

Fig. 5. Sensitivity of DA neurons to the neurotoxins in Pael-R Tg and Pael-R KO mice. (A) The estimated number of TH-positive neurons in the SN and VTA of Pael-R KO and WT littermate mice at 3 months of age was assessed by a stereological method (mean  $\pm$  S.E.M.,  $n = 7$  mice). \* $P < 0.05$  vs. WT littermates by Student's  $t$ -test. (B) Effect of 6-OHDA on DA neurons of Pael-R Tg mice 21 days after administration. 6-OHDA was injected into the left striatum of PrP-Tg and non-Tg littermate mice at 2–3 months of age. The number of TH-immunopositive neurons in the SN was assessed by a stereological method. To correct for genotype-based differences in the number of TH-positive cells, data are represented as percentage of the number on the non-treated side (right striatum) of each animal (mean  $\pm$  S.E.M., Tg,  $n = 8$ ; non-Tg,  $n = 9$ ). \*\*\* $P < 0.001$  vs. non-Tg by Student's  $t$ -test. (C) Representative coronal sections of 6-OHDA-treated non-Tg (upper) and Tg (lower) brains containing the SN are shown. The 6-OHDA-treated SN is located on the left side. (D) Effect of MPTP on DA neurons of Pael-R KO mice 7 days after administration. MPTP was injected into Pael-R KO and WT littermate mice at 3 months of age. Data are represented as percentage of the number of DA neurons in the SN in each pair with saline treatment (mean  $\pm$  S.E.M.,  $n = 8$  per each group). \*\* $P < 0.01$  vs. non-Tg by Student's  $t$ -test. (E) Representative coronal sections of

this phenotype. Although DA neurons in the SN of Parkin KO mice do not show axonal degeneration or neuronal death with age like those of AR-JP patients, there is some evidence that DA neurons in Parkin KO mice are functionally disturbed. Therefore, we expected that DA neurons in Pael-R Tg mice might be subjected to stress to deal with elevated DA content. DA neurotoxins 6-OHDA and MPTP, which have been used to develop PD animal models, behave as catecholaminergic or DA neuron-specific neurotoxins (Betarbet et al., 2002). To evaluate the vulnerability of mice with altered Pael-R expression to these neurotoxins, the number of TH-immunopositive neurons in the SN or the amounts of DA in the striatum was evaluated after the treatment. The SN of PrP-Tg and non-Tg littermates that were treated with 6-OHDA-injection into the left striatum showed, respectively, 64% and 16% reduction of TH-immunopositive neurons compared with the untreated hemisphere (Fig. 5B and C). In contrast, MPTP-treatments of WT and Pael-R KO mice led to 27% and 4% fewer TH-immunoreactive neurons, respectively, than counted in saline-treated WT mice (Fig. 5D and E). The amount of striatal DA in Pael-R KO mice and WT littermates 3 weeks after 6-OHDA-injection into the left striatum showed, respectively, 38% and 81% reduction compared with the untreated hemisphere (Fig. 5F). These results indicate that DA neurons in PrP-Tg mice are more sensitive to DA neurotoxins, suggesting that these DA neurons are potentially stressed. Conversely, DA neurons in Pael-R KO mice appeared to be less sensitive (i.e., to have the opposite characteristics from that in PrP-Tg mice).

### 3.6. Electrophysiological analysis of DA neurons in Pael-R-KO and PrP-Tg mice

To study how the function of DA neurons was influenced by the expression of Pael-R, we made the whole-cell patch-clamp recordings from DA neurons in midbrain slices and slices containing the striatum prepared from Pael-R KO and PrP-Tg mice of postnatal 3–4 weeks. In both DA neurons of Pael-R KO (WT,  $n = 36$  cells, KO,  $n = 39$  cells) and PrP-Tg (non-Tg,  $n = 28$  cells, Tg,  $n = 28$  cells) mice we found no changes in the resting membrane potentials (WT,  $-55.4 \pm 0.8$  mV, KO,  $-55.0 \pm 0.7$  mV; non-Tg,  $-57.2 \pm 0.9$  mV, Tg,  $-55.3 \pm 1.2$  mV), the spike thresholds (WT,  $-30.0 \pm 0.5$  mV, KO,  $-29.8 \pm 0.6$  mV; non-Tg,  $-29.5 \pm 0.5$  mV, Tg,  $-30.4 \pm 0.4$  mV), the peak values (WT,  $26.9 \pm 1.1$  mV, KO,  $26.8 \pm 1.1$  mV; non-Tg,  $27.8 \pm 1.3$  mV, Tg,  $27.3 \pm 1.3$  mV), and amplitudes (WT,  $56.9 \pm 1.0$  mV, KO,  $56.6 \pm 1.3$  mV; non-Tg,  $57.4 \pm 1.2$  mV, Tg,  $57.6 \pm 1.3$  mV) of action potentials, the spike widths at half amplitude (WT,  $1.46 \pm 0.05$  ms, KO,  $1.47 \pm 0.06$  ms; non-Tg,  $1.57 \pm 0.06$  ms, Tg,  $1.53 \pm 0.06$  ms), spontaneous firing frequencies (WT,  $2.87 \pm 0.20$  Hz, KO,  $2.50 \pm 0.20$  Hz; non-Tg,  $1.85 \pm 0.13$  Hz, Tg,  $1.81 \pm 0.15$  Hz), and firing patterns. However, the input resistance of DA neurons of PrP-Tg mice

was slightly larger (Student's *t*-test,  $P < 0.05$ ; Fig. 6A) than that of the non-Tg control neurons although there was no difference between DA neurons of Pael-R KO and WT mice (data not shown). Interestingly, the input resistance in the striatal MSNs was smaller in Pael-R KO mice (WT,  $n = 16$ ,  $133.3 \pm 18.9$  M $\Omega$ ; KO,  $n = 14$ ,  $57.6 \pm 9.8$  M $\Omega$ ,  $P < 0.01$ ) and larger in PrP-Tg mice (non-Tg,  $n = 19$ ,  $81.9 \pm 22.3$  M $\Omega$ ; Tg,  $n = 22$ ,  $146.2 \pm 21.4$  M $\Omega$ ,  $P < 0.05$ ) than their respective controls (data not shown). Since the factors which determine the input resistance are the cell size and the density and permeability of various types of ion channels incorporated into the cell membrane, our finding that the cell size of the Tg DA neurons was similar to that of non-Tg controls (soma area: non-Tg,  $303 \pm 14$   $\mu\text{m}^2$ ,  $n = 29$ ; Tg,  $286 \pm 16$   $\mu\text{m}^2$ ,  $n = 26$ ;  $P > 0.4338$ ) suggests a possible interaction of Pael-R with a certain membranous component.

Electrical stimulation of cortico- and nigro-striatal pathways in striatal slices evokes release of DA from the residual dopaminergic nerve terminals (Calabresi et al., 1995). The released DA then depresses GABAergic IPSC in the striatal MSNs by activation of presynaptic DA D2 receptors (Bamford et al., 2004; Centonze et al., 2002, 2003, 2004). We thus performed paired pulse stimulation to get paired pulse ratios (PPRs) of the second IPSC amplitudes to the first in the MSN to study a change in DA release in Pael-R KO and PrP-Tg mice. We found no statistical change in PPRs in both Pael-R KO and PrP-Tg mice with respect to their respective controls (upper left in Fig. 6B, and data not shown). Nomifensine is a selective DA uptake inhibitor interacting with the DA transporter at a site different from that of cocaine. A previous report demonstrated that both cocaine and amphetamine, more potent drugs than nomifensine, increased the DA content and suppressed IPSCs through activation of presynaptic DA D2 receptors (Centonze et al., 2002; Wiczorek and Kruk, 1994). After nomifensine application there was a slight increase in PPR in WT and a decrease in KO at an interval of 100 ms, yielding a significant difference only in Pael-R KO mice (lower left in Fig. 6B,  $P < 0.05$ ). Furthermore, we found a significant decrease in IPSC amplitudes upon repeated low frequency stimulation (30 pulses applied 70 ms apart) both before and after application of nomifensine in Pael-R KO mice (right in Fig. 6B). In contrast, no change was observed in PPRs and IPSC amplitudes with paired pulse stimulation and repeated low frequency stimulation before and after nomifensine in PrP-Tg mice (data not shown). In both types of mice there were no changes in rise time and decay time constant of IPSC, suggesting no alterations in GABA<sub>A</sub> receptor channel kinetics *per se* (data not shown).

These results suggest that in Pael-R KO mice DA is significantly less released while electrophysiological properties of DA neurons remain unchanged. On the other hand, we did not observe any significant changes in DA neurons of PrP-Tg mice except for a small increase in input resistance probably because

MPTP-treated (+) or saline-treated (–) brains containing the SN are shown. (F) Effect of 6-OHDA on DA neurons of Pael-R KO mice. 6-OHDA was injected as in B at 2–3 months of age. The amount of DA in the striatum was measured by HPLC-EC method 21 days after administration. To correct for genotype-based differences in the amount of striatal DA, data are represented as percentage of the amount on the non-treated side (right striatum) of each animal (mean  $\pm$  S.E.M., Tg,  $n = 5$ ; non-Tg,  $n = 5$ ). \*\*\* $P < 0.001$  vs. non-Tg by Student's *t*-test.

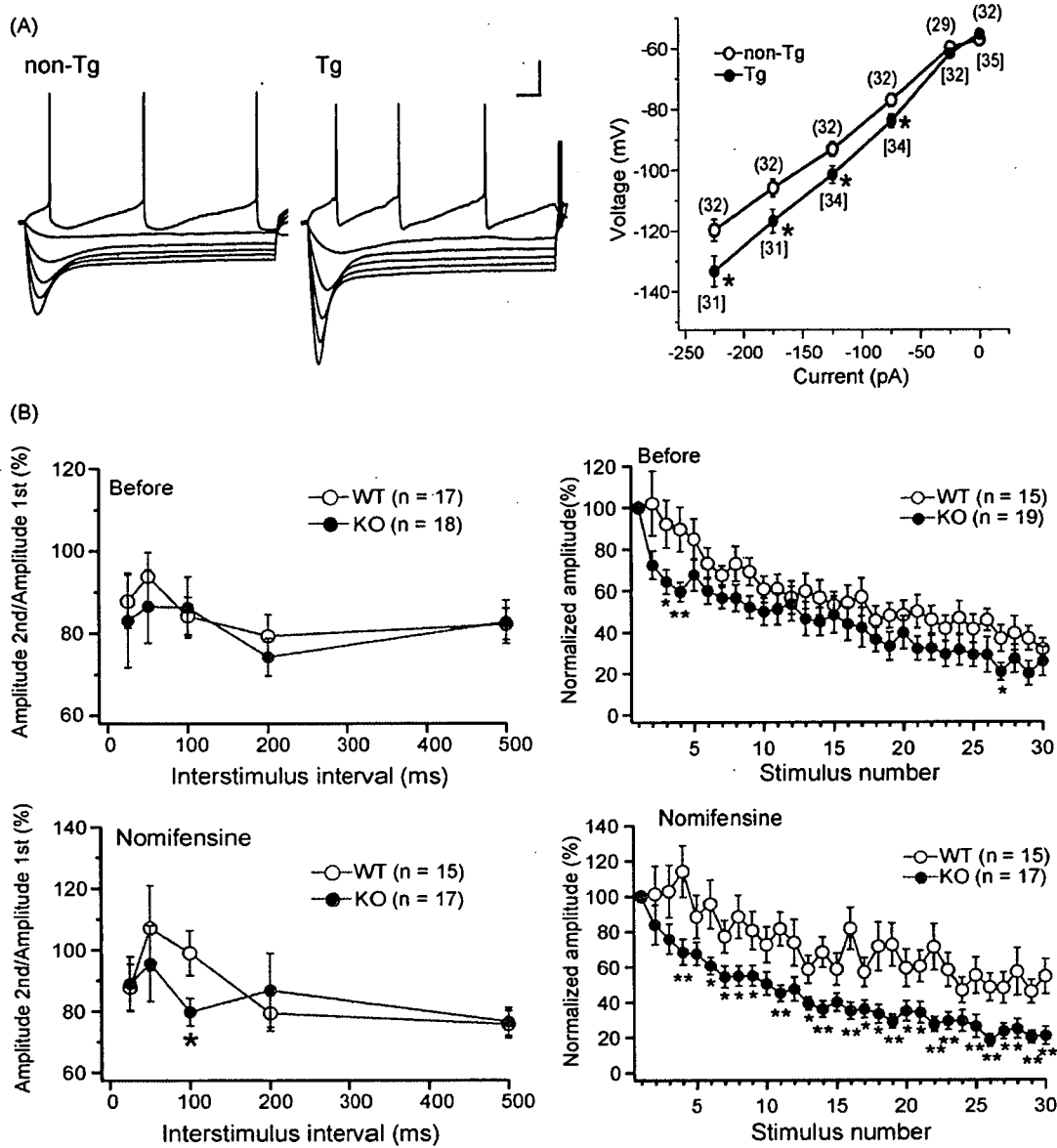


Fig. 6. Effects of Pael-R expression on physiological properties of DA neurons. (A) Sample waveforms of DA neurons taken from a non-Tg and a PrP-Tg mouse (left). Current–voltage relationships generated by injecting current pulses and recording the voltage deflections are shown on the right. Numbers in parenthesis show the numbers of cells sampled. Calibration, 25 mV, 100 ms. Input resistance in PrP-Tg mice is larger than that in non-Tg mice. \* $P < 0.05$ . (B) Effects of paired pulse stimulation and repeated low frequency stimulation before and after nomifensine in Pael-R KO mice. At left are shown plots of the mean ( $\pm$ S.E.M.) percentage of the second IPSC with respect to the first IPSC as a function of interstimulus interval before (upper) and after (lower) nomifensine application. After nomifensine treatment (3  $\mu$ M), paired pulse depression (PPD) observed in wild types (WT, open circles) changed into small paired pulse facilitation (PPF), whereas PPD in knockouts (KO, gray circles) remained unchanged, yielding significant difference in paired pulse ratios at 100 ms ( $P < 0.05$ ). Amplitudes (mean  $\pm$  S.E.M.) of successive IPSCs in a burst of 30 applied 70 ms apart (i.e. at 14 Hz) normalized with respect to the amplitude of the first IPSC of the burst are shown on the right. There was a significant decrease in normalized IPSC amplitude in Pael-R KO mice (Student's *t*-test,  $P < 0.05$ ) both before (upper) and after (lower) nomifensine treatment.

the change in DA content at this stage may be too small to detect nigrostriatal abnormalities in our electrophysiological analysis.

#### 4. Discussion

Pael-R, transcripts of which are exclusively expressed in the CNS and testis, is a putative G protein coupled receptor (Donohue et al., 1998; Kawasawa et al., 2003). Unfolded Pael-R is thought to have a role in the etiology of AR-JP (Imai et al., 2001; Yang et al., 2003). Moreover, Pael-R-immunoreactivity has been observed in Lewy bodies of PD patients (Murakami

et al., 2004). These reports suggest that unfolded Pael-R is associated with degeneration of DA neurons in PD. However, the physiological function of Pael-R in the CNS remains unknown. Our investigation of Pael-R-deficient and Pael-R Tg mice here revealed its physiological function as well as its pathological function in nigrostriatal system.

Although in Pael-R-deficient mice the number of TH-positive neurons in the SN was only slightly reduced, the striatal level of DA was significantly reduced. The alteration of DA content in these mice cannot simply be explained by a change of TH (a rate-limiting enzyme of DA synthesis, converting tyrosine into

L-DOPA) or aromatic amino acid decarboxylase (AADC, the enzyme that converts L-DOPA to dopamine) expression at protein level because the change of those expressions was not observed by Western blot analysis (data not shown). We also failed to detect a significant difference in the steady state and METH-stimulated levels of DA in the striatal CSF of Pael-R KO mice or a behavioral difference following METH administration. Thus, the reduction in whole striatal DA content could come from a non-releasable pool of DA in DA neurons.

The observations of Pael-R KO mice by Marazziti et al. (2004) is almost consistent with the results of our Pael-R KO mice. However, we do not see a significant reduction in the body weights of Pael-R KO mice and a significant defect of motor performance in the rotarod test. Another difference is their mice were supersensitive to amphetamine as assessed by locomotor activity, whereas we failed to find a significant difference in the amount of METH-stimulated DA in the CSF of Pael-R KO mice. These inconsistencies may come from tested ages of the mice and a difference in genetic backgrounds (100% C57BL/6J in this study versus 75% C57BL/6J and 25% 129P2/OlaHsd mixed background in the previous study by Marazziti's group). We analyzed older mice (12-month-old for measurement of body weight and rotarod test, 6–12-month-old for METH administration) compared with those (2.5–4-month-old) in Marazziti's group. As a result, a compensation for Pael-R-deficiency may go on with age.

The electrophysiological analysis was done only in young mice (3–4-week-old) for technical reasons. We found that the DA neuron and striatal MSN input resistance significantly increased in PrP-Tg mice and striatal MSN input resistance significantly decreased in Pael-R KO although the resting membrane potentials, the firing thresholds, and the amplitudes and widths of the spikes remained unchanged. This observation suggests that Pael-R may interact with certain membrane factor(s) that determine the input resistance and thereby play an important role in membrane constitution. On the other hand, the finding that PPR was not altered in either Pael-R Tg or KO mice indicates that Pael-R does not affect the GABA release machinery. However, the decrement of PPR was evident after nomifensine treatment and after repeated low frequency stimulation in Pael-R KO mice compared with WT littermates. This result indicates that the absence of Pael-R depletes available striatal DA content, which might be consistent with a very recent report that the population of the cell-surface DAT at the presynapse of Pael-R KO mice is increased by the absence of direct interaction between Pael-R and DAT (Marazziti et al., 2007). Another recent study on a candidate of Pael-R ligands has showed that Pael-R is internalized upon stimulation by a neuropeptide head activator (HA) (Rezgaoui et al., 2006). Given that Pael-R is one of DAT-associated proteins, the cell-surface DAT may be internalized together with Pael-R upon HA stimulation. That could cause the extracellular accumulation of DA. However, the observations that Pael-R KO mice and Pael-R Tg mice are respectively resistant and susceptible to DA neurotoxins suggest that there are DAT-independent mechanisms of MPTP toxicity.

Growing numbers of reports have shown that increased DA levels affect terminal degeneration of DA neurons and that DA

treatment leads to cell death *in vitro* (Ben-Shachar et al., 2004; Cantuti-Castelvetri et al., 2003; Hastings et al., 1996; La Voie and Hastings, 1999; Masserano et al., 1996; Rabinovic et al., 2000; Xu et al., 2002; Zigmond et al., 2002). Moreover, although differing from classic Lewy bodies, dopamine-dependent neuronal inclusions have been experimentally generated in mice and cultured cells treated with METH (Fornai et al., 2004). The fact that various antioxidants can prevent DA neurotoxicity suggests oxidative stress occurring during DA metabolism might damage crucial neuronal functions and reduce survival. Indeed, the aging of human brain, which is an important risk factor for PD, is closely associated with attenuated antioxidant pathways challenged by oxidative stress (Lee et al., 2000; Lu et al., 2004). Considering constitutively high DA levels might expose DA neurons to chronic oxidative stress, one can assume Pael-R Tg mice are more sensitive than WT littermates to DA neurotoxins. DA neurotoxins such as MPTP and 6-OHDA are thought to disturb the mitochondrial activity of DA neurons possibly by promoting leakage of electrons from the mitochondrial electron transfer system and thereby generating reactive oxygen species. The levels of DAT and VMAT2 are reported to determine the sensitivity of neurons to DA neurotoxins. However, the resistance of Pael-R KO mice to MPTP was not explained by cell-surface levels of DAT in the striatum, which was shown to be significantly increased in Pael-R KO mice (Marazziti et al., 2007). The examination of cell-surface DAT level of Pael-R Tg mice, therefore, will be important to elucidate whether their sensitivity to DA neurotoxins is based on DAT-dependent mechanisms involving dysregulation of DA metabolism in the future.

Our results from Pael-R mutant mice strongly suggest that the Pael-R signal regulates the amount of DA in the dopaminergic neurons and that excessive Pael-R expression renders dopaminergic neurons susceptible to chronic DA toxicity. Further analysis of Pael-R mutant mice could provide useful information on the nigrostriatal DA metabolism and therapeutic strategy of PD.

#### Acknowledgments

The authors would like to thank Nagatsu T. and Sawada M. for helpful discussion, Meiji Institute of Health Science for MS12, Miyazaki J.-I. for pCAGGS-Cre, Yagi T. for pDT-ApA, the Research Resource Center of the Brain Science Institute for embryo manipulation and support for these animal experiments. This work was partially supported by the Ministry of Education, Science, Sports and Culture, Grant-in-Aid for Scientific Research on Priority Areas – Advanced Brain Science Project – #15016120 to R.T., for Scientific Research (A) #14207032 to R.T., and for Young Scientists (A) #15680011 to Y.I. and a grant from the Special Postdoctoral Researcher Program of RIKEN to Y.I.

#### References

- Bamford, N.S., Zhang, H., Schmitz, Y., Wu, N.P., Cepeda, C., Levine, M.S., Schmauss, C., Zakharenko, S.S., Zablow, L., Sulzer, D., 2004. Heterosy-

- naptic dopamine neurotransmission selects sets of corticostriatal terminals. *Neuron* 42, 653–663.
- Ben-Shachar, D., Zuk, R., Gazawi, H., Ljubuncic, P., 2004. Dopamine toxicity involves mitochondrial complex I inhibition: implications to dopamine-related neuropsychiatric disorders. *Biochem. Pharmacol.* 67, 1965–1974.
- Betarbet, R., Sherer, T.B., Greenamyre, J.T., 2002. Animal models of Parkinson's disease. *Bioessays* 24, 308–318.
- Borchelt, D.R., Davis, J., Fischer, M., Lee, M.K., Slunt, H.H., Ratovitsky, T., Regard, J., Copeland, N.G., Jenkins, N.A., Sisodia, S.S., Price, D.L., 1996. A vector for expressing foreign genes in the brains and hearts of transgenic mice. *Genet. Anal.* 13, 159–163.
- Calabresi, P., Fedele, E., Pisani, A., Fontana, G., Mercuri, N.B., Bernardi, G., Raiteri, M., 1995. Transmitter release associated with long-term synaptic depression in rat corticostriatal slices. *Eur. J. Neurosci.* 7, 1889–1894.
- Cantuti-Castelvetri, I., Shukitt-Hale, B., Joseph, J.A., 2003. Dopamine neurotoxicity: age-dependent behavioral and histological effects. *Neurobiol. Aging* 24, 697–706.
- Centonze, D., Picconi, B., Baunez, C., Borrelli, E., Pisani, A., Bernardi, G., Calabresi, P., 2002. Cocaine and amphetamine depress striatal GABAergic synaptic transmission through D2 dopamine receptors. *Neuropsychopharmacology* 26, 164–175.
- Centonze, D., Grande, C., Usiello, A., Gubellini, P., Erbs, E., Martin, A.B., Pisani, A., Tognazzi, N., Bernardi, G., Moratalla, R., Borrelli, E., Calabresi, P., 2003. Receptor subtypes involved in the presynaptic and postsynaptic actions of dopamine on striatal interneurons. *J. Neurosci.* 23, 6245–6254.
- Centonze, D., Gubellini, P., Usiello, A., Rossi, S., Tschertner, A., Bracci, E., Erbs, E., Tognazzi, N., Bernardi, G., Pisani, A., Calabresi, P., Borrelli, E., 2004. Differential contribution of dopamine D2S and D2L receptors in the modulation of glutamate and GABA transmission in the striatum. *Neuroscience* 129, 157–166.
- Chui, D.H., Tanahashi, H., Ozawa, K., Ikeda, S., Checler, F., Ueda, O., Suzuki, H., Araki, W., Inoue, H., Shirogami, K., Takahashi, K., Gallyas, F., Tabira, T., 1999. Transgenic mice with Alzheimer presenilin 1 mutations show accelerated neurodegeneration without amyloid plaque formation. *Nat. Med.* 5, 560–564.
- Donohue, P.J., Shapira, H., Mantey, S.A., Hampton, L.L., Jensen, R.T., Battey, J.F., 1998. A human gene encodes a putative G protein-coupled receptor highly expressed in the central nervous system. *Brain Res. Mol. Brain Res.* 54, 152–160.
- Fornai, F., Lenzi, P., Gesi, M., Soldani, P., Ferrucci, M., Lazzeri, G., Capobianco, L., Battaglia, G., De Blasi, A., Nicoletti, F., Paparelli, A., 2004. Methamphetamine produces neuronal inclusions in the nigrostriatal system and in PC12 cells. *J. Neurochem.* 88, 114–123.
- Fumagalli, F., Gainetdinov, R.R., Valenzano, K.J., Caron, M.G., 1998. Role of dopamine transporter in methamphetamine-induced neurotoxicity: evidence from mice lacking the transporter. *J. Neurosci.* 18, 4861–4869.
- Goldberg, M.S., Fleming, S.M., Palacios, J.J., Cepeda, C., Lam, H.A., Bhatnagar, A., Meloni, E.G., Wu, N., Ackerson, L.C., Klapstein, G.J., Gajendiran, M., Roth, B.L., Chesselet, M.F., Maidment, N.T., Levine, M.S., Shen, J., 2003. Parkin-deficient mice exhibit nigrostriatal deficits but not loss of dopaminergic neurons. *J. Biol. Chem.* 278, 43628–43635.
- Gomi, H., Yokoyama, T., Fujimoto, K., Ikeda, T., Katoh, A., Itoh, T., Itohara, S., 1995. Mice devoid of the glial fibrillary acidic protein develop normally and are susceptible to scrapie prions. *Neuron* 14, 29–41.
- Hastings, T.G., Lewis, D.A., Zigmond, M.J., 1996. Role of oxidation in the neurotoxic effects of intrastriatal dopamine injections. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 93, 1956–1961.
- Imai, Y., Soda, M., Takahashi, R., 2000. Parkin suppresses unfolded protein stress-induced cell death through its E3 ubiquitin–protein ligase activity. *J. Biol. Chem.* 275, 35661–35664.
- Imai, Y., Soda, M., Inoue, H., Hattori, N., Mizuno, Y., Takahashi, R., 2001. An unfolded putative transmembrane polypeptide, which can lead to endoplasmic reticulum stress, is a substrate of Parkin. *Cell* 105, 891–902.
- Imai, Y., Soda, M., Hatakeyama, S., Akagi, T., Hashikawa, T., Nakayama, K.I., Takahashi, R., 2002. CHIP is associated with Parkin, a gene responsible for familial Parkinson's disease, and enhances its ubiquitin ligase activity. *Mol. Cell.* 10, 55–67.
- Itier, J.M., Ibanez, P., Mena, M.A., Abbas, N., Cohen-Salmon, C., Bohme, G.A., Laville, M., Pratt, J., Corti, O., Pradier, L., Ret, G., Joubert, C., Periquet, M., Araujo, F., Negroni, J., Casarejos, M.J., Canals, S., Solano, R., Serrano, A., Gallego, E., Sanchez, M., Deneffe, P., Benavides, J., Tremp, G., Rooney, T.A., Brice, A., Garcia de Yebenes, J., 2003. Parkin gene inactivation alters behaviour and dopamine neurotransmission in the mouse. *Hum. Mol. Genet.* 12, 2277–2291.
- Ito, S., Kato, T., Fujita, K., 1988. Covalent binding of catechols to proteins through the sulphhydryl group. *Biochem. Pharmacol.* 37, 1707–1710.
- Kaneko, S., Hikida, T., Watanabe, D., Ichinose, H., Nagatsu, T., Kreitman, R.J., Pastan, I., Nakanishi, S., 2000. Synaptic integration mediated by striatal cholinergic interneurons in basal ganglia function. *Science* 289, 633–637.
- Kawawasa, Y., McKenzie, L.M., Hill, D.P., Bono, H., Yanagisawa, M., 2003. G protein-coupled receptor genes in the FANTOM2 database. *Genome Res.* 13, 1466–1477.
- Kitada, T., Asakawa, S., Hattori, N., Matsumine, H., Yamamura, Y., Minoshima, S., Yokochi, M., Mizuno, Y., Shimizu, N., 1998. Mutations in the parkin gene cause autosomal recessive juvenile parkinsonism. *Nature* 392, 605–608.
- LaVoie, M.J., Hastings, T.G., 1999. Dopamine quinone formation and protein modification associated with the striatal neurotoxicity of methamphetamine: evidence against a role for extracellular dopamine. *J. Neurosci.* 19, 1484–1491.
- Lee, C.K., Weindrich, R., Prolla, T.A., 2000. Gene-expression profile of the ageing brain in mice. *Nat. Genet.* 25, 294–297.
- Lu, T., Pan, Y., Kao, S.Y., Li, C., Kohane, I., Chan, J., Yankner, B.A., 2004. Gene regulation and DNA damage in the ageing human brain. *Nature* 429, 883–891.
- Marazziti, D., Gallo, A., Golini, E., Matteoni, R., Tocchini-Valentini, G.P., 1998. Molecular cloning and chromosomal localization of the mouse Gpr37 gene encoding an orphan G-protein-coupled peptide receptor expressed in brain and testis. *Genomics* 53, 315–324.
- Marazziti, D., Golini, E., Mandillo, S., Magrelli, A., Witke, W., Matteoni, R., Tocchini-Valentini, G.P., 2004. Altered dopamine signaling and MPTP resistance in mice lacking the Parkinson's disease-associated GPR37/parkin-associated endothelin-like receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 101, 10189–10194.
- Marazziti, D., Mandillo, S., Di Pietro, C., Golini, E., Matteoni, R., Tocchini-Valentini, G.P., 2007. GPR37 associates with the dopamine transporter to modulate dopamine uptake and behavioral responses to dopaminergic drugs. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 104, 9846–9851.
- Masserano, J.M., Gong, L., Kulaga, H., Baker, I., Wyatt, R.J., 1996. Dopamine induces apoptotic cell death of a catecholaminergic cell line derived from the central nervous system. *Mol. Pharmacol.* 50, 1309–1315.
- Murakami, T., Shoji, M., Imai, Y., Inoue, H., Kawarabayashi, T., Matsubara, E., Harigaya, Y., Sasaki, A., Takahashi, R., Abe, K., 2004. Pael-R is accumulated in Lewy bodies of Parkinson's disease. *Ann. Neurol.* 55, 439–442.
- Nelson, E.L., Liang, C.L., Sinton, C.M., German, D.C., 1996. Midbrain dopaminergic neurons in the mouse: computer-assisted mapping. *J. Comp. Neurol.* 369, 361–371.
- Rabinovic, A.D., Lewis, D.A., Hastings, T.G., 2000. Role of oxidative changes in the degeneration of dopamine terminals after injection of neurotoxic levels of dopamine. *Neuroscience* 101, 67–76.
- Rezzaoui, M., Susens, U., Ignatov, A., Gelderblom, M., Glassmeier, G., Franke, I., Urny, J., Imai, Y., Takahashi, R., Schaller, H.C., 2006. The neuropeptide head activator is a high-affinity ligand for the orphan G-protein-coupled receptor GPR37. *J. Cell. Sci.* 119, 542–549.
- Shimura, H., Hattori, N., Kubo, S., Mizuno, Y., Asakawa, S., Minoshima, S., Shimizu, N., Iwai, K., Chiba, T., Tanaka, K., Suzuki, T., 2000. Familial Parkinson disease gene product, parkin, is a ubiquitin–protein ligase. *Nat. Genet.* 25, 302–305.
- Sunaga, S., Maki, K., Komagata, Y., Ikuta, K., Miyazaki, J.I., 1997. Efficient removal of loxP-flanked DNA sequences in a gene-targeted locus by transient expression of Cre recombinase in fertilized eggs. *Mol. Reprod. Dev.* 46, 109–113.
- Tateno, M., Sadakata, H., Tanaka, M., Itohara, S., Shin, R.M., Miura, M., Masuda, M., Aosaki, T., Urushitani, M., Misawa, H., Takahashi, R., 2004. Calcium-permeable AMPA receptors promote misfolding of mutant SOD1 protein and development of amyotrophic lateral sclerosis in a transgenic mouse model. *Hum. Mol. Genet.* 13, 2183–2196.

- Valdenaire, O., Giller, T., Brey, V., Ardati, A., Schweizer, A., Richards, J.G., 1998. A new family of orphan G protein-coupled receptors predominantly expressed in the brain. *FEBS Lett.* 424, 193–196.
- West, M.J., 1999. Stereological methods for estimating the total number of neurons and synapses: issues of precision and bias. *Trends Neurosci.* 22, 51–61.
- Wieczorek, W.J., Kruk, Z.L., 1994. A quantitative comparison on the effects of benzotropine, cocaine and nomifensine on electrically evoked dopamine overflow and rate of re-uptake in the caudate putamen and nucleus accumbens in the rat brain slice. *Brain Res.* 657, 42–50.
- Xu, J., Kao, S.Y., Lee, F.J., Song, W., Jin, L.W., Yankner, B.A., 2002. Dopamine-dependent neurotoxicity of alpha-synuclein: a mechanism for selective neurodegeneration in Parkinson disease. *Nat. Med.* 8, 600–606.
- Yanagawa, Y., Kobayashi, T., Ohnishi, M., Tamura, S., Tsuzuki, T., Sanbo, M., Yagi, T., Tashiro, F., Miyazaki, J., 1999. Enrichment and efficient screening of ES cells containing a targeted mutation: the use of DT-A gene with the polyadenylation signal as a negative selection maker. *Transgenic Res.* 8, 215–221.
- Yang, Y., Nishimura, I., Imai, Y., Takahashi, R., Lu, B., 2003. Parkin suppresses dopaminergic neuron-selective neurotoxicity induced by Pael-R in *Drosophila*. *Neuron* 37, 911–924.
- Zhang, Y., Gao, J., Chung, K.K., Huang, H., Dawson, V.L., Dawson, T.M., 2000. Parkin functions as an E2-dependent ubiquitin-protein ligase and promotes the degradation of the synaptic vesicle-associated protein, CDCrel-1. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 97, 13354–13359.
- Zhou, Q.Y., Palmiter, R.D., 1995. Dopamine-deficient mice are severely hypoactive, adipsic, and aphagic. *Cell* 83, 1197–1209.
- Zigmond, M.J., Hastings, T.G., Perez, R.G., 2002. Increased dopamine turnover after partial loss of dopaminergic neurons: compensation or toxicity? *Parkinsonism Relat. Disord.* 8, 389–393.

# パーキンソン病の成因

竹内 啓喜 高橋 良輔

## パーキンソン病の成因

竹内 啓喜 高橋 良輔

**要約** これまでの多くの研究により、パーキンソン病の原因に関して様々な仮説が提唱され、多くのことがわかってきた。その全貌については今なお不明な点も多いが、環境要因と遺伝要因の複合により発症すると考えられている。環境要因については加齢、また農薬や神経伝達物質であるドーパミンが酸化して生じるキノン類等による酸化ストレスの増大、遺伝要因ではミトコンドリア機能に関わるタンパク質や、不要となったり産生の際に異常を来したりしたタンパク質の分解経路、とくにユビキチン-プロテアソーム系の機能不全による $\alpha$ -シヌクレイン ( $\alpha$ -synuclein) の凝集が注目されている。本稿ではこれまでに明らかになったパーキンソン病の発症に関わっていると思われるメカニズムについて、環境要因と遺伝要因それぞれについてまとめた。

**Key words** : パーキンソン病, 農薬, 酸化ストレス,  $\alpha$ -シヌクレイン, ユビキチン-プロテアソーム系

(日老医誌 2007; 44: 415-421)

### はじめに

パーキンソン病 (PD) は、安静時振戦、筋固縮、寡動、姿勢反射障害を4大徴候とする神経変性疾患である。これらの神経学的徴候は中脳黒質のドーパミン作動性神経細胞死によるドーパミン量の低下が直接の原因であり、病理学的にはレビー小体という細胞内封入体を特徴とする。しかし細胞死の原因やレビー小体の成因については、これまでの様々な研究から多くのことが明らかになってきているものの、その全体像については未だ不明である。一般的には、孤発性PDは何らかの遺伝要因と環境要因とが重なってミトコンドリアの機能障害や炎症反応による酸化ストレスの増大、また不要タンパク質の分解処理能が低下して蓄積して生じる細胞毒性でドーパミン作動性神経が細胞死を起こして発症するとされているが、そのメカニズムについては議論が分かれている。そこで孤発性PDと、その研究を大きく前進させることになった家族性PDについてこれまでに示されてきたことを元に、現在考えられているPDの成因についてまとめた。

### 環境要因

孤発性PDの原因については、これまでの疫学調査で

多くのものが候補として挙げられてきた。代表的なものとしては加齢と農薬への曝露で<sup>1)</sup>、加齢についてはATP依存性タンパク質分解経路であるユビキチン-プロテアソーム系の機能低下が想定されている<sup>2)</sup>。農薬については、農村部での居住、井戸水の利用、農作業への従事がPDのリスクとなっている<sup>3)</sup>ことより疑われる一方、PDとよく似た症状をおこす物質が発見されて一部はPDの疾患モデル作製に応用された<sup>4)</sup>(表1)。これらは酸化ストレスを増大させることでドーパミン作動性神経に選択的に細胞死を起こし、直接活性酸素種 (Reactive oxygen species; ROS) を産生するディルドリン<sup>5)</sup>(本邦では製造中止)、ミトコンドリア電子伝達系阻害によるものとしてはパラコート、ロテノンなどがある。除草剤として使われるパラコートは可逆的ではあるが、マウス中脳黒質ドーパミン神経内でレビー小体の主要構成成分である $\alpha$ -synucleinの集簇を促す<sup>6)</sup>。ロテノンはマメ科植物の根から得られる天然由来の農薬であるが、慢性投与によりミトコンドリア電子伝達系複合体Iを阻害しラットにPDと似た症状を示すだけでなく黒質から線条体にかけてのドーパミン神経の減少と細胞質内にレビー小体に似た封入体が形成する<sup>7)</sup>。これまでの薬物モデルでは封入体形成がみられないことを考えると、ロテノンはPDの病態に近いモデルを作製できる毒物として有用なものと思われる。また農薬とは別にPDモデル作製に使われているものとしてMPTP、6-ヒドロキシドーパミン (6-OHDA) などがある。いずれもドーパミントランスポー



表1 パーキンソン病関連因子とモデル作製に使う毒物

正の相関	モデル作製に使う毒物	負の相関
加齢	6-OHDA	喫煙 (ニコチン?)
農村部での居住	MPTP	コーヒー (カフェイン?)
井戸水の使用 農業への従事 農薬への曝露	ロテノン パラコート ディルドリン (本邦では使用中止)	

ターによってドーパミン神経に取り込まれることで選択毒性を発揮し、ミトコンドリア電子伝達系複合体Iを阻害し、ROSの産生を上昇させて毒性を発揮する。MPTPは麻薬中毒患者にPD様症状がみられたのをきっかけに合成麻薬の不純物として発見され<sup>8)</sup>、PD研究を飛躍させることになった。また、以前より毒物モデル作製に用いられている6-OHDAはドーパミンの水酸化物として得られたものであるが内因性に存在し、ドーパミン神経を傷害する可能性が示唆されている<sup>9)</sup>。既に知られている内因性のドーパミン神経毒性を持つ物質としてはドーパミンの自己酸化により生成されるイソキノリン類<sup>10)</sup>や、 $\beta$ -カルボリン誘導体<sup>11)12)</sup>が知られる。いずれにせよこれらPDとよく似た特徴を示す薬物は、概して酸化ストレス増大を引き起こすものである。なお金属イオン中毒もマンガンを主体に取り上げられているが、既に発症しているPDを悪化させるものの、一次的な原因としての根拠は不十分である<sup>13)</sup>。プロテアソーム阻害薬でPDモデル動物を作製したとの報告もあるが<sup>14)</sup>、この結果は再現性に問題があることが指摘されている<sup>15)16)</sup>。また、逆に保護的であったとの報告もあり<sup>17)</sup>、統一した見解は得られていない。

一方、PDと負の相関を持つ因子も調査されており、代表的なものとして喫煙<sup>18)</sup>とコーヒー摂取<sup>19)</sup>があげられている。いずれもそのメカニズムについてはよくわかっていないが、喫煙については、ニコチンの作用が挙げられており、ニコチン受容体を介して黒質のドーパミン神経からのドーパミン遊離を促す<sup>20)</sup>、神経保護効果としてはPI3K-Aktシグナル伝達によりBcl familyを活性化する<sup>21)</sup>、あるいはNF- $\kappa$ B抑制によりアポトーシスを抑制する<sup>22)</sup>、free radical scavenger作用をもち酸化ストレスを直接減少させる<sup>23)</sup>、ミクログリアからの細胞傷害因子放出を抑制する<sup>24)</sup>、などが報告されている。またコーヒーは、カフェインがアデノシンA<sub>2A</sub>受容体を阻害することにより細胞保護効果を示していると考えられている<sup>25)</sup>。これらの臨床応用はそのままでは依存性や忍容性、他臓

器への影響の面で問題があるため、コリンエステラーゼ阻害薬やニコチン受容体のアゴニスト、他のアデノシンA<sub>2A</sub>受容体阻害薬の使用が期待される。また、NSAIDsが神経細胞脱落部位での炎症反応を抑制することで神経保護に働くと考えられたが、疫学調査では効果は部分的なようである<sup>26)</sup>。

## 遺伝要因

### 1. 家族性PD

PDは90%が明らかな家族歴のない孤発性で、家族性(即ち遺伝性)のものは5~10%程度と少ない<sup>27)</sup>。しかし家族性症例の原因遺伝子を突き止めることが孤発例の原因解明につながるため、PDでも同様に家族例について多くの研究がなされ、その結果PDの発症メカニズムについて多くのことがわかってきた。以下、これまでに原因遺伝子が明らかになった家族性PDとその遺伝子について述べる。主だった特徴については別表にまとめた(表2)。

#### A. 常染色体優性遺伝

PARK1, PARK4は $\alpha$ -synuclein遺伝子の変異による。表現型は孤発性PDとほぼ同じでL-ドーパも有効だが、発症年齢が40~50代と若年傾向で認知症が目立つ。病理学的所見も孤発性PDと似通っているが、レビー小体が黒質だけでなく皮質でもみられる。これまでに知られている変異は53番目のアラニンがスレオニンに、30番目のアラニンがプロリンに、46番目のグルタミン酸がリジンに(A53T, A30P, E46K)<sup>28)~30)</sup>変異したものであり、これらは正常型より凝集しやすい。 $\alpha$ -synucleinの生理機能はシナプス前に存在し、ドーパミン放出や再取り込みにかかわるはたらきを持つことが報告され<sup>31)32)</sup>、 $\alpha$ -synucleinの機能不全が神経毒性をもつドーパミンの自己酸化生成物を増大させることでドーパミン神経細胞死が生じるのかもしれない<sup>33)</sup>。

PARK1の報告例は少ないが、レビー小体の主要成分がユビキチン化やリン酸化を受けた $\alpha$ -synucleinであることが明らかになり、注目を集めるようになった<sup>34)~36)</sup>。 $\alpha$ -synucleinが何らかの理由により凝集して細胞毒性を発揮し、ドーパミン神経に選択的に細胞死をおこす、という孤発性PDの発症仮説のもと、様々な遺伝子改変動物がつけられている。ヒト正常型 $\alpha$ -synucleinや前述の変異 $\alpha$ -synucleinを導入したショウジョウバエではドーパミン作動性神経の減少、レビー小体様の細胞内封入体や $\alpha$ -synucleinのフィブリルが形成され、運動機能障害の表現型がみられるが<sup>37)</sup>、マウスでは細胞内封入体やフィブリル形成が見られてもドーパミン作動性神経の脱

表2 家族性パーキンソン病

疾患	遺伝形式	遺伝子座	遺伝子	表現型※	年齢	L-DOPA の効果	レビー小体
PARK1	AD	4q21	α-synuclein	PD + dementia	broad	+	+
PARK2	AR	6q25-27	parkin	PD + dystonia	~ 40代	+	-
PARK3	AD	2p13	?	PD	60代	+	+
PARK4	AD	4q21	α-synuclein	PD + dementia	30代	+	+
PARK5	AD	4p14	UCH-L1	PD	50代	+	+ ?
PARK6	AR	1p35	PINK-1	PD + dystonia	30代	+	- ?
PARK7	AR	1p36	DJ-1	PD + dystonia	30代	+	?
PARK8	AD	12q12	LRRK2	PD	broad	+	+ or -
PARK9	AR	1p36	ATP13A2	PD + 注視制限	10代	+	?
PARK10	AR	1p32	?	PD	60代	+ ?	?
PARK11	AD	2q36-37	?	PD	60代	?	?
PARK12	X-linked	Xq21-25	?	PD ?	60代	?	?
PARK13	AD	2p12	Omi/HtrA2	PD	50代	+	+ ?

PD : sporadic PD の表現型 ※特徴的所見

落がみられないか、みられてもごく軽度であり、表現型も軽度な異常にとどまっている<sup>38)</sup>。これは齧歯類以上のほ乳類ではα-synuclein凝集以外の要素も重要であることを示唆しているのかもしれない。一方、同じくα-synuclein遺伝子の変異を原因とするが、正常型遺伝子の三重複がPARK4である。PARK4は孤発性PD症状に加えて早期から認知症や自律神経障害を伴い、L-ドーパが有効であるが孤発性と比べて若年で発症(30歳代)し、進行も早い。病理像ではレビー小体が黒質や青斑核のみならず大脳皮質にも広範に見られ、海馬やマイネルト基底核で空胞形成がみられる。しかし、神経原線維変化や老人斑は正常レベルにとどまる<sup>39)</sup>。また、α-synuclein二重複の家系も報告されているが、孤発性PDと比べて早期に発症するものの臨床症状はあまり変化なく認知症の合併も少ない<sup>40)</sup>。これらの所見より、PD発症にα-synucleinは大変重要な役割を果たしていることが明らかになった。

PARK5はUCH-L1 (Ubiquitin C-terminal hydrolase) 遺伝子の変異によるもので、50歳前後で発症し、臨床症状は孤発性PDと明らかな違いはなく、L-ドーパが有効である。これまでのところドイツの一家系のみで報告で、93番目のイソロイシンのメチオニンへの変異(I93M)を認めている<sup>41)</sup>。UCH-L1は脱ユビキチン化酵素の一種で、他の分子と結合したユビキチンのC末端を切断してユビキチンを活性化し、ユビキチンを供給している<sup>39)</sup>ことからI93Mの変異でユビキチン供給が低下する結果、異常蛋白が蓄積し、パーキンソン症状をおこすものと考えられている。これまでに剖検例がなくレビー小体の有無は不明であるが、トランスジェニックマウスでは中脳黒質でUCH-L1の凝集がみられている<sup>42)</sup>。

一方UCH-L1二量体ではα-synucleinに対するユビキチンリガーゼとして働き、ポリユビキチン化を行う<sup>43)</sup>。このときのユビキチン鎖は26Sプロテアソームでの分解のシグナルとなる48番目のリジン(K48)ではなく63番目のリジン(K63)を介して形成される。その結果α-synucleinが蓄積すると考えられているが、I93M変異ではユビキチンリガーゼ活性が低下しており、必ずしも発症危険度と相関しない<sup>44)</sup>。このプロテアソームでの分解シグナルとならないユビキチン化の意義を明らかにすることが、病因解明の上での大きな鍵であると思われる。

PARK8はLRRK2 (Leucine-Rich Repeat Kinase2) 遺伝子の変異による<sup>45)</sup>。孤発例と思われていた症例でも変異が見いだされており、浸透率も様々で家族性PDでは最も多いものと思われる<sup>46)</sup>。臨床症状はほぼ孤発性PDと同じであり、発症年齢も多くは50~60歳代である。L-ドーパが有効で、臨床経過も他の家族性PDと比べて比較的良好である。LRRK2は2527アミノ酸からなる分子量286kDaの巨大分子で、細胞質内やミトコンドリアに存在し、種々のドメインを持ち複数の作用を持つことが予想されている<sup>47)</sup>。これまで報告された変異は、MAPキナーゼ-キナーゼ-キナーゼドメイン(MAPKKK)中のものが多く(G2019S, I2020T)<sup>47)</sup>、G2019S変異ではキナーゼ活性の亢進が報告されている<sup>48)</sup>。このため何らかのタンパク質の異常なリン酸化が発症につながっていると思われる。本疾患は病理所見が多彩で、MAPKKKドメインの変異でもG2019S変異ではレビー小体が見られるが<sup>49)</sup>日本の相模原家系のI2020T変異ではみられないことが多く<sup>50)</sup>、病理像を修飾する他因子の関与も疑われる。

## B. 常染色体劣性遺伝

PARK2はparkinを原因遺伝子とする若年性パーキンソンニズムである。本邦で報告され<sup>51)</sup>、かつ原因遺伝子の特定<sup>52)</sup>も行われた。変異は種々のエクソンの欠失や<sup>53)</sup>点変異が報告されている<sup>54)</sup>が、いずれにせよこれらの変異によりユビキチンリガーとしての活性が低下するloss-of-function変異である。孤発性PDと比較して、臨床症状においては、1)40歳以下での発症が大半である、2)ジストニアを呈する、3)症状に日内変動を認める、4)睡眠により改善する、5)L-ドーパが有効であるが早期よりジスキネジアを生じる、6)病理所見ではレビー小体を認めない、といった差異がある。また、parkinがS-ニトロシル化を受けて活性が低下することが報告されており、孤発性PDの発症にも関与していると思われる<sup>55)56)</sup>。このことからparkinの基質蓄積が発症原因のひとつであるとの仮説の元、さまざまなタンパク質の検索が行われた。中でもPael受容体(Parkin-associated endothelin receptor-like receptor)は<sup>57)</sup>、正常な状態でも正しい折りたたみ構造をとることができないものが多く産生されるため(midfoldingしやすい)、parkinによるユビキチン化が低下すると蓄積し、小胞体ストレスを増大させる<sup>58)</sup>。またPael受容体はレビー小体にも存在し、PD発症に大きな役割を果たしていると思われる<sup>59)</sup>。

PARK6はPINK1(PTEN-Induced Kinase)遺伝子の変異による<sup>60)</sup>。30~40代で発症し、臨床症状は孤発性PDと明らかな違いはなくL-ドーパが有効な症例が多いが、より若年での発症においてジスキネジアが多い<sup>61)</sup>。PINK1はミトコンドリアに局在しミトコンドリアターゲットモチーフとセリン/スレオニンキナーゼドメインをもち、前者によりミトコンドリア内に移動し、後者よりミトコンドリアにおいて細胞保護的な役割を果たしていると考えられている<sup>60)</sup>。これまでに報告されている変異はセリン/スレオニンキナーゼドメインに集中しており<sup>60)62)~64)</sup>、キナーゼ活性が低下する。このためPINK1のキナーゼ活性が発症に重要な役割を果たしていると思われるが、ミトコンドリア電子伝達系複合体Iのサブユニットのいくつかが発見されていることが報告されており<sup>65)~68)</sup>、両者の関連がうかがわれる<sup>46)</sup>。PINK1はレビー小体の構成成分であるが、本例でその存在が報告されているのは現在のところヘテロ変異のみである<sup>69)70)</sup>。

PARK7はDJ-1の変異により発症する<sup>71)</sup>。20~40代で発症し、孤発性PD症状に加え下肢のジストニアや眼瞼攣縮、精神症状(認知症症状、不安症、妄想など)を呈し<sup>72)</sup>、L-ドーパが有効である。一部の症例でジスキネジアもみられる<sup>71)</sup>。DJ-1は抗酸化作用<sup>73)</sup>、プロテアーゼ

活性、転写調節因子と種々の働きをもち<sup>74)</sup>、種々の変異が報告されているが、変異により抗酸化作用または酸化ストレスのセンサーとしての働きが失われ<sup>75)</sup>、酸化ストレスが増大してドーパミン神経細胞死がおこると考えられている。またL166P変異でDJ-1蛋白の折りたたみ不全が生じ、すみやかにユビキチン-プロテアソーム系で分解されること<sup>76)</sup>、parkin基質であるPael受容体による小胞体ストレスが野生型DJ-1にて軽減される<sup>77)</sup>ことも合わせると、酸化ストレス以外に想定されるPDの原因への関与も考えられる。DJ-1はレビー小体の構成成分であるが、本例においてレビー小体が存在するかどうかはわかっていない。

PARK9<sup>78)79)</sup>はATP13A2遺伝子の変異を原因とする、Kufor-Rakeb病として知られる。10代で発症し孤発性PDの症状に加え、錐体路障害、上方注視制限、認知症症状を合併する。L-ドーパは有効であるが、進行は早い。ATP13A2はP型ATPase(plasma membraneに存在するATPase)の一種で、正常型はリソソームの膜に発現するが、この疾患で見られる変異型は機能低下を来とし、小胞体に集まり、プロテアソームによる分解を受け、小胞体ストレス増大でのプロテアソーム機能不全、あるいはリソソームでのタンパク分解(オートファジー)低下が神経細胞死の原因となるかどうかは不明であるが、オートファジー不全がPDの発症に関与することを示唆するもので、興味深い知見である。

## C. 遺伝子多型

これまでに種々の遺伝子多型とPDの関連が報告されている。代表的なものとしては遺伝子多型にOmi/HtrA2遺伝子<sup>80)</sup>がある。これはミトコンドリアのプロテアーゼであり、後に変異が発見された(PARK13)<sup>80)</sup>。変異Omi/HtrA2(399番目のグリシンがセリン:G399S)ではプロテアーゼ活性が低下しており、ミトコンドリア機能不全がうかがわれる<sup>80)</sup>。また、 $\alpha$ -synucleinでもイントロンの遺伝子多型と孤発性PDとの関連が報告されており<sup>81)</sup>、splicingの段階での変化も関連しているのかも知れない。

## まとめ

これまでに述べたPDの原因と考えられている環境因子、遺伝的要因についてまとめた(図1)。即ちミトコンドリアにおける電子伝達系や各種酵素やタンパク質の機能不全で酸化的ストレスが増大し、ドーパミン神経細胞のアポトーシスを亢進する(ミトコンドリア仮説)。また異常タンパク質が、ユビキチン-プロテアソーム系が何らかの理由(異常蛋白が構造上分解困難、正常な分

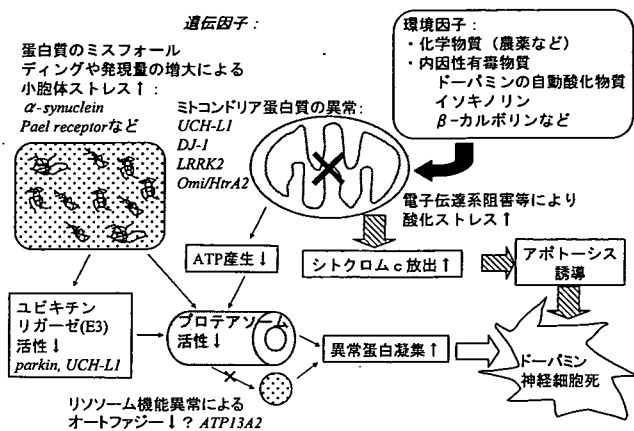


図1 パーキンソン病におけるドーパミン神経細胞死の仮説

解能力を超えて産生される、ミトコンドリア機能低下でATP供給が低下する)で傷害されることで蓄積し細胞毒性を持つ(ユビキチン-プロテアソーム仮説)ことが主な原因と考えられている。また一部、代償的にリソソームで行われるオートファジーの機能不全も関係しているかもしれない。今後、これらの知見をさらに発展させ、根本原因に迫る疾患の予防法や治療法の開発をすすめていくことが期待される。

文 献

- 1) Di Monte DA, Lavasani M, Manning-Bog AB: Environmental factors in Parkinson's disease. *Neurotoxicology* 2002; 4(5): 487-502.
- 2) Martinez-Vicente M, Sovak G, Cuervo AM: Protein degradation and aging. *Exp Gerontol* 2005; 40 (8-9): 622-633.
- 3) Priyadarshi A, Khuder SA, Schaub EA, Priyadarshi SS: Environmental risk factors and Parkinson's disease: a metaanalysis. *Environ Res* 2001; 86 (2): 122-127.
- 4) Uversky VN: Neurotoxicant-induced animal models of Parkinson's disease: understanding the role of rotenone, maneb and paraquat in neurodegeneration. *Cell Tissue Res* 2004; 318 (1): 225-241.
- 5) Kitazawa M, Anantharam V, Kanthasamy AG: Dieldrin-induced oxidative stress and neurochemical changes contribute to apoptotic cell death in dopaminergic cells. *Free Radic Biol Med* 2001; 31 (11): 1473-1485.
- 6) Manning-Bog AB, McCormack AL, Li J, Uversky VN, Fink AL, Di Monte DA: The herbicide paraquat causes up-regulation and aggregation of alpha-synuclein in mice: paraquat and alpha-synuclein. *J Biol Chem* 2002; 277 (3): 1641-1644.
- 7) Betarbet R, Sherer TB, MacKenzie G, Garcia-Osuna M, Panov AV, Greenamyre JT: Chronic systemic pesticide exposure reproduces features of Parkinson's disease. *Nat Neurosci* 2000; 12: 1301-1306.
- 8) Watanabe Y, Himeda T, Araki T: Mechanisms of MPTP toxicity and their implications for therapy of Parkinson's disease. *Med Sci Monit* 2005; 11 (1): RA17-23.
- 9) Blum D, Torch S, Lambeng N, Nissou M, Benabid AL, Sadoul R, et al: Molecular pathways involved in the neurotoxicity of 6-OHDA, dopamine and MPTP: contribu-

tion to the apoptotic theory in Parkinson's disease. *Prog Neurobiol* 2001; 65 (2): 135-172.

- 10) Naoi M, Maruyama W, Dostert P, Ota M, et al: Dopamine-derived endogenous 1 (R), 2 (N)-dimethyl-6, 7-dihydroxy-1, 2, 3, 4-tetrahydroisoquinoline, N-methyl-(R)-salsolinol, induced parkinsonism in rat: biochemical, pathological and behavioral studies. *Brain Res* 1996; 709 (2): 285-295.
- 11) Matsubara K, Kobayashi S, Kobayashi Y, Yamashita K, Koide H, Kimura K, et al: beta-Carbolinium cations, endogenous MPP+ analogs, in the lumbar cerebrospinal fluid of patients with Parkinson's disease. *Neurology* 1995; 45 (12): 2240-2245.
- 12) Matsubara K, Gonda T, Sawada H, Uezono T, Kobayashi Y, Akaike A: Endogenously occurring beta-carboline induces parkinsonism in nonprimate animals: a possible causative protoxin in idiopathic Parkinson's disease. *J Neurochem* 1998; 70 (2): 727-735.
- 13) McMillan G: Is electric arc welding linked to manganese or Parkinson's disease? *Toxicol Rev* 2005; 24 (4): 237-257.
- 14) McNaught KS, Olanow CW: Proteasome inhibitor-induced model of Parkinson's disease. *Ann Neurol* 2006; 60 (2): 243-247.
- 15) Beal F, Lang A: The proteasomal inhibition model of Parkinson's disease: "Boon or bust"? *Ann Neurol* 2006; 60 (2): 158-161.
- 16) Stephen L Hauser: Proteasome inhibitors revisited. *Ann Neurol* 2006; 60 (2): A10.
- 17) Inden M, Kondo J, Kitamura Y, Takata K, Nishimura K, Taniguchi T, et al: Proteasome inhibitors protect against degeneration of nigral dopaminergic neurons in hemiparkinsonian rats. *J Pharmacol Sci* 2005; 97 (2): 203-211.
- 18) Wirdefeldt K, Gatz M, Pawitan Y, Pedersen NL: Risk and protective factors for Parkinson's disease: a study in Swedish twins. *Ann Neurol* 2005; 57 (1): 27-33.
- 19) Ascherio A, Zhang SM, Hernan MA, Kawachi I, Colditz GA, Willett Wc, et al: Prospective study of caffeine consumption and risk of Parkinson's disease in men and women. *Ann Neurol* 2001; 50 (1): 56-63.
- 20) Morens DM, Grandinetti A, Reed D, White LR, Ross GW: Cigarette smoking and protection from Parkinson's disease: false association or etiologic clue? *Neurology* 1995; 45: 1041-1051.
- 21) Kihara T, Shimohama S, Sawada H, Honda K, Nakamizo T, Akaike A: alpha 7 nicotinic receptor transduces signals to phosphatidylinositol 3-kinase to block Aβ-amyloid-induced neurotoxicity. *J Biol Chem* 2001; 276 (17): 13541-13546.
- 22) Liu Q, Zhang J, Zhu H, Qin C, Chen Q, Zhao B: Dissecting the signaling pathway of nicotine-mediated neuroprotection in a mouse Alzheimer disease model. *FASEB J* 2007; 21 (1): 61-73.
- 23) Xie YX, Bezdard E, Zhao BL: Investigating the receptor-independent neuroprotective mechanisms of nicotine in mitochondria. *J Biol Chem* 2005; 280 (37): 32405-32412.
- 24) Suzuki T, Hide I, Matsubara A, Hama C, Harada K, Nakata Y, et al: Microglial alpha7 nicotinic acetylcholine receptors drive a phospholipase C/IP3 pathway and modulate the cell activation toward a neuroprotective role. *J Neurosci Res* 2006; 83 (8): 1461-1470.
- 25) Kalda A, Yu L, Oztas E, Chen JF: Novel neuroprotection by caffeine and adenosine A2A receptor antagonists in animal models of Parkinson's disease.
- 26) Ton TG, Heckbert SR, Longstreth WT Jr, Rossing MA, Kukull WA, Checkoway H: Nonsteroidal anti-inflammatory drugs and risk of Parkinson's disease. *Mov Disord* 2006; 21 (7): 964-969.

- 27) 長谷川一子: その他の遺伝性パーキンソン病家系と遺伝子. 脳の科学 第26巻増刊号 (パーキンソン病のすべて). 星和書店, 東京, 2004, p194-205.
- 28) Polymeropoulos MH, Lavedan C, Leroy E, Ide SE, Dehejia A, Nussbaum RL, et al: Mutation in the alpha-synuclein gene identified in families with Parkinson's disease. *Science* 1997; 276 (5321): 2045-2047.
- 29) Kruger R, Kuhn W, Muller T, Woitalla D, Graeber M, Riess O, et al: Ala30Pro mutation in the gene encoding alpha-synuclein in Parkinson's disease. *Nat Genet* 1998; 18 (2): 106-108.
- 30) Zarranz JJ, Alegre J, Gomez-Esteban JC, Lezcano E, Ros R, de Yebenes JG, et al: The new mutation, E46K, of alpha-synuclein causes Parkinson and Lewy body dementia. *Ann Neurol* 2004; 55 (2): 164-173.
- 31) Chandra S, Gallardo G, Fernandez-Chacon R, Schluter OM, Sudhof TC: Alpha-synuclein cooperates with CSPalpha in preventing neurodegeneration. *Cell* 2005; 123 (3): 383-396.
- 32) Adamczyk A, Kazmierczak A, Strosznajder JB: Alpha-synuclein and its neurotoxic fragment inhibit dopamine uptake into rat striatal synaptosomes. Relationship to nitric oxide. *Neurochem Int* 2006; 49 (4): 407-412.
- 33) Hasegawa T, Matsuzaki-Kobayashi M, Takeda A, Sugeno N, Kikuchi A, Itoyama Y, et al: Alpha-synuclein facilitates the toxicity of oxidized catechol metabolites: implications for selective neurodegeneration in Parkinson's disease. *FEBS Lett* 2006; 580 (8): 2147-2152.
- 34) Spillantini MG, Schmidt ML, Lee VM, Trojanowski JQ, Jakes R, Goedert M: Alpha-synuclein in Lewy bodies. *Nature* 1997; 388 (6645): 839-840.
- 35) Shimura H, Schlossmacher MG, Hattori N, Mizuno Y, Kosik KS, Selkoe DJ, et al: Ubiquitination of a new form of alpha-synuclein by parkin from human brain: implications for Parkinson's disease. *Science* 2001; 293 (5528): 263-269.
- 36) Fujiwara H, Hasegawa M, Dohmae N, Kawashima A, Masliah E, Iwatsubo T, et al: Alpha-Synuclein is phosphorylated in synucleinopathy lesions. *Nat Cell Biol* 2002; 4 (2): 160-164.
- 37) Feany MB, Bender WW: A Drosophila model of Parkinson's disease. *Nature* 2000; 404 (6776): 394-398.
- 38) Fleming SM, Fernagut PO, Chesselet MF: Genetic mouse models of parkinsonism: strengths and limitations. *NeuroRx* 2005; 2 (3): 495-503.
- 39) Singleton AB, Farrer M, Johnson J, Singleton A, Hague S, Gwinn-Hardy K, et al: Alpha-Synuclein locus triplication causes Parkinson's disease. *Science* 2003; 302 (5646): 841.
- 40) Nishioka K, Hayashi S, Farrer MJ, Singleton AB, Mizuno Y, Hattori N, et al: Clinical heterogeneity of alpha-synuclein gene duplication in Parkinson's disease. *Ann Neurol* 2006; 59 (2): 298-309.
- 41) Leroy E, Boyer R, Auburger G, Leube B, Ulm G, Polymeropoulos MH: The ubiquitin pathway in Parkinson's disease. *Nature* 1998; 395 (6701): 451-452.
- 42) Setsuie R, Wang YL, Mochizuki H, Mizuno Y, Noda M, Wada K, et al: Dopaminergic neuronal loss in transgenic mice expressing the Parkinson's disease-associated UCH-L1 I93M mutant. *Neurochem Int* 2007; 50 (1): 119-129.
- 43) Liu Y, Fallon L, Lashuel HA, Liu Z, Lansbury PT Jr: The UCH-L1 gene encodes two opposing enzymatic activities that affect alpha-synuclein degradation and Parkinson's disease susceptibility. *Cell* 2002; 111 (2): 209-218.
- 44) 和田圭司: PARK5 (UCH-L1). 臨床神経科学, 第25巻1号, 中外医学社, 東京, 2007, p75-76.
- 45) Paisan-Ruiz C, Jain S, Evans EW, Gilks WP, Simon J, Singleton AB, et al: Cloning of the gene containing mutations that cause PARK8-linked Parkinson's disease. *Neuron* 2004; 44 (4): 595-600.
- 46) Anthony HV Schapira: Etiology of Parkinson's disease. *Neurology* 2006; 66: S10-S23.
- 47) Mata IF, Wedemeyer WJ, Farrer MJ, Taylor JP, Gallo KA: LRRK2 in Parkinson's disease: protein domains and functional insights. *Trends Neurosci* 2006; 29 (5): 286-293.
- 48) West AB, Moore DJ, Smith WW, Ross CA, Dawson VL, Dawson TM, et al: Parkinson's disease-associated mutations in leucine-rich repeat kinase 2 augment kinase activity. *PNAS* 2005; 102 (46): 16842-16847.
- 49) Giasson BI, Covy JP, Bonini NM, Hurtig HI, Trojanowski JQ, Van Deerlin VM, et al: Biochemical and pathological characterization of Lrrk2. *Ann Neurol* 2006; 59 (2): 315-322.
- 50) 長谷川一子: PARK8 (LRRK2). 臨床神経科学, 第25巻1号, 中外医学社, 東京, 2007, p81.
- 51) Yamamura Y, Sobue I, Ando K, Iida M, Yanagi T: Paralysis agitans of early onset with marked diurnal fluctuation of symptoms. *Neurology* 1973; 23 (3): 239-244.
- 52) Kitada T, Asakawa S, Hattori N, Yokochi M, Mizuno Y, Shimizu N, et al: Mutations in the parkin gene cause autosomal recessive juvenile parkinsonism. *Nature* 1998; 392 (6676): 605-608.
- 53) Hattori N, Kitada T, Kuzuhara S, Nakamura S, Shimizu N, Mizuno Y, et al: Molecular genetic analysis of a novel parkin gene in Japanese families with autosomal recessive juvenile parkinsonism: evidence for variable homozygous deletions in the parkin gene in affected individuals. *Ann Neurol* 1998; 44 (6): 935-941.
- 54) Hedrich K, Eskelson C, Ozelius LJ, Pramstaller PP, Klein C, Kramer P, et al: Distribution, type, and origin of parkin mutations: review and case studies. *Mov Disord* 2004; 19 (10): 1146-1157.
- 55) Chung KK, Thomas B, Troncoso JC, Marsh L, Dawson VL, Dawson TM, et al: S-nitrosylation of parkin regulates ubiquitination and compromises parkin's protective function. *Science* 2004; 304 (5675): 1328-1331.
- 56) Yao D, Gu Z, Nakamura T, Masliah E, Uehara T, Lipton SA, et al: Nitrosative stress linked to sporadic Parkinson's disease. S-nitrosylation of parkin regulates its E3 ubiquitin ligase activity. *PNAS* 2004; 101 (29): 10810-10814.
- 57) Imai Y, Soda M, Inoue H, Hattori N, Mizuno Y, Takahashi R: An unfolded putative transmembrane polypeptide, which can lead to endoplasmic reticulum stress, is a substrate of Parkin. *Cell* 2001; 105 (7): 891-902.
- 58) Takahashi R, Imai Y: Pael receptor, endoplasmic reticulum stress, and Parkinson's disease. *J Neurol* 2003; 250 Suppl3: III25-29.
- 59) Murakami T, Shoji M, Imai Y, Inoue H, Kawarabayashi T, Matsubara E, et al: Pael-R is accumulated in Lewy bodies of Parkinson's disease. *Ann Neurol* 2004; 55 (3): 439-442.
- 60) Valente EM, Abou-Sleiman PM, Caputo V, Dallapiccola B, Auburger G, Wood NW, et al: Hereditary early-onset Parkinson's disease caused by mutations in PINK1. *Science* 2004; 304 (5674): 1158-1160.
- 61) Bonifati V, Rohe CF, Breedveld GJ, Fabrizio E, De Mari M, Oostra BA, et al: Early-onset parkinsonism associated with PINK1 mutations: frequency, genotypes, and phenotypes. *Neurology* 2005; 65 (1): 87-95.
- 62) Valente EM, Salvi S, Ialongo T, Marongiu R, Elia AE, Bentivoglio AR, et al: PINK1 mutations are associated with sporadic early-onset parkinsonism. *Ann Neurol*

- 2004; 56 (3): 336–341.
- 63) Hatano Y, Li Y, Sato K, Asakawa S, Mizuno Y, Hattori N, et al.: Novel PINK1 mutations in early-onset parkinsonism. *Ann Neurol* 2004; 56 (3): 424–427.
- 64) Rohe CF, Montagna P, Breedveld G, Cortelli P, Oostra BA, Bonifati V: Homozygous PINK1 C-terminus mutation causing early-onset parkinsonism. *Ann Neurol* 2004; 56 (3): 427–431.
- 65) Schulenberg B, Aggeler R, Beechem JM, Capaldi RA, Patton WF: Analysis of steady-state protein phosphorylation in mitochondria using a novel fluorescent phosphosensor dye. *J Biol Chem* 2003; 278 (29): 27251–27255.
- 66) Chen R, Fearnley IM, Peak-Chew SY, Walker JE: The phosphorylation of subunits of complex I from bovine heart mitochondria. *J Biol Chem* 2004; 279 (25): 26036–26045.
- 67) Murray J, Marusich MF, Capaldi RA, Aggeler R: Focused proteomics: monoclonal antibody-based isolation of the oxidative phosphorylation machinery and detection of phosphoproteins using a fluorescent phosphoprotein gel stain. *Electrophoresis* 2004; 25 (15): 2520–2525.
- 68) Schulenberg B, Goodman TN, Aggeler R, Capaldi RA, Patton WF: Characterization of dynamic and steady-state protein phosphorylation using a fluorescent phosphoprotein gel stain and mass spectrometry. *Electrophoresis* 2004; 25 (15): 2526–2532.
- 69) Gandhi S, Muqit MM, Stanyer L, Healy DG, Abou-Sleiman PM, Revesz T, et al.: PINK1 protein in normal human brain and Parkinson's disease. *Brain* 2006; 129 (Pt 7): 1720–1731.
- 70) Murakami T, Moriwaki Y, Harigaya Y, Shoji M, Takahashi R, Abe K: PINK1, a gene product of PARK6, accumulates in alpha-synucleinopathy brains. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 2007; Epub ahead of print.
- 71) Bonifati V, Rizzu P, van Baren MJ, Schaap O, Breedveld GJ, Heutink P, et al.: Mutations in the DJ-1 gene associated with autosomal recessive early-onset parkinsonism. *Science* 2003; 299 (5604): 256–259.
- 72) Dekker M, Bonifati V, van Swieten J, Leenders N, Galjaard RJ, van Duijn C, et al.: Clinical features and neuroimaging of PARK7-linked parkinsonism. *Mov Disord* 2003; 18 (7): 751–757.
- 73) Meulener MC, Xu K, Thomson L, Ischiropoulos H, Bonini NM: Mutational analysis of DJ-1 in *Drosophila* implicates functional inactivation by oxidative damage and aging. *PNAS* 2006; 103 (33): 12517–12522.
- 74) Shinbo Y, Niki T, Maita C, Seino C, Iguchi-Ariga SM, Ariga H, et al.: Proper SUMO-1 conjugation is essential to DJ-1 to exert its full activities. *Cell Death Differ* 2006; 13 (1): 96–108.
- 75) Takahashi-Niki K, Niki T, Taira T, Iguchi-Ariga SM, Ariga H: Reduced anti-oxidative stress activities of DJ-1 mutants found in Parkinson's disease patients. *Biochem Biophys Res Commun* 2004; 320 (2): 389–397.
- 76) Olzmann JA, Brown K, Wilkinson KD, Rees HD, Huai Q, Chin LS, et al.: Familial Parkinson's disease-associated L166P mutation disrupts DJ-1 protein folding and function. *J Biol Chem* 2004; 279 (9): 8506–8515.
- 77) Yokota T, Sugawara K, Ito K, Takahashi R, Ariga H, Mizusawa H: Down regulation of DJ-1 enhances cell death by oxidative stress, ER stress, and proteasome inhibition. *Biochem Biophys Res Commun* 2003; 312 (4): 1342–1348.
- 78) Ramirez A, Heimbach A, Grundemann J, Stiller B, Hampshire D, Kubisch C, et al.: Hereditary parkinsonism with dementia is caused by mutations in ATP13A2, encoding a lysosomal type 5 P-type ATPase. *Nat Genet* 2006; 38 (10): 1184–1191.
- 79) Williams DR, Hadeed A, al-Din AS, Wreikat AL, Lees AJ: Kufor Rakeb disease: autosomal recessive, levodopa-responsive parkinsonism with pyramidal degeneration, supranuclear gaze palsy, and dementia. *Mov Disord* 2005; 20 (10): 1264–1271.
- 80) Strauss KM, Martins LM, Plun-Favreau H, Marx FP, Kautzmann S, Kruger R: Loss of function mutations in the gene encoding Omi/HtrA2 in Parkinson's disease. *Hum Mol Genet* 2005; 14 (15): 2099–2111.
- 81) El-Agnaf OM, Curran MD, Wallace A, Middleton D, Murgatroyd C, Jaros E, et al.: Mutation screening in exons 3 and 4 of alpha-synuclein in sporadic Parkinson's and sporadic and familial dementia with Lewy bodies cases. *Neuroreport* 1998; 9 (17): 3925–3927.

## Pathogenesis of Parkinson disease

Hiroki Takeuchi and Ryosuke Takahashi

### Abstract

Although the pathogenesis of Parkinson disease (PD) is still unclear, various studies have uncovered important clues to the cause of the dopaminergic cell death. Accumulating evidence has suggested that both environmental and genetic factors collaborate and cause dopaminergic cell death. Aging, exposure to pesticides, and endogenous toxic agents, such as dopamine derivatives, might induce oxidative stress and lead to neurodegeneration. The studies on familial PD-related genes indicate that impairment of the ubiquitin-proteasome system induces the accumulation of misfolded protein, mainly  $\alpha$ -synuclein, leading to cell death. This review discusses the possible mechanisms, underlying sporadic and familial PD.

**Key words:** *Parkinson disease, Pesticides, Oxidative stress,  $\alpha$ -synuclein, Ubiquitin-proteasome system*

(*Nippon Ronen Igakkai Zasshi* 2007; 44: 415–421)

Graduate School of Medicine, Department of Neurology, Kyoto University

最新医学・第62巻・第7号 (2007年7月号 別刷)

特集 パーキンソン病—最近の進歩—

アプローチ：パーキンソン病の  
病因解明にどう取り組むか

高橋良輔

最新医学社

## アプローチ：パーキンソン病の 病因解明にどう取り組むか

高橋 良輔\*

### 要 旨

パーキンソン病は多系統神経変性を特徴とする全身疾患であることが認識されつつある一方、分子レベルでの病因解明は家族性パーキンソン病研究の進歩によって飛躍的に進展した。発症機構に関して「異常タンパク質の蓄積」と「ミトコンドリア機能障害」の2つの有力な仮説が浮上してきた。これら分子レベルで得られた知見をシステムの理解に結び付ける統合的な視点に立ってパーキンソン病の病態を解明し、治療法開発に結びつけることが重要である。

### はじめに

—パーキンソン病をどう理解するか—

「パーキンソン病は進行性の運動障害を主症状とし、病理学的には黒質緻密層ドパミンニューロンの選択的変性を特徴とする神経変性疾患である」というのが、これまでの教科書的理解であった。ところが、現在その概念は大きく改訂を迫られている。

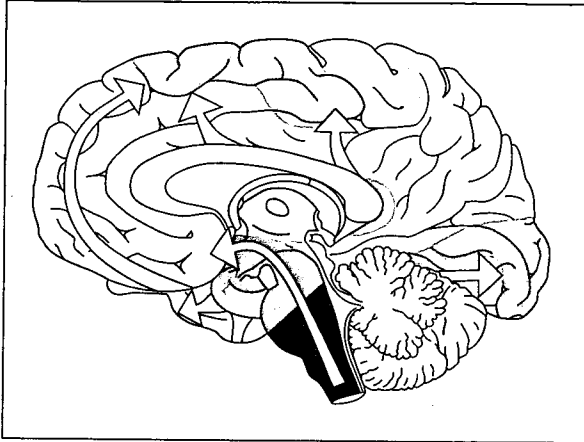
パーキンソン病の病理所見は、細胞が変性脱落するだけでなく後段で詳述するレビー小体という細胞質内の封入体が形成されることが特徴である。ドイツの神経病理学者 Heiko Braak は、レビー小体および関連するレビー神経突起、pale body が形成される部位に着

目し、100例以上のパーキンソン病剖検例を調べた結果、パーキンソン病の初発部位は嗅球、延髄、橋被蓋であり（ステージ1～2）、徐々に上行して橋、中脳に及び（ステージ3～4）、最終的には大脳皮質に至る（ステージ5～6）という仮説を提唱した（図1）<sup>1)</sup>。この Braak の仮説は、多くの臨床家に驚きを与えたというよりも、むしろ得心のいくものであった。パーキンソン病では運動症状の発現に先行してさまざまな非運動症状、すなわち嗅覚障害、睡眠障害、自律神経症状などが生じることが知られていたが<sup>2)</sup>、Braak の仮説において、中脳が障害され運動症状が発現する時期以前のステージ1～2の病巣は、非運動症状に対して見事に説明を与えるものだったのである。さらに進行期における大脳皮質への病巣の進展は、臨床的には認知障害の発現と合致する（井関の稿参照）。まだ仮説として検証されなければならない点が多い

\* 京都大学大学院医学研究科 臨床神経学 教授

キーワード：Braak, 家族性パーキンソン病,  
α-synuclein, ミトコンドリア,  
プロテアソーム



図1 Braakの仮説(文献<sup>1)</sup>より改変引用)

パーキンソン病の病変(レビー小体の形成)は下位脳幹から始まり,上行して中脳に至り,最終的には大脳皮質に到達する。詳細は本文参照。

とはいえ, Braak の功績により, パーキンソン病は多系統変性疾患であることが見直されようとしている。

また, パーキンソン病では心臓の meta-iodobenzylguanidine (MIBG) 集積が特異的に低下することが主として日本のグループにより明らかにされ, 心臓交感神経の脱神経がその病理学的根拠であることが織茂智之らにより示された(織茂の稿参照)<sup>3)</sup>。この事実は, パーキンソン病が中枢神経のみならず末梢神経をも障害する全身病であることを意味する。

「運動症状を主徴とする疾患」から「睡眠障害や認知障害も来す疾患」へ, また「中脳黒質ドパミンニューロンの病気」から「全身病」へと, 概念のうえで複雑さを増したかに見えるパーキンソン病の病因解明に, 我々はどう立ち向かえば良いのだろうか?

#### パーキンソン病をシステムの疾患として理解する

神経系を他の多くの臓器と分けるものは, 階層性(レベル)の存在である。神経系は異なる分子の構成により, 異なる性質を持つニューロンが生まれる。次にニューロン同士の結合によって神経回路が形成され, さまざ

まな高次神経機能の発現が可能になる。機能の理解において分子, 細胞, 神経回路(またはシステム)レベルの階層的な理解が必要なのと同様, 疾患の理解においても階層別の考え方は重要である。神経疾患の中で, パーキンソン病は特に階層別の理解が治療にも有効な疾患であることが, これまでも示されてきた。ドパミンニューロンの変性脱落が起きるという細胞レベルの理解は, L-DOPA, ドパミン作動薬の開発に結びついた。また大脳基底核の運動回路の解明は, 定位脳破壊術, そして深部脳刺激術への道を開いた(三輪, 深谷の稿参照)。ドパミンニューロンおよび関与する神経回路以外に原因のある非運動症状に関しても, 分子からシステムレベルの階層的な理解の努力が有効であると考えられる。

ここからは, 分子・細胞レベルでの病因解明へのアプローチに焦点を絞る。このレベルでの最も有効なアプローチは, これまでの研究史を振り返ると遺伝子からのアプローチではないかと思われる。

#### 遺伝子からのアプローチ

パーキンソン病はほとんどの場合孤発性疾患であるが, 5~10%の症例は家族性である。現在まで遺伝的危険因子も含めてパーキンソン病の病因または関連遺伝子として PARK1 から 13 までの遺伝子座が同定されており, これらのうちメンデルの法則に従う単一遺伝子疾患の病因遺伝子として7つの遺伝子が同定されている(表1)<sup>4)</sup>。遺伝性疾患の研究が孤発性疾患の理解に役立つかどうかは議論のあるところであるが, 他の神経変性疾患でも遺伝性から孤発性へというアプローチは成功を収めてきた。最も良い例はアルツハイマー病である。孤発性に比べると非常にまれな家族性アルツハイマー病の病因遺伝子として, amyloid precursor protein (APP) や presenilin が同定された。これらは, 孤発性アル

表1 家族性パーキンソン病の分類

	遺伝子座	遺伝子	遺伝形式
• PARK1	4q21-22	$\alpha$ -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	?	遺伝的危険因子
• PARK11	2q36-37	?	遺伝的危険因子
• PARK12	Xq21-q25	?	遺伝的危険因子
• PARK13	2p12	Omi/HtrA2	遺伝的危険因子

AD：常染色体優性，AR：常染色体劣性

他の略語：巻末の「今月の略語」参照

ツハイマー病の病因に深くかかわる分子であることが判明したばかりでなく、治療のターゲットとしても注目され、現在のアルツハイマー病研究の中心となっている。

同じことがパーキンソン病に関しても期待され、事実、家族性パーキンソン病の病因遺伝子の研究はパーキンソン病の研究にブレークスルーをもたらした。以下に重要な遺伝子について概観する。詳細に関しては武田、野田、山下、有賀、久保の稿を参照されたい。

### 1. $\alpha$ -synuclein

$\alpha$ -synuclein は 140 アミノ酸の神経末端に豊富に存在する神経特異的なタンパク質であるが、生理的役割はまだ明らかでない。1997年、53番目のアラニンがトレオニンに変わるミスセンス変異が常染色体優性遺伝性パーキンソン病の原因となることが明らかになった。その後、別の2種類のミスセンス変異がパーキンソン病責任遺伝子として同定されている。これらは世界に数家系しかないと言われるまれな変異であるが、この発見がパーキンソン病研究にかつてない大きなインパクト

を与えた。 $\alpha$ -synuclein がレビー小体の主要構成成分であることが、レビー小体を単離してプロテオミクスのアプローチでその成分を同定しようとしていた岩坪 威らの研究などによって明らかになったのである<sup>5)</sup>。さらに $\alpha$ -synuclein の遺伝子重複変異でもパーキンソン病になることが判明し、アミノ酸変異がなくとも量が増加するだけでパーキンソン病が発症する点から、 $\alpha$ -synuclein は孤発性パーキンソン病の原因を説明しうる分子と見なされている。また戸田達史らによって $\alpha$ -synuclein が孤発性パーキンソン病の遺伝的危険因子になることも示された<sup>6)</sup>。現在孤発性パーキンソン病は「 $\alpha$ -synuclein 蓄積病」との見方が有力である。事実、 $\alpha$ -synuclein の過剰発現によるパーキンソン病動物モデルの作製が行われ、ある程度の成功を収めている。これまで10種類以上の $\alpha$ -synuclein トランスジェニックマウスが作製され、封入体形成、ドパミン神経終末の変性など、一部の症状を再現できるモデルが発表されている。また、ショウジョウバエで $\alpha$ -synuclein を過剰発現すると、ドパミン神経選択的細胞死

がレビー小体様の封入体形成を伴って生じ、パーキンソン病の良いモデルになることが分かった。 $\alpha$ -synuclein でなぜ細胞死が起こるのかについては、プロトフィブリルという毒性の強い異常構造物になるという説<sup>7)</sup>や、プロテアソームを阻害するという説<sup>8)</sup>など諸説あるが、まだ決着していない。

## 2. Parkin

*Parkin* は、常染色体劣性若年性パーキンソン症 (AR-JP または PARK2) の原因遺伝子として、1998 年水野美邦、清水信義らのグループによって単離された。その後、*Parkin* の機能はユビキチン・プロテアソーム系で重要な役割を果たすユビキチンリガーゼであることが分かった。ユビキチン・プロテアソーム系は不要になった異常構造タンパク質や短寿命のタンパク質を分解する主要なタンパク質分解系であり、ユビキチンが鎖状につながったポリユビキチン鎖が分解のシグナルの役割を果たし、プロテアソームという巨大なタンパク質分解酵素複合体に認識される。多くのユビキチンリガーゼの機能は、分解されるべきタンパク質にポリユビキチン鎖を付加してそのプロテアソームによる分解を促進することにある。*Parkin* が機能を失う AR-JP では、したがってその基質が蓄積して神経変性が生じるというシナリオが最も考えられる。*Parkin* の基質候補として、現在までに十数種類の分子が同定されている<sup>9)</sup>。しかしながら *Parkin* ノックアウトマウスでは神経変性は全く生じない。どの分子も明確には *Parkin* ノックアウトマウスで蓄積は証明されておらず、その意味ではまだどの基質の蓄積が変性の原因かは不明である。ただ、ミスフォールド化した Pael 受容体は蓄積によって小胞体ストレスを引き起こし、細胞死を誘発するというメカニズムが示されている点で注目すべき基質である。最近我々は、

Pael 受容体トランスジェニックマウスと *Parkin* ノックアウトマウスの掛け合わせによって慢性的に小胞体ストレスが誘発され、緩徐進行性のカテコールアミン神経 (ドパミン神経およびノルアドレナリン神経) 選択的変性が生じるモデルを確立した。このマウスは AR-JP の新たなモデルとなる可能性がある。一方最近、*Parkin* は *in vitro* ではもっぱらモノユビキチン化を媒介するリガーゼであることが示されており、タンパク質分解機能との関係が注目されている<sup>10)</sup>。

## 3. その他のパーキンソン病関連遺伝子<sup>11)</sup>

常染色体劣性パーキンソン病である PARK6 の原因遺伝子として同定された *PINK1* は、ミトコンドリアに局在するタンパク質キナーゼである。PARK6 は臨床症状からは *Parkin* の変異を原因とする PARK2 と鑑別できない。モデル動物での検討では、*Parkin* も *PINK1* もノックアウトマウスではほとんど無症状であるが、驚くべきことにショウジョウバエで *Parkin*, *PINK1* の欠損は全く同じ表現型を示すことが判明した<sup>12)</sup>。両者とも筋肉と精子のアポトーシス様変性を生じ、超微形態的にはミトコンドリアの形態異常を引き起こすのである。ドパミン神経変性の有無は報告によって異なるが、あっても軽微と考えられる。さらに見かけ上の類似性だけでなく、*PINK1* 変異ショウジョウバエの表現型は *Parkin* 過剰発現で消失するが、その逆は起こらないこと、*PINK1* と *Parkin* のダブルノックアウトで表現型が増悪しないことから、ショウジョウバエではこれら2つの遺伝子が同じシグナル伝達経路上で細胞変性を防御する役割を担っており、*PINK1* が *Parkin* の上流に位置することが明らかになった。ヒトでも欠損の表現型が全く同じであることから、*PINK1* と *Parkin* の関係は保存されている可能性がある。しかしながら、

ミトコンドリアのタンパク質キナーゼである PINK1 と、主として細胞質のユビキチンリガーゼである Parkin が、どのように機能相関しているのかは全く不明である。

最近パーキンソン病との関係で注目されているミトコンドリアタンパク質は、Omi/HtrA2 である。Omi はミトコンドリアから放出され、細胞死を促進する作用があることを我々が見いだしたセリンプロテアーゼである<sup>13)</sup>。ところが、遺伝的変異によって Omi の酵素活性が失われているマウスでは、生後数週間で線条体ニューロンの変性が起こり、パーキンソニズムを呈して死亡することが明らかになった。また、孤発性パーキンソン病患者で Omi の酵素活性が低下する変異が有意に多く見つかることが分かり、Omi は PARK13 の遺伝子として認定されている。Omi の変異ではおそらく基質が分解されなくなることが神経変性の原因になることが予想されるので、基質の同定が重要な課題である。

PARK7 の原因遺伝子となる DJ-1 は多機能タンパク質であり、酸化還元依存的なシャペロン機能で細胞防御的に機能しているものと推測されている。DJ-1 はほとんどは細胞質にあるが、一部はミトコンドリアに局在すると言われている。

上記以外では、常染色体優性の PARK8 の原因遺伝子が LRRK2 というタンパク質キナーゼであり、変異タンパク質ではキナーゼ活性が亢進していることが報告された。LRRK2 は欧米では孤発性パーキンソン病の 1~2% を占めることが報告され、その点で注目を集めている。また、PARK9 という特殊なタイプの家族性パーキンソン病の原因遺伝子として、ATP13A2 というトランスポーター様のリソソームタンパク質が同定されたが、メカニズムに関してはまだほとんど分かっていない<sup>14)</sup>。

このように見ていくと、最近同定された家族性パーキンソン病原因遺伝子の多くは、ミトコンドリア機能障害とパーキンソン病の関係を示唆するものが多い。実は、ミトコンドリアは従来からパーキンソン病患者検体の検討や毒物によるパーキンソン病モデルで、病因との関係が注目されてきた。

#### 患者検体、毒物からのアプローチ<sup>15)</sup>

ミトコンドリア電子伝達系の複合体 I は、パーキンソン病患者の筋、脳、血小板で活性が低下していることが示されているが、原因か結果かが判然としなかった。複合体 I の活性低下をパーキンソン病の原因と結びつける考えは、ロテノン、MPTP などの神経毒がパーキンソン病を引き起こす事実によって多くの研究者にインパクトを与えるようになった。MPTP は、代謝産物の MPP<sup>+</sup> がドパミントランスポーターによってドパミン神経に取り込まれることで選択毒性を発揮し、複合体 I を阻害し、活性酸素種 (ROS) の産生を上昇させて毒性を発揮する。封入体は形成しないが、ドパミン神経選択的毒性に優れるため、MPTP はパーキンソン病モデル動物作製の主流となってきた。ロテノンはマメ科植物の根から得られる天然化合物由来の農薬であるが、慢性投与によりミトコンドリア電子伝達系複合体 I を阻害してラットにパーキンソニズムを引き起こし、黒質ドパミン神経の減少と細胞質内にレビー小体に似た封入体が形成される<sup>7)</sup>。MPTP モデルでは封入体形成が見られないことを考えると、ロテノンはよりパーキンソン病に近い毒物モデルとして有用なものと思われる。農薬とパーキンソン病の関係を示唆する疫学調査の報告もあり、環境要因としてロテノンまたはその類似化合物がパーキンソン病発症にかかわる可能性も指摘されている。

一方、家族性パーキンソン病の研究でユビ