

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20年度 総括・分担研究報告書

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21(2009)年 3月

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 20 年度 総括・分担研究報告書

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 21 (2009) 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                | 1  |
| 服部 信孝                             |    |
| 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             | 5  |
| 服部 信孝                             |    |
| 2. パーキンノックインマウス作製・解析              | 13 |
| 田中 啓二                             |    |
| 3. パーキンソン病におけるパエル受容体の役割           | 17 |
| 高橋 良輔                             |    |
| 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 | 21 |
| 澤田 誠                              |    |
| III. 研究成果の刊行に関する一覧表               | 29 |
| IV. 研究成果の刊行物・別刷                   | 37 |

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黑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。単一遺伝子異常で発症する遺伝性パーキンソン病の病態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。Parkin の原因遺伝子パーキンは、その中で最も変異頻度が高く、世界中に分布する。そして Parkin 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 Parkin 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。

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* ボルタメトリーによるドパミン放出に関する検討を行った。その結果、parkin KO mice では、表現型ほぼ正常であるものの、直接的な方法でドパミン遊離低下の異常を見出した。更にその異常は、ドパミントランスポーターの代償的不全低下による機序が考えられた。また新規基質として PDGFR- $\alpha$  を同定した。そしてこの基質がパーキン遺伝子変異剖検脳で蓄積していることを見出した。

パーキンの新たな機能として通常で細胞質に存在するパーキンが、膜電位を失った障害ミトコンドリアの外膜に移行し、それが引き金となってオートファジーによる障害ミトコンドリアの品質管理が行われる可能性が示唆された。さらに AR-JP 変異パーキンの解析から AR-JP の原遺伝子産物であるパーキンがオートファジーによるミトコンドリアの品質管理に密接に関係していることが強く示唆された。

一方、パーキンの基質候補である Pael-R 受容体に関しては、HEK293T 細胞の過剰発現系を用いた免疫沈降実験により、ドパミントランスポーター (DAT)、ノルエピネフリントランスポーター (NET) と Pael-R あるいは Parkin の結合が明らかになった。また、*in vitro* ubiquitination assay の結果、これらトランスポーターがいずれも Pael-R 同様に Parkin の基質タンパク質である可能性が示唆された。先のパーキンの運動学習能力の低下に DAT の代償的減衰が観察されないことと関連性があると推定する。DAT もパーキンの基質である可能性が指摘されているので、パーキンの loss-of-function 効果で DAT が分解されないとすれば DAT の代償的不全状態は説明可能と言える。

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。片側 6-OHDA 投与パーキンソンモデルラットの投与側線条体ではマイクログリアの活性化がみられ、[11C]PK11195 などの末梢性ベンゾジアゼピン受容体リガンドにより *in vivo* 検出が可能であるが、二相性を示す活性化マイクログリアのどちらを認識しているかは明らかでない。今回、特異的結合能を示す新規化合物 [18F]FEPPA を用いて同モデルで活性化マイクログリアの検出解析を行い、ドーパミン神経に対して毒性を持つ状態のマイクログリアをイメージングできることを見いだした。

## 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。更に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。そしてミトコンドリア品質管理メカニズムに関して検討する。

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) パーキンノックアウトマウスの解析

パーキンノックアウトマウスでは行動学的変化は存在しないとされているが、ラット用ロタロッドを用いることで学習能力の低下が認められた。In vivo ボルタメトリーではドパミンの遊離低下が観察された。更にドパミン遊離の低下に伴うドパミントランスポーターの代償的減衰現象が観察されなかった。

### 2) パーキンと 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) 新規基質 PDCD2-1

Yeast two hybrid 法によるスクリーニングでパーキンと結合し、パーキンによりユビキチン化される PDCD2-1 を同定した。ヒトパーキン遺伝子変異陽性例の剖検脳で PDCD2-1 の蓄積を確認した。

4) パーキンノ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) 通常で細胞質に存在するパーキンが、膜電位を失った障害ミトコンドリアの外膜に移行し、それが引き金となってオートファジーによる障害ミトコンドリアの品質管理が行われる可能性が示唆された。さらにAR-JP変異パーキンの解析からAR-JPの原遺伝子産物であるパーキンがオートファジーによるミトコンドリアの品質管理に密接に関係していることが強く示唆された。

7) Pael 受容体 (Pael-R) はユビキチンリガーゼである常染色体劣性若年性パーキンソンニズム (AR-JP) の原因遺伝子産物 Parkin の基質タンパク質である。HEK293T 細胞の過剰発現系を用いた免疫沈降実験により、ドパミントランスポーター (DAT)、ノルエピネフリントランスポーター (NET) と Pael-R あるいは Parkin の結合が明らかになった。また、*in vitro* ubiquitination assay の結果、これらトランスポーターがいずれも Pael-R 同様に Parkin の基質タンパク質である可能性が示唆された。これはカテコールアミン代謝における Pael-R の役割を示唆するものと考えられる。

8) 片側 6-OHDA 投与パーキンソンモデルラットの投与側線条体ではミクログリアの活性化がみられ、[11C]PK11195 などの末梢性ベンゾジアゼピン受容体リガンドにより *in vivo* 検出が可能であるが、二相性を示す活性化ミクログリアのどちらを認識しているかは明らかでない。今回、特異的結合能を示す新規

化合物 [18F]FEPPA を用いて同モデルで活性化ミクログリアの検出解析を行い、ドパミン神経に対して毒性を持つ状態のミクログリアをイメージングできることを見いだした。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パーキンソン病である。その原因遺伝子パーキンと PINK1 が共通機構を形成していることが分かった。パーキンが PINK1 の安定性に関与している可能性が示された。またパーキンノックアウトマウスでは、運動学習能力の低下が観察された。更に DAT の減衰現象が観察されなかった。DAT がパーキン遺伝子変異の患者脳では亢進していることが推定された。パーキンは通常細胞質に局在している。しかしながら、CCGP による膜電位低下を起こさせるとパーキンはミトコンドリアの外膜周囲に集積した。その結果、障害ミトコンドリアのクリアランスが誘導された。パーキンはオートファジーと関連を持って機能している可能性が示唆された。

パエル受容体に関しては、DAT と NET との結合が確認された。そして DAT はパーキンによりユビキチン化された。このことは loss-of-function 型変異効果が推定されるパーキンの機能から患者脳では DAT のクリアランスの低下が推定された。

グリアの機能解析については、特異的結合能を示す新規化合物 [18F]FEPPA を用いて同モデルで活性化ミクログリアの検出解析を行い、ドパミン神経に対して毒性を持つ状態のミクログリアをイメージングできるこ

とを見いだした。

#### 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。

パーキンソックアウトマウスの行動異常解析及び劣性遺伝性パーキンソン病遺伝子産物の  
共通機構の解明

研究代表者：服部 信孝 順天堂大学医学部脳神経内科 教授

研究要旨

常染色体劣性遺伝性若年性パーキンソンニズム (autosomal recessive juvenile parkinsonism, AR-JP:Park2) の原因遺伝子パーキンの機能解明には、劣性遺伝性とする遺伝形式を考慮すればパーキンソックアウトマウスの作出は不可欠である。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、その表現型は単純な行動異常に関して異常は見出されなかった。しかしながらラット用ロタロッドで運動学習能力を検討すると3ヶ月月齢のノックアウトマウスでは、その学習能力が低下していた。6ヶ月、9ヶ月と低下を認め、12ヶ月月齢では代償機構の作用かほぼ野性型マウスと大差ないレベルまで回復している。In vivo ボルタメトリーでドーパミン遊離を測定すると低下が観察され、学習能力の低下はドーパミン遊離の低下によると考えられた。学習に際し、ドーパミンによる学習強化が不十分であることが予想された。ドーパミントランスporter (DAT) の阻害剤である nomifensine を投与すると forebrain bundle を multiple に刺激した場合 fascilitation は改善された。更に細胞外ドーパミン濃度を測定すると有意な上昇が観察され、ドーパミン遊離に伴う代償的 DAT の低下が認められないことが推定された。このタイプの患者では、levodopa 早期治療により運動合併症状が出現することと DAT の減衰が認められないことと関連性があると考えられた。数多くの論文がパーキン欠損マウスの行動異常を見出せていないが、我々の用いたラット用ロタロッドでの運動学習能力の低下は重要な発見と言える。

またパーキン遺伝子変異と PINK1 変異の患者の臨床症状は極めて類似性が高い。発症年齢こそパーキン変異患者で若年化が認められるが両遺伝子の機能が共通機構を形成している可能性が高い。そこで共通機構を明らかにすべく両遺伝子の結合について検討した。その結果、両遺伝子産物はミトコンドリア外膜で結合し、パーキンが PINK1 の安定性に関与していることが分かった。

A. 研究目的

パーキンはユビキチンリガーゼであることがわれわれの研究グループにより明らかにされた (1)。そして多くのパーキン基質候補が報告された。しかしながら、依然 Park2 の発症機序に関しては不明であると言わざるを得ない。更に劣性遺伝性型の遺伝形式を考慮すればノックアウトマウスによる解析は最も有効であると推定されるが、行動学的には異常を認めず細胞脱落も観察されない。しかしながら、多くの論文では10ヶ月月齢前後のマウスを解析しており、年齢による違いについては解析されていない。また In vivo での RI を用いた各分子の結合能を観察したものはあるが、直接的なドーパミン遊離を検討したレポートは存在しない。

今まで多くのノックアウトマウスの解析結果が報告されたが、方法論の問題もあり、全

て行動異常は認められないと結論づけられている。若年発症であるが故に発生段階で機能している可能性もある。パーキンが若年発症のパーキンソン病の原因遺伝子であり、発症ピークが20歳代にあることを考えると発生や発達に関連していることも考えられる。パーキンの真の機能解明には、基質の同定が必須であるが、これが不明であるために結論的なことが言えないのが現状である。第一にパーキンの本質的な機能解明のために In vivo ボルタメトリーによりカテコラミンの放出能を確認する。第二にラット用ロタロッドを使った行動解析を行う。第三に詳細なパーキンソックアウトマウスのドーパミン放出能を解析する。この現象について培養細胞系を用いて検討することで詳細な放出機構とパーキンの関連性について検討する。

一方で yeast two hybrid 法にて20分子をスクリーニングしている。その中で新規



基質候補を単離した。基質には K48, K63 を介したポリユビキチン化やモノユビキチン化が存在するが、パーキンの主要機能は明らかにされていない。先に触れたように基質同定も重要な課題である。

遺伝性パーキンソン病の劣性遺伝形式を呈する若年性パーキンソン病には共通した機構の存在が推定される。FRET 現象を使った方法では生きた細胞内の結合有無を観察することができるメリットがある。既に海外からはパーキンと PINK1 の結合に関する論文が発表になっている。ショウジョウバエのパーキンノックアウトでは、PINK1 を補給しても機能変化は起こらないが、PINK1 ノックアウトではパーキンを補給すれば正常化することが報告され、PINK1 はパーキンの上流で機能していることが推定されている。このことから両分子が共通機構を形成している可能性が高い。

本年は、これらの課題に取り組むと共に、新たに浮上したパーキンと学習能力との関連性に関してミトコンドリアとの機能的な関係について精力的に研究を進めた。

## B. 研究方法

### In vivo ボルタメトリーによるドーパミン放出の検討

カーボンファイバーを forebrain bundle に挿入しボルタメトリーでドーパミン放出を測定する。

#### 行動解析

マウス用ロタロッドでは行動異常を観察できない。そこで半径の大きいラット用ロタロッドを使い 3, 6, 9, 12 か月でポール上に乗っている時間を測定する。またドーパミントランスポーター (DAT) 阻害剤である nomifensine を使い投与前後でのドーパミンシグナルを検討した。

#### 培養細胞

PC12 や HIT-15 細胞を使い、トレーサーとして growth hormone を用いて分泌能に関して検討した。また HeLa 細胞を用いて FRET 現象を検討した。

#### 生化学的解析

パーキン遺伝子変異陽性脳をホモジナイズした後、パーキン、PINK1 のタンパク量についてウェスタンブロットで半定量する。また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。

#### ウェ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。

#### 免疫細胞染色及び FRET 現象

免疫染色は、ミトコンドリアマーカには mitotracker を使った。FRET 現象にはパーキン、PINK1、 $\alpha$ -シヌクレインを用いた。

#### Yeast two hybrid によりパーキン結合分子のスクリーニング

既に結合分子として PDCD2-1 を単離同定している。パーキンのユビキチン化とパーキン遺伝子変異剖検脳での PDCD2-1 の蓄積の有無を検討する。ウェスタンブロットでの判定量を行った。

## C. 研究結果

[研究 1] In vivo ボルタメトリーでのドーパミン放出の検討。

既に In vivo での RI での結合能ではドーパミン放出の低下が推定される。今回の解析では直接的にドーパミン放出の低下が観察された。また放出の低下に伴い一般に DAT の減衰が観察されるが、パーキンノックアウトでは、DAT の減衰は観察されなかった。不十分な減衰がドーパミン放出不全と関連性が推定された。DAT 阻害剤を使うと野性型とほぼ同じ刺激反応を示したことより DAT の不全低下がパーキンノックアウトの病態に強く関わっていることが推定された。また 3, 6, 9, 12 ヶ月齢においてラット用ロタロッドでのポール上に乗っている時間を検討した。その結果、3 ヶ月月齢で最も顕著な差異が野性型と比較して観察された。この現象は学習能力の低下と意味づけた。トレーニング効果がなかったことがその根拠である。

[研究 2] パーキンと PINK1 の結合について FRET でパーキンと PINK1 の結合について

検討した。その結果、ミトコンドリア外膜で結合が観察された。既に分担者の田中らにより CCCP による脱共役阻害剤の投与でパーキンがミトコンドリアに集積することと関連性があると考えられた。また変異型、野生型で比較検討するとパーキンが PINK1 の安定性に関わっている可能性が考えられた。この現象はパーキン変異陽性症例の剖検脳でも観察された。更にパーキンの stable cell line でも同じように PINK1 の安定性が観察された。パーキンの PINK1 安定性機能が推定された。

#### [研究3] PDCD2-1

Yeast two hybrid 法でスクリーニングした分子のうち PDCD2-1 についてパーキンのユビキチン化効果について検討した。パーキンは PDCD2-1 をポリユビキチン化した。更にヒト剖検脳について検討し、この分子が変異症例で蓄積していることを見出した。

#### D. 考察

パーキンノックアウトマウスでラット用ロタロッドでのポール上に乗っている時間の学習能力が低下していることが分かった。このマウスのドパミン放出が3ヶ月齢をピークに6, 9ヶ月齢でも観察された。12ヶ月齢では野生型と大差ない状態であった。このことはパーキンが学習能力獲得の過程で重要な機能を成している可能性が考えられた。この現象は、一部のマウスでは DAT 阻害剤である nomifensine で改善された。パーキンと DAT の関連性が重要と考えられた。ドパミン放出が低下すると DAT も代償的に減衰することが報告されているが、パーキンノックアウトマウスでは代償的減衰が観察されず、不全であることがパーキンノックアウトマウスでの学習能力の低下に繋がっている可能性が考えられた。

劣性遺伝性パーキンソン病の原因遺伝子パーキン、PINK1、DJ-1は臨床的に極めて類似性が高い。ショウジョウバエの検討でもパーキンと PINK1 は同じカスケードに入ることが報告されている。特にミトコンドリア機能への関与が推定されている。今回の検討では、パーキンと PINK1 はミトコンドリア外膜で結合していることが分かった。過剰発現系ではあるが、パーキンと PINK1 は相互作用し、その安定性に関与していることが考えられた。このことは分担者の田中らのパーキンがミトコンドリアの品質管理に関わるとするデータと関連性が高いことを示唆している。またパーキンの存在は PINK1 の安定性に関わっており、パーキン、

PINK1 変異の二重変異症例では発症年齢の若年化など症状の重篤化が観察されることと管レ性が高いと言える。

新規基質候補に関して PDCD2-1 を同定した。この分子はパーキンによりユビキチン化され、しかもパーキン変異陽性の剖検脳で蓄積が観察されたことより有力な基質の1つと考えられた。

#### E. 結論

パーキンは運動学習能力に関与しており、パーキンの機能に DAT の関与が推定された。またパーキンはミトコンドリア外膜に PINK1 と共同してミトコンドリア機能の維持に関わっていることが推定される。また新規基質として PDCD2-1 を同定した。

#### F. 健康危険情報

無し

#### G. 研究発表

Kubo S, Iwatake A, Ebihara N, Murakami A, Hattori N. Visual impairment in Parkinson's disease treated with amantadine: case report and review of the literature. *Parkinsonism Relat Disord.* 2008;14(2):166-9. Epub 2007 May 16.

Kumazawa R, Tomiyama H, Li Y, Imamichi Y, Funayama M, Yoshino H, Yokochi F, Fukusako T, Takehisa Y, Kashiwara K, Kondo T, Elibol B, Bostantjopoulou S, Toda T, Takahashi H, Yoshii F, Mizuno Y, Hattori N. Mutation analysis of the PINK1 gene in 391 patients with Parkinson disease. *Arch Neurol.* 2008 Jun;65(6):802-8.

Funayama M, Li Y, Tsoi TH, Lam CW, Ohi T, Yazawa S, Uyama E, Djaldetti R, Melamed E, Yoshino H, Imamichi Y, Takashima H, Nishioka K, Sato K, Tomiyama H, Kubo S, MD, Mizuno Y, Hattori N. Familial parkinsonism with digenic parkin and PINK1 mutations. *Mov Disord.* 2008; 23(10):1461-5.

Mellick GD, Siebert GA, Funayama M, Buchanan DD, Li Y, Imamichi Y, Yoshino H, Silburn PA, Hattori N. Screening PARK Genes for Mutations in Early Onset Parkinson's

- Disease Patients from Queensland, Australia. *Parkinsonism Relat Disord* 2009; 15(2): 105-9.
- Momma K, Funayama M, Li Y, Ichinose H, Motoyoshi K, Hattori N, Mizuno Y, Kamakura K. A new mutation in the GCH1 gene presents as early-onset Parkinsonism. *Parkinsonism Relat Disord* 2009; 15(2): 160-1.
- Ning Y, Kanai K, Tomiyama H, Li Y, Funayama M, Yoshino H, Sato S, Asahina M, Kuwabara S, Takeda A, Hattori T, Mizuno Y, Hattori N. PARK9-linked parkinsonism in Eastern Asia: Mutation detection in ATP13A2 and clinical phenotype. *Neurology* 2008;70(16):1491-3.
- Ross OA, Wu YR, Lee MC, Funayama M, Chen ML, Soto AI, Mata IF, Lee-Chen GJ, Chen CM, Tang M, Zhao Y, Hattori N, Farrer MJ, Tan EK, Wu RM. Analysis of Lrrk2 R1628P as a risk factor for Parkinson's disease. *Ann Neurol*. 2008;64(1):88-92.
- Ross OA, Braithwaite AT, Skipper LM, Kachergus J, Hulihan MM, Middleton FA, Nishioka K, Fuchs J, Gasser T, Maraganore DM, Adler CH, Larvor L, Chartier-Harlin MC, Nilsson C, Langston JW, Gwinn K, Hattori N, Farrer MJ. Genomic investigation of alpha-synuclein multiplication and parkinsonism. *Ann Neurol* 2008;63(6): 743-50
- Tomiyama H, Kokubo Y, Sasaki R, Li Y, Imamichi Y, Funayama M, Mizuno Y, Hattori N, Kuzuhara S. Mutation analyses in amyotrophic lateral sclerosis/parkinsonism-dementia complex of Kii, Japan. *Mov Disord*. 2008;23:2344-2348.
- Tomiyama H, Mizuta I, Li Y, Funayama M, Yoshino H, Li L, Murata M, Yamamoto M, Kubo S, Mizuno Y, Toda T, Hattori N. LRRK2 P755L variant in sporadic Parkinson's disease. *J Hum Genet* 2008 Oct 16. [Epub ahead of print].
- C. 著書・総説**
- Mizuno Y, Hattori N, Kubo SI, Sato S, Nishioka K, Hatano T, Tomiyama H, Funayama M, Machida Y, Mochizuki H. Review. Progress in the pathogenesis and genetics of Parkinson's disease. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*. 2008;363(1500):2215-2227.
- 名取司保子, 服部信孝. パーキンソン病患者さんに発生する合併症の諸問題と具体的な対応策. *難病と在宅ケア*. 14 巻 4 号 Page25-28. 2008 年 7 月.
- 服部信孝. 薬学セレクト 疾患と薬物治療知っておきたい common diseases101. 富野康日己・望月正隆 編. 医歯薬出版. 2008 年 5 月.
- 服部信孝. 高齢者パーキンソン病の治療戦略 (座談会). *Pharma Medica*. 26 巻 3 号 Page153-159. 2008 年 3 月.
- D. 学会発表**
- 松山学, 吉野浩代, 今道洋子, 李元哲, 李林, 増田浩美, 板谷昌子, 高梨雅史, 高嶋博, 松浦英治, 有村公良, 野元三治, 水野美邦, 服部信孝. Autosomal recessive late onset parkinsonism の原因遺伝子探索. 第 49 回日本神経学会総会, 横浜, 5 月 16 日, 2008.
- 松山学, 大橋聡, 市川直樹, 今井哲司, 山本庄司, 日下弘道, 板谷昌子, 平澤恵理, 水野美邦, 服部信孝. NDUFV2+/- マウスにおける MPTP 感受性の検討. 生体機能と創薬シンポジウム 2008 東京, 東京, 9 月 5 日, 2008.
- 松山学, 吉野浩代, 今道洋子, 李元哲, 李林, 増田浩美, 板谷昌子, 高梨雅史, 高嶋博, 松浦英治, 有村公良, 野元三治, 富山弘幸, 久保紳一郎, 水野美邦, 服部信孝. Autosomal recessive late onset parkinsonism の原因遺伝子探索. 第 2 回 Movement Disorder Society, Japan 学術集会, 京都, 10 月 4 日, 2008.
- 松山学, 大橋聡, 市川直樹, 今井哲司, 山本庄司, 日下弘道, 板谷昌子, 平澤恵理, 水野美邦, 服部信孝. NDUFV2+/- マウスにおける MPTP 感受性の検討. 第 8 回日本ミトコンドリア学会年会, 東京, 12 月 20 日, 2008.
- E. 講演**
- Hattori N, Parkinson's Disease genetics in Asia, GEOPD meeting, Norway, 2008.6.9
- 服部信孝. パーキンソン病治療における新しい選択肢. 多摩パーキンソン病学術講演会, 2008 年 1 月 31 日, 立川
- 服部信孝. パーキンソン病治療における新しい選択肢. 熊本パーキンソン病治療研究会,

- 2008年2月6日, 熊本
- 服部信孝. パーキンソン病治療における新しい選択肢. レキップ錠発売1周年記念講演会, 2008年2月13日, 甲府
- 服部信孝. パーキンソン病治療の up to date. 第9回神奈川セレグリン研究会~パーキンソン病の治療とケア-新世紀への挑戦-, 2008年3月5日, 横浜
- 服部信孝. 遺伝性パーキンソン病の Up To Date. Movement Disorders Forum in Tokushima, 2008年3月13日, 徳島
- 服部信孝. パーキンソン病の最先端. 第8回大阪神経難病医療推進協議会総会, 2008年3月15日, 大阪
- 服部信孝. パーキンソン病治療の最先端. 鹿児島パーキンソン病学術講演会, 2008年3月21日, 鹿児島
- 服部信孝. パーキンソン病の Up to Date. コムタン錠発売1周年記念講演会, 2008年4月25日, 静岡
- 服部信孝. 遺伝性パーキンソン病の遺伝子産物の機能から黒質変性のメカニズムを探る. 第16回カテコールアミンと神経疾患研究会, 2008年4月26日, 東京
- 服部信孝. 気合いで治すパーキンソン病. パーキンソン病友の会, 2008年5月1日, 東京
- 服部信孝. 第49回日本神経学会総会ランチョンセミナー, 2008年5月17日, 横浜
- 服部信孝. パーキンソン病の最近の知見と薬物療法について. PD エキスパートミーティング, 2008年5月20日, 福岡
- 服部信孝. パーキンソン病の病態と治療. 名古屋パーキンソン病フォーラム, 2008年5月29日, 名古屋
- 服部信孝. パーキンソン病治療における Up to Date. パーキンソン病市民フォーラム in 飯田, 2008年6月15日, 飯田
- 服部信孝. パーキンソン病治療の Up to Date. 茨城 Movement Disorder 研究会, 2008年7月4日, 茨城
- 服部信孝. パーキンソン病の最新の知見と治療の進歩. 町田市医師会学術講演会, 2008年7月15日, 富山
- 服部信孝. パーキンソン病の Up to Date. コムタン錠 発売1周年記念講演会, 2008年7月16日, 広島
- 服部信孝. パーキンソン病発症機序: 遺伝性パーキンソン病からヒントを得て. 第1回富山ライフサイエンスシンポジウム~細胞内分子機構から見た老化と疾患~, 2008年7月26日, 富山
- 服部信孝. パーキンソン病治療の最前線: 薬物治療と機能的外科の手術療法の最近の進歩. 第34回卒後教育講座, 2008年8月31日, 神戸薬科大学
- 服部信孝. パーキンソン病治療~薬物治療と機能的外科の手術の融合を目指して~. 第27回関東機能的脳外科カンファレンス, 2008年9月6日, 神楽坂
- 服部信孝. 介護のエキスパートを目指して! パーキンソン病の介護テクニックセミナー. 2008年9月12日, 大崎
- 服部信孝. パーキンソン病とはどんな病気か-症状から発症のメカニズムまで. 越谷市民公開講座「パーキンソン病のすべて」, 2008年9月13日, 越谷
- 服部信孝. パーキンソン病の非運動症候: 特に精神症状について. 第11回横浜セミナー~脳とところを考える~, 2008年10月7日, 横浜
- 服部信孝. パーキンソン病治療の最前線~治療の問題点と今後の展望. 第9回東海パーキンソン病治療・症例検討会, 2008年10月17日, 名古屋
- 服部信孝. パーキンソン病治療の最前線~治療の問題点と今後の展望. 第8回東葛パーキンソン治療医療フォーラム, 2008年10月18日, 柏
- 服部信孝. パーキンソン病治療の最前線. 上越医師会, 2008年10月31日, 上田
- 服部信孝. パーキンソン病の非運動症候: 特に精神症状について. 第2回富山臨床精神神経医学研究会, 2008年11月15日, 富山
- 服部信孝. パーキンソン病治療の最前線: 薬物治療と機能的外科の手術療法の最近の進歩. 平成20年度卒後教育関東地区講座, 2008年11月30日, 渋谷
- 服部信孝. パーキンソン病の発症機序. 特別講

- 演. 第 20 回分子糖尿病学シンポジウム, 2008 年 12 月 13 日, 品川
- 服部信孝. パーキンソン病の Q&A・困ったときの対処法. パーキンソン病テレフォン教室, 2008 年 12 月 25 日
- 服部信孝. パーキンソン病の診断と治療—鑑別診断と症例、薬物療法を中心に—. 最新医療セミナー, 2009 年 1 月 12 日, 大門
- 服部信孝. 遺伝性パーキンソン病の最近の進歩. 発達障害研究所シンポジウム, 2009 年 1 月 29 日, 愛知県心身障害者コロニー
- 服部信孝. パーキンソン病のマネージメント. 杉並パーキンソン病懇話会, 2009 年 2 月 3 日, 吉祥寺
- 服部信孝. パーキンソン病治療に関する提案. PDExpert Seminar in Kochi, 2009 年 3 月 26 日, 高知
- F. その他
- Hattori N, Chair. Parallel Session: Genetics of Parkinson's Disease: Dominant, recessive and complex associations including Gaucher's disease, MDS 12<sup>th</sup> International Congress Session, Chicago, 2008. 6. 25
- 服部信孝. 【ここまでわかったパーキンソン病研究】はじめに. 医学のあゆみ 225 巻 5 号 Page357(2008. 05)
- 服部信孝. 座長. 第 8 回関東パーキンソン病勉強会. 青山. 1 月 12 日, 2008
- 服部信孝. 座長. 第 5 回臨床セミナー. 鈴木祐介先生(順天堂大学医学部 腎臓内科 准教授)「CKD を踏まえた降圧療法」2008 年 1 月 18 日, 順天堂
- 服部信孝. 座長. Academic Conference in Tokyo. 2008 年 2 月 7 日, 東京
- 服部信孝. 厚生労働科学研究費補助金 難治性疾患克服研究事業 新規抗パーキンソン病薬ゾニサミドの神経保護作用に関する臨床研究班(2007 年度 班会議). 2008 年 2 月 9 日, 乃木坂
- 服部信孝. 司会. 第 2 回薬物治療と機能外科の融合 PD シンポジウム. 2008 年 2 月 23 日, 丸の内
- 服部信孝. 司会. Web 講演会, 2008 年 3 月 14 日, 東京 リリー
- 服部信孝. 座長. 第 6 回高松国際パーキンソン病シンポジウム. 2008 年 4 月 2 日-4 日, 香川
- 服部信孝. 講演. 日本ベーリンガーインゲルハイム全社会議. 2008 年 4 月 25 日, 芝
- 服部信孝. 座長. 第 8 回神経学セミナー. 柳澤信夫先生(関東労災病院 名誉院長)「神経学に魅せられて」. 2008 年 5 月 9 日, 順天堂
- 服部信孝. 座長. Jie Shen, PhD (Associate Professor, Center for Neurologic Diseases, Program in Neuroscience, Harvard Medical School) Dopaminergic Circuit Dysfunction and Parkinson's Disease. 第 4 9 回日本神経学会総会ランチョンセミナー-4, 2008 年 5 月 15 日, 横浜
- 服部信孝. 座長. PD 治療における L-dopa 療法を再考する. 第 4 9 回日本神経学会総会イブニングセミナー-2, 2008 年 5 月 15 日, 横浜
- 服部信孝. 座長. パーキンソン病の臨床、基礎の最前線. 第 4 9 回日本神経学会総会シンポジウム講演, 2008 年 5 月 17 日, 横浜
- 服部信孝. 座長. Meet the Specialist in Tokyo. Heinz Reichmann 先生 (Professor and chair, Department of Neurology, Dean of Medical Faculty, University of Dresden) "New Trends in Parkinson's Disease Management in EU". 2008 年 5 月 19 日, 京王プラザ
- 服部信孝. 司会. 第 5 回パーキンソン病治療の“いま”を考える会. 鈴木裕先生(日本大学医学部内科系神経内科部門). 2008 年 5 月 21 日, 青山
- 服部信孝. 座長. 第 6 回臨床セミナー. 山路健先生(順天堂大学医学部 膠原病・リウマチ内科 准教授)「アフェレシス療法の UPDATE-膠原病・リウマチ性疾患を中心に」5 月 23 日, 順天堂
- 服部信孝. 第 1 回パーキンソン病治療ガイドライン改訂委員会. 2008 年 5 月 24 日, 京都
- 服部信孝. 世話人. 第 19 回細胞生物学セミナー. 村田茂穂先生(東京大学大学院薬学系研究科 教授)「プロテアソームの多様性による生命活動の制御とその分子基盤」. 2008 年 5 月 26 日, 順天堂
- 服部信孝. 座長. 第 2 回 DBS 懇話会. 中島円先生(順天堂大学 脳神経外科)「本院における DBS 現況報告」, 戸田弘紀先生(財団法人田附興風会医学研究所 北野病院神経外科)「脳深部刺激療法: 合併症

- を避ける工夫」. 6月6日, 順天堂
- 服部信孝. 講演. 江東区パーキンソン病友の会. 2008年6月7日, 順天堂
- 服部信孝. 司会. WEB パネルディスカッション. パーキンソン病早期治療による ADL の維持. 6月20日, 赤坂
- 服部信孝. 新井平伊. 座長. 順天堂 都民公開講座. 健やかな中高年ライフをめざして—メタボリック症候群と認知症の克服. 6月21日, 順天堂
- 服部信孝. 世話人. 第20回細胞生物学セミナー. 松本満先生(徳島大学疾患酵素学研究中心)「遺伝的要因が関与するヒト免疫関連疾患の病態解析」. 2008年7月7日, 順天堂
- 服部信孝. 座長. パーキンソン病とその類縁疾患. 第31回日本神経科学大会. 2008年7月12日, 東京国際フォーラム
- 服部信孝. 司会. 第7回変性疾患懇話会〜リスクとベネフィットを考える〜. 2008年7月18日, 御茶ノ水
- 服部信孝. 第2回パーキンソン病治療ガイドライン改訂委員会 会合. 2008年7月21日, 神田
- 服部信孝. 第51回 神経内科懇話会世話人会. 2008年8月2日, 経団連会館
- 服部信孝. 座談会(パーキンソン病の治療戦略). 2008年8月7日, 札幌
- 服部信孝. 文部科学省(特定領域研究「病態脳」)夏のワークショップ. 2008年8月7日-10日, 札幌
- 服部信孝. 厚生労働科学研究費補助金(難病疾患克服研究事業)神経変性疾患に関する調査研究班 ワークショップ. 2008年8月22日, 都市センターホテル
- 服部信孝. 総合司会. 第2回お茶の水 PD 研究会. 2008年9月5日, 飯田橋
- 服部信孝. 座長. 神経学会関東地方会. 2008年9月6日, 東京
- 服部信孝. 世話人. 第22回細胞生物学セミナー. 赤澤智宏先生(東京医科歯科大学)「メンブレントラフィッキングに必要なユビキチンリガーゼ」講演. 2008年9月17日, 順天堂
- 服部信孝. 座長. 17<sup>th</sup> Symposium on the Treatment of Parkinson's Disease. 2008年9月27日, 赤坂
- 服部信孝. 座長. 第7回臨床セミナー. 島田和典先生(順天堂大学 循環器内科 准教授)「動脈硬化 Update-予防と治療の最前線」講演 2008年10月10日, 順天堂
- 服部信孝. 総合司会. 市民公開フォーラム「パーキンソン病の全てを知る」. 2008年10月11日, 神田
- 服部信孝. 司会. Web パネルディスカッション「パーキンソン病の運動症状と非運動症状〜薬物療法の観点から〜, 2008年10月29日, 赤坂
- 服部信孝. 座長. 第11回神経学セミナー. 松本昌泰先生(広島大学大学脳神経内科学教授)「脳卒中医学・医療の維新を目指して」講演 2008年11月5日, 順天堂
- 服部信孝. 座長. ランチョンセミナー1「パーキンソン病における認知と情動」. 第61回日本自立神経学会総会. 2008年11月6日, 横浜
- 服部信孝. 座長. Expert Meeting for Update Strategy on PD Treatment. 2008年11月8日, 芝
- 服部信孝. 座長. パーキンソン病治療勉強会. 2008年11月17日, 京王
- 服部信孝. 座長. 第11回神経学セミナー. 西澤正豊先生(新潟大学脳研究所 神経内科学分野 教授)「運動失調症研究の最近の話題」講演 2008年11月28日, 順天堂
- 服部信孝. 座長. パーキンソン病治療勉強会. 2008年11月17日, 京王プラザ
- 服部信孝. 総合司会. 東京パーキンソン病スタンディーグループ・研究会. 2008年11月21日, 汐留
- 服部信孝. 座長. 第12回神経学セミナー. 西澤正豊先生(新潟大学脳研究所 神経内科学分野 教授)「運動失調症研究の最近の話題」講演 2008年11月28日, 順天堂
- 服部信孝. 会長. 第187回日本神経学会関東地方会. 2008年11月29日, 砂防会館
- 服部信孝. 厚生労働科学研究費補助金(難病疾患克服研究事業)神経変性疾患に関する調査研究班 班会議. 2008年12月19日-20日, 都市センターホテル
- Hattori N, Chair. Young onset PD. AOPMC & APPA2009, India, 2009. 2. 16
- 服部信孝. 座談会 (Frontiers in Parkinson Disease 対談「Expert Message」). 出席者服部信孝先生(順天堂大学医学部脳神経内科学 教授)山本光利先生(香川県立中央病院神経内科 主任部長). 2009年1月9日, パレスホテル

- 服部信孝. パーキンソン病治療ガイドライン改訂委員会第3回会合. 2009年1月10-11日, 京都大学
- 服部信孝. ゴニサミド(トレリフ) ボードミーティング. 2009年1月18日, 丸の内ホテル
- 服部信孝. 座談会司会 (テーマ: 「パーキンソン病患者さんの Unmet Needs, 医療連携の重要性」). 出席者服部信孝 先生 (順天堂大学医学部脳神経内科学 教授) 高橋 一司 先生 (慶應義塾大学医学部神経内科専任講師) 波田野 琢 先生 (順天堂大学医学部脳神経内科学 助教) 村田 美穂 先生 (国立精神・神経センター病院第二病棟 部長). 2009年1月23日, パレスホテル
- 服部信孝. 第50回日本神経学会総会プログラム委員会. 2009年1月30日, ホテルニューオータニ東京
- 服部信孝. 座談会司会 (Frontiers in Parkinson Disease 対談, (テーマ: パーキンソン病治療の最新の話題—ドパミンアゴニストの気分障害への効果を中心に—). 出席者服部信孝 先生 (順天堂大学医学部脳神経内科学 教授) Dr. Lemke MR (Center of Psychiatry and Neurology, Rhine Clinic Bonn, Germany) 鈴木 正彦 先生 (東京慈恵会医科大学神経内科 講師) 永山 寛 先生 (日本医科大学神経内科・腎臓内科 講師)). 2009年2月2日, 東京ドームホテル
- 服部信孝. World Parkinson meeting. 2009年2月5-7日, ニューヨーク
- 服部信孝. 司会. 出席者: 服部信孝 先生 (順天堂大学医学部脳神経内科学 教授) 戸田 達史 先生 (神戸大学大学院医学研究科神経内科 教授) 山本光利 先生 (香川県立中央病院神経内科 主任部長)). Academic Conference In Tokyo. 2009年2月13日, シェラトンホテル東京
- 服部信孝. 研究活動評価委員. 2009年1月19日, 東京医科歯科大学難治疾患研究所
- 服部信孝. 世話人会. ニューロフォーラム東京. 2009年2月26日, 京王プラザ
- 服部信孝. 座長. PD とは何か. 8th International Parkinson's Disease Symposium in Takamatsu. 2009年3月7日, かがわ国際会議場にて
- 服部信孝. 座長. 第8回臨床セミナー, 青木茂樹教授先生 (順天堂大学医学部放射線 教授) 「MRI 最近の進歩」2009年3月13日, 順天堂
- 服部信孝. 世話人会. 関東パーキンソン病勉強会. 2009年3月14日, 都内
- 服部信孝. 厚生労働科学研究費補助金「創薬基盤推進研究事業: ヒトゲノムテーラーメイド研究」班会議. 2009年3月21日, 大阪大学
- 服部信孝. 医療相談. 神経系難病無料医療相談会. 2009年3月22日, 小金井

#### 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

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ン症 (autosomal recessive juvenile parkinsonism, AR-JP) の責任遺伝子であるパーキンの生理機能とその破綻による AR-JP の発症機序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、その表現型は中脳の黒質に何らの異常を見出すことはできなかった。そこでパーキンの役割を再評価する目的でその組織分布について詳細に検討した。即ち、マウス脳におけるパーキンの細胞内分布について、パーキン欠損マウスを対照に生化学的に検討した結果、ほとんどが可溶性画分(細胞質)に存在することが分かった。しかし、様々な細胞の細胞質の大部分のパーキンは、ミトコンドリアの uncoupler である CCCP (carbonyl cyanide *m*-chlorophenylhydrazone) 処理によって膜電位が低下したミトコンドリアに移行した。AR-JP の患者由来の変異パーキンについて検討した結果、このミトコンドリア移行に障害のあるケースが可成りの頻度で観察された。そしてミトコンドリアの外膜表面が抗ユビキチン抗体で濃染されることから、パーキンの真の標的分子がミトコンドリア表面膜に存在する可能性を強く示唆された。その後、パーキンが移行したミトコンドリアは時間経過と共に消失し、この消失はオートファジー欠損 MEFs (マウス胎児線維芽細胞) では、観察されなかった。この結果は、パーキンがミトコンドリアの品質管理に関与している可能性を強く示唆している。

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、その遺伝子は1998年に突き止められた。そして我々がパーキンのユビキチンリガーゼ活性を報告して以来(1)、世界中で精力的に解析が進められてきた。特にその標的基質に関する論文は、枚挙に暇がないほどに発表されてきた。問題は、それらが相互に関連性が認められないであり、AR-JPの発症機構に関して研究者間でコンセンサスが得られていないことである。即ち、依然としてAR-JPの発症機構の発症機構は闇に包まれている。

問題点を整理すると、第一にパーキンのユビキチンリガーゼとしての分子機能が曖昧であることが挙げられる。この解明には、基質の同定が必須であるが、これが不明であるために結論的なことが言えないのが現状である。我々は recombinant の MBP (maltose binding protein) パーキンを利用したインビトロでの酵素活性アッセイ系を確立して、少なくとも MBP-パーキンが Multiple Monoubiquitylation を触媒する酵素であることを明らかにした

(2)。この結果は、その後、複数のグループから追試の報告が発表された。その後の研究から、我々はパーキンが自己抑制的な活性を持つ

た酵素であり、触媒活性としては、K-48 リンクのポリユビキチン鎖のみならず用いた E2 の種類依存的に K-63 リンクのポリユビキチン鎖を形成できる酵素であることを突き止めた(論文投稿中)。従って、細胞内では、二つの可能性が考えられる。一つは、Multiple Monoubiquitylation としての機能と、もう一つは、まだ明らかにされていない活性化因子が存在してその因子との連携作用により Polyubiquitylation を触媒する場合である。後者の場合、K-48 リンクのポリユビキチン鎖を形成する酵素であるのか、K-63 リンクのポリユビキチン鎖を形成する酵素であるのかは、大きな問題である。いずれにしてもこれらの解明には、基質の同定が必須であり、基質が不明である限り、究極的に解決を導くのは困難である。

第二の問題点は、パーキンの細胞内局在性である。これまでパーキンの局在に関して、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きた。しかしこのように論文間で結果が異なる原因として、(a)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、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、(b)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、



昨年から本年にかけて、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などではなく、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目標をおいて詳細に解析してきた。

第三の問題点は、パーキンが細胞内で複合体を形成しており、そのことによって機能変換が想定される可能性である。この課題に関しては、マウス脳抽出物におけるパーキンの動態に関して蔗糖密度勾配遠心法を駆使して、非常にマイルドな条件でのパーキンの動態を解析した。

本年は、これらの問題に取り組むと共に、新たに浮上したパーキンとミトコンドリアとの機能的な関係について精力的に研究を進めた。

## B. 研究方法

### 培養細胞

主として HeLa 細胞と atg7 遺伝子 (オートファジー) 欠損マウスから樹立した MEFs (mouse embryonic fibroblasts) 細胞を使用した。そして transfection した細胞では、基本的に stable cell line を樹立して、導入した遺伝子の発現が安定した状態で実験に供した。

### 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。

### ウエスタンブロット分析

25mM Tris (hydroxymethyl) aminomethane [Tris]-HCl (pH 7.5)、2mM ATP、1mM dithiothreitol (DTT) に調整したバッファ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× nupage LDS サンプルバッファ、2-mercaptoethanol を加え、95°C、5min で前処理した。ゲルは Nupage ブレキャストゲル (invitrogen) を使用した。

### 密度勾配遠心

マウス脳抽出液を 1.1 M - 1, 16 M の蔗糖密度勾配遠心 (20 時間、4°C) し、1ml、30 本に分画し、ウエスタンブロット分析に今日した。

### 免疫細胞染色

免疫染色は、GFP-パーキン、ユビキチン (FK2) 抗体、Tom20 (ミトコンドリア外膜タンパク質) 抗体を用い、共焦点レーザー顕微鏡を用いて直接観察した。

## 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、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エ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、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示唆された。

### [研究 2] マウス脳抽出液におけるパーキンの動態

マウス脳抽出液を蔗糖密度勾配で遠心した後、分画した各々の画分について抗パーキン抗体でウエスタンブロット分析をした結果、パーキンは遊離のモノマーの位置に沈降した。この結果は、少なくともパーキンはマウス脳抽出液において、他の分子と安定に相互作用する可能性は低く、単量体として存在していると考えられた。

### [研究 3] パーキンとミトコンドリア

ミトコンドリアの内膜に存在する呼吸鎖、特に complex I の活性低下が、パーキンソン病と関係することを示唆した報告は、多い。そこで、HeLa 細胞 (内在性のパーキンは存在しな

い)に GFP-パーキンを導入した後、ミトコンドリアの uncoupler である CCCP(carbonyl cyanide m-chlorophenylhydrazone) 処理 (10  $\mu$ M)してミトコンドリア内膜の電子伝達系を破壊し、膜電位を強く低下させた。そして GFP-パーキンの細胞内局在について共焦点顕微鏡で観察した結果、30 分以内に細胞質に拡散的に存在していたパーキンが大量にミトコンドリアの表面に移行した。このミトコンドリアに移行したパーキンは、ミトコンドリア外膜のタンパク質である Tom20 と共染色した結果、両者は完全にマージした。即ち、ミトコンドリアに移行したパーキンは、外膜に結合していると考えられた。

またこの移行に関して多数の AR-JP 変異パーキンで検討した結果、ミトコンドリア移行がほぼ完全に抑制される変異、少し抑制される変異、全く抑制されない変異に分類されることが判明した。

その後、モノユビキチンとポリユビキチン鎖の両者を認識できる抗パーキン抗体 FK2 で染色すると、パーキンと同じように CCCP 依存的にミトコンドリアの外膜 (Tom20 と共染) が濃染された。その後の経過をみると、GFP-パーキンを導入した細胞のミトコンドリアのみが消失した。しかもこの消失は、オートファジー (Atg7) が欠損した MEFs では、大幅に抑制されたことから、膜電位を失ったミトコンドリアはオートファジーによって品質管理されている可能性が示唆された。

#### D. 考察

通常、パーキンは一部が膜面に存在するものの大部分が細胞質に存在するが、CCCP処理することにより、可成りの量がミトコンドリアに移行した。これは、HeLa細胞のみならず、HEK293細胞やMEF細胞でも観察されたが、CCCPの濃度や移行時間には、細胞間で相違が認められた。他種類のAR-JP変異で検討した結果、CCCP依存的なパーキンのミトコンドリア移行が完全に阻害される場合があったので、このミトコンドリアの移行阻害が、AR-JPの発症原因の一翼を占めている可能性が強く示唆された。

その後、ミトコンドリアの外膜周辺がFK2 (ユビキチン抗体)で染色されたが、パーキンが存在しない場合には、パーキンの細胞質分布は変動しなかった。パーキンのユビキチンリガーゼ活性 (RING2ドメイン) が完全に消失したAR-JP変異パーキンの一部は、ミトコンドリアへの移行がほぼ正常であるにも関わらず、ユビ

キチン染色が負である場合が存在したので、CCCP処理でミトコンドリアがFK2で染色されるためには、パーキンのリガーゼ活性が不可欠であることが判明した。この結果は、ミトコンドリアの外膜にパーキンの標的タンパク質が存在する可能性がきわめて高いことを示唆している。

CCCP処理で傷害されたミトコンドリアがオートファジー (Atg7遺伝子) が欠損したMEF細胞では、パーキンの移行、ユビキチンのミトコンドリア染色は、明瞭に観察されたが、ミトコンドリアの消失は、強く抑制された。この結果は、オートファジーが膜電位を失ったミトコンドリアを消化して品質管理しており、注目される観察であった。

以上の結果は、オートファジーを欠失させると、神経変性疾患様の症状を呈すること(3)、そしてプリキン細胞でオートファジーを欠失させると軸索にミトコンドリアを含むオルガネラが蓄積してニューロンが自律的に細胞死 (cell autonomous death) を引き起こすこと(4、5)を報告した我々の知見とを考え合わせると、非常に興味深い

また哺乳類の加齢に従って、例えばヒトやマウスの高年齢化に伴って、ミトコンドリアの機能低下やオートファジーの活性低下が見られることを考え合わせると、ニューロンの健康維持において、オートファジーによるミトコンドリアの品質管理の重要性が強く示唆された (関連論文6-8)。

#### E. 結論

仮説: パーキンソン病は、ミトコンドリアの品質管理の破綻によって発症するミトコンドリア病である。

#### 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) Matsuda, N., Kitami, T., Suzuki, T., Mizuno, Y., Hattori, N., and Tanaka, K. (2006) Diverse effects of pathogenic mutations of Parkin that catalyzes multiple mono-ubiquitylation in vitro. **J. Biol. Chem.** 281, 3204-3209.
- (3) Komatsu, M., Waguri, S., Chiba, T., Murata, S., Iwata, J., Ueno, T., Koike, M., Uchiyama, Y., Kominami, E., and Tanaka, K. (2006) Loss of autophagy in the central nervous system causes neurodegeneration. **Nature** 441, 880-884
- (4) Komatsu M., Wang QJ., Holstein GR., Friedrich VL., Iwata JI., Kominami E., Chait BT., Tanaka K., Yue Z. (2007) Essential role for autophagy protein Atg7 in the maintenance of axonal homeostasis and the prevention of axonal degeneration. **Proc Natl Acad Sci USA** 104, 14489-14494.
- (5) Yue, Z., Friedman, L., Komatsu, M., and Tanaka, K., The cellular pathways of neuronal autophagy and their implication in neurodegenerative diseases. **Biochem Biophys Acta – Mol Cell Res.** in press.
- (6) Matsuda, N. and Tanaka, K. (2009) Does impairment of ubiquitin-proteasome system predispose to neurodegenerative disorders? **Journal of Alzheimer's Disease** in press.
- (7) Murata, S., Yashiroda, H., and Tanaka, K. (2009) Molecular mechanisms of proteasome assembly. **Nature Rev Mol Cell Biol** 10, 104-115.
- (8) Tanaka, K. (2009) The proteasome: Overview of structure and functions. **Proc. Jpn. Acad. Ser B Phys Biol Sci.** 85, 12-36.

## 2. 学会発表

田中啓二：Protein Degradation and Neurodegenerative Diseases. Neuroscience 2008 第31回日本神経科学大会.特別講演。July 10, 2008 (東京フォーラム) 東京。

田中啓二：タンパク質分解と病態生理学 (Proteolysis and Pathophysiology). 第2回 Diabetes Leading-edge Conference：静岡県沼津市淡島ホテル (平成20年8月9日) 静岡

Keiji Tanaka : The Novel Thymoproteasome Regulates Development of CD8<sup>+</sup> T Cells. 33<sup>rd</sup> FEBS Congress & 11<sup>th</sup> IUBMB Conference (Symposium on the ubiquitin-proteasome system) Peace and Friendship Stadium, June 30, 2008, Athens, Greece.

Keiji Tanaka : Unexpected encounter with immunity during my proteasome study. Japan-German Immunology Seminar 2008 : Immune Regulation in Health and Disease. (November 3-6, 2008) Fukuoka, Japan

## 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

パーキンソン病におけるパエル受容体の役割に関する研究

研究分担者 高橋良輔 京都大学医学研究科

研究要旨

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 *parkin* 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り、タンパク質分解系の破綻が PD の発症にかかわることを示す強い証拠を提供している。我々は *Parkin* の基質タンパク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 が蓄積すると、これが小胞体ストレスを惹起して神経変性が生じるという仮説を提唱している。また、我々は Pael-R 変異マウスの解析から Pael-R のドパミン代謝への関与をしている。本年度は、Pael-R と複合体を形成するタンパク質の同定と、*Parkin* の基質候補としての Pael-R 複合体構成タンパク質について解析した。既報告のあるドパミントランスポーターに加え、同様に選択的な変性の認められるノルエピネフリン作動性神経に特異的に発現しているノルエピネフリントランスポーターがそれぞれ Pael-R と複合体を形成し、さらにこれら Pael-R 複合体形成タンパク質の少なくとも一部が *Parkin* の基質となりう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ニズム (AR-JP) の原因遺伝子産物 *Parkin* は、細胞内の主要なタンパク質分解系のひとつであるユビキチン・プロテアソーム系 (UPS) で重要な役割を果たすユビキチンリガーゼ (E3) としての活性をもち、AR-JP 患者で見られる変異体はこの E3 活性が欠失または低下している。このことは、本来 *Parkin* によって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 Pael 受容体 (Pael-R) は小胞体でのフォールディングが難しく、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。これは本来そのほとんどが小胞体関連分解 (ERAD) で分解されている、うまくフォールディングされなかった Pael-R が ERAD の処理能力を超えて小胞体および細胞質に蓄積し小胞体ストレスを引き起こすためであると考えられる。また、Pael-R トランスジェニック (Tg) マウスでは線条体における小胞内ドパミン (DA) 量とその代謝産物である DOPAC 量が増加し、Pael-R ノックアウト (KO) マウスでは線条体 DA レベルが対照

群の 60% に減少していた。これは Pael-R の DA 代謝への関与を示唆するものと考えられる。

このように Pael-R の蓄積による細胞毒性と DA 代謝への関与が明らかになったものの、Pael-R の蓄積がなぜカテコールアミン作動性神経選択的な細胞死を引き起こすかについての明確な理由は依然として不明であり、これを明らかにするためには Pael-R の黒質ドパミン作動性神経および青斑核のノルエピネフリン作動性神経における生理的役割を解明する必要がある。

ドパミン作動性神経特異的に発現しているドパミントランスポーター (DAT) と Pael-R の結合および Pael-R KO マウス線条体における細胞表面 DAT レベルの増加がすでに Marazziti らによって報告されている。彼女らは Pael-R による DAT の膜表面への発現抑制を示唆している。さらにこの DAT は *Parkin* の基質候補タンパク質として同定されている。これらを踏まえ、我々は Pael-R および *Parkin* が DAT を介した DA 代謝のみならず、ノルエピネフリントランスポーター (NET) を介したノルエピネフリン (NE) 代謝にも関与しているのではないかと、Pael-R と複合体を形成する膜タンパク質がカテコールアミン作動性神経選択的な細胞死のメカニズ