly eye, and the authors further extended this finding to mammalian cells and showed that DJ-1 knockdown by small interfering RNA results in decreased phosphorylation of PKB/Akt, whereas DJ-1 overexpression leads to PKB/Akt hyperphosphorylation and increased cell survival. This finding led to the proposal that DJ-1 acts as a novel regulator of PTEN. Our genetic and biochemical studies are consistent with this notion. It is not clear at this point how DJ-1A and the PI3K/PEN/Akt-signaling pathway may interact. It is possible that the function of DJ-1 in regulating cellular ROS homeostasis or as a redox-sensitive molecular chaperone may facilitate PI3K/PEN/Akt signaling, because many signal transduction pathways are known to be sensitive to cellular ROS levels or require chaperone activities (33, 34), and modulation of PTEN activity by ROS has been reported before (35). Alternatively, the genetic interaction between DJ-1A and PI3K-signaling pathway may be mediated by a direct role of PI3K signaling in cellular defense against ROS accumulation and related damages. Our data are consistent with both possibilities. Given that hyperactivation of DJ-1 could be oncogenic, whereas its deficiency leads to neuronal

dysfunction and degeneration, future studies aimed at understanding the mechanisms by which DJ-1 and PI3K/PEN/Akt pathway interact will have far-reaching implications for understanding disease mechanisms and developing therapeutic strategies.

Oxidative stress and mitochondrial dysfunction are being increasingly recognized as common pathological features of neurodegenerative diseases including PD and Alzheimer's disease (2, 36). Previous genetic studies in *Drosophila* and mice have implicated Parkin, an E3 ubiquitin ligase associated with autosomal recessive juvenile parkinsonism, in these processes (37–40). In flies and mice, *parkin* mutants show defects in mitochondrial function and oxidative stress response. Like DJ-1, loss of *Drosophila* Parkin function also affects the viability of mutant animals. This result contrasts with the situation in mammals where loss of DJ-1 or Parkin is nonlethal. The differential effects on the viability of humans and flies are probably caused by fundamental differences in the antioxidant defense systems of these two species (41). The exact cellular mechanism by which Parkin dysfunction leads to susceptibility to oxidative stress and cell death remains to be established. Our finding that, similar to DJ-1A inactivation, inhibition of *parkin* also leads to impairment of PI3K/Akt signaling implicates these two genes in a common pathway that promotes neuronal survival. We speculate that impairment of PI3K/Akt signaling may be a common feature of familial as well as sporadic PD cases and that manipulation of this signaling pathway may provide a rational strategy for the therapeutic intervention of PD.

We are grateful to Drs. Morris Birnbaum (University of Pennsylvania, Philadelphia), Mel Feany (Harvard University, Boston), Ernst Hafen (University of Zurich, Zurich), Raj Sohal (University of Southern California, Los Angeles), Bertrand Mollereau (The Rockefeller University, New York), Hermann Steller (The Rockefeller University), Tian Xu (Yale University, New Haven, CT), and the Bloomington *Drosophila* Stock Center for fly stocks; Dr. Kazuaki Yoshikawa for his generous support; the Center for Research and Education of Osaka University School of Medicine for help with SEM and eye sectioning; Dr. Su Guo for reading the manuscripts; Dr. Ting-ting Huang for help with H₂O₂ assay; and Dr. Kyung-Tai Min for communicating unpublished results. Special thanks go to Jennifer Quach and Yali Zhang for excellent technical support and members of the B.L. laboratory for discussions. This work was supported by the McKnight, Beckman, and Sloan Foundations (to B.L.).

- Dunnett, S. B. & Bjorklund, A. (1999) *Nature* 399, A32–A39.
- Dawson, T. M. & Dawson, V. L. (2003) *Science* 302, 819–822.
- Shen, J. & Cookson, M. R. (2004) *Neuron* 43, 301–304.
- Nagakubo, D., Taira, T., Kitaura, H., Ikeda, M., Tamai, K., Iguchi-Ariga, S. M. & Ariga, H. (1997) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 231, 509–513.
- Hod, Y., Pentylala, S. N., Whyard, T. C. & El-Maghrabi, M. R. (1999) *J. Cell Biochem.* 72, 435–444.
- Takahashi, K., Taira, T., Niki, T., Seino, C., Iguchi-Ariga, S. M. & Ariga, H. (2001) *J. Biol. Chem.* 276, 37556–37563.
- Canet-Aviles, R. M., Wilson, M. A., Miller, D. W., Ahmad, R., McLendon, C., Bandyopadhyay, S., Baptista, M. J., Ringe, D., Petsko, G. A. & Cookson, M. R. (2004) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 101, 9103–9108.
- Mitumoto, A. & Nakagawa, Y. (2001) *Free Radical Res.* 35, 885–893.
- Mitumoto, A., Nakagawa, Y., Takeuchi, A., Okawa, K., Iwamatsu, A. & Takanezawa, Y. (2001) *Free Radical Res.* 35, 301–310.
- Kinumi, T., Kimata, T., Taira, T., Ariga, H. & Niki, E. (2004) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 317, 722–728.
- Yokota, T., Sugawara, K., Ito, K., Takahashi, R., Ariga, H. & Mizusawa, H. (2003) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 312, 1342–1348.
- Goldberg, M. S., Pisani, A., Haburcak, M., Vortherms, T. A., Kitada, T., Costa, C., Tong, Y., Martella, G., Tschertner, A., Martins, A., *et al.* (2005) *Neuron* 45, 489–496.
- Kim, R. H., Smith, P. D., Aleyasin, H., Hayley, S., Mount, M. P., Pownall, S., Wakeham, A., You-Ten, A. J., Kalia, S. K., Home, P., *et al.* (2005) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 102, 5215–5220.
- Chen, L., Cagniard, B., Mathews, T., Jones, S., Koh, H. C., Ding, Y., Carvey, P. M., Ling, Z., Kang, U. J. & Zhuang, X. (2005) *J. Biol. Chem.* 280, 21418–21426.
- Kim, R. H., Peters, M., Jang, Y., Shi, W., Pintilie, M., Fletcher, G. C., DeLuca, C., Liepa, J., Zhou, L., Snow, B., *et al.* (2005) *Cancer Cell* 7, 263–273.
- Verdu, J., Buratovich, M. A., Wilder, E. L. & Birnbaum, M. J. (1999) *Nat. Cell Biol.* 1, 500–506.
- Leevers, S. J., Weinkove, D., MacDougall, L. K., Hafen, E. & Waterfield, M. D. (1996) *EMBO J.* 15, 6584–6594.
- Huang, H., Potter, C. J., Tao, W., Li, D. M., Brogiolo, W., Hafen, E., Sun, H. & Xu, T. (1999) *Development (Cambridge, U.K.)* 126, 5365–5372.
- Wittmann, C. W., Wszolek, M. F., Shulman, J. M., Salvaterra, P. M., Lewis, J., Hutton, M. & Feany, M. B. (2001) *Science* 293, 711–714.
- Kalidas, S. & Smith, D. P. (2002) *Neuron* 33, 177–184.
- Yang, Y., Nishimura, I., Imai, Y., Takahashi, R. & Lu, B. (2003) *Neuron* 37, 911–924.
- Nishimura, I., Yang, Y. & Lu, B. (2004) *Cell* 116, 671–682.
- Ito, S., Kato, T. & Fujita, K. (1988) *Biochem. Pharmacol.* 37, 1707–1710.
- Beal, M. F., Kowall, N. W., Swartz, K. J. & Ferrante, R. J. (1990) *Neurosci. Lett.* 108, 36–42.
- Tao, X. & Tong, L. (2003) *J. Biol. Chem.* 278, 31372–31379.
- Feany, M. B. & Bender, W. W. (2000) *Nature* 404, 394–398.
- Taira, T., Saito, Y., Niki, T., Iguchi-Ariga, S. M., Takahashi, K. & Ariga, H. (2004) *EMBO Rep.* 5, 213–218.
- Bergmann, A., Agapite, J., McCall, K. & Steller, H. (1998) *Cell* 95, 331–341.
- Kuranaga, E., Kanuka, H., Igaki, T., Sawamoto, K., Ichijo, H., Okano, H. & Miura, M. (2002) *Nat. Cell Biol.* 4, 705–710.
- Martinat, C., Shendelman, S., Jonason, A., Leete, T., Beal, M. F., Yang, L., Floss, T. & Abellovich, A. (2004) *PLoS Biol.* 2, e327.
- Jang, H. H., Lee, K. O., Chi, Y. H., Jung, B. G., Park, S. K., Park, J. H., Lee, J. R., Lee, S. S., Moon, J. C., Yun, J. W., *et al.* (2004) *Cell* 117, 625–635.
- Shendelman, S., Jonason, A., Martinat, C., Leete, T. & Abellovich, A. (2004) *PLoS Biol.* 2, e362.
- Shibata, Y., Branicky, R., Landaverde, I. O. & Hekimi, S. (2003) *Science* 302, 1779–1782.
- Morey, M., Serras, F., Baguna, J., Hafen, E. & Corominas, M. (2001) *Dev. Biol.* 238, 145–156.
- Leslie, N. R., Bennett, D., Lindsay, Y. E., Stewart, H., Gray, A. & Downes, C. P. (2003) *EMBO J.* 22, 5501–5510.
- Albers, D. S. & Beal, M. F. (2000) *J. Neural Transm.* 59, Suppl., 133–154.
- Kitada, T., Asakawa, S., Hattori, N., Matsumine, H., Yamamura, Y., Minoshima, S., Yokochi, M., Mizuno, Y. & Shimizu, N. (1998) *Nature* 392, 605–608.
- Greene, J. C., Whitworth, A. J., Kuo, I., Andrews, L. A., Feany, M. B. & Pallanck, L. J. (2003) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 100, 4078–4083.
- Pesah, Y., Pham, T., Burgess, H., Middlebrooks, B., Verstreken, P., Zhou, Y., Harding, M., Bellen, H. & Mardon, G. (2004) *Development (Cambridge, U.K.)* 131, 2183–2194.
- Palacino, J. J., Sagi, D., Goldberg, M. S., Krauss, S., Motz, C., Klose, J. & Shen, J. (2004) *J. Biol. Chem.* 279, 18614–18622.
- Kanzok, S. M., Fechner, A., Bauer, H., Ulschmid, J. K., Muller, H. M., Botella-Munoz, J., Schneuwly, S., Schirmer, R. & Becker, K. (2001) *Science* 291, 643–646.

BIOLOGY TOPICS

コンフォメーション病のしくみ

きむ よんじょん たかはし りょうすけ
■ 金 然正¹⁾ ・ 高橋 良輔²⁾

- 1) 独立行政法人理化学研究所 BSI 運動系神経変性研究チーム
2) 京都大学大学院医学研究科 脳病態生理学講座



金 然正
1992年(韓国)中央大学産業科学部卒業。2001年東京大学大学院医学系研究科修了, 03年東京大学理学部助手, 03年~理化学研究所BSI研究員, 現在に至る。研究テーマは神経変性疾患における変異タンパク質の凝集機構。趣味は水泳。

Key words : コンフォメーション病, 神経変性疾患, 凝集, 封入体, タンパク質品質管理システム

Abstract

病変組織における異常タンパク質の凝集及び蓄積は神経変性疾患の共通の病理所見である。凝集の主な原因は遺伝子の変異によるタンパク質の構造異常であるが、細胞内には分子シャペロンとユビキチン・プロテアソームなどのタンパク質の品質管理システムがあり、タンパク質の機能を安定に保つための働きをしている。老化に伴う細胞ストレスはタンパク質の凝集を促進させる原因の一つであり、神経変性疾患のしくみは原因タンパク質の凝集し易い構造とそれを制御するタンパク質品質管理システムの駆け引きであろう。

はじめに

1997年, CarrellとLomasにより提唱されたコンフォメーション病(フォールディング病)とは、病変組織に異常タンパク質が凝集し、封入体を形成する疾患の総称である。コンフォメーション病は神経系、免疫系、内分泌系、循環系、心筋・骨格筋系などに幅広く存在する。特に神経系においては、日本でも発症が

報告され話題となった狂牛病(プリオン病)を始め、パーキンソン病やアルツハイマー病、ハンチントン病、筋萎縮性側索硬化症(ALS)などのいわゆる神経変性疾患で、神経細胞内外のさまざまな封入体の存在が共通の病理所見として知られている。神経変性疾患の原因は長年不明であったが、近年の研究結果から、原因タンパク質が構造異常により不溶化し凝集物を形成していく過程で、細胞死を引き起こすのではないかと考えられている。本稿ではタンパク質の立体構造、分解、凝集のプロセスに注目し、コンフォメーション病としての神経変性疾患の病理形成機序について論じたい。

1. タンパク質のフォールディングと凝集

蛋白質はアミノ酸が直線状につながった高分子の“ひも”である。1950年代のアンフィセン, C. (1972年ノーベル化学賞受賞)に

Mechanism for Conformational Diseases : Yeon-Jeong Kim, Ryosuke Takahashi, 1)RIKEN, Brain Science Institute, Lab for Motor System Neurodegeneration, 2)Kyoto University, Graduate School of Medicine, Department of Neurology

よるリボヌクレアーゼAの可逆的な変性及び再生実験で示されたように、タンパク質が本来の機能を果たすためには、正しく折りたたまれ、特定の立体構造を持たなければならない。タンパク質は、構成アミノ酸の配列が持つ情報に基づき折りたたまれ、特定の立体構造を形成する。タンパク質によっては、翻訳後修飾など、配列情報が複雑であり上手く折りたたまれないものもある。このようなタンパク質の折りたたみ（フォールディング）は分子シャペロンと呼ばれるタンパク質ファミリーがつかさどっており、タンパク質の正しいフォールディングを助けている。

タンパク質の立体構造は流動性（ダイナミックス）を持っており、条件に応じ、その構造は変化する。可溶性タンパク質の多くでは、親水性アミノ酸残基は立体構造の外側に、疎水性アミノ酸残基は内側に分布しており、水溶液中において安定に機能している。しかし、熱、酸化物の蓄積などのストレスにより、タンパク質の立体構造は崩壊し易く、内側の疎水性アミノ酸残基が露出され凝集してしまう。また、タンパク質の働きそのものにより、疎水性アミノ酸残基が露出される恐れがある。球脊髄性筋萎縮症（Spinal and Bulbar Muscular Atrophy）の場合、アンドロゲン受容体（AR）の遺伝子にCAGトリプレットリピートの過剰伸長(>35CAGs)が原因とされ、変異ARは伸長したグルタミン残基を持つ。ARは、非活性の時には、Hsp90というシャペロン分子が結合しており、安定な構造を取っているが、リガンド（テストステロン）と結合すると、Hsp90から離れ、構造が不安定になり凝集する。すなわち、変異ARはリガンド依存的に凝集するのである。

凝集したタンパク質を電子顕微鏡下で観察

してみると、その形態もタンパク質によってさまざまであるが、その中には規則性を持つ線維も存在する。この線維はアミロイド線維と呼ばれ、アルツハイマー病で見られる老人斑の内部構造と類似である。試験管内において、アミロイド様線維構造を形成するタンパク質は数多く、アルツハイマー病のA β ペプチド、狂牛病の変異プリオン、パーキンソン病の α -synuclein、家族性アミロイドポリニューロパチーの変異transferrin, 家族性筋萎縮性側索硬化症の変異superoxide dismutase 1 (SOD1)などが報告されている。アミロイド線維は主に β シート構造であり、Congo redやThioflavin Tのような色素と結合する性質を持つ。狂牛病の場合、正常プリオンは主に α ヘリックス構造だが、異常プリオンに感染されると β シート構造に変換（ $\alpha \rightarrow \beta$ 転移）されることが知られている。このような $\alpha \rightarrow \beta$ 転移は生物学的にも興味深い反応である。

2. タンパク質のアンフォールディングと生体内の凝集制御

試験管内でタンパク質を凝集させることは比較的容易であり、一定の条件を満たせば、後は待つのみでよい。タンパク質の多くは熱するだけでも容易に凝集物を形成することができる。生理的条件のバッファー系において、アミロイド様凝集物を作るための基本原理はタンパク質を部分的に変性（アンフォールディング）させる、何らかの条件を探ることである。コンフォメーション病の原因タンパク質は多く変異タンパク質であるため、野生型に比べ、アンフォールドしやすい。要するに、変異タンパク質は野生タンパク質より凝集しやすい立体構造を持つ。しかし、生体内にお

いて凝集物の蓄積を観察するための実験モデルを作るのは容易ではない。家族性筋萎縮性側索硬化症の原因タンパク質である、SOD1を培養細胞に発現させてみると、変異SOD1のタンパク質レベルは野生型に比べ低く、半減期も短い。最近の報告によると、SOD1はユビキチン・プロテアソーム系により分解されるという。それでは、どのようにして細胞は野生型と変異SOD1を見分けているのだろうか。その機序は変異SOD1の立体構造に起因する。変異SOD1は立体構造が不安定なため、細胞内でシャペロンHsc70と複合体を形成している。Hsc70のC-末端にはCHIP (carboxyl terminus of Hsc70-interacting protein)と呼ばれるE3ユビキチン連結酵素が結合し、異常構造のSOD1をユビキチン化することが判明した。すなわち、CHIPはシャペロン依存的ユビキチン化のE3であり、シャペロンを介し変異SOD1の分解を助け、凝集を抑制する

と考えられる。最近の報告では、CHIPは変異tauやパーキンの気質の一つであるパエル受容体の分解にも関与することが明らかになった。

ユビキチン・プロテアソーム系に破綻をきたすことが病因として考えられる神経変性疾患の代表として、家族性パーキンソン病の一病型である常染色体劣性若年性パーキンソニズム(AR-JP)が挙げられる。AR-JPの原因遺伝子産物、パーキンはRING-finger型のユビキチン連結酵素である。この発見により、AR-JPがユビキチン・プロテアソーム系の破綻によって発症することが判明された。さらに、パーキンのN-末端に存在するユビキチンホモロジドメインが、26SプロテアソームのRpn10サブユニットと結合すること、そしてこの相互作用の破綻によってもAR-JPが発症することが報告された。これらのことから、コンフォメーション病におけるタンパク質の

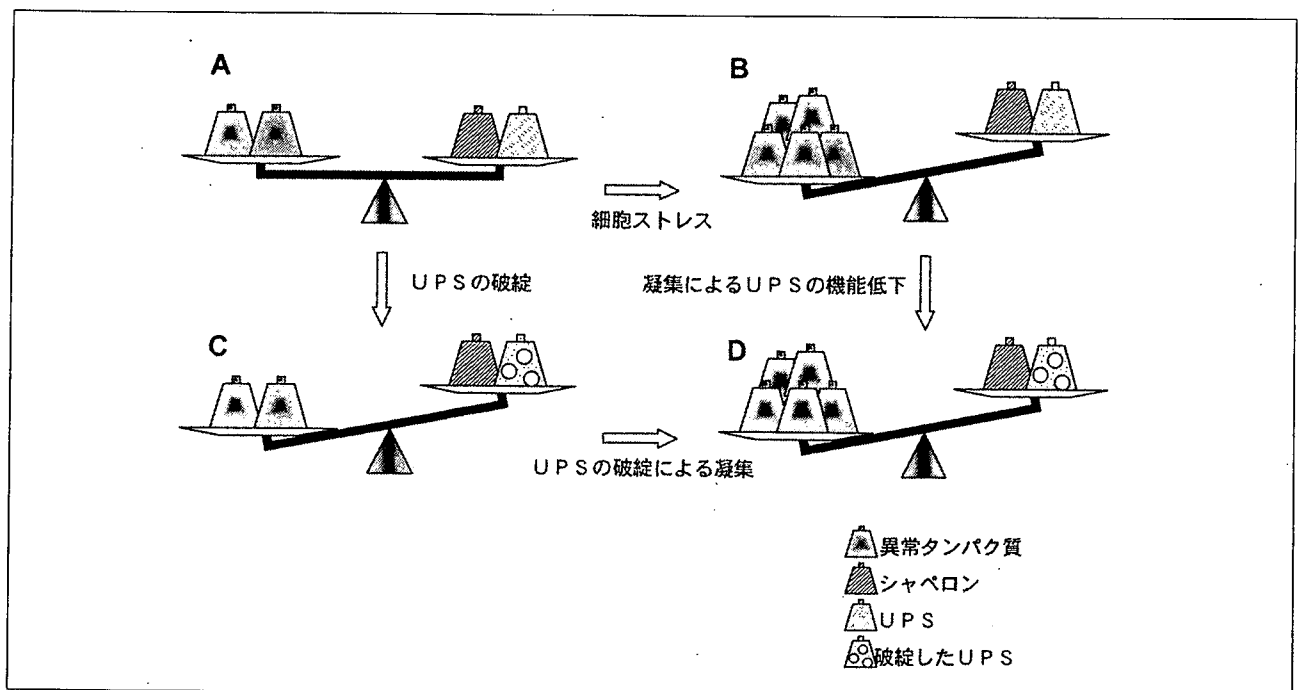


図1 異常タンパク質の凝集。細胞内の異常タンパク質のレベルはシャペロンやユビキチン・プロテアソームシステム(UPS)の働きにより均衡を保つ(A)。酸化ストレスなどの細胞ストレスにより異常タンパク質のレベルがタンパク品質管理システムを上回り(B)、UPSの機能障害を引き起こす。UPSの破綻(C)により、異常タンパク質が凝集する(D)。

酸化ストレスを引き起こすことによるタンパク質のニトロ化など、膨大な論文が発表されている。これらの知見は、凝集タンパク質による細胞死が一つの経路を介して引き起こるというよりは、さまざまな細胞の代謝経路が障害され、複合的機能不全により細胞が死に至ることを支持するように思われる。

一方、2002年 Bucciantini と Stefani らは顆粒状の凝集タンパク質は細胞毒性を示すが、線維状の凝集タンパク質は毒性がないという興味深い論文を発表した。この結論は顆粒状と線維状の凝集タンパク質を加えた培地を用い、細胞を培養した際引き起こる細胞死を観察した結果、得られたものである。さらに、病気と無関係な大腸菌の HypF を用いた実験でも同様の結果が示され、毒性を持つ凝集タンパク質は線維状ではなく顆粒状であるという、凝集タンパク質の毒性に共通する知見が得られた。また、A β ペプチドを用いた実験でもこれらの結果が裏付けられ、線維形成の中間体であるオリゴマーやプロトフィブリルと呼ばれるものが主な毒性を発揮することが示唆された。凝集タンパク質が持つ細胞毒性のメカニズムにはまだ解っていない部分が多いが、最新の論文によると、毒性を持つオリゴマーは脂質二重膜の膜電位を上昇させる、すなわち、二重膜を崩壊させることや、カル

シウム代謝をかく乱し細胞内カルシウム濃度を上げる働きをすることが示された。確かに、この人為的な実験系が生体内の細胞毒性をどの程度反映しているのかは疑問ではあるが、凝集タンパク質と脂質二重膜の相互作用が細胞死と密接な関連があることを示唆した。

おわりに

コンフォメーション病における異常タンパク質の凝集は、疾患の原因となる本質的な現象であるか、あるいは、単に病気の結果に過ぎないのかは長い期間議論されてきた。これは、異常タンパク質の代謝経路から凝集体の産生及び制御機構や細胞死に至るまで、病気の全容が多く謎に包まれているからであろう。しかしながら、技術や科学の輝かしい進歩により、病気の一部が明らかになりつつあり、凝集の抑制が症状を改善や、延命に繋がる多数の証拠が提出された。異常タンパク質の生化学的性質に加え、シャペロンやプロテアソームのタンパク質品質管理システム、アグリソームなど、異常タンパク質を巡るさまざまな代謝経路の研究の更なる進歩により、神経変性疾患の治療法の確立が一日でも早まることを期待する。

< BIO Information >

日本顕微鏡学会第61回学術講演会

日本顕微鏡学会は日本顕微鏡学会第61回学術講演会を下記の日程で開催いたします。

日 時：平成17年6月1日（水）～3日（金）

会 場：つくば国際会議場（エポカルつくば）

主 催：社団法人・日本顕微鏡学会 会 長：外村 彰（日立基礎研）

お問い合わせ：〒101-8449 東京都千代田区神田錦町3-24 住友商事神保町ビル

（株）ICS コンベンションデザイン内 JSM05 事務局

電話：03-3219-3541、ファックス：03-3292-1811 電子メール：jism05@ics-inc.co.jp

凝集は原因となる異常タンパク質のレベルがシャペロンやプロテアソームなどのタンパク質品質管理システムを上回る結果であることが考えられる(図1)。

一方、タンパク質の凝集に影響するもう一つの要因は酸化ストレスや小胞体ストレスなどの細胞ストレスである。孤発性のALSとパーキンソン病においても酸化ストレスの関与が従来から報告されている。培養細胞を用いた実験において、過酸化水素水の処理により、異常タンパク質が凝集し、蓄積することが報告され、酸化ストレスが変異タンパク質のアンフォールディングを促進させることが原因の一つとして考えられている。さらに、凝集タンパク質を含む細胞が酸化ストレスに対する脆弱性を持つという報告が多い。最近では、抗酸化機能を持つDJ-1の変異が若年性パーキンソン病の原因として新たに発見された。

3. 封入体とアグリソーム

コンフォメーション病の共通の病理所見である封入体は、アルツハイマー病では老人斑および神経原線維変化、パーキンソン病ではLewy body、ポリグルタミン病では核内封入体、孤発性のALSでは、Bunina小体など、さまざまである。また、SOD1に変異のある家族性ALSでは、前角運動ニューロンなどの細胞質にLewy body-like hyaline inclusionが認められ、抗SOD1抗体染色で陽性である。これらのことは原因タンパク質の凝集が封入体の核または本体を形成している可能性を示唆している。さらに、封入体はユビキチンやシャペロン、プロテアソームの抗体染色においても陽性で、凝集タンパク質がこれらの因子を巻き込んで、長い期間にわたり、成長したも

のとして考えられている。

近年、封入体形成の機構に関し、逆行性輸送のモータータンパク質であるダイニン複合体が凝集タンパク質を中心体に集積させるという新たな研究結果が報告された。プロテアソームを阻害した際に出現する、中心体に集積したタンパク質の凝集物はアグリソームと名づけられた。アグリソームは、ユビキチン、プロテアソーム、シャペロンなどの抗体染色に陽性反応を示しており、コンフォメーション病で見られる封入体と類似のものとして考えられ、病理的封入体の産生経路にダイニンモーターが関与しているのではないかと推測される。また、逆行性輸送を阻害し、アグリソームの形成を抑えると、細胞が死に至ることが見出され、アグリソームは凝集タンパク質の毒性に対する防御機構の一つではないかと考えられるようになった。さらに、ArrasateとFinkbeinerらは、自動化した蛍光顕微鏡を用い、伸張したポリグルタミン残基を持つ蛍光タンパク質の動態を連続的に観察した。その結果、核内封入体を持っていない細胞が細胞封入体を持っている細胞に比べ細胞死を起こしやすい傾向を明らかにした。細胞間で、封入体形成の差が生じるメカニズムは不明であるが、封入体の形成が細胞防御機構の一つである可能性が示唆された。

4. 凝集タンパク質の細胞毒性

凝集タンパク質が持つ細胞毒性やタンパク質の凝集による細胞死のメカニズムに関してはaxonal transportの物理的障害、シャペロンやプロテアソームを凝集体に巻き込むことによる、タンパク品質管理システムの崩壊、カルシウム代謝やリン酸化システムのかく乱、

脳神経外科速報

第15巻 5号 2005年 5月10日発行

パーキンソン病の分子生物学

高橋良輔¹⁾ Ryosuke TAKAHASHI

1) 京都大学大学院医学研究科脳病態生理学講座臨床神経学
〒606-8507 京都市左京区聖護院川原町54

I. パーキンソン病とは

パーキンソン病は高齢者に多い神経変性疾患であり、有病率は約1,000人に1人で、65歳以上の人口の1%以上が罹患するといわれる。神経病理学的には中脳黒質のドーパミン神経の選択的変性脱落が主体である。病気が進行すると青斑核のノルアドレナリンニューロンやマイネルト基底核のアセチルコリンニューロンにも変性が及ぶ。さらに、光学顕微鏡的にはドーパミン神経にレビー小体とよばれる細胞質内封入体に変性するニューロンにみられるのが特徴である(図1)。

臨床的にはドーパミン欠乏症状が主症状であり、振戦(手足のふるえ)、無動(運動の緩慢化)、固縮(筋肉が固くなる)、姿勢反射障害(転倒しやすくなる)といった運動障害が徐々に出現、十数年にわたって進行し、末期には寝たきりになるという経過をたどる。L-ドーパによるドーパミン補充療法、ドーパミンアゴニストによる治療、さらに最近では深部脳刺激療法という機能外科的治療法が症状を改善させる効果があり、注目されている。

しかし、神経変性そのものを遅らせるようなより効果的な治療法の開発には発症メカニズムの解明が必須である。パーキンソン病は多くの場合、はっきりとした遺伝的要素は認められな

い孤発性であるが、5~10%のケースが家族性、すなわち遺伝性で発症する。この数年間に複数の家族性パーキンソン病の病因遺伝子が単離されてきた。その病因遺伝子の解析から遺伝子変異によって神経変性が起こるメカニズムの基本的な道筋が明らかになりつつある。

本稿では家族性パーキンソン病に焦点をあて、神経変性の分子メカニズムについて最新の知見を含めて概説する。

II. 家族性パーキンソン病

これまで遺伝子座が判明しているものに11疾患があり、そのうち六つの遺伝子が明らかになっている。家族性パーキンソン病の遺伝子座のシンボルとしてはPARKが使われている(表1)。遺伝子が同定され、その異常がパーキンソン病を引き起こすことが確実なPARK1、PARK2、PARK6、PARK7の病因遺伝子産物とその神経変性とのかかわりについて以下に詳しく述べる^{5, 14, 22)}。

1. PARK1, PARK4: α -シヌクレイン

α -シヌクレインはアミノ酸140個の蛋白質で、比較的神経特異的に発現している。神経細胞のなかでもプレシナプス領域の細胞質に多いが、生理的役割は不明である。1997年、 α -シヌクレインの点変異(A53T)が常染色体優性遺伝性パーキンソン病の原因になるという報告が

なされた¹⁸⁾。α-シヌクレイン遺伝子変異は大変まれであるが、レビー小体の主成分であることが明らかになったことから、俄然パーキンソン病の鍵を握る分子として注目を集めるようになった¹⁾。

さらに、PARK4はα-シヌクレインを含む染

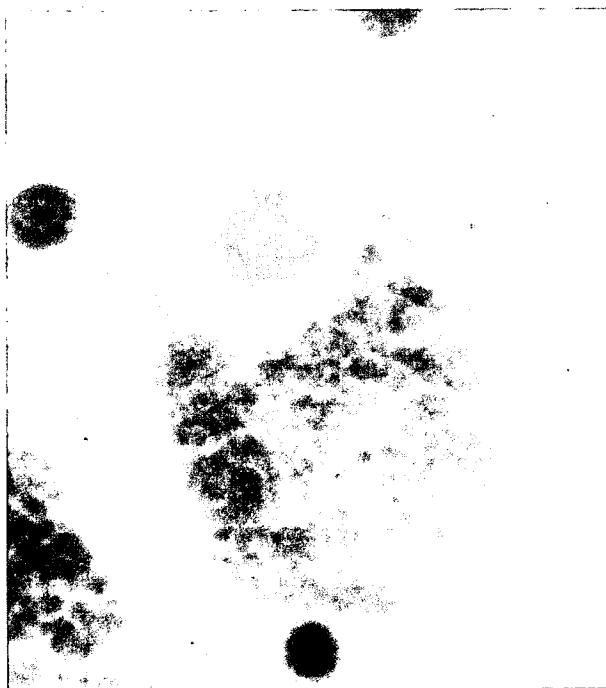


図1 レビー小体

神経細胞体にみられる異常なタンパク性の凝集物。パーキンソン病で変性する黒質や青斑核の色素含有細胞によくみられる。

色体領域の三重複によって起こることがわかった。これはα-シヌクレインが遺伝子量にして2倍になるとパーキンソン病になることを意味し、孤発性パーキンソン病がα-シヌクレインの蓄積によって起こる可能性を強力にサポートする証拠となっている。

それではα-シヌクレインはどのようにしてレビー小体を形成するようになるのか？ レビー小体のような凝集塊は封入体とよばれ、ミスフォールド蛋白質という異常蛋白質を多く含んでいる。蛋白質が本来の機能を発揮するためには正しい折れたたみ(フォールディング)が起こる必要がある。分子シャペロンは蛋白質のフォールディングを助ける役割を担うが、それでもうまく折れたたみが起こらない不良品の蛋白質、つまりミスフォールド蛋白質ができる。

通常ミスフォールド蛋白質はパーキンの項で詳しく述べるユビキチンプロテアソーム蛋白質分解系の働きで分解され、処理されるが、何らかの理由で分解が間に合わなくなるとミスフォールド蛋白質が細胞内に蓄積する。α-シヌクレインは家族性パーキンソン病では変異によってミスフォールド化するが、孤発性

表1 家族性パーキンソン病の分類

	遺伝子	遺伝形式
PARK1 4q21-22	a-synuclein	AD
PARK2 6q25-27	Parkin	AR
PARK3 2p13	?	AD
PARK5 4p14	UCH-L1	AD(?)
PARK6 1p35-36	PINK1	AR
PARK7 1p36	DJ-1	AR
PARK8 12p11.2-q13.1	dardarin/LRRK2	AD
PARK9 1p36	?	AR
PARK10 1p32?	?	susceptibility locus
PARK11 2q36-37	?	susceptibility locus

パーキンソン病では翻訳後修飾によってミスフォールド化し、蓄積してレビー小体を形成するのではないかと考えられるようになった^{4, 6)}。レビー小体は電子顕微鏡でみると径約10ナノメートルのアミロイドフィブリルとよばれる線維構造を呈するが、組み換え α -シヌクレインも試験管内でレビー小体とよく似たアミロイドフィブリルを形成することが示されている。

ミスフォールド化した α -シヌクレインの蓄積がパーキンソン病の原因になるという考えは、 α -シヌクレインを過剰発現するモデル動物がパーキンソン病類似の病態を示すようになることから支持されている^{4, 22)}。まずマウスで神経特異的に野生型または変異型の α -シヌクレインを脳で発現させると、ドーパミン神経終末が特異的に変性し、運動機能も低下する。さらに神経細胞内にレビー小体に似た凝集物が出現する。一方、ショウジョウバエでも脳に α -シヌクレインを過剰発現させるとドーパミン神経細胞死が起り、やはりレビー小体様封入体が形成される。

現在、関心の的になっていることは細胞毒性を発揮するのがレビー小体なのか、それ以外のミスフォールド化した α -シヌクレインの分子種かという点である。 α -シヌクレインがレビー小体のような線維構造を*in vitro*で形成する過程の研究から、アミロイドフィブリルになる前の中間体であるプロトフィブリルの存在が明らかになり、線維そのものではなく、プロトフィブリルが細胞毒性を発揮するのではないかとこの数年提唱されるようになった(図2)⁶⁾。

プロトフィブリルを重視する立場からはレビー小体のような線維性の封入体は危険なプロトフィブリルに変わることを阻害したり、封じ込めてしまったりする防御的な機能をも

• Amyloidogenic intermediate □



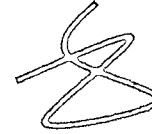
• Oligomer H //



• Protofibril



• Amyloid fibril



• Amyloid Plaque/ Inclusion

図2 α -シヌクレインの線維フィブリルの形成過程

正常な α -シヌクレインは遺伝子変異や翻訳後修飾などによってミスフォールド化し、中間体のプロトフィブリルを形成する。プロトフィブリルの形態は直鎖状、環状などさまざまであり、この一部が毒性をもつ可能性がある。プロトフィブリルは最終的にはフィブリルに転換し、レビー小体が形成される。

つことが推測されている。一方フィブリルとなったレビー小体もプロトフィブリルもプロテアソームの活性を低下させる可能性が指摘されており、どの分子種が毒性を担っているのか、今後の展開が待たれる。

2. PARK2 : パーキン

AR-JPは40歳以下で発症するパーキンソン病様症状を主体とする疾患で、神経病理学的には孤発性パーキンソン病と同様、黒質・青斑核の色素含有細胞の選択的変性が特徴である。しかしレビー小体は通常みられない¹⁵⁾。

AR-JPの病因遺伝子パーキンはN末端にユビキチンホモロジー領域、C末端に二つのRINGフィンガー領域を有する蛋白質であり、ユビキチンリガーゼ(略称:E3)というユビキチンプロテアソーム蛋白分解系にかかわる酵素であることが判明している^{7, 13, 20, 28)}。ユビキチンプロテアソーム経路は短寿命の蛋白質の主な分解経路である(図3)²³⁾。

ユビキチンは76アミノ酸の小さな蛋白質であるが、活性化酵素 (E1)、結合酵素 (E2)、連結酵素あるいはリガーゼ (E3) からなる連続的な酵素反応により標的蛋白質に共有結合し、さらにこの反応を繰り返すことによって形成されたポリユビキチン鎖が標的蛋白質の分解シグナルとして作用する。

分解シグナルを認識するのは巨大な蛋白質分解酵素複合体であるプロテアソームであり、シリンダー状の形状の20Sプロテアソームの中を通過して標的蛋白質はばらばらに分解されてしまう。E3の役割は標的蛋白質を特異的に認識し、E2の助けを借りて、そのユビキチン化を促進することである。パーキンのRINGフィンガーはE2との結合、一方N末端のユビキチンホモロジー領域はプロテアソームとの結合に必要である¹⁹⁾。

以上より、AR-JPではパーキンのE3活性の低下によってパーキンが本来ユビキチン化し、その分解を促進すべき基質がドーパミン神経に蓄積し、神経変性を引き起こすと考えられる。これまでにパーキンの標的蛋白質としていくつかの蛋白質が分離同定されている。シナプス小胞に局在するGTPaseのCDC-rel1²⁸⁾、糖鎖修飾された α -シヌクレインおよび α -シヌクレインの凝集を促進する作用をもち、レビー小体の構成成分でもあるsynphilin-1^{3, 21)}、そのほかサイクリンE、 α -/ β -チューブリン、アミノアシルtRNA合成酵素複合体p38サブユニットも標的蛋白質として報告されている。これらのなかで私たちが分離同定したパエル (Pael) 受容体は小胞体ストレスとパーキンソン病を結びつけ、その蓄積が直接細胞死を誘導する分子として特に注目されている⁸⁾。

パエル受容体は、酵母2ハイブリッド法でパーキン結合蛋白質として同定されたG蛋白共役型

受容体である。パエル受容体はドーパミン神経に発現しており、蛋白質新生の段階でミスフォールド蛋白質になってしまったパエル受容体をパーキンが小胞体レベルで分解していることがわかった。

小胞体は細胞内蛋白質の約3分の1を占める膜蛋白質/分泌蛋白質の品質管理を行う細胞内小器官である¹⁶⁾。小胞体では蛋白質のフォールディングの状況によって蛋白質が選別され、うまくフォールディングされて、折れたたんだけ蛋白質は分泌経路にのせられるが、フォールディングに失敗したミスフォールド蛋白質は分解される。

このように分泌系蛋白質が小胞体でフォールディング状態に応じてより分けられ、分解に至る経路を小胞体関連分解 (ERAD: endoplasmic reticulum-associated degradation) とよぶ⁹⁾。ERADの基質となる蛋白質は細胞質へ逆行輸送され、細胞質のユビキチン・プロテアソーム系によって分解される (図4)。Pael受容体を過剰発現させた細胞でプロテアソーム阻害剤を投与したところ、パエル受容体の小胞体への集積が観察され、パエル受容体がERADで分解されていることがわかった。

さらにプロテアソームの阻害を持続させると、やがて細胞内で異常な凝集塊を形成し、それに伴って細胞が丸く縮んで死んでしまう。小胞体にミスフォールド蛋白質が蓄積すると細胞機能が障害されることが知られ、小胞体ストレスとよばれている。細胞は小胞体ストレスに対する究極のストレス応答として細胞死を起こす¹⁰⁾。パエル受容体は小胞体ストレス誘導性細胞死を引き起こしたと考えられる。

さらに、ヒト脳を使った検討でAR-JPの剖検脳で不溶性パエル受容体の蓄積が観察されたことから、パエル受容体の蓄積はAR-JPにみられ

る神経変性のメカニズムをうまく説明する²⁵⁾ (図5)。

以上の結果より、AR-JPはミスフォールド化したパエル受容体の異常蓄積によりドーパミン神経が選択的に細胞死に陥って発症に至るのではないかと考えられる。この仮説をさらに支持する事実として、ショウジョウバエの脳にパエル受容体を大量に発現させることによってAR-JPのモデルが作製された²⁷⁾。パエル受容体をドーパミン神経特異的なプロモーターを用いて発現させると、孵化後40日で脳のある部位のドーパミン神経が半数ほどに減少する。さらにパエル受容体を神経細胞全般に発現させても、同じようにドーパミン細胞だけが変性脱落することがわかり、ドーパミン細胞が何らかの理由でパエル受容体蓄積のストレスに特別脆弱なことが想像される。

一方、マウスではパーキンの遺伝子をノックアウトしても見かけ上異常は見当たらない。これにはさまざまな説明が可能であるが、ヒトのAR-JPでも20~30歳代になるまで発症しないことから、パーキンの基質の蓄積はゆっくりした過程であると考えられ、せいぜい2年前後しか生きないマウスでは病気を発症しないのかもしれない。

3. PARK6 : PINK1

PARK6は常染色体劣性若年性パーキンソン病の臨床病型をとり、病因遺伝子としてPINK1 (PTEN-induced kinase 1) が最近単離された²⁶⁾。PINK-1は蛋白質リン酸化酵素であるという以外の機能は明らかでないが、ミトコンドリアに局在することから、ミトコンドリアの機能維持に不可欠な役割を有している可能性がある。

おもしろいことに、孤発性パーキンソン病患者剖検例の黒質ではミトコンドリア電子伝

達系の複合体Iの活性が低下している。また、同じく複合体Iを阻害するMPTP, rotenoneといった薬剤がドーパミン神経毒として作用し、実験動物でパーキンソニズムを引き起こすことから、ミトコンドリアの機能低下が孤発性パーキンソン病の発症に密接に関連していると想像されてきた¹¹⁾。PINK1の機能解析によってミトコンドリアとパーキンソン病を結びつける強力な証拠が得られることが期待される。

4. PARK7 : DJ-1

PARK7も常染色体劣性遺伝で、若年性パーキンソン病の表現型を呈する。DJ-1の変異がオランダとイタリアのPARK7の家系に見出された²⁾。DJ-1は構造上、古細菌のプロテアーゼに類似しているが、機能はよくわかっていない¹²⁾。最初はオンコジーンとして同定された¹⁷⁾、最近、過酸化水素を強力に解毒する抗酸化蛋白質すなわちアンチオキシダントであることが判明した²⁴⁾。ドーパミン神経は酸化的ストレスに曝されやすい環境におかれていることから、酸化的ストレスが孤発性パーキンソン病の病因にかかわるとの考えは以前から有力であった。DJ-1はこの考えを遺伝子の側から裏づけている。

Ⅲ. おわりに

家族性パーキンソン病の分子メカニズムに関する最近の知見を概観してきた。一番強調したいことは、家族性パーキンソン病の研究から孤発性パーキンソン病の病因への直接的な手がかりが得られたことである。PARK1の病因遺伝子 α -シヌクレインが孤発性パーキンソン病においても重要な役割を演じていることは疑いない。次にPARK1, PARK2の研究からパーキンソン病ではミスフォールド蛋白質の蓄積とそれを分解する役割を担うユビキチ

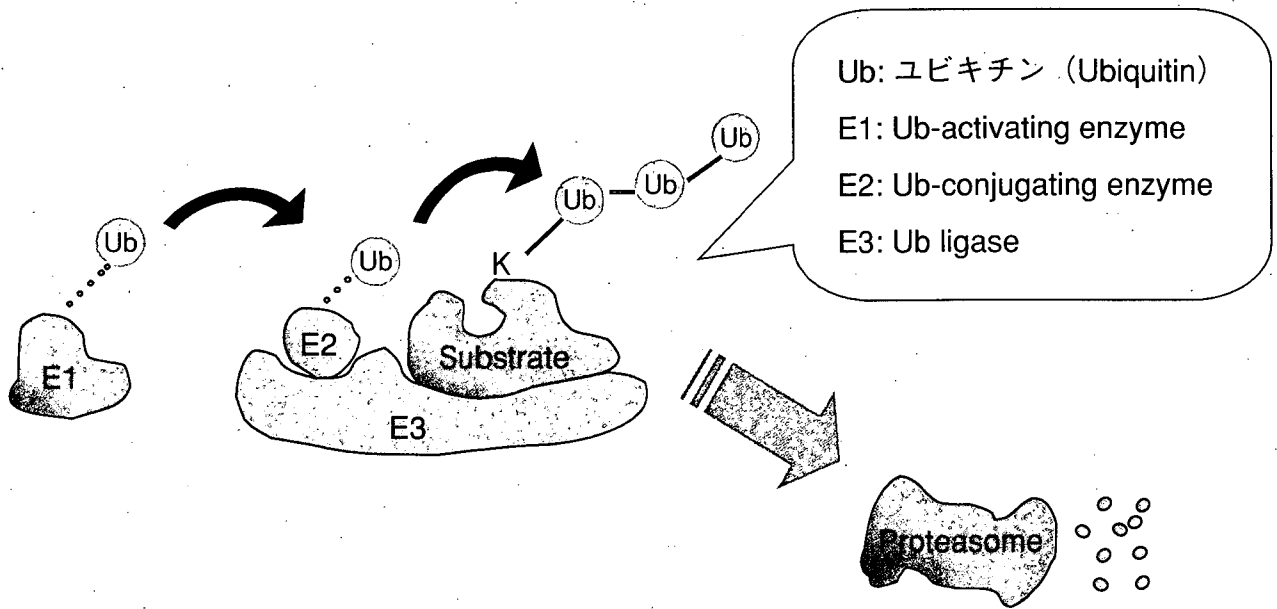


図3 ユビキチンプロテアソーム蛋白質分解系

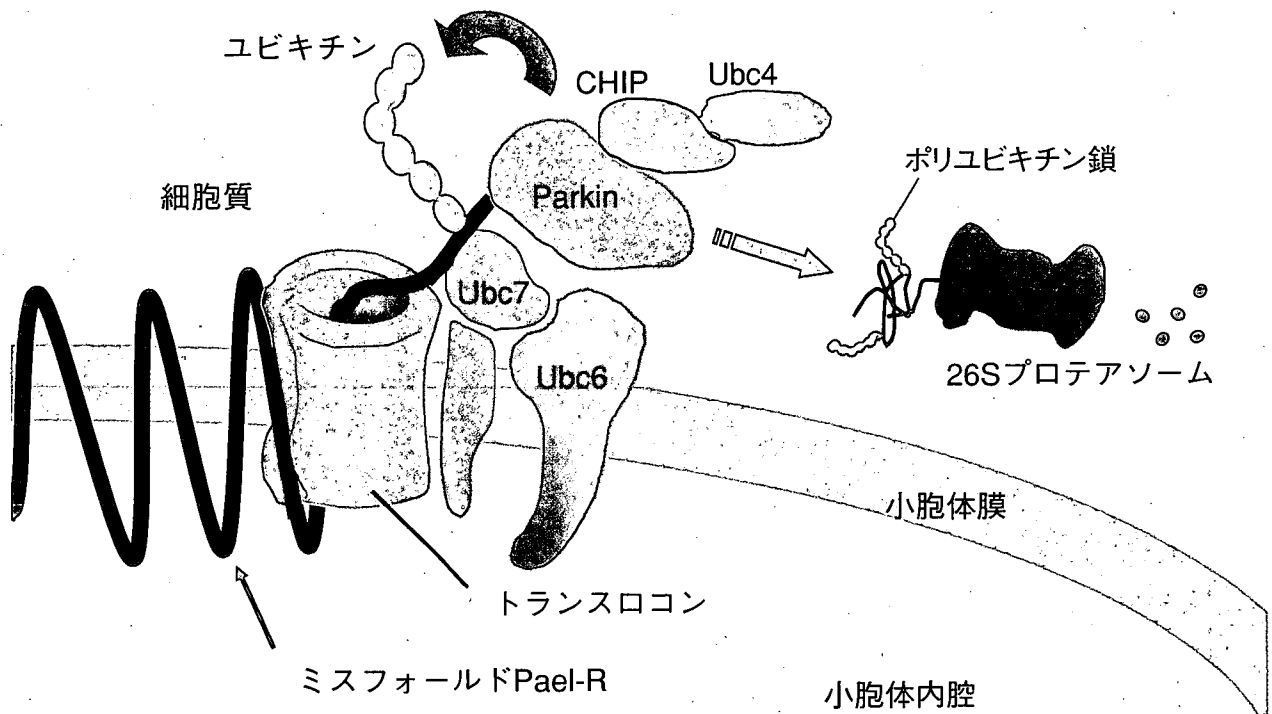


図4 小胞体関連分解 (ERAD) と Parkin の役割

Ubc6, Ubc7は小胞体膜の細胞質側にあるERADにかかわるE2である。ミスフォールド化パエル受容体 (Pael-R) はトランスロコンを通して細胞質に逆に運ばれ、ユビキチンプロテアソーム系によって分解される。

ンプロテアソーム系の破綻が神経変性を引き起こしているらしいこともわかってきた。

このような家族性パーキンソン病からの知見をもとに孤発性パーキンソン病の病因仮説をや

や単純化して図式化してみた (図6)。まず加齢に伴い複合体Iの障害が起こると酸化的ストレスが生じ、 α -シヌクレインの酸化によりミスフォールド化が促進される。ミスフォールド

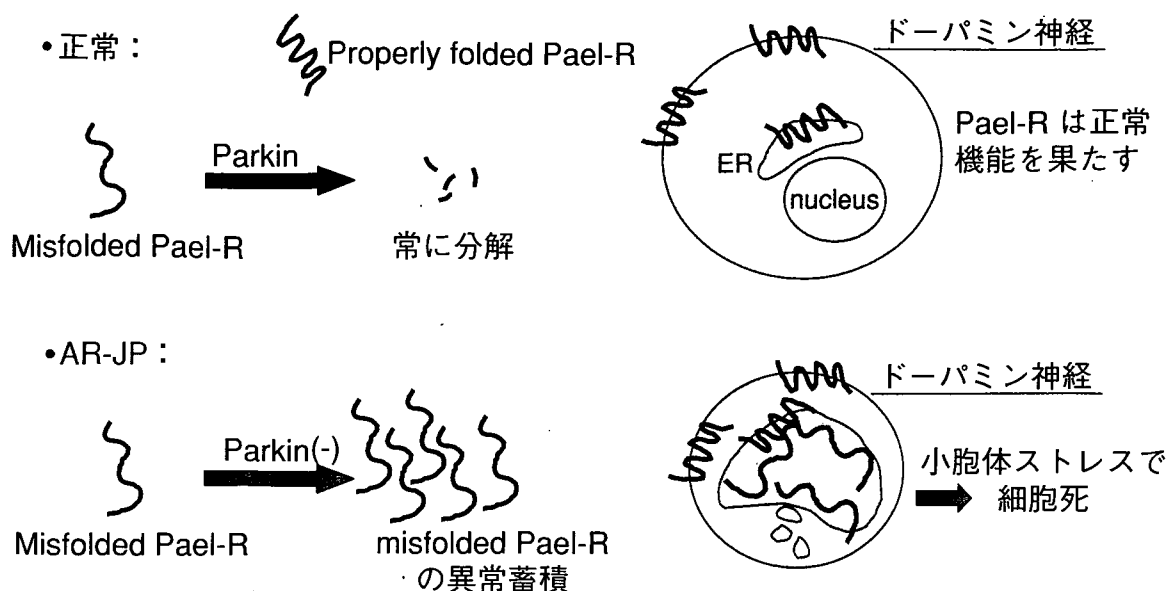


図5 AR-JP発症の分子メカニズム

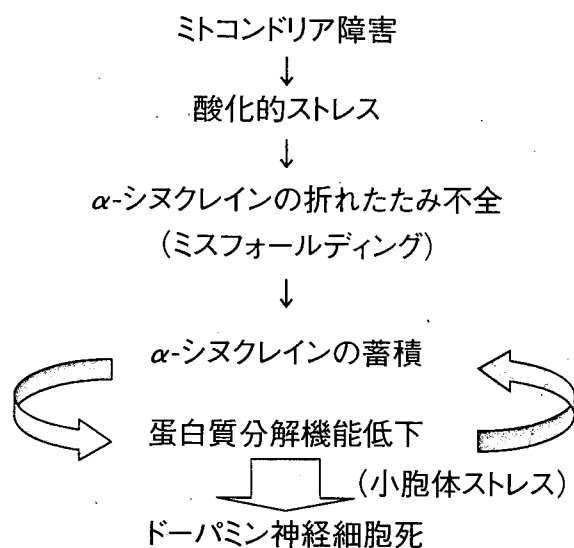


図6 家族性パーキンソン病に基づくパーキンソン病の病因仮説

化した α -シヌクレインはプロテアソームに過重な負担をかけることでプロテアソーム機能低下を引き起こし、それがERADの阻害から小胞体ストレスを誘導し、神経変性が起こるという作業仮説である。

この仮説を検証していくことによってパーキンソン病の病因が解明され、その先にある治療

法開発が実現することが期待される。

文献

- 1) Baba M, Nakajo S, Tu PH, et al: Aggregation of alpha-synuclein in Lewy bodies of sporadic Parkinson's disease and dementia with Lewy bodies. *Am J Pathol* 152: 879-884, 1998
- 2) Bonifati V, Rizzu P, van Baren MJ, et al: Mutations in the DJ-1 gene associated with autosomal recessive early-onset parkinsonism. *Science* 299: 256-259, 2003
- 3) Chung KK, Zhang Y, Lim KL, et al: Parkin ubiquitinates the alpha-synuclein-interacting protein, synphilin-1: implications for Lewy-body formation in Parkinson disease. *Nat Med* 7: 1144-1150, 2001
- 4) Dawson TM, Mandir AS, Lee MK: Animal models of PD: Pieces of the same puzzle? *Neuron* 35: 219-222, 2002
- 5) Dawson TM, Dawson VL: Rare genetic mutations shed light on the pathogenesis of Parkinson disease. *J Clin Invest* 111: 145-151, 2003
- 6) Goldberg MS, Lansbury PT: Is there a cause-and-effect relationship between alpha-synuclein fibrillization and Parkinson's disease? *Nat Cell Biol* 2: E115-119, 2000
- 7) Imai Y, Soda M, Takahashi R: Parkin suppresses unfolded protein stress-induced cell death through its E3 ubiquitin-protein ligase activity. *J Biol Chem* 275: 35661-35664, 2000