

厚生労働科学研究費補助金
こころの健康科学研究事業

パーキン蛋白の機能解析と治療法の開発

平成 19 年度 総括研究報告書

主任研究者 服部 信孝

分担研究者 田中 啓二
高橋 良輔
澤田 誠

平成 20 (2008) 年 3 月

目次

I. 総括研究報告	
パーキン蛋白の機能解析と治療法の開発 服部 信孝	3
II. 分担研究報告	
1. パーキン蛋白の機能解析と治療法の開発 服部 信孝	7
2. パーキンノックインマウス作製・解析 田中 啓二	13
3. パーキンソン病におけるパエル受容体の役割 高橋 良輔	17
4. ミクログリアの毒性転換とオートファジー細胞死誘導に関する研究 澤田 誠	20
III. 研究成果の刊行に関する一覧表	27
IV. 研究成果の刊行物・別刷	37

厚生労働科学研究費補助金(こころの健康科学研究事業)

総括研究報告書

パーキン蛋白の機能解析と治療法の開発

主任研究者: 服部 信孝 順天堂大学医学部 神経学講座教授

研究要旨

遺伝性パーキンソン病 (FPD)は、単一遺伝子異常で発症することから、その病態解明は選択的黒質神経変性解明にヒントを我々に与えてくれることが予想される。孤発型パーキンソン病(SPD)の原因究明に繋がると考えられている。Parki2の原因遺伝子 parkin は、その中で最も頻度が高く、世界中に分布する。そしてPark2は、青斑核の変性は極めて軽く選択的ドパミン神経変性のモデルとなる。また、病理学的検討では、一般にレビー小体形成が存在せず、正常パーキン蛋白が、存在することが形成上必須因子であると言える。従ってパーキン蛋白の機能解明は黒質選択的細胞死の機序を考える上で重要なヒントを与えてくれる。本研究課題の目的は、パーキン遺伝子変異に伴うPark2の病態を解明し、更には孤発型PDの病態を明らかにすることにある。更に parkin を中心とした遺伝子産物のネットワーク形成を検討することで黒質神経変性の発症機序解明に応用する。また既知の遺伝子変異スクリーニングを行いながら新規遺伝子座にマップされる家系の発掘を行い、原因遺伝子の単離・同定を目指した。

平成19年度は、パーキンノックアウトマウスの解析を行い、in vivo autographyによる解析に加えてIn vivo voletametryによるreal timeによる解析を行った。その結果、parkin KO miceでは、表現型ほぼ正常であるものの、ドパミン遊離異常を見出した。現在、parkinを組み込んだAdeno-associated vectorを準備しており、臨床応用に向けた基礎固めが出来た。Parkin Tgマウスを確立し、脳内発現の高いlineでは海馬の神経脱落が観察された。

FPDの遺伝子産物がタンパク分解系に関与することから黒質神経変性におけるプロテアソーム活性の低下の関与が指摘されている。事実、多くの神経変性疾患では残存細胞に核内或いは細胞質内封入体を形成することからプロテアソーム活性の低下が細胞死に与える影響に関する検討は重要である。そこで我々は、プロテアソームの形成に必要な分子集合因子PAC1を中枢神経特異的に欠損したマウスを作製した。そのマウスは、小脳の構造異常が起こり、発育障害、振戦、運動障害などを伴った神経変性疾患が発症した。この結果、プロテアソームの機能不全が神経変性疾患の発症に関与することが初めて判明した。プロテアソームと神経変性の関係を解析するために我々の研究室で作製したプロテアソームの形成に必要な分子集合因子PAC1(Proteasome Assembly Chaperone 1)のコンディショナルノックアウトマウスを各種神経細胞特異的なトランスジェニック(Tg)マウスと交配して神経細胞特異的にプロテアソームを低減させたマウスを作出すると、各種神経系におけるプロテアソームの役割が解明できる。パーキンの基質候補であるパエル受容体(Pael-R)を過剰発現するトランスジェニックマウスとPael-Rノックアウトマウスを作製し、それぞれ脳内ドーパミンとその代謝産物が増加、減少し、それに伴って、行動学的にはhyperactive、hypoactiveとなったことから、Pael-Rは生理的にはドーパミン代謝に関与していると考えられた。一方、家族性パーキンソン病PARK6の原因遺伝子PINK1の結合タンパク質としてHsp90とそのcochaperoneであるcdc37を見出し、これらがPINK1のタンパク質としての安定性に寄与していることを明らかにした。、あた parkin は、pINK1の安定性に関与していることが分った。臨床的にも類似性の高いこの劣性遺伝性の遺伝子産物が、共通カスケードを形成している可能性が高い。

中枢神経系には、神経細胞のみならずグリア細胞も存在する。近年、このneuron-glia crosstalkの重要性が注目されている。そのような点から特にマイクログリアの機能解析は重要であると言える。マイクログリアの毒性転換モデルの解析から毒性転換にかかわる細胞表面上のタンパク質に絞りSST-REX法を行ってTREM-2b遺伝子を単離した。この遺伝子産物はリガンド未解明の受容体でこの分子がマイクログリアの毒性転換にかかわっていることを証明するためSSTクローンを使った刺激抗体・抑制抗体を分離することを行っている。また、マイクログリアがNOを産生してグリオーマ細胞にオートファジー細胞死を誘導することを見出した。

A. 研究目的

常染色体劣性若年性パーキンソン病 (AR-JP) の原因遺伝子であるパーキンソン遺伝子とその遺伝子産物パーキンソン蛋白の機能解析を推進し、本症における黒質神経細胞死の機序を分子レベルで解明することを目的とする。またパーキンソン遺伝子陰性例が少なからず存在することが明らかにされ、PINK1(PARK6), DJ-1 (Park7), ATP13A2(Park9) が劣性遺伝性 FPD の原因遺伝子として、SNCA, multiplication of SNCA, Lrrk2 が優性遺伝性 FPD の原因遺伝子として単離された。劣性 FPD は loss-of-function 効果で発症し、優性 FPD は gain-of function 効果で発症することが予想される。しかしながら近年のデータからは、これら遺伝子産物が共通機構を形成している可能性が推定されている。このことは個々の遺伝子機能解析は、この共通機序に関連していることが推定されることから一気に変性機序解明に繋がる可能性が高い。本課題では、最も変異頻度の高い parkin の機能解析から孤発型 PD の病態解明の戦略となると考えている。更に本課題では、グリア、神経細胞との crosstalk について解析し、parkin の機能は神経細胞優位なのかグリア優位に作用しているのかは依然不明である。その基礎的な検討も行う。

B. 研究方法

研究課題を遂行するために、次の 4 名よりなる研究グループを組織した。主任研究者：服部信孝 (順天堂大学医学部神経学・老人性疾患病態治療研究センター)、分担研究者：田中啓二 (東京都臨床医学研究所)、高橋良輔 (独立行政法人理化学研究所脳科学総合センター)、澤田誠 (名古屋大学環境医学研究所) である。

各研究者の研究分担は次の通りである。

服部信孝：パーキンソン遺伝子と既知の遺伝子産物

の機能解析、新規原因遺伝子の同定・単離。

田中啓二：PAC ノックアウトマウスの作成。部位特異的プロテアソーム欠損マウスの作成。正常 parkin の局在。

高橋良輔：パエル受容体の機能解析。

澤田誠：神経変性疾患でのマイクログリアの毒性転換のメカニズムに関する研究。

研究方法の詳細については、各研究者の分担研究報告書を参照されたい。本年度は、次に示す研究成果が得られた。

C. 研究成果

1) Parkin KO mice and TG mice の解析

既に parkin KO mice では行動学的変化は存在しないが、in vivo voltametry ではドパミンの遊離低下が観察された。一方、Tg mice では、脳に高発現すると海馬の神経脱落が観察された。新奇基質に関しては LMO3 を同定した。この分子は、KO mice でも増加が観察された。

2) Parkin と PINK1 との関連性

parkin の存在下では、PINK1 の安定性が増すことが pulse chase で分かった。変異型では、安定性は消失することが示された。全ての変異型で同様に安定性を欠いていた。この現象は parkin 変異症例と KO mice でも確認された。

3) ATP13A2 (Park9) の機能解析

既報では、欠失型の機能解析があり、変異型では ER に留まり、lysosome に移行できないことが疾患発症に関わっていることが指摘されているが、我々が見出した点変異でも同様に ER から lysosome への移行が出来ないことが分かった。遺伝形式が劣性であることから ER ストレスに伴うものは考えにくくこの局在変化が loss-of-function 効果を生んでいる可能性が考えられた。SNCA の duplication の家系が少なくとも 8 家系存在してい

ることが分かった。その家系のうち、1症例について剖検が得られたので詳細な神経病理学的検討を行った。その結果 multiple system atrophy (MSA)に特徴的な glial cytoplasmic inclusions (GCI)が観察された。

4)新規遺伝子座の同定

鹿児島在住の1家系(8人兄妹で3人の発症)における連鎖解析を行った。その結果、常染色体XX番に連鎖が確認された。その部位に存在する2種類の遺伝子に変異が認められた。更に他の家系での変異の有無を検討している。

5)パーキンソックインマウスの脳を対照としてパーキンの分布を厳格に生化学的方法で再検討した結果、パーキンは一部が膜画分に存在するものの大部分が細胞質に存在することが判明した。

6)プロテアソームの形成に必須な分子集合因子PAC1を中枢神経特異的に欠損したマウスを作製したところ小脳の構造異常が起こり、発育障害、振戦、運動障害などを伴った神経変性疾患が発症した。この結果、プロテアソームの機能不全が神経変性疾患の発症に関与することが初めて判明した。

7)パエル受容体(Pael-R)は家族性パーキンソン病AR-JPの病因遺伝子でユビキチンリガーゼであるParkinの基質タンパク質である。Pael-Rを過剰発現するトランスジェニックマウスとPael-Rノックアウトマウスを作製し、それぞれ脳内ドーパミンとその代謝産物が増加、減少し、それに伴って、行動学的にはhyperactive、hypoactiveとなったことから、Pael-Rは生理的にはドーパミン代謝に関与していると考えられた。

8)家族性パーキンソン病PARK6の原因遺伝子PINK1の結合タンパク質としてHsp90とそのcochaperoneであるcdc37を見出し、これらがPINK1のタンパク質としての安定性に寄与していることを明らかにした。MBP融合パーキンをE1, E2(Ubc7,

UbcH7, Uev1/Ubc13)存在下でユビキチンと共に保温したとき、強い自己ユビキチン化活性が複数のバンドとして検出された。このユビキチン化はGST-ユビキチンを用いた場合の高分子量側へのバンドシフトで実証できた。In-frameでパーキンに融合した

9)ミクログリアの毒性転換モデルの解析から毒性転換にかかわる細胞表面上のタンパク質に絞りSST-REX法を行ってTREM-2b遺伝子を単離した。この遺伝子産物はリガンド未解明の受容体でこの分子がミクログリアの毒性転換にかかわっていることを証明するためSSTクローンを使った刺激抗体・抑制抗体を分離することを行っている。

10)ミクログリアがNOを産生してグリオーマ細胞にオートファジー細胞死を誘導することを見出した。

D. 考察と結論

劣性遺伝性FPDであるpark2, 6は臨床的に類似性の高い臨床型である。その原因遺伝子parkinとPINK1が共通機構を形成していることが分かった。ParkinがPINK1の安定性に関与している可能性が示された。またSNCAのduplicationの解析からSNCAの発現増加がPDの発症と認知症の発現に関与していることがPETや神経病理学的解析から明らかにされた。興味深いことに神経病理学的検討でSNCAのduplicationの症例にGCIsが観察されたことから、MSAもまたSNCAの高発現による可能性が推定された。

PAC欠損マウスの解析からプロテアソームの欠損により神経変性が惹起されることが分かった。次年度は黒質選択的にプロテアソーム欠損マウスを作成し、プロテアソームの活性が神経変性に直結するの可否かを検討する。

パエル受容体に関しては、TgとKOの2種の遺伝子改変モデルを作製し、それぞれ脳内ドーパミンとその代謝産物が増加、減少し、それに伴って、行動学的にはhyperactive、hypoactiveとなったことから、Pael-Rは生理的にはドーパミン代謝に関与していると

考えられた。このことはパエル受容体 Tg mce では、ドパミンの遊離低下の可能性が間接的に示された。

グリアの機能解析については、前段階として脳内における機能について検討した。マイクログリアは神経保護的であったり神経毒性を示したりと二面性がある。その毒性転化に関わる候補として TREM-2b 遺伝子を同定した。またグリアの細胞死にオートファジー死が関与している可能性も示された。今後は、FPD におけるマイクログリアの関与について検討する予定である。

E. 研究発表

分担研究報告書並びに研究成果の刊行に関する一覧参照。

厚生労働科学研究費補助金(こころの健康科学研究事業)

分担研究報告書

パーキン蛋白の機能解析と治療法の開発

主任研究者:服部 信孝 順天堂大学医学部 神経学講座 教授

研究要旨

遺伝性パーキンソン病 (FPD)は、単一遺伝子異常で発症することから、その病態解明は孤発型パーキンソン病(SPD)の原因究明に繋がると考えられている。その中で最も頻度が高く、世界中に分布するタイプとしてパーキン遺伝子変異による Park2 は、青斑核の変性は極めて軽く選択的ドパミン神経変性のモデルとなる。また、病理学的検討では、一般にレビー小体形成が存在せず、正常パーキン蛋白が、存在することが形成上必須因子出ることが想定されている。従ってパーキン蛋白の機能解明は黒質選択的細胞死の機序を考える上で重要なヒントを与えてくれる。本研究課題の目的は、パーキン遺伝子変異に伴う Park2 の病態を解明し、更には孤発型 PD の病態を明らかにすることにある。更に既知の遺伝子変異スクリーニングを行いながら新規遺伝子座にマップされる家系の発掘を行い、原因遺伝子の単離・同定を目指した。平成 19 年度は、パーキンノックアウトマウスの解析を主に行った。パーキンノックアウトはエクソン 2, 3 の二種を作製したが、表現型ほぼ正常であり、組織学的にも細胞脱落は認めなかった。一方で、in vivo autoradiography による解析で、ドパミン遊離異常を見出した。懸案だったパーキンの Tg マウスの作成に成功した。脳にパーキンの発現が高いと海馬を中心とした細胞脱落が観察された。先にパーキンが PINK1 の安定性に関与していることが分かっているが、PINK1 はむしろパーキンの分解に関与していることが推定された。従って Tg マウスの結果と併せて両分子は厳密に制御されている可能性が考えられた。またパーキンの新奇基質候補として LMO 分子を見出した。特に LMO3 は神経細胞腫に関わることが分かっており、Park2 がドパミン神経細胞選択性の高いことから、この分子との関連性は興味深い。また In voltametry を使った real time のカテコラミンの放出では、やはり放出低下が観察された。この現象は有意差を持って差異が認められたので、パーキンを組み込んだ AAV を遺伝子治療として行う準備が整った。今放出低下が遺伝子 replacement therapy による改善されれば、人への臨床応用が可能となる。他の遺伝子産物の機能解析に関しては、 α -シヌクレイン(SNCA)、PINK1, DJ-1, LRRK2 そして Park9 の遺伝子産物 ATP13A2 について検討を行った。SNCA に関しては遺伝子コピーの多い duplication の優性遺伝性 PD の家系が少なくとも8家系存在した。このタイプの家系では、浸透率が低く約 33-50%であった。つまり未発症キャリアの存在がはっきりした。この未発症者と発症者の違いが分かれば今後の新奇薬物治療の開発が可能となる。非運動症状である REM Sleep Behavior Disorder (RBD)や嗅覚障害の有無を検討したが、違いは認められなかった。一方、発症者においては、認知症の発現有無に関係なく glucose を用いた PET による解析では、全例、後頭葉の代謝低下が認められた。このことは、認知症の発現に SNCA の発現に関与していることが推定された。

新奇遺伝子の同定に関しては遺伝子変異スクリーニングの過程で、劣性遺伝性の late-onset PD がやはり西日本を中心に分布していることが分かった。現在連鎖解析を行い遺伝子座を1カ所に決定し、2個の候補遺伝子まで絞り込みができた。1家系のみのでデータであるので今後症例数を増やして追加症例の有無を検討する。

A. 研究目的

常染色体劣性若年性パーキンソニズム (AR-JP) の原因遺伝子であるパーキン遺伝子とその遺伝子産物パーキン蛋白の機能解析を推進し、本症における黒質神経細胞死の機序を分子レベルで解明することを目的とする。またパーキン遺伝子

陰性例が少なからず存在することが明らかにされ、PINK1(PARK6)、DJ-1 (Park7)、ATP13A2 (Park9) が、劣性遺伝性 PD の原因遺伝子として、また SNCA の duplication (multiplication)、Lrrk2 は優性遺伝性 PD の原因遺伝子として単離・同定された。これら遺伝子産物の共通機序としてタンパク

分解系の関与が推定されている。事実、parkin は ubiquitin-proteasome pathway、ATP13A2 は autophagy-lysosomal pathway の直接的分子として関与していることが判明している。更に Lewy 小体の主要構成成分である SNCA の過剰発現系の優性遺伝性 PD も明らかにされた。Duplication の範囲は、個々の症例で異なるが何れの症例も SNCA を含んでおり、この分子の発現増加が発症に関わることが推定される。SNCA の点変異症例が SNCA の分解低下で発症することが推定されており、SNCA の蓄積そのものが重要な鍵を握っていることが分かっている。本課題では、パーキン蛋白の機能解明のみならず遺伝性 PD の遺伝子産物機能の機能解析から共通カスケードを明らかにすることも視野に入れている。

B. 研究方法

服部信孝: パーキンタンパクの機能解析、既知の遺伝性 PD の遺伝子産物の機能解析。常染色体劣性晩発性 PD の新奇原因遺伝子の同定・単離。

1) Parkin KO and Tg mice の解析

Yeast two hybrid 法による parkin 結合分子の探索。

2) Parkin と PINK1 の相互作用の検討

i) FRET による結合の有無

ii) Pulse chase による分解の経時的変化の検討。

3) 他の既知遺伝子の機能解析

4) 新奇常染色体劣性晩発性 PD の遺伝子座及び原因遺伝子の同定。

C. 研究成果

1) Parkin KO mice and TG mice の解析

既に parkin KO mice では行動学的変化は存在しないが、in vivo voltametry ではドパミンの遊離低

下が観察された。一方、Tg mice では、脳に高発現すると海馬の神経脱落が観察された。新奇基質に関しては LMO3 を同定した。この分子は、KO mice でも増加が観察された。

2) Parkin と PINK1 との関連性

parkin の存在下では、PINK1 の安定性が増すことが pulse chase で分かった。変異型では、安定性は消失することが示された。全ての変異型で同様に安定性を欠いていた。この現象は parkin 変異症例と KO mice でも確認された。

3) ATP13A2 (Park9) の機能解析

既報では、欠失型の機能解析があり、変異型では ER に留まり、lysosome に移行できないことが疾患発症に関わっていることが指摘されているが、我々が見出した点変異でも同様に ER から lysosome への移行が出来ないことが分かった。遺伝形式が劣性であることから ER ストレスに伴うものは考えにくくこの局在変化が loss-of-function 効果を生んでいる可能性が考えられた。SNCA の duplication の家系が少なくとも 8 家系存在していることが分かった。その家系のうち、1 症例について剖検が得られたので詳細な神経病理学的検討を行った。その結果 multiple system atrophy (MSA) に特徴的な glial cytoplasmic inclusions (GCI) が観察された。

4) 新規遺伝子座の同定

鹿児島在住の 1 家系 (8 人兄妹で 3 人の発症) における連鎖解析を行った。その結果、常染色体 XX 番に連鎖が確認された。その部位に存在する 2 種類の遺伝子に変異が認められた。更に他の家系での変異の有無を検討している。

パエル受容体 (Pael-R) は家族性パーキンソン病 AR-JP の病因遺伝子でユビキチンリガーゼである Parkin の基質タンパク質である。Pael-R を過剰発現

するトランスジェニックマウスと Pael-R ノックアウトマウスを作製し、それぞれ脳内ドーパミンとその代謝産物が増加、減少し、それに伴って、行動学的には hyperactive、hypoactive となったことから、Pael-R は生理的にはドーパミン代謝に関与していると考えられた。一方家族性パーキンソン病 PARK6 の原因遺伝子 PINK1 の結合タンパク質として Hsp90 とその cochaperone である cdc37 を見出し、これらが PINK1 のタンパク質としての安定性に寄与していることを明らかにした。

D. 考察と結論

Parkin KO mice では、行動異常は認めなかったが、in vivo voltmetry ではドーパミンの遊離低下が観察された。このことは in vivo autoradiography による解析結果と同様であった。Parkin Tg mice では、脳の発現の高い 2 lines を得ることができた。病理学的には海馬に細胞脱落が観察された。Parkin と PINK1 に関しては、parkin が PINK1 の安定性に関連していることが分かった。この現象は、KO mice や parkin 変異を持つ剖検脳でも確認されている。興味深いことに PINK1 は parkin を分解していることが観察され、この両分子は相互作用を示し、量的に制御されていることが分かった。FRET による解析では、ミトコンドリアの周囲で両分子が結合していることが判明した。PINK1 はミトコンドリア移行シグナルを持ちことから、parkin が外膜で PINK1 を安定化することで移行する PINK1 の量を制御している可能性が高い。一方、PINK1 は parkin を分解しており、両分子の量的制御が厳密に行われている可能性が高い。

他の既知遺伝子産物の機能解析では、SNCA の duplication 家系では、神経病理学的に diffuse Lewy body disease の様相を呈していた。PET での代謝解析では、認知の有無と関係なく後頭葉の代謝低下が観察されたことより、SNCA の発現増加が認知発現にとって必要条件であることが考えられた。Triplcation の家系と比較して発症年齢の遅発性や認知症の合併時期の遅発性など臨床症状の軽減化

が観察される。特記すべきこととして GCIs が観察されたことであり、MSA 発症にも SNCA の発現増加が誘因となっていることが推定された。ATP13A2 の機能解析では局在の変化が発症の直接的要因となっていることが推定された。何故、ER から lysosome への移行が細胞死に繋がるのか現在検討中である。

新奇遺伝子の同定に関しては、遺伝子座を決定できた。そして同領域にある 2 種の遺伝子に変異が認められた。更に追加症例の有無を検討し、真の原因遺伝子を定める予定である。

他の遺伝子改変マウスモデルの作成は済んでおり、順調に課題は進んでいる。またミトコンドリア complex I の NDUFB2 の KO mice も作成が済んでおり、parkin KO との交配を始めた。

E. 研究発表

英語業績

Yasuda T, Fukuda-Tani M, Nihira T, Wada K, Hattori N, Mizuno Y, Mochizuki H. Correlation between levels of pigment epithelium-derived factor and vascular endothelial growth factor in the striatum of patients with Parkinson's disease. *Exp Neurol*. 2007 Aug;206(2):308-17. Epub 2007 May 23.

Fukae J, Mizuno Y, Hattori N. Mitochondrial dysfunction in Parkinson's disease. *Mitochondrion*. 2007 Feb-Apr;7(1-2):58-62. Epub 2006 Dec 13. Review.

Ihara M, Yamasaki N, Hagiwara A, Tanigaki A, Kitano A, Hikawa R, Tomimoto H, Noda M, Takanashi M, Mori H, Hattori N, Miyakawa T, Kinoshita M. Sept4, a Component of Presynaptic Scaffold and Lewy Bodies, Is Required for the Suppression of alpha-Synuclein Neurotoxicity. *Neuron*. 2007 Feb 15;53(4):519-33.

Kagohashi M, Nakazato T, Yoshimi K, Moizumi S, Hattori N, Kitazawa S. Wireless voltammetry recording in unanesthetized behaving rats. *Neurosci Res*. 2008 Jan;60(1):120-7. Epub 2007 Oct 3.

Tamo W, Imaizumi T, Tanji K, Yoshida H, Takanashi S, Wakabayashi K, Takahashi R, Hattori N, Satoh K. Parkin is expressed in vascular endothelial cells. *Neurosci Lett*. 2007 Jun 4;419(3):199-201. Epub 2007 Apr 13.

Fukae J, Mizuno Y, Hattori N. Mitochondrial dysfunction in Parkinson's disease. *Mitochondrion*. 2007 Feb-Apr;7(1-2):58-62.

Mogi M, Kondo T, Mizuno Y, Nagatsu T. p53 protein, interferon-gamma, and NF-kappaB levels are elevated in the parkinsonian brain. *Neurosci Lett*. 2007 Feb 27;414(1):94-7. Epub 2006 Dec 29.

日本語業績

服部信孝, 久保紳一郎 ここまでわかったパーキンソン病(PD)の成因 遺伝性 PD の病態からわかったこと *臨床神経学* 47 巻 11 号 774-778 2007

服部信孝【薬物と神経筋障害 診断と治療の進歩】薬物副作用による神経・筋障害 抗パーキンソン薬の副作用 *日本内科学会雑誌* 96 巻 8 号 1614-1620 2007

服部信孝, 序論, 特集【パーキンソン病-最近の進歩-】, *最新医学*, 62 巻 7 号 Page1577-1578 (2007.07)

服部信孝(順天堂大学 脳神経内科), ふるえの臨床】振戦 パーキンソン病の振戦, *Clinical Neuroscience* 25 巻 3 号 Page285-287(2007.03)

服部信孝, 村田美穂, 佐藤健一, 鈴木正彦 内科医のためのパーキンソン病診療】パーキンソン病治療のこれから, *内科* 99 巻 5 号 Page884-894(2007.05)

学会発表 講演

Hattori N, Symposium in the genetics of Parkinson's disease, The annual meeting of Taiwan Neurology Association (Tao-yuan), Taiwan, 2007.4.7

Hattori N, Clinical Features and Molecular mechanisms of Nigral Neuronal Death in Parkinsonism with parkin Gene Mutation (PARK2), department of Neurology National Taiwan University Hospital College of Medicine National Taiwan University, Taiwan, 2007.4.7

Hattori N, The Aspects of Motor and non-Motor control with Dopamine Agonists, The opening meeting of PD Center of National Taiwan University Hospital (Taipei), Taiwan, 2007.4.8

Hattori N, The Aspects of Motor and non-Motor

control with Dopamine Agonists, Lecture meeting in Taichung, Taiwan, 2007.4.9

Hattori N, The Formats of Motor and Non-Motor control with Dopamine agonists, Lecture meeting in Kaohsiung, Taiwan, 2007.4.10

Hattori N, Pathogenesis of PD: insight obtained from inherited PD, ADPD Korea Japan Joint Meeting, Korea, 2007.4.14

Hattori N, Protein Degradation System in Parkinson's disease, the 19th Annual Meeting of KSMCB, Korea, 2007.10.19

Hattori N, The role of ubiquitin - proteasome system in Parkinson's Disease Duration of Lecture, 1st Asian and Oceania Parkinson's Disease and Movement Disorders Congress, Singapore, 2007.10.21

Hattori N, Molecular Genetics & Biology in Parkinson's Disease: Concepts, Approach & Methodology, 1st Asian and Oceania Parkinson's Disease and Movement Disorders Congress, Singapore, 2007.10.22

講演

1 月

服部信孝. 服部教授、パーキンソン病を語る～基礎から臨床まで～. ビ・シフロール錠発売 3 周年記念講演会 Tel-Meeting. 2007 年 1 月 11 日, 山口

服部信孝. 黒質神経変性メカニズム解明と神経再生の可能性を追求. GSK PD Forum. 2007 年 1 月 13 日, 東京

服部信孝. 黒質神経変性メカニズム解明と神経再生の可能性を追求. GSK PD Forum. 2007 年 1 月 14 日, 福岡

服部信孝. ドパミンアゴニストのリスクとベネフィット. パーキンソン病学術講演会. 2007 年 1 月 17 日, 名古屋

服部信孝. 黒質神経変性メカニズム解明と神経再生の可能性を追求. GSK PD Forum. 2007 年 1 月 20 日, 名古屋

服部信孝. 黒質神経変性メカニズム解明と神経再生の可能性を追求. GSK PD Forum. 2007 年 1 月 21 日, 大阪

服部信孝. パーキンソン病治療の最近の動向から基礎まで. 第 1 回茨城パーキンソン病研究会. 2007 年 1 月 24 日, つくば市

服部信孝. パーキンソン病治療戦略. 豊橋地区「パ

ーキンソン病について考える」. 2007年1月27日, 豊橋

2月
服部信孝. パーキンソン病の臨床とちよつと基礎. 第2回佐賀パーキンソン病勉強会. 2007年2月2日, 佐賀

服部信孝. パーキンソン病の発症機序～今後の展望～. 第3回沖繩パーキンソン病研究会学術集会. 2007年2月3日, 那覇

服部信孝. Genetic features of familial PD, ASIAN EDUCATIONAL SYMPOSIUM, 東京プリンス, 2007年2月4日

服部信孝. 黒質神経変性メカニズム解明と神経再生の可能性を追求. GSK PD Forum. 2007年2月4日, 仙台

服部信孝. パーキンソン病の最前線. 第6回京滋パーキンソン病研究会. 2007年2月8日, 京都

服部信孝. 黒質神経変性メカニズム解明と神経再生の可能性を追求. GSK PD Forum. 2007年2月10日, 札幌

3月
服部信孝. 若年性パーキンソン病におけるパーキンソン遺伝子の発見及び役割の解明. 第20回愛媛神経内科懇話会. 2007年3月7日, 松山

服部信孝. パーキンソン病について. パーキンソン病治療学術講演会. 2007年3月10日, 秋田

服部信孝. パーキンソン病発症機序の解明: 遺伝子改変モデルから分かったこと. Bio-Rad イブニングセミナー. 2007年3月13日, 日暮里, 東京

服部信孝. パーキンソン病治療の最前線. アルツハイマー病とパーキンソン病研究の最前線. 2007年3月17日, 京都

服部信孝. パーキンソン病の発症機序. 平成18年度日本神経学会九州地区生涯教育講演会. 2007年3月18日, 福岡

服部信孝. パーキンソン病治療戦略. Web講演会. 2007年3月28日, 東京

4月
服部信孝. パーキンソン病診察のスキルアップ～UPDRSのつけ方と有効活用～. 第1回東京神経内科勉強会. 2007年4月16日, 東京

服部信孝. 本に書けないパーキンソン病治療. 第1回慶應PDカンファレンス. 2007年4月28日, 東京

5月
服部信孝. パーキンソン病の原因を探る. 大塚製薬(株)徳島研究所講演会. 2007年5月10日, 徳島

服部信孝. パーキンソン病の発症機序: 遺伝性パーキンソン病は黒質神経変性の鍵を握るか?. 第47回日本神経学会総会 ランチョンセミナー. 2007年5月11日, 東京

服部信孝. パーキンソン病の発症機序-遺伝性パー

キンソン病からわかること-. 第10回兵庫脳循環代謝研究会. 2007年5月26日, 神戸(兵庫脳循環代謝研究会)

服部信孝. パーキンソン病の治療戦略. 兵庫P.D.治療勉強会. 2007年5月26日, 神戸

6月
服部信孝. パーキンソン病治療戦略. パーキンソン病薬物治療セミナー. 2007年6月1日, 松阪

服部信孝. 江東区パーキンソン病友の会. 2007年6月9日, 東京

服部信孝. パーキンソン病の発症機序: 新規治療の開発に向けて. 北陸PDフォーラム. 2007年6月9日, 金沢

服部信孝. パーキンソン病治療のUp to Date. パーキンソン病の診断と治療のコツ-新薬コムタンの登場にあたって-. 2007年6月13日, 横浜

服部信孝. リサーチの楽しさと厳しさの中でパーキンソン病はここまでわかってきた. 第244回福井大学学内セミナー(大学院セミナー)2007年6月18日, 福井

服部信孝. パーキンソン治療の現状. 福井パーキンソン病講演会. 2007年6月18日, 福井

服部信孝. パーキンソン病 UP TO DATE. 第3回奈良パーキンソン病ネットワーク-病診連携構築のために-. 2007年6月23日, 奈良

服部信孝. パーキンソン病の最近の話題. PDFForum in Okayama. 2007年6月29日, 岡山

7月
服部信孝. ミトコンドリア機能障害と神経変性. 合同年会 第29回日本生物学的精神医学会 第37回日本神経精神薬理学会. 札幌. 2007年7月12日

服部信孝. 本には書けないパーキンソン病のちよつと治療の最先端. 学術講演会. 2007年7月25日, 東京

服部信孝. パーキンソン病治療のUp to Date. パーキンソン病治療の新しい展開～学術講演会のお知らせ～. 2007年7月27日, 盛岡

8月
服部信孝. Everything in Parkinson's Disease. 長崎パーキンソン病研究会. 2007年8月10日, 長崎

服部信孝. パーキンソン病治療の最前線. 学術講演会(日本医師会生涯教育講座). 2007年8月22日, 上田(上田市医師会・日本ベリリンガー)

服部信孝. パーキンソン病治療のUp to Date. 第8回東北神経変性疾患研究会. 2007年8月31日, 青森

9月
服部信孝. 神経疾患と精神疾患-パーキンソン病に合併するうつを中心に. Cabaser 大阪講演会. 2007年9月6日, 大阪

服部信孝. パーキンソン病治療のUp to Date. 群馬

県コムタン錠新発売記念講演会. 2007年9月7日, 群馬

服部信孝、ミトコンドリア異常と精神疾患、Neuro2007 (第30回日本神経科学大会・第50回日本神経化学学会大会・第17回日本神経回路学会大会)、パシフィコ横浜、2007年9月11日

服部信孝. パーキンソン病のUp to Date. 北九州パーキンソン病カンファレンス. 2007年9月28日, 北九州市

10月

服部信孝. 家族性パーキンソン病の遺伝子診断, 臨床病型. 第1回 Movement Disorder Society, Japan 学術集会. 2007年10月6日, 品川

服部信孝. パーキンソン病の発症機序: 遺伝性パーキンソン病からヒントを得て. 第3回群馬大学大学院医学系研究科ワークショップ「脳・神経科学の最前線」. 2007年10月12日, 群馬

服部信孝. ドパミンアゴニストの位置づけを考える～リスクとベネフィットの観点から～. Web講演会. 2007年10月31日, 赤坂

11月

服部信孝. 遺伝子治療の最新情報. 東京都パーキンソン病友の会学習会. 2007年11月7日, 東京

服部信孝. パーキンソン病の発症機序. 第53回BNM研究会. 2007年11月16日, 丸の内

服部信孝. Toxic effects in dopamine metabolism for Parkinson's disease. The 3rd international Symposium on Dopaminergic and Nondopaminergic Mechanisms in Parkinson's Disease(INPD). 2007年11月24日, 大阪

12月

服部信孝. パーキンソン病の診断と治療. 杉並パーキンソン病勉強会. 2007年12月3日, 荻窪

服部信孝. パーキンソン病治療の基礎と臨床～パーキンソン病治療の今を考える～. 千葉パーキンソン病治療研究会. 2007年12月4日, 千葉

厚生労働科学研究費補助金（こころの健康科学研究事業）
分担研究報告書

パーキンソックインマウスの作製・解析

分担研究者：田中 啓二 東京都臨床医学総合研究所 副所長

研究要旨

常染色体劣性遺伝性若年性パーキンソニズム (autosomal recessive juvenile parkinsonism, AR-JP) の原因遺伝子であるパーキンの病態生理学的機能を解明するためにパーキン遺伝子の (GFP) ノックインマウスを作出した。パーキン欠損マウスはドーパミン (DA) の代謝異常を示したが、予想に反して中脳の黒質における形態学的異常及びパーキンソン病患者に見られる運動失調を中心とした行動異常は、殆ど観察されなかった。一方、パーキンの細胞内分布については、諸説あり一致した結論に達していない。そこで、現在入手可能な全ての抗体の反応性を検討し、ウェスタンブロット法を用い生化学的にパーキンの分布をマウス脳において検討した。その結果、パーキンは一部が膜画分に存在するものの大部分が細胞質に存在した。また密度勾配遠心法による解析からパーキンが他の生体成分と複合体を形成していることを示唆する積極的な証拠は得られなかった。一方、パーキンがプロテアソーム依存性のタンパク質分解系に関係することを視野においてプロテアソームと神経変性の関係を解析するために我々の研究室で同定したプロテアソームの形成に必須な分子集合因子 PAC1 (Proteasome Assembly Chaperone 1) をターゲットとしてコンディショナルノックアウトマウス (cKO) を作製した。全身 PAC1 欠損マウスにおいては着床後早期胎児期に致死に至り、また Nestin プロモーターに Cre リコンビナーゼを組み込んだトランスジェニック (Tg) マウスと交配して PAC1 を神経細胞特異的に欠損させると小脳の構造異常が起こり、発育障害、振戦、運動障害の神経変性賞状が現れ、ほぼ 3 週目で死に至るという興味深い結果を得た。

A. 研究目的

パーキンは遺伝性 (常染色体劣性) パーキンソン病 (AR-JP) の原因遺伝子であり、ユビキチンリガーゼ活性を有することが判明して以来 (1)、現在まで世界中で精力的に解析が進められてきた。その為パーキンに関して多数の論文が報告されているが、研究者間で必ずしもコンセンサスが得られていない事柄も多い。例えば、パーキンの細胞内局在でさえも研究グループ毎に見解が異なっており、ミトコンドリア・小胞体 (ER) 膜・細胞骨格など様々な局在が報告されている。

論文間で結果が異なる原因として、1) 論文によってはパーキンにタグを付けたり、過剰発現して細胞内局在を観察しているので、そのことがパーキンの局在に何らかの影響を与えている、2) 論文間で使用している抗-パーキン抗体が異なる、等が考えられる。そこで我々は確実にパーキンを認識する抗体のスクリーニングを行った上で、培養細胞での過剰発現系ではなく、マウス脳における内在性パーキンの細胞内局在を調べることにした。

一方、これまでにプロテアソーム (ユビキチン化タンパク質を選択的に分解する真核生

物の ATP 依存性プロテアーゼ複合体) とパーキンソン病の関係については、多くの controversial な研究成果が報告されており、謎のままである。その大きな理由はこの問題に迫る遺伝学的な研究手段がなかった為である。他方、我々は最近の研究からプロテアソームの分子集合に必須なプロテアソームに特異的な分子シャペロン Proteasome Assembling Chaperone (PAC) 1/PAC2 ヘテロダイマー (2) と PAC3/PAC4 ホモダイマーを発見した (3, 4)。これらのシャペロン分子の発現低下は、細胞内におけるプロテアソームレベルを低下させることが推定される。実際、PAC1 の単純ノックアウトマウスは胎生致死になった (未発表)。そこで条件的に PAC1 を欠損させることが可能なコンディショナルノックアウトマウス PAC1^{Flox/Flox} を作製し、このマウスと Nestin-Cre Tg マウスを交配して中枢神経系において特異的に PAC1 が欠損したマウス (PAC1^{Flox/Flox}:Nes) を作製した (投稿準備中)。

B. 研究方法

生化学的解析

マウス脳をホモジナイズした後、定法の細

胞分解法により核、リソゾーム・ミトコンドリア小胞体、細胞質、に分画した。実験には、野性型マウスと対照としてパーキンノックアウトマウスの脳を用いて行った。

マウス関連

条件付き PAC1 欠損マウス (PAC1^{Flox/Flox}) の作製: ターゲティングベクターの作製と ES 細胞のスクリーニングは、定法に従って行った。ノックアウト ES 細胞をマウス 8 細胞期胚にマイクロインジェクションし、仮親の子宮に移植、得られたヘテロマスがジャームラインに入っていることを PCR およびサザンブロットングにより確認した。最終的にヘテロマスを交配して条件的 PAC1 欠損ホモマウス (PAC1^{Flox/Flox}) を作製した。

中枢神経系特異的 PAC1 欠損マウス (PAC1^{Flox/Flox}:Nes) の作製: PAC1^{flox} (Neomycin resistance gene を含む) マウスを Flipase マウスと掛け合わせ PAC1^{flox} (Δ neo) マウスを作製、これを解析用に増やし、適宜 Cre マウスと交配した。PAC1^{-/-} は adenovirus EIIa プロモーター Cre との交配により、また Pac1^{flox/flox}:Nestin-cre は Nestin プロモーター CreTg マウスとの交配により作製した。作製したヘテロ Cre マウスは C57BL/6J によりバッククロスを行った。実験に用いるマウスは specific-pathogen-free (SPF) 飼育室、8:00-20:00 の明暗周期の環境の下に飼育した。マウスを用いた実験はすべて東京都臨床医学総合研究所における動物倫理規定に基づいて行った。

遺伝子型解析は以下のプライマーを作製し行った。Flox(+NEOr)かつ Wildtype allele の確認には (1, 2, 3) を用いた。Flox かつ Wildtype allele については (1, 2, 4)、Knockout (-) かつ Wildtype allele については (1, 2, 4, 5)、Cre リコンビナーゼの有無には (6, 7) の各プライマーの組み合わせを用いて確認した。

1. tgtcttcaaaagccacagtcgt
2. agggcaagagctcctaactag
3. tcgtgctttacggatcgcgcctcccatt
4. agggcaagcgataccgctcgagattaaaata
5. ggtgattgtgtcaacgacagacacttttg
6. atttgctgcattaccggtcgatgcaac
7. tgtttactatccagggttacggatatagt

ウエスタンブロット分析

25mM Tris(hydroxymethyl)aminomethane [Tris]-HCl (pH7.5)、2mM ATP、1mM dithiothreitol (DTT) に調整したバッファー

を用いてホモジナイズし 20,000g で 10 分間、4°C で遠心を行い、上清を回収した。さらに同条件で遠心を再度行い、上清を回収した。Protein assay (Bio-Rad) は、スタンダードに BSA (0.5mg/mL) を使用して Bradford 法により定量を行った。1mg/mL になるように 1× nupageLDS サンプルバッファー、2-mercaptoethanol を加え、95°C、5min で前処理した。ゲルは Nupage プレキャストゲル (invitrogen) を使用した。

H/E 染色、免疫組織染色

固定はすべて 4% paraformaldehyde (PFA) を用いた。胎児の場合は目的臓器を取り出し phosphate buffer saline (PBS) で一度洗った後、4% PFA で 4°C、1 晩かけて浸潤固定した。生後のマウスは PBS と 4% PFA を用いて灌流固定を行った。組織を取り出し PBS で洗浄後、同様に 4% PFA で 4°C、1 晩かけて固定を行った。固定後、50%~100% EtOH 系列に通し、トルエンで透徹を行い、パラフィン浸透させた後パラフィン切片を作製した。

切片はキシレン-エタノール系列で洗浄し、脱パラフィン処理を行った。H/E 染色ではその後ヘマトキシリン 3G (サクラファインテック)、エオジン (サクラファインテック) で染色 (H/E 染色) し、エタノール-キシレン系列を通し包埋を行った。

免疫染色では脱パラフィン処理の後、0.05% 無水シトロン酸中でマイクロウェーブ 10min × 2 回処理し抗原を賦活化させた。2% Goat-serum + 0.1% Tween20 in PBS でブロッキングし、1 次抗体反応は下記の抗体を用い 4°C (一晩) もしくは 1 時間 (室温) で行った。anti-calbindin-D-28K (Sigma)、anti-neuN [4G2] (abcam)、anti-GFAP [2A5] * (Novus biologicals)、anti-ubiquitin [Fk2] (medical & biological laboratories co., LTD.) anti-PAC1 (antiserum) *: (GFAP の場合) Zenon Alexa Fluor 647 Mouse IgG1 Labeling Kit を用いラベリングした。次いで 2 次抗体反応は下記の抗体を用い室温で 1 時間行った。Alexa Fluor 488 anti-mouse IgG / anti-rabbit IgG (molecular probes)、Alexa Fluor 647 anti-rabbit IgG (molecular probes)。核は DAPI (molecular probes) で染色した。

C. 研究結果

[研究 1] 内在性パーキンの細胞内局在の再検討

研究の第一歩として、様々な市販および自作の抗-パーキン抗体について網羅的な検定・評価を行った。その結果、抗体によっては内在性(endogenous)のパーキンを認識できずに、AR-JP 患者脳やパーキン KO マウス脳を用いてもバンドパターンが変化しないものが有ることや、変性したパーキンは殆ど認識しないが、非変性状態の(立体構造を保った)パーキンは良く認識する抗体が存在すること、等が解った。これらの結果から、実験の手法や目的に応じて適当な抗-パーキン抗体を使い分ける必要があることが示唆される。

次にマウス脳を用いた組織分画を行った後にウェスタブロット分析に最適と思われる抗体を使用してパーキンの細胞内分布を調べた。その結果、既に報告されているラットやヒトとは異なり、少なくともマウスにおいては内在性パーキンのメインの局在部位は細胞質であることが示唆された。

[研究2] PAC1 全身欠損マウスの解析

全身欠損マウスの作製はアデノウイルス EIIa プロモーター制御下 Cre リコンビナーゼ発現トランスジェニックマウスとの交配により行った。このプロモーター制御下では着床前から発現を開始するため胎児期早期から広範囲の組織におけるターゲット遺伝子のノックアウトが可能となる。以降は生殖細胞で発現するため受精後からのノックアウト解析が可能となる。

PAC1^{fllox} マウスと Cre トランスジェニックマウスを交配し作製した PAC1 ヘテロ接合体(+/-) マウスは生存可能であった。このヘテロ接合体は通常通り繁殖可能であり C57BL/6J によりバッククロスを行いその後ヘテロ接合体同士で繁殖を始めた。ヘテロ接合体同士を掛け合わせるとホモ接合体(-/-) が生まれてこなかった。そして十分な交配の結果メンデルの法則を満たすことが明らかとなった。また出生後早期における死亡、母獣による食殺も確認できないため PAC1 のホモ接合体は胎生致死となることが明確となった。

[研究3] 神経細胞特異的 PAC1 欠損マウスの解析結果

ホモ接合体の割合はメンデルの法則に従った割合で生まれてきた。外見上生まれた直後は区別がつかなかった。P(postnatal days: 出生後日数)3 頃からわずかではあるが、小さめの体格マウスが確認された。生後1週齢頃には顕著になり、それ以降は外見上の表現型でホモ

接合体を識別できるようになった。自力で歩き回り始める2週齢以降では体格の違いに加え、手足の震え(振戦症状)、歩行困難等の異常を示した。ほとんどのホモ接合体は3週齢前後で死に至った。この頃の徴候としては栄養摂取障害に伴う成長障害、立毛、振戦、歩行障害・平衡感覚障害、背を丸めた姿勢、過敏・攻撃的な性格が観察された。ヘテロ欠損体については、体型・体格・行動などにおいて野生型と全く区別がつかなかった。

最初に神経細胞特異的に表現型が現れるという考えのもと、脳の組織学的解析を行った。P21 の非常にシビアな表現型が表れている時期に何らかの形態学的異常が認められるはずであると考え、この時期の脳を固定しパラフィン切片を作製し H/E 染色を行った。その結果、大脳皮質領域の減少に加え、特に興味深いことに小脳において極度の形成異常が確認された。一方、視床、視床下部、海馬、延髄等の小脳、大脳皮質以外の部位においては少なくとも H/E 染色では違いが見られなかった。

小脳は生後まもなく各種細胞群が増殖・移動を開始し、約3週間後にほぼ形成を完了する。胎児期にほぼ基本的細胞構成が完了した脳の他の部位と比べると顕著に遅れた発達時期を特徴としている。ホモ欠損マウスに表れた小脳形態異常が発達時期特異性によるものなのか等も考慮しつつ、経時的な観察が必要であると考えた。

そこでまず約1週齢、2週齢、3週齢頃のマウスの脳の切片を作製し、PAC1 の消失に伴う時間依存的な形態異常を H/E 染色によって観察した。その結果、対照として用いた PAC1^{fllox/fllox} マウスでは小脳の形成(発生・発達)を刻々と順序よく見られるのに対して、ホモ欠損体では発達過程が全く観察されなかった。

さらに P0~P21 までのホモ欠損体とコントロールとして同腹のヘテロ欠損体の脳の重量それぞれを大脳(終脳・間脳)と小脳(脳幹を含む)に分けて測定した結果、生後直後はほぼ変わらなかったがその後の発達に大きな相違が見られた。以上の結果から、PAC1 ホモ欠損体の脳では生後からの全体的な成長障害に加え、小脳の発達について特に初期段階で停止するという興味深い知見が得られた。

D. 考察

これまでプロテアソーム阻害剤(P S I : carbobenzoxy-L-isoleucyl-gamma-t-butyl-L-glutamyl-L-alanyl-L-leucinal, lactacystin, epoxomycin 等)を中脳に注入すると、パーキ

ンソン病床状を発症させるトキシン（神経毒素）

1-methyl-4-phenyl-1, 2, 3, 6-tetra-hydropyridine (MPTP)の感受性が高まり、封入体の形成やチロシン水酸化酵素抗体陽性のドーパミンニューロンの脱落が引き起こされることが報告されていた。この方法は最初に報告したMcNaught' protocol と呼ばれている。ところが、最近、この報告に疑義を呈して否定する報告や逆に支持する報告も出て、激しい論争になった。しかし、プロテアソームの阻害とパーキンソン病の関係については、決着がつかないまま今日に至っている。そこで、我々は独自に発見したプロテアソームの分子集合因子 PAC1 (2) をニューロンで欠損させ、神経細胞内でのプロテアソーム量を減弱させると神経変性疾患に陥ることを世界で最初に見出した(投稿準備中)。この条件的 PAC1 欠損マウスを用いてドーパミンニューロン特異的 PAC1 欠損マウスを作製すれば、上記の論争に終止符が打てるかと考え、現在、このマウスの作出を進めている。と同時にこの PAC1^{Flox/Flox}:Nes マウスはパーキンソン病発症過程の初期にプロテアソームの破綻でどのような異常がドーパミンニューロンに発生するかを時空間的に解析できる唯一の系であるので、この解析も精力的に進めていく計画である。

E. 結論

1) パーキンソン病マウスの脳を対照としてパーキンの分布を厳格に生化学的方法で再検討した結果、パーキンは一部が膜画分に存在するものの大部分が細胞質に存在することが判明した。

2) 中枢神経系ニューロンでプロテアソーム分子集合因子PAC1を欠損させプロテアソームレベルを低下させると小脳の構造異常が起こり、発育障害、振戦、運動障害などを伴った神経変性疾患が発症した。プロテアソームが神経細胞の生存維持に必須であることが判明した。

F. 健康危険情報

無し

G. 研究発表

1. 論文発表

(1) Shimura, H., Hattori, N., Kubo, S., Mizuno, Y., Asakawa, S., Minoshima, S., Shimizu, N., Iwai, K., Chiba, T., Tanaka, K., and Suzuki, S. (2000) Familial Parkinson's disease gene product,

parkin, is a ubiquitin-protein ligase. *Nature Genet.* 25, 302-305.

- (2) Hirano, Y., Hendil, K.B., Yashiroda, H., Iemura, S., Nagane, R., Hioki, Y., Natsume, T., Tanaka, K., and Murata, S. (2005) A heterodimeric complex that promotes the assembly of mammalian 20S proteasomes, *Nature* 437, 1381-1385.
- (3) Hirano, Y., Hayashi, H., Iemura, S., Hendil, K.B., Niwa, S., Kishimoto, T., Natsume, T., Kasahara, M., Tanaka, K., and Murata, S. (2006) Cooperation of multiple chaperones required for the assembly of mammalian 20S proteasomes. *Mol Cell* 24, 977-984.
- (4) Yashiroda, H., Mizushima, T., Okamoto, K., Kameyama, T., Hayashi, H., Kishimoto, T., Kasahara, M., Kurimoto, E., Sakata, E., Suzuki, A., Yuko Hirano, Y., Murata, S., Kato, K., Yamane, T., and Tanaka, K. (2008) Crystal Structure of a Chaperone Complex that Contributes to the Assembly of Yeast 20S Proteasomes. *Nature Struct. Mol. Biol.* 15, 228 - 236

2. 学会発表

Keiji Tanaka and Masaaki Komatsu: Protein Quality Control by Constitutive Autophagy. The Ubiquitin Family (CSHS Symposium) : Quality Control. April 25 - 29, 2007, New York, USA.

Keiji Tanaka and Masaaki Komatsu Pathophysiology of Constitutive Autophagy. The 20th Naito Conference / Innate Immunity in Medicine and Biology [III] (October 10 - 12, 2007) 湘南国際村センター、神奈川

G. 知的財産権の取得状況

1. 特許取得

無し

2. 実用新案登録

無し

3. その他

無し

厚生科学研究費補助金（こころの健康科学研究事業）

パーキン蛋白の機能解析と治療法の開発

分担研究報告書

パーキンソン病におけるパエル受容体の役割

分担代表者：高橋良輔 京都大学医学研究科・臨床神経学 教授

研究要旨

常染色体劣性遺伝性パーキンソンニズム (AR-JP) の病因遺伝子として同定された Parkin はユビキチンプロテアソーム蛋白質分解系で重要な役割を果たすユビキチンリガーゼであり、蛋白質分解系の破綻が PD の発症に関わることを示す強い証拠を提供している。我々はパーキンの基質蛋白質として構造異常を起こした Pael 受容体 (Pael-R) を単離し、Parkin の変異によって分解されなくなった Pael-R が蓄積し、小胞体ストレスを引き起こして神経変性が生じるという仮説を提唱している。本年度は Pael-R のトランスジェニック (Tg) マウスと Pael-R ノックアウト (KO) マウスを作製・解析した。Pael-R KO マウスでは線条体ドーパミン (DA) レベルが対照群の 60% に減少していた。一方 Pael-R Tg マウスでは小胞内 DA 量とその代謝産物である DOPAC 量が増加していた。また、ドーパミン神経毒に対する感受性が Pael-R Tg および KO でそれぞれ、亢進、低下していた。以上より Pael-R は線条体 DA 量を制御している可能性が示唆された。一方家族性パーキンソン病 PARK6 の原因遺伝子 PINK1 の結合タンパク質として Hsp90 とその cochaperone である cdc37 を見出し、これらが PINK1 のタンパク質としての安定性に寄与していることを明らかにした。

A. 研究目的

常染色体劣性若年性パーキンソン病 (AR-JP) の原因遺伝子産物 Parkin は、細胞内タンパク質の分解にかかわるユビキチン・プロテアソーム経路のユビキチンリガーゼ (E3) の活性を持ち、AR-JP 患者でみられる変異体はこのユビキチンリガーゼ活性が欠失または低下している。このことは、Parkin によって本来分解されるべき基質の神経細胞への蓄積がその病態の原因であることを示唆している。我々が Parkin の基質として同定した膜タンパク質パエル受容体 (Pael-R) は神経系培養細胞内で過剰発現させると、高度なユビキチン化とともに細胞死が観察される。この原因は Pael-R が折り畳み効率の低いタンパク質であり、

ほとんどが小胞体関連分解 (ERAD) で分解されるものの、ERAD の処理能力を超えた発現量が小胞体及び細胞質に蓄積し小胞体ストレスを引き起こすからであると考えられる。

しかし Pael-R の蓄積がなぜドーパミン神経特異的細胞死をもたらすかについては明確な理由は不明であり、これを明らかにするためには Pael-R の黒質ドーパミン神経における生理的役割を解明する必要がある。このような考えに基づき、Pael-R 遺伝子改変マウスの作製・解析により、Pael-R の生理的役割を探索した。また、Parkin と PARK6 の原因遺伝子である PINK1 のノックアウトショウジョウバエは筋肉と精子がアポトーシス様に変性する全く同じ表現型を呈す

る。このことから Parkin と PINK1 は同じシグナル経路で細胞死を防御する役割を果たしていることが判明した。そこで PINK1 の生理的役割を、その結合タンパク質の解析を通じて明らかにする。

B. 研究方法

ヒト Pael-R cDNA を神経特異的な PDGF プロモーター及び prion プロモーターの下流に連結したプラスミドを作製し、それらをマウス受精卵に導入して Pael-R Tg マウスを作製した。常法により、Pael-R ノックアウト (KO) マウスを作製した。線条体におけるドーパミンおよびその代謝産物を HPLC で測定、また *in vivo* dialysis により、細胞外のドーパミン濃度を、定常状態とメタアンフェタミン投与時に測定した。さらにオープンフィールドテストで遺伝子改変マウスの行動解析を行った。またドーパミン神経毒である 6-OHDA と MPTP をそれぞれ Pael-R-Tg と Pael-R-KO マウスに投与した。一方、PINK1 と共免疫沈降するタンパク質を一次元電気泳動で分離し、個々のバンドの質量分析によって、結合タンパク質を同定した。

C. 研究結果

Pael-R Tg と Pael-R KO マウスを解析したところ、前者では線条体 DA および DOPAC 量と小胞内 DA、細胞外 DA 量が増加していた。後者では逆に線条体 DA 量が減少していた。また Pael-R Tg マウスではメタアンフェタミンによる DA 放出が増強しており、これに一致して運動過剰となった。オープンフィールドテストによる行動学的解析では Pael-R Tg マウスは hyperactive、Pael-R KO マウスは hypoactive となった。さらにドーパミン神経毒に対する反応を調べると、Pael-R Tg マウスは 6-OHDA に対してより脆弱になり、Pael-R KO マウスは MPTP に対してより抵抗性となった。マウス線条体スライス標本の電気生理学的解析で

は、Paired Pulse Stimulation による Paired Pulse Ratio (PPR) および低頻度繰り返し刺激による IPSC 振幅が Pael-R KO マウスで、特異的なドーパミン再取り込み阻害剤である nomifensine 投与、非投与下双方で減少していた。

PINK1 の結合タンパク質の解析では、Hsp90 と Cdc37 を同定した。Hsp90 の阻害剤である geldanamycin で処理すると、PINK1 の半減期は著明に減少した。また、PHsp90、Cdc37 と結合できなくなる L347P 変異は有意に分解が促進された。

D. 考察

Pael-R-Tg と Pael-R KO マウスでそれぞれ DA 及びその代謝産物が増加、減少し、それに伴ってこれらマウスが Hyperactive、Hypoactive になることから、Pael-R の過剰発現が Pael-R の刺激と同様の効果があると考えられるならば、Pael-R は DA 代謝を正に制御する役割があると考えられる。また Pael-R Tg では細胞外 DA が増加していたが、最近イタリアの Marazziti らが Pael-R はドーパミントランスポーターに結合し、その細胞表面への発現を抑制する作用のあることを報告している (Marazziti D et al., PNAS, 2007)。彼女らは Pael-R KO マウスでは細胞表面の DAT が増加することを示しており、これによれば Pael-R Tg では細胞表面の DAT は減少することになるはずであり、細胞外 DA の増加を説明できる。これは今後の検討課題である。ところが Pael-R KO で細胞表面の DAT の量が増加しているとする、MPTP に対してより感受性が高まるはずであり、この実験事実をうまく説明できない (Pael-R Tg の結果も同様に説明困難)。Pael-R KO でドーパミン量が減少することがドーパミン毒性の軽減につながっているのかもしれない。

PINK1 における Hsp90 と Cdc37 の役割は、これら 2 つのタンパク質が結合する多くのタンパク質

キナーゼ同様、タンパク質の安定性を付与している。

E. 結論

Pael-R KO マウスと Pael-R Tg マウスの解析により、Pael-R はドーパミン代謝に関与していると考えられた。また PINK1 結合タンパク質の Hsp90 と Cdc37 は PINK1 のたんぱく質としての安定性を高めている。

F. 研究発表

1. 論文発表

Iwasato, T., Katoh, H., Mishimaru, H., Ishikawa, Y., Inoue, H., Saito, Y. M., Ando, R., Iwama, M., Takahashi, R., Negishi, M., Itohara, S. (2007) Rac-GAP α -Chimerin Regulates Motor-Circuit Formation as a Key Mediator of EphrinB3/EphA4 Forward Signaling. *Cell* 130:742-753

Imai, Y., Inoue, H., Kataoka, A., Wang, H.Q., Masuda, M., Ikeda, T., Tsukita, K., Soda, M., Kodama, T., Fuwa, T., Honda, Y., Kaneko, S., Matsumoto, S., Wakamatsu, K., Ito, S., Miura, M., Aosaki, T., Itohara, S. and Takahashi, R. (2007) Pael receptor is involved dopamine metabolism in the nigrostriatal system. *Neurosci. Res.*, 59:413-425.

Yamanaka, K., Chun, S.J., Boillee, S., Fujimori-Tonou, N., Yamashita, H., Gutmann, D.H., Takahashi, R., Misawa, H. and Cleveland, D.W. (2008 Feb 3) Astrocytes as determinants of disease progression in inherited amyotrophic lateral sclerosis. *Nat. Neurosci.* 11(3):251-253

Moriwaki, Y., Kim, Y.J., Ido, Y., Misawa, H., Kawashima, K., Endo, S., Takahashi, R. L347P PINK1 mutant that fails to bind to Hsp90/cdc37 chaperones is rapidly degraded in a proteasome-dependant manner. *Neurosci. Res.*, in press

2. 学会発表

国際学会発表

Takahashi R: The molecular mechanisms underlying parkin-related parkinsonism. Croucher Advanced Study Institute on Innovative Therapies of Movement Disorders. Hong Kong (2007. 11. 28)

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

厚生労働科学研究費補助金（こころの健康科学研究事業）

パーキン蛋白の機能解析と治療法の開発

分担研究報告書

ミクログリアの毒性転換とオートファジー細胞死誘導に関する研究

分担研究者 澤田 誠 名古屋大学教授

研究要旨

ミクログリアの毒性転換モデルの解析から毒性転換にかかわる細胞表面上のタンパク質に絞り SST-REX 法を行って TREM-2b 遺伝子を単離した。この遺伝子産物はリガンド未解明の受容体でこの分子がミクログリアの毒性転換にかかわっていることを証明するため SST クローンを使った刺激抗体・抑制抗体を分離することを行っている。また、ミクログリアが NO を賛成してグリオーマ細胞にオートファジー細胞死を誘導することを見出した。

A. 研究目的

脳に器質性および機能性の障害が生じたときにミクログリアは活性化され様々な生体応答を生じる。このとき、ミクログリアの活性化には 2 相性があり、脳内細胞を保護するような活性化とダメージを受けた細胞を積極的に排除するような活性化の両者が見られる。これまでの研究から、ミクログリアの活性化には 2 段階のステップ、軽度な活性化では神経保護的な作用を示すミクログリアが、何らかの因子の作用を受けて神経毒性を持つように変化すると考えている。本研究では培養ミクログリアに外来遺伝子を導入して毒性転換させるモデルと脳に人為的に損傷を誘導したときの *in vivo* のミク

ログリアの変化を新たに創出した単一細胞解析システムで検証することを目的に行った。

HIV が中枢神経系に感染すると神経細胞死や神経機能障害を誘発し痴呆が生じることが知られている。このとき生じる生物反応はパーキンソン病などの神経変性疾患が発症する場合にも共通性がみられると考えられている。ミクログリアはこのときに中心的な役割を果たすと考えられているが、その詳細や実体は明らかでない。最近我々は、本来神経保護的に働くミクログリアに HIV 由来 *nef* 遺伝子を導入することによって神経障害性の活性酸素を産生ようになること (J Biol. Chem. 277:42136-43, 2002) を見だし