

200935020A

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21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22(2010)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 21 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 22(2010)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	3
服部 信孝	
II. 分担研究報告	
1. パーキンノックアウトマウスのインスリン分泌機構のメカニズム	13
服部 信孝	
2. パーキンノックインマウスの作製・解析	19
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に関する研究	25
高橋 良輔	
4. ミクログリアの二相性と脳保護作用に関する研究	29
澤田 誠	
III. 研究成果の刊行に関する一覧表	37
IV. 研究成果の刊行物・別刷	47

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

平成 21 年度は、Parkin knock out (KO) マウスの隣β細胞のインスリン分泌機構の解析を行った。インスリン含有小胞とカテコラミン含有小胞は構造上類似性が高い。インスリン分泌とドパミン放出の共通機構の存在を想定し、より均一なβ細胞のメリットを最大限に利用して解析を進めた。インスリンには 2 相性分泌機構を持っており parkin KO mice では、選択的第 1 相の低下が観察された。このことは膜結合型分泌機構の破綻が予想された。またボルタメトリーによるドパミン分泌の低下を確認するとともにラット用ロタロッドテストを使用することで運動学習能力を解析できるシステムを開発した。このテストは MPTP マウスでも行っており、運動学習能力はドパミン分泌と相関があった。このモデルの登場で抗パーキンソン病薬の開発が mice レベルで可能になったと言える。

Parkin 蛋白は、ユビキチン・プロテアソーム系に関与しているが、この蛋白分解系だけでなくオートファジー・リソソーム系も神経変性において重要な機能をなしていることが予想されている。遺伝性 PD で Park9 の遺伝子産物 ATP13A2 はこの系に属することが推定されている。この蛋白の正常型と変異型の局在の変化を検討し、変異型では小胞体に局在することが予想された。この局在変化は変異型に共通しており、loss-of-function 効果は局在の変化によることが予想された。Mitophagy に parkin, PINK1 が関与することが分かった。既に CCCP 処理すると膜電位が低下すると parkin がミトコンドリア外膜に集合し、mitophagy を誘導することが分かった。更にこの mitophagy 誘導には PINK1 の存在が必須であった。

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することを見出した。我々は Pael-R のドーパミン代謝への影響を探るため、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%に減少していたが、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。つまり Pael-R は線条体 DA 量を制御している可能性が示唆された。また 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。

最近の考え方として neuron-glia crosstalk が注目されており、マイクログリアに注目した。本年度はマイクログリアの脳保護作用について検討を行った。ラット脳一次培養からえられる性質の異なるマイクログリアのうちタイプ II を IL-4 で活性化すると神経毒性の強い A beta (1-42) オリゴマーの貪食分解が促進された。このとき、スカベンジャー受容体 CD36, ネプリライシン、インシュリン分解酵素が誘導された。CD36 に機能変異をもつラットから分離したタイプ II ミクログリアでは A beta (1-42) オリゴマーの貪食増大が見られなかった。この効果はタイプ I ミクログリアでは見られなかった。この結果から、マイクログリアにはサブタイプが存在し、神経変性疾患発症にそれぞれ異なる役割を果たしている事がわかった。サブタイプの活性化条件はそれぞれ異なる事から、パーキンソン病の段階における各サブタイプの役割を調べる事により発症や病態形成のメカニズムへの関与が明らかになると考えられる。

A. 研究目的

パーキンソン病 (PD) はアルツハイマー病について頻度の高い神経変性疾患で黒質ドパミン神経細胞が変性することにより動作が遅くなる、手足がふるえる等の運動障害が主な症状である。しかしながら近年、うつ症状、認知機能障害、自律神経障害等多岐にわたる障害が高頻度に合併し患者の ADL を著しく阻害する。今後予想される高齢化社会に向け患者が増加することが確実視されているがその根本的治療法はまだ開発されていない。根本的治療法開発に向け、PD の原因究明が急務である。その多くは孤発性であるが約 10 パーセントに家族性のパーキンソン病が知られている。10 年前より原因遺伝子が単離されはじめ、その病態の解明が急速に進み近年の分子遺伝学の進歩により家族性 PD (FPD) の原因遺伝子が明らかになりつつある。特に FPD の中でも常染色体劣性の遺伝形式を呈する若年性パーキンソニスムの原因遺伝子 parkin (PARK2) は最も多くの頻度を占める。また PINK1 (PARK6) の遺伝子変異の頻度も高いことが分かってきた。また同じく常染色体劣性の ATP13A2 遺伝子異常の患者の頻度は少ないが、本邦でも新たな変異をもつか患者を報告してきた。そこで我々はこれら常染色体劣性パーキンソン病の原因遺伝子産物に着目し、その分子機能を明らかにすることにより、神経細胞死の機序を解明するとともにその発症予防の開発

につなげることを目標とする。

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 (京都大学医学研究科)、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・遺伝子産物解析、新規原因遺伝子の同定・単離。更にはインスリン分泌機構の破綻と parkin 機能についての解析。また Park9 の遺伝子産物 ATP13A2 の機能解析。田中啓二：パーキンノックインマウス作製・解析。遺伝子産物の制御機構解析。高橋良輔：パエル受容体の機能解析。パーキンノックアウトマウスの解析。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。

C. 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. 結果

1) インスリン分泌機構の解析

膵β細胞の放出をTIRFMIにて解析したところインスリンの第1相の放出の低下が顕著に見られた。このことはSNARE蛋白が関与する放出の障害の関与が推測された。さらにSeptin5の発現、結合を

ウェスタンブロット法にて検討したところ、Parkin欠損マウスにおいてSeptin5の細胞膜上での集積、ポリマー化を認め、SeptinとSNARE蛋白の結合の増加が確認された。Septin5の細胞膜上での集積の機序としてリン酸化、他の細胞骨格蛋白との結合が関与していることが推測された。

2) Parkin, PINK1のmitophagyへの関与

パーキンの損傷（膜電位低下）ミトコンドリアへの移行

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（膜電位の低下を誘導）が、パーキンソン病をはじめとして多くの神経細胞で観察されている。そこで、パーキン遺伝子が変異してパーキンを発現していない HeLa 細胞に GFP-パーキンを導入した後、ミトコンドリアの uncoupler（脱共役剤）である CCCP(carbonyl cyanide m-chlorophenylhydrazone: 10 mM) 処理してミトコンドリア内膜の膜電位をほぼ完全に低下させた。そして GFP-パーキンの細胞内局在について共焦点レーザー顕微鏡で観察した結果、30 分以内に細胞質に存在していたパーキンの大部分がミトコンドリアの外表面膜に移行した。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。培養細胞ならびに MEF を CCCP で処理し、Parkin

と PINK1 の動態を生化学的に解析したところ Parkin は CCCP 処理により膜電位を消失した異常なミトコンドリアを認識して移行する。この反応は Parkin 特異的な反応であるが、ミトコンドリアへの移行には PINK1 が必須であることを見出した。さらに Parkin が移行したミトコンドリアは次第に消化されていくことを観察した。一方で PINK1 の変異体の場合は parkin のミトコンドリアへの移行が障害されるとともにミトコンドリアの消化も抑制された。Parkin は障害されたミトコンドリアのクリアランスに重要な要素であり、ミトコンドリアの品質管理に重要な役割を担っていることが推測された (Matsuda et al. JCB 2010, Kawajiri et al. FEBS Lett 2010)。クリアランスの詳細なメカニズムは不明であるがオートファジーを阻害するとクリアランスが抑制されることからミトファジーが有力である。以前より孤発性パーキンソン病の病態としてミトコンドリア機能異常が指摘されており、Parkin のこのようなミトコンドリアクリアランスの作用の解明は重要な課題である。

3) ボルタメトリーを使った parkin KO mice と MPTP 処理 mice の解析

parkin KO mice を直径 9 cm のラット用ロタロッドを用いて解析すると若齢 mice ではロタロッドに乗っていられる時間が学習しても延長しな

いことが分かった。一方、この現象は、老齡 mice では認めなかった。また MPTP 処理した mice ではドパミン枯渇状態と相関してこの運動学習能力の低下が観察された。

4) ATP13A2の局在とその機能

ATP13A2の正常タンパク質はリソソームに局在するが、今回見出しATP13A2の変異タンパク質は小胞体にとどまることが分かった。変異タンパク質は小胞体からリソソームに輸送されないことによりリソソームの機能異常ならびにタンパク分解異常をきたすことが推測された。この現象は正常ATP13A2を補充することで回復したことから Park9 の発症は遺伝形式が示すように loss-of-function効果によるものと考えられた。

5) 遺伝性PDの変異解析及び新規遺伝子座の同定

5 家系に関してホモ接合体マッピングを決定した。現在変異スクリーニングを行っている。一方、既知の原因遺伝子のスクリーニングの過程で新しい α -シヌクレイン遺伝子変異 A53V を見出した。この変異はホモ接合体を示していた。従来報告されていた変異は全て優性遺伝形式であるのでホモ接合体のみ発症者が見出されているので今後、ドパミン量のイメージングスタディーを予定し、ドパミン低下の有無を検討する予定である。

6) パーキンによる損傷ミトコンドリア外膜タンパク質のユビキチン化

CCCP処理後、抗パーキン抗体FK2で細胞染色すると、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が濃染(Tom20と共染)された。このユビキチン化の動態を調べるためにK48リンクのユビキチン鎖及びK63リンクのユビキチン鎖に特異的な抗体を用いて免疫染色した結果、後者が強く反応した。その結果、パーキンによる損傷ミトコンドリア外膜タンパク質のユビキチン化はK63リンクのユビキチン鎖であることが判明した。

7) 損傷ミトコンドリアのパーキン依存的な選択的オートファジーによるクリアランス (mitophagy)

CCCP処理後の経過をみると、24時間後には GFP-パーキンを導入した細胞のミトコンドリアのみが選択的に消失した。しかもこの消失は、オートファジー (Atg7) が欠損したMEFs (mouse embryonic fibroblasts) 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選択的に分解されている可能性が示唆された。このオートファジーによる選択的なミトコンドリア分解は、mitophagyと呼ばれている。パーキンはこの膜電位低下 (損傷) に依存したmitophagyに必須な役割を果たしてい

ることが示唆された。

8) PINK1 依存的なパーキンのミトコンドリア移行

ハエ (*Drosophila*) の遺伝学的研究から PINK1 はミトコンドリアの形態維持に必須であること、そしてパーキンと同じ経路に存在することが示唆されていた。さらにこの経路において PINK1 は、パーキンの上流に位置することも報告されていた。その理由は、PINK1 欠失によるミトコンドリアの形態異常はパーキンの過剰発現で抑制されるが、逆にパーキン欠失は PINK1 の過剰発現で相補されないからであった。

そこで損傷ミトコンドリアへのパーキンの移行に PINK1 が関係しているのか否かを調べるために PINK1 欠損 MEFs にレトロウイルスに組み込んだ GFP-パーキンを導入し、CCCP 処理 (30 mM, 3 時間) を行った。その結果、野生株 MEFs では、パーキンは損傷ミトコンドリアに移行したが、PINK1 欠損 MEFs では、全く移行しなかった。そこで、PINK1 欠損 MEFs にレトロウイルスに PINK1 を組み込んで導入した戻し実験をすると、CCCP によるパーキンのミトコンドリア移行は、完全に回復した。この結果は、PINK1 がパーキンの損傷ミトコンドリアへのリクルート因子であることを示唆している。

9) PINK1 によるパーキンのミトコンドリア移行の誘導には、PINK1 のミトコンドリア局在とキナーゼ活性が必須である

PINK1 は N-末端側に putative なミトコンドリア移行シグナル (典型的な構造ではない) 領域をもち C-末端側半分領域に Ser/Thr タンパク質キナーゼ領域 (serine/ threonine-protein kinase) を持っている。そこで、PINK1 欠損 MEFs にレトロベクターで野性型 PINK1 と欠損変異体 PINK1 を導入・発現させた戻し実験を行った。その結果、N-末端側ドメインを削除し PINK1 がミトコンドリアに移行できないようすると、パーキンの損傷ミトコンドリアへのリクルートは、完全に阻害された。この結果、PINK1 のミトコンドリア局在がパーキンの損傷ミトコンドリアへのリクルートに不可欠であることが判明した。

さらに PINK1 のキナーゼ不活性型変異体 (触媒部との Ser/Thr 残基を変異させた kinase dead PINK1) も、同様な戻し実験においてパーキンの損傷ミトコンドリア移行が全く回復しなかった。したがって PINK1 のタンパク質キナーゼ活性がパーキンの損傷ミトコンドリアへのリクルート因子としての機能に必須であることが判明した。

10) PINK1 は膜電位依存的な mitophagy に必須である

最終的に PINK1 がミトコンドリアの膜電位

に依存した mitophagy に必須であるか否かを検討した。パーキンをレトロウイルスで導入した野生型 MEFs と PINK1 欠損 MEFs に CCCP 処理して 24 時間後に、ミトコンドリア量を Tom20 の染色度で観察した。野生型 MEFs のミトコンドリア量は、CCCP 処理によって激減したが、PINK1 欠損 MEFs で検討すると、ミトコンドリアの有意な減少は、明確に阻害された。この結果から、PINK1 が膜電位低下とパーキンに依存した mitophagy に必須であることが判明した。

11) 膜電位依存的な PINK1 の選択的限定分解機構 : 損傷ミトコンドリアの感知機構

次いで PINK1 の動態 (細胞内局在性) を CCCP 処理の有無で比較検討した。通常、(膜電位が高い) 健康なミトコンドリアでは、全長 (60-kDa) PINK1 が短鎖 (50-kDa) PINK1 に限定分解され、その後の急速な分解によって PINK1 が恒常的に分解されているために、PINK1 は検出できないが、

(膜電位が低い) 損傷ミトコンドリアでは、この限定分解が阻害され、PINK1 がミトコンドリア外膜上に急激に蓄積することを見出した。この結果は、膜電位依存的に PINK1 を切断する (プロトン^{H+}依存性) プロテアーゼが損傷ミトコンドリアの感知機構の鍵を握ることが判明した。

12) Pael-R Tg と Pael-R KO マウスの解析

Pael-R Tg mice 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 mice 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 mice は hyperactive、Pael-R KO mice 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 mice は 6-OHDA に対してより脆弱になり、Pael-R KO mice 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。

13) ミクログリアのサブタイプの分離

新生ラット脳より調製した混合グリア培養から既報の方法によりタイプ I および II ミクログリアを分離した。両者は CD86 陽性細胞であるが、タイプ I は CD40 陽性、タイプ II は陰性であった。一方、IL-4 受容体発現についてはタイプ I ではほとんど発現が見られなかったが、タイプ II では発現が見られた。CD36 スカベンジャー受容体は無刺激では両者ともわずかに検出できる程度

であったが、IL-4で活性化をするとタイプIIミクログリアで発現が増大した。CD36の発現誘導はミクログリアの活性化を起こす事が知られているLPS、インターフェロン γ 、M-CSFなどでは見られなかった。一方、スカベンジャー受容体Aは両者とも高発現しており、活性化剤などでの発現誘導は見られなかった。

14) IL-4で活性化したタイプIIミクログリアでA betaオリゴマーの取り込み、分解が促進される : 1 μ g/mlの¹²⁵I標識A beta(1-42)オリゴマーを添加して37°Cで6時間反応させた場合、タイプIIミクログリアはmgタンパク質あたり約70ngのA beta(1-42)オリゴマーを取り込んだ。また5ng/mlのIL-4で活性化すると約70%取り込み量が増大(120ng/mgタンパク)した。細胞内の量は6-12時間でピークとなるが、その後減少する事から細胞内で分解排除されと考えられる。この分解はネプリライシン阻害剤のチオルファンの前処理やインスリン分解酵素の基質であるインスリンにより抑制される事から両酵素が関わっている事が推定できた。また、両酵素はIL-4による活性化で増大する事から、IL-4で活性化されたタイプIIミクログリアは神経毒性の強いA beta(1-42)オリゴマーの排除に特異的に関わっている可能性が考えられた。

15) A beta(1-42)オリゴマーの取り込みメカニズム : タイプIIミクログリアによるA beta(1-42)オリゴマーの取り込みがIL-4による活性化によりCD36の発現と並行して増大する事、A beta(1-42)オリゴマーがCD36などのスカベンジャー受容体のリガンドになることなどから、今回検出しているミクログリアによるA beta(1-42)オリゴマーの取り込みにはCD36が関与していると考えられる。その可能性を確認するために以下の実験を行った。まず、スカベンジャー受容体の競合的リガンドであるフコイタンを添加したところ、A beta(1-42)オリゴマーの取り込み量が減少した。次に、CD36を強制発現したCHO細胞でA beta(1-42)オリゴマーの取り込みが検出できる事がわかった。さらに、CD36の機能変異をもSHR/NCrjラットから調製したタイプIIミクログリアではIL-4依存的なA beta(1-42)オリゴマーの取り込み量増大が見られなかった。これらの結果から、タイプIIミクログリアによるA beta(1-42)オリゴマーの取り込みはCD36スカベンジャー受容体を經由して起こる事がわかった。

D. 考察と結論

インスリンとカテコラミンは構造上同じLarge dense core vesicleに属しており同じ開口機構を共有している。膵 β 細胞を用いた解析ではparkin KO miceのドパミン放出同様インスリ

ン分泌の低下が観察された。更に膜直下における septin5 の蓄積を認めた。この蓄積がインスリン分泌の放出を妨げていると考えられた。同様な機序がドーパミン放出破綻に関与していると推定された。

parkin のミトコンドリア品質管理は、PINK1 存在下で機能していることが判明している。孤発型 PD でもミトコンドリア機能低下が指摘されており、FPD においてもミトコンドリアの関与がキーポイントとなっている。少なくとも mitophagy に PINK1 と parkin が関わっていることは間違いないと言える。

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、最近報告では 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。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

しているとすると、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。

ミクログリアの毒性に関しては、二種のタイプのグリアが存在する。タイプ II マイクログリアは、CD36 に変異が入ると A beta (1-42) の貪食効果は観察されなかった。タイプ I マイクログリアにも貪食効果が観察されなかったことより神経変性においては異なる役割をなしていることが予想された。善玉的機能をなすマイクログリアと悪玉的機能をなすマイクログリアが存在することが考えられた。今後、サブタイプをコントロールできれば神経変性疾患の治療ターゲットになり得ると考える。

新規遺伝子単離に関しては既知の遺伝子変異陰性例を集積して解析しており SNP chip などを使った解析でホモ接合体マッピングの部位を同定しそこに存在する遺伝子の変異有無をスクリーニングしている。

単一遺伝子異常に伴う FPD の解析から共通カスケードを明らかにし、新規治療薬の開発を目指す。最終年度で特筆すべき点は、FPD、特に parkin, PINK1 の病態に異常ミトコンドリアのクリアランスが関与していることが分かったことである

う。孤発型 PD においてもミトコンドリアの機能が注目されており、PD は孤発型、遺伝型に関わらず、その病態の中心にミトコンドリアがあることは間違いないと言える。

G. 研究発表

分担研究者報告書並びに研究刊行に関する一覧参照。

「パーキン蛋白の機能解析と治療法の開発」班
パーキンノックアウトマウスのインスリン分泌機構のメカニズム

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 parkin 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 parkin 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 parkin 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、parkin 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。平成 21 年度は、Parkin knock out (KO) マウスの膵β細胞のインスリン分泌機構の解析を行った。インスリン含有小胞とカテコラミン含有小胞は構造上類似性が高い。インスリン分泌とドパミン放出の共通機構の存在を想定し、より均一なβ細胞のメリットを最大限に利用して解析を進めた。インスリンには 2 相性分泌機構を持っており Parkin KO mice では、選択的 1 相の低下が観察された。このことは膜結合型分泌機構の破綻が予想された。またボルタメトリーによるドパミン分泌の低下を確認するとともにラット用ロタロッドテストを使用することで運動学習能力を解析できるシステムを開発した。Parkin KO マウスでは、若年齢で運動学習能力が低下し、加齢とともに学習能力が改善することを見出した。このテストは MPTP マウスでも行っており、運動学習能力はドパミン分泌と相関があった。

Parkin 蛋白は、ユビキチン・プロテアソーム系に関与しているが、この蛋白分解系だけでなくオートファジー・リソソーム系も神経変性において重要な機能をなしていることが予想されている。遺伝性 PD で Park9 の遺伝子産物 ATP13A2 はこの系に属することが推定されている。この蛋白の正常型と変異型の局在の変化を検討し、変異型では小胞体に局在することが予想された。この局在変化は変異型に共通しており、loss-of-function 効果は局在の変化によることが予想された。

A. 研究目的	ない。根本的治療法開発に向け、PD の原因究明
パーキンソン病 (PD) はアルツハイマー病について頻度の高い神経変性疾患で黒質ドパミン神経細胞が変性することにより動作が遅くなる、手足がふるえる等の運動障害が主な症状である。しかしながら近年、うつ症状、認知機能障害、自律神経障害等多岐にわたる障害が高頻度に合併し患者の ADL を著しく阻害する。今後予想される高齢化社会に向け患者が増加することが確実視されているがその根本的治療法はまだ開発されてい	ない。根本的治療法開発に向け、PD の原因究明が急務である。その多くは孤発性であるが約 10 パーセントに家族性のパーキンソン病が知られている。10 年前より原因遺伝子が単離されはじめ、その病態の解明が急速に進み近年の分子遺伝学の進歩により家族性 PD (FPD) の原因遺伝子が明らかになりつつある。特に FPD の中でも常染色体劣性の遺伝形式を呈する若年性パーキンソニスムの原因遺伝子 parkin (PARK2) は最も多くの頻度を占める。また PINK1 (PARK6) の遺伝子変異

の頻度も高いことが分かってきた。また同じく常染色体劣性の ATP13A2 遺伝子異常の患者の頻度は少ないが、本邦でも新たな変異をもつか患者を報告してきた。そこで我々はこれら常染色体劣性パーキンソン病の原因遺伝子産物に着目し、その分子機能を明らかにすることにより、神経細胞死の機序を解明するとともにその発症予防の開発につなげることを目標とする。

B. 研究方法

1) インスリン分泌機構の解析

Parkin をノックダウン(KD)した神経内分泌細胞の cell line の放出能を検討した。そのために Parkin 欠損マウスの MEF、初代培養細胞(膵β細胞、大脳皮質細胞)の放出に関与する細胞膜上の蛋白の局在、構造変化を、全反射蛍光顕微鏡(TIRFM)を用いて観察した。とくに parkin KO マウス由来膵β細胞の放出を TIRFM にて解析した。更に AAV-parkin で補充してその変化が起こるか検討した。

2) parkin, PINK1 の mitophagy への関与

ミトコンドリア脱共役剤(CCCP)はミトコンドリア膜を高度に障害し、その結果イオン勾配を消失させ、膜電位を保てなくする作用を持つことが知られている。培養細胞ならびに Mice EmbryoFibroblast (MEF)を CCCP で処理し、Parkin と PINK1 の動態を生化学的に解析した。

3) ボルタメトリーを使った新しい運動学習能力

の評価法

ラット用ボルタメトリーを使うことで(Slip rod test)、運動学習能力を判定できるか検討した。

Parkin KO mice と MPTP 処理 mice で解析した。

Parkin KO mice では若齢、老齢で検討。MPTP 処理 mice ではドパミン含有との関連を検討した。

4) ATP13A2の局在とその機能

我々は国内で初めてpark9の家系を見出し報告した(Ning et. al. Neurology 2008)。Park9の患者は常染色体劣性の遺伝形式を呈し、若年発症のパーキンソニズムに錐体路障害、認知機能障害を合併する。我々はその原因遺伝子ATP13A2がコードするタンパク質に着目し、その局在やタンパク質の機能について検討した。ATP13A2に対する合成ペプチドに対する抗血清を作成。特異性を確認の上、免疫染色及びウェスタンブロットを行った。

5) 遺伝性PDの変異解析及び新規遺伝子座の同定

既に報告されている遺伝性PD及び新規遺伝子単離を目指して、既知の変異陰性例を用いて新たな遺伝子座及び原因遺伝子の単離・同定を目指した。方法は血縁婚のある劣性遺伝性PDが疑われる家系に関してSNP chipを用いてホモ接合体マッピングを決定した。またハプロタイプ解析を行った。

C. 結果

1) インスリン分泌機構の解析

膵β細胞の放出をTIRFMにて解析したところインスリンの第1相の放出の低下が顕著に見られた。

このことはSNARE蛋白が関与する放出の障害の関与が推測された。さらにSeptin5の発現、結合をウェスタンブロット法にて検討したところ、Parkin欠損マウスにおいてSeptin5の細胞膜上での集積、ポリマー化を認め、SeptinとSNARE蛋白の結合の増加が確認された。Septin5の細胞膜上での集積の機序としてリン酸化、他の細胞骨格蛋白との結合が関与していることが推測された。

2) Parkin, PINK1のmitophagyへの関与

培養細胞ならびにMEFをCCCPで処理し、ParkinとPINK1の動態を生化学的に解析したところParkinはCCCP処理により膜電位を消失した異常なミトコンドリアを認識して移行する。この反応はParkin特異的な反応であるが、ミトコンドリアへの移行にはPINK1が必須であることを見出した。さらにParkinが移行したミトコンドリアは次第に消化されていくことを観察した。一方でPINK1の変異体の場合はparkinのミトコンドリアへの移行が障害されるとともにミトコンドリアの消化も抑制された。Parkinは障害されたミトコンドリアのクリアランスに重要な要素であり、ミトコンドリアの品質管理に重要な役割を担っていることが推測された (Matsuda et al. JCB 2010, Kawajiri et al. FEBS Lett 2010)。クリアランスの詳細なメカニズムは不明であるがオートファジーを阻害するとクリアランスが抑制されることからミトファジーが有力である。

以前より孤発性パーキンソン病の病態としてミトコンドリア機能異常が指摘されており、Parkinのこのようなミトコンドリアクリアランスの作用の解明は重要な課題である。

3) ボルタメトリーを使った parkin KO mice と MPTP 処理 mice の解析

parkin KO mice を直径9 cmのラット用ロタロッドを用いて解析すると若齢 mice ではロタロッドに乗っていられる時間が学習しても延長しないことが分かった。一方、この現象は、老齢 mice では認めなかった。またMPTP処理した mice ではドパミン枯渇状態と相関してこの運動学習能力の低下が観察された。

4) ATP13A2の局在とその機能

ATP13A2の正常タンパク質はリソソームに局在するが、今回見出しATP13A2の変異タンパク質は小胞体にとどまることが分かった。変異タンパク質は小胞体からリソソームに輸送されないことによりリソソームの機能異常ならびにタンパク分解異常をきたすことが推測された。この現象は正常ATP13A2を補充することで回復したことからPark9の発症は遺伝形式が示すようにloss-of-function効果によるものと考えられた。

5) 遺伝性PDの変異解析及び新規遺伝子座の同定

5家系に関してホモ接合体マッピングを決定した。現在変異スクリーニングを行っている。一方、既知の原因遺伝子のスクリーニングの過程で新

しい α -シヌクレイン遺伝子変異 A53V を見出した。この変異はホモ接合体を示していた。従来報告されていた変異は全て優性遺伝形式であるのでホモ接合体のみ発症者が見出されているので今後、ドパミン量のイメージングスタディーを予定し、ドパミン低下の有無を検討する予定である。

D. 考察

インスリンとカテコラミンは構造上同じ Large dense core vesicle に属しており同じ開口機構を共有している。膵 β 細胞を用いた解析では parkin KO mice 同様インスリン分泌の低下が観察された。更に膜直下における septin5 の蓄積を認めた。この蓄積がインスリン分泌の放出を妨げていると考えられた。より均一な膵 β 細胞を用いることで解析しやすさを実現することが出来ており、インスリン分泌にある二相性の開口機構のうち第 1 相の選択的抑制が生じていることが分かった。第 1 相は syntaxin1 依存性の開口機構であり神経細胞の放出機構にも共通していることが予想される。Parkin KO mice での解析ではドパミン放出の低下が観察されておりインスリン分泌低下との共通機構として septin5 が膜直下で蓄積することで放出を抑制していることが予想される。現在、神経系組織を使って詳細を解析中である。

parkin のミトコンドリア品質管理は研究分担者の田中らにより更に詳細な検討がなされて

いる。我々のデータでは parkin と PINK1 があればミトコンドリアの外膜に移行し、品質管理を行っている。更に parkin は PINK1 の安定性に関わっており、現在新規 PINK1 安定因子も同定できしており parkin と PINK1 は同じカスケードに入ることが予想されている。少なくとも mitophagy に PINK1 と parkin が関わっていることは間違いな

いと言える。ボルタメトリーを使うことのメリットはダイナミックな神経伝達物質の変化にも対応できることにある。従来、MPTP mice においても運動障害は観察されない。しかしながら、今回我々が見出した slip rod test は運動学習能力の良い試験となり得ることが分かり、抗パーキンソン病薬の開発にマウスモデルでの解析を実現させたと言える。

変性疾患の蛋白分解系の関与は重要な因子であることは言うまでもない。大きく二つの蛋白分解系が関与しておりユビキチン・プロテアソーム系とオートファジー・リソソーム系があり、それぞれ FPD の遺伝子産物、parkin そして ATP13A2 がその代表格である。ATP13A2 の正常型はリソソームの膜に局在しているが変異型は小胞体の局在することが分かった。局在の変化が変異型 ATP13A2 の細胞死において重要な機序であることが分かった。更にこの変化は正常型 ATP13A2 を補うことで改善したことから点変異型であっ

ても loss-of-function 効果を示していることが推定された。現在、ATP13A2 KO mice を確立しており、今後詳細な解析を行うことで in vitro での結果との整合性を確認する。

E. 健康危険情報

無し

G. 研究発表

2009 年度

1. 論文発表

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 & Related Disorders*. 2008; 105-109

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 & Related Disorders*. 15. 160-161. 2009

Fukae J, Sato S, Shiba K, Sato K, Mori H, Sharp PA, Mizuno Y, & Hattori N. Programmed cell death-2 isoform1 is ubiquitinated by parkin and increased in the substantia nigra of patients with autosomal recessive Parkinson's disease. *FEBS Lett*. 2009; 583: 521-5.

Tomiyama H, Li Y, Yoshino H, Mizuno Y, Kubo S, Toda T, & Hattori N. Mutation analysis for DJ-1 in sporadic and familial parkinsonism: Screening strategy in parkinsonism. *Neurosci Lett* 2009;455:159-61.

Sasaki K, Shimura H, Itaya M, Tanaka R, Mori H, Mizuno Y, Kosik KS, Tanaka S, & Hattori N. Excitatory amino acid transporter 2 associates with phosphorylated tau and is localized in neurofibrillary tangles of tauopathic brains. *FEBS Lett*. 2009;583:2194-200.

Satake W, Nakabayashi Y, Mizuta I, Hirota Y, Ito C, Kubo M, Kawaguchi T, Tsunoda T, Watanabe M, Takeda A, Tomiyama H, Nakashima K, Hasegawa K, Obata F, Yoshikawa T, Kawakami H, Sakoda S, Yamamoto M, Hattori N, Murata M, Nakamura Y, & Toda T. Genome-wide association study identifies common variants at four loci as genetic risk factors for Parkinson's disease. *Nat Genet*. 2009 ;41:1303-7

Kawajiri S, Saiki S, Sato S, Sato F, Hatano T, Eguchi H, & Hattori N. PINK1 is recruited to mitochondria with parkin and associates with LC3 in mitophagy *FEBS Lett*. 2010 19;584:1073-9.

2. 学会発表

Hattori N. Plenary Session III "Young onset PD". the 2nd Asian Oceanian Parkinson's Disease and Movement Disorders Congress, New Delhi, India. 2009.2.16.

Hattori N, Fragile X permutation and movement disorders, Asian Scientific Symposium, Tokyo, 2009.7.4

Hattori N, Molecular genetics of a-synuclein pathogenesis, the 22nd Biennial Joint Meeting of the International Society for Neurochemistry (ISN) and the Asian Pacific Society for Neurochemistry (APSN), Korea, 2009.8.25.

Hattori N, Pathogenesis of PD, 4th International Expert Meeting on the Treatment of Parkinson's disease, 2009.10.31.

服部信孝. Mechanisms of Parkinson's disease . International Conference Protein folding and neurodegenerative disease, 2009 年 4 月 6 日～7 日, 京都

服部信孝. イブニングセミナー8. パネルディスカッション「大規模患者調査からみた PD 薬物治療の動向」. 第 50 回日本神経学総会. イブニングセミナー1 (ES-1) . 2009 年 5 月 21 日, 仙台

服部信孝. 「遺伝性パーキンソン病研究の進歩」. シンポジウム「パーキンソン病の病因・診断・治療研究の進歩」. 第 50 回日本神経学総会. イブニングセミナー1 (ES-1) . 2009 年 5 月 22 日, 仙台

服部信孝. パーキンソン病の病態解明: 遺伝性パーキンソン病から分かったこと. The pathogenesis of Parkinson's disease (PD): Insights from monogenic forms of PD 日本神経科学大会ランチョンセミナー. 2009 年 9 月 17 日, 名古屋国際会議場

2010

服部信孝. Mayo Clinic にて招待講演. The pathogenesis of nigral degeneration in Parkinson's disease: From insights for the mechanisms of familial Parkinson's disease. 2010 年 1 月 20 日. アメリカ ジャクソンビルにて.

H. 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」班
分担研究報告書

パーキンノックインマウスの作製・解析

研究分担者：田中 啓二 東京都臨床医学総合研究所 所長代行

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) の責任遺伝子であるパーキンともう一つ若年期に常染色体劣性遺伝様式で発症する家族性パーキンソン病の責任遺伝子 PINK1 (PTEN-induced putative kinase 1) は、その症状が類似しており、モデル動物ハエ (*Drosophila*) を用いた遺伝学的研究から両遺伝子が同一の代謝経路に位置することが報告されている。しかし哺乳動物における両者の関係は、全く不明であった。ごく最近、パーキンが損傷ミトコンドリアのオートファジー経路 (mitophagy) による品質管理 (膜電位の低下に依存してパーキンが損傷ミトコンドリアに移行して mitophagy を誘導する機構) に関与することが報告された。われわれはこの観察を確認すると共に PINK1 がパーキンの損傷ミトコンドリアへの移行促進因子として作用することを発見した。さらにわれわれは膜電位が低下するとミトコンドリアに PINK1 が増加することを見出し、その機構の解明にも成功した。即ち、通常、(膜電位が高い) 健康なミトコンドリアでは、全長 PINK1 (60-kDa) が短鎖 PINK1 (50-kDa) に限定分解され、その後の急速な分解によって PINK1 が恒常的に分解されているために、成熟型 PINK1 は検出できないが、(膜電位が低い) 損傷ミトコンドリアでは、この限定分解が阻害され、PINK1 がミトコンドリア外膜上に急激に蓄積することを見出した。そしてこの増加した PINK1 がパーキンの損傷ミトコンドリアへの移行を促進し、mitophagy を誘導すると推定された。この結果、PINK1/パーキン経路は、ミトコンドリアの品質管理に重要な役割を果たしており、若年性で発症するパーキンソン病は (全てではないが)、一種のミトコンドリア病であることが判明した。この仮説は、孤発型パーキンソン病の発症機構にも敷衍できる可能性が推測されており、今後の神経変性疾患研究の大きな breakthrough になる画期的な発見であると考えられる。

A. 研究目的

2000 年、われわれは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) の責任遺伝子であるパーキンがユビキチンリガーゼであることを証明した (1)。しかしその後のパーキンの作動機構と AR-JP の病態発生機序の解明は全く進展しなかった。その最大の理由は、数多く発表されたパーキンの基質が AR-JJP 病態の発症を説明できなかったこと (2) とパーキンのノックアウト (KO) マウスが中脳におけるドーパミンニューロンの異常 (変性・脱落) やパーキンソン病の症状を呈さなかったからであった (3)。そこで、本研究の最大の目標は、パーキンの機能解析と AR-JP 引いては孤発型パーキンソン病の病態発生機構を解明し、抜本的な治療法の開発戦略を探ることである。パーキンの機能解析のヒントは、意外な研究から突然得られた。2008 年の年末、損

傷ミトコンドリアのオートファジー経路による品質管理にパーキンがユビキチンリガーゼとして関与していることが報告された (4 : 参考文献)。そこでこの報告の真偽を探ると共にこの知見をヒントに AR-JP の発症機構解明に迫ることを本年の研究目的とした (5)。

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) 及び pink1 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 (pMXs-puro plasmids harboring genes of interest were packaged into individual retroviruses using PLAT-E cells) 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。

細胞分画

To depolarize the mitochondria, HeLa and SH-SY5Y cells were treated with 10 μ M CCCP and MEFs with 30 μ M CCCP, respectively. For fractionation experiments, HeLa and SH-SY5Y cells were treated with CCCP for 1 - 5 h and subsequently treated with 1mM dithiobis[succinimidyl propionate] (DSP, Pierce) in PBS for 1 h on ice, inactivated by 10 mM glycine in PBS three times, and suspended in chappell-perry buffer (0.15M KCl, 20 mM HEPES-NaOH, pH 8.1, 5 mM MgCl₂, protease- and phosphatase-inhibitor [Roche]). Cells were disrupted by 5 passages through a 25-gauge needle (with 1-ml syringe), debris was removed by centrifugation at 1,000 *g* for 7 min, and the supernatant was subjected to 10,000 *g* for 10 min to separate mitochondria-rich fraction from cytosol-rich fraction.

免疫沈降

Immunoblotting and immunoprecipitation were performed by conventional methods. The cell lysate was collected in the presence of 10 mM N-ethylmaleimide to protect ubiquitylated Parkin from de-ubiquitylation enzymes. To monitor the degradation of endogenous PINK1, HeLa cells were treated with 10 μ M CCCP and 50 μ g/ml cyclohexamide and were subjected to immunoblotting.

免疫細胞染色

For immunofluorescence experiment, cells were fixed with 4% paraformaldehyde, permeabilized with 50 μ g/ml digitonin and stained using a standard protocol. To monitor the mitochondrial membrane potential, MEFs were treated with 50 nM MitoTracker Red CMXRos (Invitrogen) for 15 min, washed three times and incubated for an additional 10 min before fixation. 免疫組織染色は、下記記載の各種抗体を用い、共焦点レーザー顕微鏡を用いて直接観察した。

抗体

Antibodies used in this study are as follows: anti-Actin (AC-40, Sigma), anti-Cytochrome-c (6H2.B4, BD), anti-Flag

(M2, Sigma), anti-GFP (3E6, Wako chemical; A6455, Invitrogen), anti-HA (12CA5, Roche), anti-Hsp70 (SR-B810, MBL), anti-Lactate Dehydrogenase (LDH) (ab2101, Abcam), anti-Parkin (#2132, Cell Signaling for immunocytochemistry; PRK8, Sigma for immunoblotting), anti-PINK1 (BC100-494, Novus), anti-Tom20 (FL-145 and F-10, Santa Cruz Biotech), anti-Ubiquitin (P4D1, Santa Cruz; FK2, MBL) and anti-V5 (Invitrogen).

(倫理面への配慮)

本年度の研究は、主としてマウスを用いたインビトロの実験系で行ったので、倫理面への配慮は不要であった。

C. 研究結果

[結果1] パーキンの損傷(膜電位低下)ミトコンドリアへの移行

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(膜電位の低下を誘導)が、パーキンソン病をはじめとして多くの神経細胞で観察されている。そこで、パーキン遺伝子に変異してパーキンを発現していない HeLa 細胞に GFP-パーキンを導入した後、ミトコンドリアの uncoupler (脱共役剤)である CCCP (carbonyl cyanide *m*-chlorophenylhydrazone : 10 μ M) 処理してミトコンドリア内膜の膜電位をほぼ完全に低下させた。そして GFP-パーキンの細胞内局在について共焦点レーザー顕微鏡で観察した結果、30 分以内に細胞質に存在していたパーキンの大部分がミトコンドリアの外表面膜に移行した。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2] パーキンによる損傷ミトコンドリア外膜タンパク質のユビキチン化

CCCP処理後、抗パーキン抗体FK2で細胞染色すると、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が濃染(Tom20と共染)された。このユビキチン化の動態を調べるためにK48リンクのユビキチン鎖及びK63リンクのユビキチン鎖に特異的な抗体を用いて免疫染色した結果、後者が強く反応した。その結果、パーキンによる損傷ミトコンドリア外膜タンパク質のユビキチン化はK63リンクのユビキチン鎖であることが判明した。

[結果3] 損傷ミトコンドリアのパーキン依存