

II. 病 因

その他の因子

炎 症

Inflammation in Parkinson's disease

澤田 誠

Key words : 脳内炎症反応, ミクログリア, サイトカイン, 毒性転換

はじめに

神経変性疾患の中でパーキンソン病は比較的発症例が多く症候学的には非常によく調べられているが, その発症機構に関する説明は, 多くの仮説が提唱されているにもかかわらず, いまだに原因を特定できるものはない. この理由の一つに, パーキンソン病の95%以上が孤発性で発症時期や様式が個別に異なるため疫学的な特徴をとらえにくい点がある. 一方, 孤発性パーキンソン病患者や動物実験モデルにおいても共通してみられる病理学的な変化として脳内の炎症反応があり, 病因や発症メカニズムを解き明かす鍵になっている可能性が考えられて注目されてきている.

本稿では, パーキンソン病脳でみられるミクログリアの活性化を伴った脳内炎症反応の意味について考えてみたい.

1. パーキンソン病における脳内炎症反応

パーキンソン病は脳の黒質線条体(A9)ドーパミン作動性神経が選択的に細胞死を起こして, 神経伝達物質のドーパミンが線条体で20%以下に減少すると筋固縮, 無動, 振戦などの運動障害が症状として現れる. 病理所見としてはドーパミン作動性神経の選択的脱落やLewy小体の蓄積などがみられるほかは, 顕著なグリア癆

痕形成や細胞浸潤などみられない‘静的’な神経変性疾患と考えられてきた. ところが最近孤発性パーキンソン病患者剖検脳の黒質線条体部や脳脊髄液で炎症性サイトカインが増加し, 反対に神経栄養因子群が減少していることが報告されるようになった¹⁾. 同様の反応はドーパミン神経特異的神経毒であるMPTPを投与したパーキンソン病モデル動物でもみられる²⁾. 炎症性サイトカイン群の増加はパーキンソン病脳での黒質線条体部位に特異的な炎症反応を示唆するが, 血液脳関門の崩壊がなく, また炎症細胞の浸潤がみられないことから, 一般的な炎症反応とは異なった現象が生じていると考えられる. 一方, 孤発性パーキンソン病患者剖検脳やMPTP誘導性パーキンソン病モデル動物脳の黒質線条体部においてミクログリアの活性化と集積がみられる³⁾. ミクログリアは活性化すると種々のサイトカインを産生するため, パーキンソン病脳で増加する炎症性サイトカインはミクログリア由来であると想定でき, このようなミクログリアの活性化および炎症性サイトカイン産生増大はパーキンソン病の病態形成に深くかかわっていることが考えられる. ミクログリアは活性化すると炎症性サイトカインを産生するばかりでなく, 活性酸素やNO, プロテアーゼ類などの神経傷害性因子も産生するため, 一見するとドーパミン神経の細胞死はミクログリア

の活性化が原因のようにも思える。しかし、パーキンソン病脳でのミクログリアの活性化は神経変性が見られない海馬や大脳皮質にも起こり、ミクログリアの活性化やそれに伴う炎症性サイトカインの増大とパーキンソン病の病態形成との関係は一義的なものではない³⁾。

2. パーキンソン病脳での炎症反応とミクログリアの活性化

パーキンソン病脳での炎症反応については1998年にMcGeerらによって初めて記載された⁴⁾。McGeerらはパーキンソン病黒質でHLA-DR陽性の活性化ミクログリアが出現することを報告した。その後、 $\beta 2$ ミクログロブリンが増加していることやIL- 1β やIL-6などの炎症性サイトカインが増大していることがパーキンソン病患者剖検脳線条体やパーキンソン病患者脳脊髄液で相次いで示されるに至った⁵⁾。更に、パーキンソン病黒質でみられる活性化ミクログリアはiNOSやCOX-2を発現⁶⁾しており、炎症反応の特徴の多くを示していることがわかった。また、これらの活性化ミクログリアはHLA-DR, ICAM-1(CD54), LFA-1(CD11a), TNF- α , IL-6に陽性であり、この結果からパーキンソン病脳で増加するサイトカインは活性化ミクログリアが産生すると考えられる⁶⁾。

ミクログリアの活性化はMPTP誘発性パーキンソニズムにおいてもみられることが報告されている⁷⁾。MPTPはドーパミン神経特異的な神経毒で摂取後短時間でドーパミン神経脱落を生じるためパーキンソン病様症状を呈するが、孤発性パーキンソン病脳にみられるLewy小体は生じない。したがって、病理学的にみるとMPTPにより誘発されるドーパミン神経の脱落とパーキンソン病は別物と考える向きもある。しかしLangstonらはMPTP誘発性パーキンソニズムを発症した患者剖検脳を調べた結果、MPTP摂取後16年後の死後脳においても活性化ミクログリアが存在することを見いだした⁷⁾。これはミクログリアの活性化を伴う長期間にわたる継続的な炎症状態がパーキンソニズムの病態の進行において病理学的変化以上に重要な意

味をもつ可能性を示唆している。

3. 抗炎症剤の効果

大規模なコホート研究の結果によると、心疾患予防に非ステロイド性炎症剤(NSAIDs)を常用しているグループのパーキンソン病発症リスクは非常用者グループに対して45%程度低いことが報告されている⁸⁾。したがってパーキンソン病におけるドーパミン神経の脱落に様々な抗炎症剤が抑制効果があることが考えられる。実際に動物実験ではNSAIDsやCOX-2阻害剤が薬物誘導性のドーパミン神経脱落を抑制し、ミクログリアの活性化も抑えられると報告されている⁹⁾。しかしこれらの薬物はそれ自身がドーパミン神経に直接作用して効果を発揮している可能性も指摘され¹⁰⁾、脳内炎症反応を抑制することがパーキンソン病の治療に対して有効であるかどうかについては疑問が残る。更に、抗炎症性ステロイドであるデキサメタゾンについてはMPTP投与によるドーパミン神経の変性を抑制する¹¹⁾という報告がある一方で、効果がないかむしろ増悪するという報告もある¹²⁾。両者で方法や投与量などが異なるため一概にはいえないが、脳内の炎症反応=パーキンソン症状の増悪因子という単純な図式は成り立たないようにも思える。

4. 動物モデルにおける炎症反応の形成

パーキンソン病の動物モデルとしてはMPTP, 6-OHDAやrotenoneなどのドーパミン神経毒による薬物誘導性のモデルと家族性パーキンソン病の原因遺伝子であるParkin遺伝子改変モデルとが知られている。薬物誘導性のドーパミン神経変性によるパーキンソン病モデルはどのモデルにおいてもドーパミン神経脱落に伴ったミクログリアの活性化とIL- 1β , IL-6, TNF- α などの炎症性サイトカインの増大およびiNOS, COX-2などの発現が報告されている¹³⁾。一方、ミクログリアに作用して活性化を誘導するリポポリ多糖をマウス線条体や黒質に注入するとドーパミン神経が傷害されパーキンソン病様症状を示す¹⁴⁾。このとき、脳内ではミ

クログリアの最大活性化が引き起こされ、炎症性サイトカインが大量に産生されるが、同時に最大活性化したミクログリアには iNOS が誘導され、大量の NO 産生が起こる¹⁵⁾。また iNOS 発現を特異的に誘導するためにリポポリ多糖とともに IFN γ を注入した場合、大量の NO 産生とともにドーパミン神経の脱落が観察される。このとき、NO 合成阻害剤を前投与¹⁵⁾したり COX-2 や NADPH オキシダーゼの遺伝子を不活性化しておくことと薬物誘導性のドーパミン神経の変性がみられなくなることから^{16,17)}、ミクログリアが活性化して毒性を示す場合には同時に NO や ROS が産生されると考えられる。

Parkin 遺伝子は常染色体性劣性遺伝性若年性パーキンソン病 (AR-JP) の原因遺伝子として同定されたもので、プロテアソームで分解される基質タンパク質をユビキチン化し神経細胞死を抑制する作用をもつユビキチンリガーゼ (E3) をコードしている。したがって、Parkin 遺伝子の産物である Parkin タンパク質はドーパミン神経に対して保護的に働いていると想定でき、その遺伝子を改変して機能不全を起こせばパーキンソン病様症状が発生すると考えられる。実際、Parkin 遺伝子改変モデル動物ではドーパミンの放出や代謝に異常をきたし、老化に伴ったドーパミン神経の脱落や若年齢でのドーパミン神経毒への感受性の亢進が観察される。ドーパミン神経の変性脱落はミクログリアの活性化を伴うことが観察されている¹⁸⁾が、Parkin 遺伝子ノックアウトマウス由来のミクログリアはストレスタンパクの誘導性がみられず神経保護作用を示さないことが報告され¹⁹⁾、Parkin の機能不全がミクログリア機能の変異を引き起こすことが示唆された。この結果もやはりミクログリアの機能変化がパーキンソン病の病態形成に重要な意味をもつ可能性を示している。

5. ミクログリアの役割

一般的にパーキンソン病脳では黒質や線条体部位に神経変性に 관련된 ミクログリアの活性化がみられるが、更に大脳皮質や海馬でも活性化ミクログリアが出現し TNF- α や IL-6 などの

炎症性サイトカインの mRNA の増大も報告されている⁶⁾。同様に、記憶障害を伴うパーキンソン病様症状を呈する Lewy 小体病 (LDB)²⁰⁾ 脳も黒質線条体や大脳皮質、海馬でミクログリアの活性化がみられる⁶⁾。しかし、パーキンソン病では海馬や大脳皮質の神経細胞死はみられないが、LDB 患者では多数の神経細胞死が認められた。この結果からパーキンソン病海馬と LDB 海馬でみられる活性化ミクログリアは性質が異なり、LDB では神経毒性を示すが、パーキンソン病脳では神経毒性をもたないと考えられる。少なくとも、単に活性化して炎症性サイトカインを産生している状態のミクログリアには神経障害性はないと考えられる。

それでは活性化したミクログリアはドーパミン神経に対して毒性をもつのか、それとも保護的に働くのだろうか。Kreutzberg は顔面神経切除モデルを用いてミクログリアの反応を詳細に検討した結果、活性化ミクログリアには二面性があると結論づけた²¹⁾。一方、著者らは明確に分画できる 2 つのミクログリアのサブタイプを同定しており、これらは細胞表面抗原の発現や増殖因子依存性が異なるほか、刺激に対する感受性やその応答も異なり、活性化の調節メカニズムや役割などが異なったミクログリアであると考えられる²²⁾。したがって、ミクログリアの両面性はひょっとしたら役割の異なるサブタイプが存在することで説明できるかもしれない。

パーキンソン病だけでなく Alzheimer 病などの神経変性を伴う疾患、脳腫瘍やてんかん、統合失調症に至るほとんどすべての脳疾患においてミクログリアの活性化がみられる²³⁾。また、疾患に限らず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みられる²⁴⁾。

脳全体に広範に存在するいわゆる休止ミクログリアはその検出が難しいが、活性化ミクログリアはマクロファージ様の性質をもつようになるため、マクロファージを認識する種々の抗体

で検出でき、脳疾患の病理像では疾患部位に集積した活性化ミクログリアが多数観察することができる。しかもそれらがあたかも神経変性や炎症などの疾患の原因を引き起こしているようにさえみえる。更に、単離したミクログリアが細胞傷害性をもつ因子を産生すること、活性化したミクログリアが病理切片においても培養下においても細胞傷害性のマクロファージと区別をつけることが難しいことから、種々の脳疾患において、ミクログリアが病変を形成する‘悪役’として考えられてきた。しかし、より多くの抗体や染色法が開発され、それらを用いた疾患脳の検索が行われた結果、ミクログリアの活性化は病変部に局限しているわけではなく、正常な組織像を呈する部分にも出現していることも明らかになりつつある。このようなミクログリアは少なくとも病態形成とは無関係であり、‘悪いミクログリア’とは明らかに異なる作用をしていると考えられる²⁴⁾。

脳内炎症反応の中心的役割をもつミクログリアの活性化には2段階のステップがあるのではないかと考えられる。つまり、もともと神経保

護的に作用するミクログリアが、何らかの作用を受けて毒性転換(toxic change)すると考えられる。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もつように変化する。パーキンソン病の病態形成においてこの変化が重要な意味をもつことは間違いのない。最近、このような変化をPETリガンドによって*in vivo*でイメージングできる可能性が出てきた^{25,26)}。

おわりに

炎症反応とは本来生体防御のメカニズムである。これまで免疫のない部位と考えられてきた脳においても様々な疾患で広義の炎症反応が生じ、病態形成に関与する。脳内炎症反応はその初期においては不可逆的に機能不全に陥った神経細胞を排除するために生じ、正常な神経細胞には保護的に働くが、それが制御できなくなった状態が疾患へと発展していくと考えられる。ミクログリアに代表される脳内炎症反応の理解はパーキンソン病の発症や病態形成の解明に大きな一助となることが期待される。

文献

- 1) Nagatsu T, Sawada M: Inflammatory process in Parkinson's disease: role for cytokines. *Curr Pharm Des* 11: 999-1016, 2005.
- 2) Mogi M, Nagatsu T: Neurotrophins and cytokines in Parkinson's disease. *Adv Neurol* 80: 135-139, 1999.
- 3) Sawada M, et al: Role of cytokines in inflammatory process in Parkinson's disease. *J Neural Transm Suppl* (70): 373-381, 2006.
- 4) McGeer PL, et al: Reactive microglia are positive for HLA-DR in the substantia nigra of Parkinson's and Alzheimer's disease brains. *Neurology* 38: 1285-1291, 1988.
- 5) Knott C, et al: Inflammatory regulators in Parkinson's disease: iNOS, lipocortin-1, and cyclooxygenases-1 and -2. *Mol Cell Neurosci* 16: 724-739, 2000.
- 6) Imamura K, et al: Cytokine production of activated microglia and decrease in neurotrophic factors of neurons in the hippocampus of Lewy body disease brains. *Acta Neuropathol* 109: 141-150, 2005.
- 7) Langston JW, et al: Evidence of active nerve cell degeneration in the substantia nigra of humans years after 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine exposure. *Ann Neurol* 46: 598-605, 1999.
- 8) Chen H, et al: Nonsteroidal anti-inflammatory drugs and the risk of Parkinson disease. *Arch Neurol* 60: 1059-1064, 2003.
- 9) Hald A, Lotharius J: Oxidative stress and inflammation in Parkinson's disease: is there a causal link? *Exp Neurol* 193: 279-290, 2005.
- 10) Teismann P, et al: Cyclooxygenase-2 is instrumental in Parkinson's disease neurodegeneration. *Proc Natl Acad Sci USA* 100: 5473-5478, 2003.

- 11) Kukowska-Jastrzebska I, et al: The inflammatory reaction following 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine intoxication in mouse. *Exp Neurol* **156**: 50-61, 1999.
- 12) Aubin N, et al: Aspirin and salicylate protect against MPTP-induced dopamine depletion in mice. *J Neurochem* **71**: 1635-1642, 1998.
- 13) Castaño A, et al: Lipopolysaccharide intranigral injection induces inflammatory reaction and damage in nigrostriatal dopaminergic system. *J Neurochem* **70**: 1584-1592, 1998.
- 14) Arimoto T, Bing G: Up-regulation of inducible nitric oxide synthase in the substantia nigra by lipopolysaccharide causes microglial activation and neurodegeneration. *Neurobiol Dis* **12**: 35-45, 2003.
- 15) Le W, et al: Microglial activation and dopaminergic cell injury: an in vitro model relevant to Parkinson's disease. *J Neurosci* **21**: 8447-8455, 2001.
- 16) Feng ZH, et al: Cyclooxygenase-2-deficient mice are resistant to 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine-induced damage of dopaminergic neurons in the substantia nigra. *Neurosci Lett* **329**: 354-358, 2002.
- 17) Wu DC, et al: NADPH oxidase mediates oxidative stress in the 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine model of Parkinson's disease. *Proc Natl Acad Sci USA* **100**: 6145-6150, 2003.
- 18) Casarejos MJ, et al: Susceptibility to rotenone is increased in neurons from parkin null mice and is reduced by minocycline. *J Neurochem* **97**: 934-946, 2006.
- 19) Solano RM, et al: Glial dysfunction in parkin null mice: effects of aging. *J Neurosci* **28**: 598-611, 2008.
- 20) Kosaka K: Diffuse Lewy body disease. *Neuropathology* **20**(Suppl): s73-78, 2000.
- 21) Kreutzberg GW: Microglia: a sensor for pathological events in the CNS. *Trends Neurosci* **19**: 312-318, 1996.
- 22) Sawada M, Suzuki H: Identification of two distinct subpopulation of microglia. *Neurosci Protocol*, 2009. (in press)
- 23) Hanish UK, Kettenmann H: Microglia: active sensor and versatile effector cells in the normal and pathologic brain. *Nat Neurosci* **10**: 1387-1394, 2007.
- 24) 澤田 誠, 鈴木弘美: 良いミクログリア, 悪いミクログリア. *Dementia Japan* **18**: 252-262, 2004.
- 25) Toyama H, et al: In vivo imaging of microglial activation using a peripheral benzodiazepine receptor ligand: [11C]PK-11195 and animal PET following ethanol injury in rat striatum. *Ann Nucl Med* **22**: 417-424, 2008.
- 26) Sawada M: Importance of microglial imaging. *Proc Brain Func Imaging Conference* **23**, 2009. (in press)

Frontiers in Parkinson Disease

第2巻第2号 (2009年4月号) 別刷

 **メディカルレビュー社**

大阪本社：〒541-0045 大阪市中央区道修町1-5-18 朝日生命道修町ビル TEL 06-6223-1468
東京本社：〒113-0034 東京都文京区湯島3-19-11 湯島ファーストビル TEL 03-3835-3041

家族性パーキンソン病は 孤発性パーキンソン病の モデルになるか?

Yes

水田依久子¹⁾

Ikuko Mizuta

戸田 達史²⁾

Tatsushi Toda

神戸大学大学院医学研究科分子脳科学¹⁾,
同 神経内科/分子脳科学 教授²⁾

No

澤田 誠

Makoto Sawada

名古屋大学大学院環境医学研究所
生体適応・防御研究部門 教授

本企画は問題点をよりクローズアップすることを目的としており、このテーマに対して、
あえて一方の見地に立った場合の議論であって、必ずしも論者自身の確定した意見ではありません。

「Yes」の立場から

水田依久子¹⁾ 戸田 達史²⁾

Ikuko Mizuta

Tatsushi Toda

神戸大学大学院医学研究科分子脳科学¹⁾, 同 神経内科/分子脳科学 教授²⁾

はじめに

孤発性パーキンソン病 (PD) は複数の遺伝因子と環境因子が原因となって発症する多因子遺伝疾患の1つであり, PD全体の90~95%を占める。これらの因子の同定については, 患者対照関連解析や疫学調査などにより, いくつかの統計学的に有意なものが知られている。しかしながら, 各因子単独の効果はあまり大きくなく, 個々のPD患者の発症に関与する因子の組み合わせは様々である(図1)。そのため, 孤発性PDのモデル実験, 例えばモデル動物の作製は非常に難しい。これに対して, 家族性PDは, 人数としてはPD全体の数%だが, 遺伝因子の占める割合が高いために家系内に複数の発症がみられると考えられる。家族性PDの多くは遺伝形式がはっきりしない多因子遺伝と考えられるが, 一部の家系は常染色体優性または劣性のメンデル遺伝形式をとる¹⁾。このようなメンデル遺伝性PD家系については, 単一遺伝子が原因となるので, 連鎖解析により原因遺伝子の同定が可能である。さらに, トランスジェニック動物の作製などにより詳細な病態解明が可能となる²⁾。ここで問題となるのは, メンデル遺伝性PDで解明された病態が, 孤発性PDの病態と共通であるといえるのかという点である。本稿では, 「家族性PDは孤発性PDのモデルになる」という立場から論旨を展開するが, 混乱を避けるために, 「家族性PD」ではなく, 「メンデル遺伝性PD」という用語を用いることにする。

メンデル遺伝性PDと孤発性PDの臨床的なオーバーラップ^{1) 3) -6)}

孤発性PDは50歳代後半~60歳代にかけての発症が多

く, 経過は緩徐で, 早期からの認知症の合併は稀で, 病理学的には黒質神経の脱落とLewy小体の出現が必須である。メンデル遺伝性PDは, 孤発性PDと臨床・病理の上で異なる点が多いが, 原因遺伝子・変異の種類によっては, 孤発性PDとほぼ同じ臨床像をとるものも少なくない(表1)。劣性遺伝性PDで孤発性PDと最も異なる点は, PARK9の臨床像とPARK2の病理所見である。PARK9はKufor-Rakeb syndromeとも呼ばれ, 大抵は10歳代で発症, 急速に進行し, パーキンソニズムに錐体路症状, 核上性上方注視麻痺, 認知症を伴い, PDよりもむしろ進行性核上性麻痺(PSP)を思わせる^{1) 5)}。しかしながら, PARK9以外の劣性家系(PARK2, PARK6, PARK7)は早発~若年発症ではあるが, 臨床経過は緩徐で, 認知症もほとんど認めず, 孤発例とほぼ同様である^{4) 5)}。PARK2の病理像は, Lewy小体を伴わない黒質神経脱落という孤発例との決定的な違いがある。ただし, PARK2複合ヘテロでLewy小体を伴う例も報告されており,

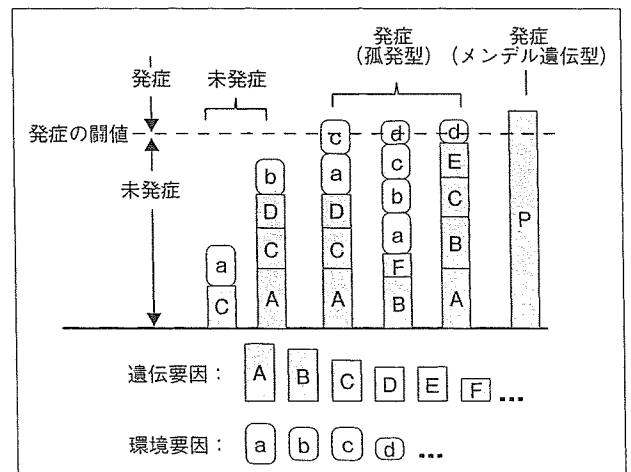


図1 多因子疾患の発症

表1 主なメンデル遺伝性PDの特徴

	遺伝形式*	原因遺伝子	臨床像	Lewy小体**	孤発性PDモデルとしてのエビデンス
PARK 1	AD	<i>α-synuclein</i> (点変異)	早発性, 急速進行, 認知症合併	+	<i>α-synuclein</i> は Lewy 小体の主成分 <i>α-synuclein</i> の SNP が孤発性 PD と強く関連
PARK 2	AR	<i>parkin</i>	若年発症, 日内変動, L-ドーパ反応性 ジスキネジア, ジストニア	-	<i>parkin</i> は Lewy 小体に含まれる <i>parkin</i> はプロテアソーム系関連蛋白
PARK 4	AD	<i>α-synuclein</i> (遺伝子重複)	3 回重複: 早発性, 急速進行, 認知症合併 2 回重複: 孤発性 PD に似る	+	(PARK1 と同じ)
PARK 5	AD	<i>UCH-L1</i>	孤発性 PD に似る	?	<i>UCH-L1</i> はプロテアソーム系関連蛋白
PARK 6	AR	<i>PINK1</i>	早発性, 緩徐進行	?	<i>PINK1</i> はミトコンドリア局在蛋白
PARK 7	AR	<i>DJ-1</i>	早発性, 緩徐進行	?	<i>DJ-1</i> は抗酸化作用・ミトコンドリア機能に関連
PARK 8	AD	<i>LRRK2</i>	孤発性 PD に似る	+ ~ -	<i>LRRK2</i> の多型が孤発性 PD と関連
PARK 9 (Kufor-Rakeb syndrome)	AR	<i>ATP13A2</i>	若年発症, 急速進行, 錐体路症状, 核上性 上方注視麻痺, 認知症合併	?	<i>ATP13A2</i> はリソソーム局在蛋白

* AD: 常染色体優性遺伝, AR: 常染色体劣性遺伝 **?: 病理報告なし

parkin の変異の種類によっては病理像も孤発例と同様になり得ると考えられている^{5) 6)}。

優性遺伝性PDでも臨床像の多様性がみられる。PARK1は*α-synuclein*の点変異によりアミノ酸変化が起きるが、変異の場所により臨床像は大きく異なる。最初に報告されたPARK1家系(A53T変異)は40歳代に発症し、経過が早く認知症の合併が高率であった。しかしながら、別の家系(A30P変異)では発症年齢は54~76歳、認知症の合併も稀で、孤発性PDとほぼ同様の臨床経過をとる。一方、PARK4は正常な*α-synuclein*遺伝子重複を持つが、重複の度合いにより臨床像も異なる。3回重複、すなわち遺伝子コピー数が通常の2倍になる変異では、平均34歳で発症し、経過も早く、高率に認知症を合併する。しかしながら、2回重複変異では、発症年齢は様々だが(38~65歳)、経過は緩徐で認知症の合併も少なく、孤発性PDとほぼ同様の臨床経過をとる場合が多い^{3) 5)}。

優性遺伝型PDで最も頻度の高いPARK8の原因遺伝子*LRRK2*にはミスセンス変異やスプライシング変異が20種類以上報告されている。PARK8の発症年齢は30歳代~60歳代と様々だが、経過は緩徐で認知症の合併も稀で、臨床的には孤発性PDとほとんど区別がつかない。ただし、Lewy小体の有無については、同一家系内でも様々である^{5) 6)}。

孤発性PD感受性遺伝子としてのPARK遺伝子^{1) 5)}

関連解析を用いて、孤発性PD群と対照群の間で、ある遺伝子の多型頻度に有意差があれば、遺伝統計学的に感受性遺伝子であると考えられる。この手法により、孤発性PDの感受性遺伝子であると結論づけられているPARK遺伝子として、*α-synuclein*、*LRRK2*がある。我々は*α-synuclein*の3'領域の複数のSNPについて、アレル頻度差が10%という、極めて強い関連を報告した⁷⁾。白人でも同様の報告がなされ、日本人と白人で共通の有意なSNPも存在することから、*α-synuclein*は人種差のない強力な感受性遺伝子であるといえる^{1) 8)}。これに対して、*LRRK2*では人種により感受性のある多型が異なる。アジア人ではG2385R、R1628P多型がPDの危険因子として報告されているが、白人では、PARK8変異で最も頻度の高いG2019S変異が孤発性PD群の一部にみられ、発症に関わっていると考えられている⁸⁾。なお、劣性遺伝性PARK2、PARK6、PARK7のヘテロが孤発性PDにみられるとの報告があるが、その有意性についてはまだ確証が得られていない⁴⁾。

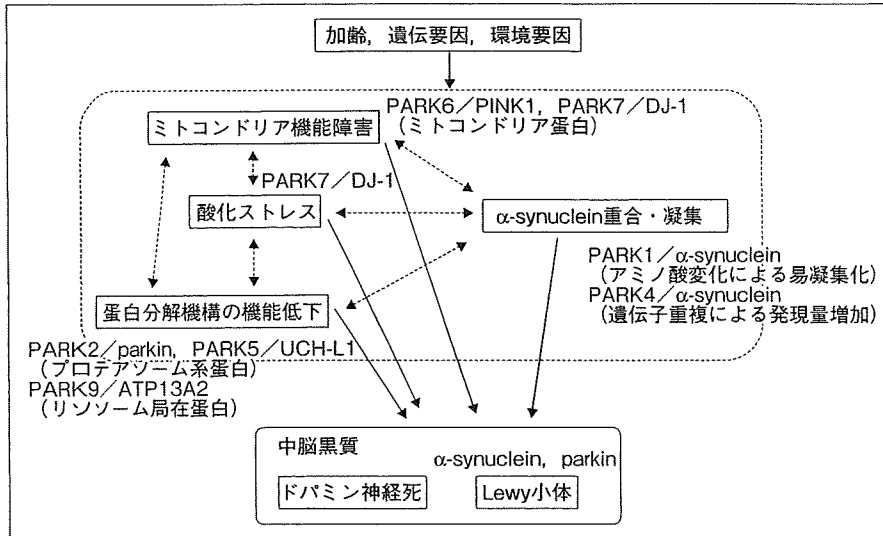


図2 孤発性 PD 発症機序と PARK 遺伝子

PARK 遺伝子の孤発性 PD 病態における位置^{3) 9) -13)}

1997年に PARK1 遺伝子が同定されたのを皮切りに、次々に PARK 遺伝子の同定が進むと、そのほとんどが孤発性 PD の病態メカニズムにも関係する蛋白であることが判明した^{3) 9) -13)} (表 1, 図 2)。最もインパクトが強かったのは、PARK1 遺伝子産物 α -synuclein 蛋白が、メンデル遺伝性 PD, 孤発性 PD 両方の Lewy 小体の主要成分であったという報告である。 α -synuclein はメンデル遺伝性 PD, 孤発性 PD の病態に共通した分子であることにより、 α -synuclein 変異の解析は、孤発性 PD のモデルにもなると考えられる。PARK1 のアミノ酸変異を持つ合成 α -synuclein は *in vitro* で重合化が促進することが知られている。また、PARK4 では、正常 α -synuclein の mRNA, 蛋白発現レベルが増加していると報告されている。現在、 α -synuclein 蛋白は生理的には可溶性単量体 (monomer) として存在し、特定の構造をとらないが、種々の要因で重合化、不溶化、凝集する過程で何らかの神経毒性をもたらすと考えられている。そして、孤発例では、 α -synuclein の重合が促進されるような、変異以外の要因が働いて、発症に至ると考えられている⁹⁾。

孤発性 PD の病理では、Lewy 小体がユビキチン抗体で染まる、脳でオートファジーの亢進がみられる¹⁴⁾、とい

う報告がある。このことと、蛋白分解機構に関する PARK 遺伝子の存在により、プロテアソーム系、オートファジー系の蛋白分解機構の破綻が PD の病態に関係するという仮説が立てられた^{10) 11)}。PARK2 (*parkin*), PARK5 (*UCH-L1*) はプロテアソーム系酵素を、PARK9 (*ATP13A2*) はオートファジー系のリソソームに局在する蛋白をコードし、変異により蛋白の機能不全が起きていると考えられる^{3) 5)}。

また、剖検脳や動物モデル(薬物性パーキンソン病モデル)²⁾の病理学的・生化学的解析からは、孤発例でのミトコンドリア機能低下や酸化ストレスマーカーの増加が報告されていた。PARK6 (*PINK1*), PARK7 (*DJ-1*) は、これらの機構に関連する蛋白をコードする^{12) 13)}。

なお、Lewy 小体に含まれる PARK 遺伝子産物として、前述の α -synuclein 以外に *parkin* も高率に含まれることが報告されている⁵⁾。

おわりに

これまで述べてきたことをまとめると、① メンデル遺伝性 PD および孤発性 PD の臨床経過・病理所見には、共通部分がある。② メンデル遺伝性 PD の原因遺伝子 (PARK 遺伝子) のいくつかは、遺伝統計学的に孤発性

PDの感受性遺伝子である。③ PARK 遺伝子のほとんどは、孤発性PDの病理像や主要な病態仮説に關与する蛋白をコードするものである。以上のことから、メンデル遺伝性PDは孤発性PDの病態を解析する上での重要なモデルになると考えられる。

REFERENCES

- 1) 戸田達史：パーキンソン病の分子遺伝学. *Brain and Nerve* 59 : 815-823, 2007
- 2) 山門穂高, 高橋良輔：Parkinson動物モデル. *神経内科* 68 : 129-134, 2008
- 3) Farrer MJ: Genetics of Parkinson disease: paradigm shifts and future prospects. *Nat Rev Genet* 7: 306-318, 2006
- 4) Gasser T: Update on the genetics of Parkinson's disease. *Mov Disord Suppl* 17: S343-350, 2007
- 5) Schiesling C, Kieper N, Seidel K, et al: Review: Familial Parkinson's disease - genetics, clinical phenotype and neuropathology in relation to the common sporadic form of the disease. *Neuropathol Appl Neurobiol* 34: 255-271, 2008
- 6) 若林孝一, 高橋 均：家族性パーキンソン病の病理. *Brain and Nerve* 59 : 851-864, 2007
- 7) Mizuta I, Satake W, Nakabayashi Y, et al: Multiple candidate gene analysis identifies α -synuclein as a susceptibility gene for sporadic Parkinson's disease. *Hum Mol Genet* 15: 1151-1158, 2006
- 8) Lesage S, Brice A: Parkinson's disease: from monogenic forms to genetic susceptibility factors. *Hum Mol Genet* 18: R48-59, 2009
- 9) Uversky VN: Neuropathology, biochemistry, and biophysics of α -synuclein aggregation. *J Neurochem* 103: 17-37, 2007
- 10) McNaught KS, Jackson T, JnoBaptiste R, et al: Proteasomal dysfunction in sporadic Parkinson's disease. *Neurology* 66 (Suppl. 4): S37-S49, 2006
- 11) Martinez-Vicente M, Cuervo AM: Autophagy and neurodegeneration: when the cleaning crew goes on strike. *Lancet Neurol* 6: 352-361, 2007
- 12) Schapira AH: Mitochondria in the aetiology and pathogenesis of Parkinson's disease. *Lancet Neurol* 7: 97-109, 2008
- 13) Jenner P, Olanow CW: Oxidative stress and the pathogenesis of Parkinson's disease. *Neurology* 47(Suppl 3): S161-S170, 1996
- 14) 水島 昇, 大隈良典, 吉森 保：動物細胞オートファジーの分子機構. *実験医学* 19 (増刊) : 294-299, 2001

「No」の立場から

澤田 誠

Makoto Sawada

名古屋大学大学院環境医学研究所生体適応・防御研究部門 教授

はじめに

「家族性パーキンソン病は孤発性パーキンソン病のモデルになるか?」という問いに対しては、何のモデルとするか、という位置付けによって「Yes」の場合も「No」の場合もあり得る。それは、パーキンソン病が見方や立場によって多くの切り口を持つことに由来する。本稿では「No」の立場つまり、「家族性パーキンソン病は孤発性パーキンソン病のモデルにならない」場合についてそれがどのような場合で、どのような意義があるかについて考えてみたい。

パーキンソン病の疾患概念と分類

パーキンソン病をとらえる場合、以下の3つの立場からそれぞれに定義される。

- ① 臨床的立場: 振戦, 筋強直, 寡動・無動, 姿勢反射障害などを主徴とする慢性進行性の神経変性疾患
- ② 病態機序の立場: 黒質線状体系のドパミン産生細胞が緩徐進行性に脱落する疾患
- ③ 病理学的立場: 黒質, 青斑核, 迷走神経背側核などの細胞脱落とLewy小体の出現を特徴とする疾患

一方、パーキンソン病の診断基準は一般的に①の臨床像を重視して行われるため病因に関しては厳密には言及しないことが多く、その分類としては孤発性、遺伝性(家族性)といった表現がなされる。また、95%以上が孤発性であるが、一部には遺伝性・家族性のものがある。遺伝性・家族性のパーキンソン病はこれまでに10数種類の遺伝子変異が特定され、それぞれの機能とパーキンソン病との関連について議論されているが、不明な点も多い。また、孤発性パーキンソン病は発症時期や様式が個別に

異なるため疫学的な特徴をとらえにくく、パーキンソン病の原因はいまだ明らかになっていない。

パーキンソン病の原因のあいまいさ

パーキンソン病は現在でも原因不明の変性疾患として分類されおり、遺伝的素因、環境因子および両者が関与する場合がある多因子疾患であると考えられている。

一方、線条体のドパミン含量が成人レベルの20%以下に減少するとパーキンソン病症状が発症するといわれており、黒質線状体系のドパミン神経やドパミン含量は加齢とともに減少するため、パーキンソン病を正常な老化過程の病的な早期発現ととらえる考え方もある。その場合、正常人でも理論的には120歳ですべてのヒトはパーキンソン病になると推定されている。

このように考えるとパーキンソン病の原因は、「正常な老化過程で起こるドパミン神経の脱落減少を促進する事象」といえる。例えば生後のある時期に外傷や脳炎、血管障害などによって脳が損傷を受けてドパミンが大きく減少すると発症のボーダーライン以下になった時にパーキンソン病が発症する(ただし、パーキンソン病様の症状を呈するが診断基準に合致しないものはパーキンソニズムとして区別される)。同様に、特定の遺伝子の変異により生まれつきドパミン神経の数が少ない場合や、ドパミン神経が脆弱であったり特定の時期にドパミン神経が死滅してしまったりする場合もパーキンソン病となる。これまでに遺伝子異常によりパーキンソン病が発症する例として、*α-synuclein* 遺伝子や *parkin* 遺伝子の異常など10種類を超える遺伝子がみつまっている。さらに、MPTP (1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine) に代表される神経毒と同様な作用を持つ化合物に曝された場合に

もドパミン神経の減少が加速されて発症する。

それでは、パーキンソン病の原因は何なのだろうか。

アイスランドで実施された大規模疫学調査ではパーキンソン病の同胞発症率が非常に高く、その発症には遺伝因子の影響が強く影響されることが示されている¹⁾。一方、一卵性双生児の研究から、発症時期が50歳以下の場合には遺伝的素因が関与しているが、発病が50歳以降の場合には遺伝的素因の関与が否定されている。さらに、双生児にパーキンソン病が発症しても重症度に大きな差がある場合があり、時には一方しか発病しないこともある。これらの知見は遺伝的素因に環境因子が加わって発病する可能性が高いことを示唆する。すなわち、パーキンソン病は遺伝子異常・遺伝的素因に環境因子が様々な程度に加わって生じる多因子疾患だと考えられる。小川はパーキンソン病の発症について、遺伝子異常によるもの、遺伝的素因が大きな要因となっているもの、遺伝的素因よりも環境因子の要素が著しく強いものまで様々な症例があり、単一の疾患ではないと論じている²⁾。

単一遺伝子異常での病因説明の難しさ

パーキンソン病が多因子疾患であり、総合的な原因を説明しにくいという事情がある時に、単一遺伝子異常によりパーキンソン病を発症する家族性パーキンソン病はどのような位置付けとなるのだろうか。

各遺伝子異常で発症メカニズムを統一的に説明できない

家族性パーキンソン病は現在10数種類のものが知られ遺伝子座も同定されているが、表現型や病理像がそれぞれで異なり、L-ドーパに対する応答性が悪いもの、Lewy小体が出現しないものなど様々で、同一疾患として分類するにはやや広範な印象がある。家族性パーキンソン病のいくつかは原因遺伝子および蛋白質が判明している。このうちPARK1 (α -synuclein), PARK2 (*parkin*), PARK4 (α -synuclein の三重複), PARK5 (*UCH-L1*) は異

常蛋白質蓄積-分解系(ユビキチン-プロテアソームシステム)の異常による小胞体(ER)ストレスが原因となる神経機能障害から神経変性が生じるという仮説が考えられる³⁾。しかし、これらの蛋白質は広汎に発現分布しており、ドパミン神経への特異性については説明が難しい。また、MPTPなどの神経毒によるミトコンドリア機能障害によるパーキンソン病様症状の出現の説明にも帰することができない。一方、PARK7のDJ-1は酸化ストレス関連蛋白質で酸化ストレスにより性質が変化する特性があるので、ミトコンドリア機能障害との関連性については説明しやすい。しかし、純粋にミトコンドリアの機能障害を引き起こしてドパミン神経の脱落を誘導するMPTPではLewy小体は生じないが、PARK7ではLewy小体が出現する。DJ-1はSUMO化されることが知られているため、酸化ストレスとユビキチン-プロテアソームシステムとの接点となっている可能性もある³⁾。

遺伝子改変動物とパーキンソン病

遺伝子工学的技術を用いてパーキンソン病の発症や病態形成に関わる遺伝子を改変・置換・あるいは欠失させたモデル動物が数多く作製されているが、それらはパーキンソン病の病態の一部の表現型を呈するものであって、パーキンソン病のモデルとはいいい難い部分がある。 α -synucleinの過剰発現モデル動物では黒質ドパミン神経での α -synuclein陽性の封入体の形成、線条体でのドパミン量およびチロシン水酸化酵素陽性のドパミン神経終末の減少、運動能の低下など、パーキンソン病でみられる形態学的・生化学的・行動学的な変化が認められ、さらに、これらの表現型が加齢により発現するため、最も有用な遺伝子改変病態モデルとして位置付けられている。しかし、これらの表現型の発現は家族性パーキンソン病で見出されている遺伝子変異の有無にかかわらず α -synucleinを過剰発現すればみられる点や、トランスジェニックマウスでは必ずしもパーキンソン病でみられる変化を再現できないという報告もある。さらに α -synuclein自体の機能が神経保護作用であるという報告

もあり、過剰発現で想定される α -synuclein の神経毒性と矛盾する。したがって、単一遺伝子の改変による病態の再現は多因子の相互作用の結果として病態が形成されるパーキンソン病の疾患モデルとしては不十分である⁴⁾。

環境因子が病理学的変異を起因する： 移植細胞での Lewy 小体出現

2008年に、細胞移植によるパーキンソン病治療患者の剖検について興味深い報告が連続してなされた^{5) 6)}。それは、パーキンソン病の治療のため移植された胎児由来中脳ドパミン神経に十数年経過後 Lewy 小体が出現し、ドパミントランスポーターなどの機能低下がみられたというものである。この結果はホストの病態が移植細胞に伝播したと解釈でき、パーキンソン病の病態形成における環境因子の重要性を示唆するものである。少なくともこの変化は家族性パーキンソン病をモデルとした場合には説明ができない。

思うに、パーキンソン病というのは孤発性という大きなグループのなかに遺伝子変異を持つ家族性パーキンソン病が含まれるのではないだろうか。そう考えると「家族性パーキンソン病は孤発性パーキンソン病のモデルになるか？」という問いには、5%程度の家族性パーキンソン病という要素から孤発性パーキンソン病という全体を推定することができれば「Yes」といえるが、それは甚だ難しいといわざるを得ない。

進行促進因子としてのフリーラジカル

一方、パーキンソン病の発症にかかわるドパミン神経の細胞脱落については、①ミトコンドリア呼吸障害または酸化ストレス、②興奮性アミノ酸、③神経毒、④神経栄養因子欠乏、⑤遺伝的素因などがある³⁾。ここで、各原因説で強調されている要因は発症の原因因子であるのと同時に進行促進因子としての一面も持ち、さらに互いに密接に関連している。ミトコンドリア呼吸障害はフリーラジカルを発生させ、また興奮性アミノ酸は細胞内 Ca^{2+}

上昇を介して一酸化窒素合成酵素 (NOS) を活性化して NO を発生させる。一方、酸化ストレスや神経毒はミトコンドリア呼吸酵素を障害し、エネルギー欠乏に陥った神経細胞は死に至る。パーキンソン病の進行促進因子を考える場合、加齢も重要な要因であるが、細胞や生体の加齢は酸化ストレスの蓄積を伴うと考えることができる。このように、どの要因によっても神経細胞死の最終過程で共通する直接的要因としてはフリーラジカルが関与する。

実際、パーキンソン病患者脳では、フリーラジカルが発生しやすく消去されにくい特徴がある。例えば、ドパミン代謝経路にフリーラジカル発生系がある、パーキンソン病患者の黒質では鉄が増加しているため水酸化ラジカルが発生しやすい、パーキンソン病患者脳ではフリーラジカルを消去するグルタチオン、カタラーゼなどが減少している、ミトコンドリア呼吸酵素活性が黒質や線条体で低下している、などと報告されている。

孤発性と家族性との接点： 脳内微小環境 = ミクログリアと炎症反応

発症時期や様式が個別に異なるため疫学的な特徴をとらえにくいという特徴を持つ孤発性パーキンソン病患者剖検脳や家族性パーキンソン病患者剖検脳、さらに MPTP 誘導性パーキンソン病モデル動物脳の黒質線条体部において共通にみられる病理変化としてミクログリアの活性化と集積がある⁷⁾。ミクログリアは活性化すると HLA-DR, ICAM-1 (CD54), LFA-1 (CD11a), TNF- α , IL-6 や iNOS や COX-2 を発現し、IL-1 β や IL-6 などの炎症性サイトカインを含む種々のサイトカインを産生し、炎症反応の特徴の多くを示す。また、活性化したミクログリアは炎症性サイトカインを産生するばかりでなく、活性酸素や NO, プロテアーゼ類などの神経傷害性因子も産生する。特に活性酸素や NO などのフリーラジカルはパーキンソン病における神経変性の進行機序に関与するため、ミクログリアの活性化や脳内炎症反応はパーキンソン病の発症や進行に密接に関わっている⁸⁾。

ミクログリアの活性化はMPTP誘発性パーキンソニズムにおいてもみられることが報告されている⁷⁾。MPTPはドパミン神経特異的な神経毒であり摂取後短時間でドパミン神経脱落を生じるためパーキンソン病様症状を呈するが、孤発性パーキンソン病脳にみられるLewy小体は生じない。したがって、病理学的にみるとMPTPにより誘発されるドパミン神経の脱落とパーキンソン病は別物と考える向きもある。しかし、LangstonらはMPTP誘発性パーキンソニズムを発症した患者剖検脳を調べた結果、MPTP摂取後16年後の死後脳においても活性化ミクログリアが存在することを見出した⁹⁾。これはミクログリアの活性化を伴う長期間にわたる継続的な炎症状態がパーキンソン病の病態の進行において病理学的変化以上に重要な意味を持つ可能性を示唆している。パーキンソン病の発症や病態形成を考える上で考慮しなければならない要因であると考えられる。

おわりに

パーキンソン病の発症や病態はドーパミン神経自体の問題で起こるのではなく脳内微小環境が作り出すものであるという考え方がある。孤発性パーキンソン病でみられるミクログリアの活性化や脳内炎症反応を含んだ微小環境の変化は、家族性パーキンソン病の原因遺伝子の単独の作用によって形成されるようには思えない。単一遺伝子の作用が発現した結果何らかの相互作用を生じることによって形成され得ることまでは否定できないが、少なくとも現時点ではその経路について十分説明できると

はいい難い。したがって、グリア細胞を研究する立場から「家族性パーキンソン病は孤発性パーキンソン病のモデルになるか？」という問いに対して「No」と答えることになる。

REFERENCES

- 1) Sveinbjörnsdóttir S, Hicks AA, Jonsson T, et al: Familial aggregation of Parkinson's disease in Iceland. *N Engl J Med* 343: 1765-1770, 2000
- 2) 小川紀雄: パーキンソン病の病因と病態. *日内会誌* 92: 1394-1399, 2003
- 3) Nagatsu T, Sawada M: Cellular and molecular mechanisms of Parkinson's disease: neurotoxins, causative genes, and inflammatory cytokines. *Cell Mol Neurobiol* 26: 781-802, 2006
- 4) Manning-Bog AB, Langston JW: Model fusion, the next phase in developing animal models for Parkinson's disease. *Neurotox Res* 11: 219-240, 2007
- 5) Li JY, Englund E, Holton JL, et al: Lewy bodies in grafted neurons in subjects with Parkinson's disease suggest host-to-graft disease propagation. *Nat Med* 14: 501-503, 2008
- 6) Kordower JH, Chu Y, Hauser RA, et al: Lewy body-like pathology in long-term embryonic nigral transplants in Parkinson's disease. *Nat Med* 14: 504-506, 2008
- 7) Nagatsu T, Sawada M: Inflammatory process in Parkinson's disease: role for cytokines. *Curr Pharm Des* 11: 999-1016, 2005
- 8) Sawada M, Imamura K, Nagatsu T: Role of cytokines in inflammatory process in Parkinson's disease. *J Neural Transm Suppl* 70: 373-381, 2006
- 9) Langston JW, Forno LS, Tetrud J, et al: Evidence of active nerve cell degeneration in the substantia nigra of humans years after 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine exposure. *Ann Neurol* 46: 598-605, 1999

Temperature dependence of proton permeation through a voltage-gated proton channel

Miyuki Kuno,^{1,2} Hiroyuki Ando,³ Hirokazu Morihata,¹ Hiromu Sakai,¹ Hiroyuki Mori,¹ Makoto Sawada,⁴ and Shigetoshi Oiki³

¹Department of Physiology, Osaka City University Graduate School of Medicine, Abeno-ku, Osaka 545-8585, Japan

²Division of Intracellular Metabolism, National Institute for Physiological Sciences, Okazaki 444-8585, Japan

³Department of Molecular Physiology and Biophysics, Faculty of Medical Sciences, University of Fukui, Fukui 910-1193, Japan

⁴Department of Brain Life Science, Research Institute of Environmental Medicine, Nagoya University, Nagoya 464-8601, Japan

Voltage-gated proton channels are found in many different types of cells, where they facilitate proton movement through the membrane. The mechanism of proton permeation through the channel is an issue of long-term interest, but it remains an open question. To address this issue, we examined the temperature dependence of proton permeation. Under whole cell recordings, rapid temperature changes within a few milliseconds were imposed. This method allowed for the measurement of current amplitudes immediately before and after a temperature jump, from which the ratios of these currents (I_{ratio}) were determined. The use of I_{ratio} for evaluating the temperature dependence minimized the contributions of factors other than permeation. Temperature jumps of various degrees (ΔT , -15 to 15°C) were applied over a wide temperature range (4 – 49°C), and the Q_{10} s for the proton currents were evaluated from the I_{ratio} s. Q_{10} exhibited a high temperature dependence, varying from 2.2 at 10°C to 1.3 at 40°C . This implies that processes with different temperature dependencies underlie the observed Q_{10} . A novel resistivity pulse method revealed that the access resistance with its low temperature dependence predominated in high temperature ranges. The measured temperature dependence of Q_{10} was decomposed into Q_{10} of the channel and of the access resistances. Finally, the Q_{10} for proton permeation through the voltage-gated proton channel itself was calculated and found to vary from 2.8 at 5°C to 2.2 at 45°C , as expected for an activation enthalpy of 64 kJ/mol. The thermodynamic features for proton permeation through proton-selective channels were discussed for the underlying mechanism.

INTRODUCTION

Proton transfer across biological membranes is performed by various types of membrane proteins, including pumps, transporters, and channels. Of these, channels are the most efficient pathway for ion transfer. The voltage-gated proton channel described initially in snail neurons (Thomas and Meech, 1982) had activation gating at depolarized potentials similar to most of the voltage-gated cation channels. The proton channel is almost perfectly selective for protons. These channels have been found in many types of cells, including phagocytes (e.g., microglia), osteoclasts, and epithelial cells. Fast proton transfer is thought to be a prerequisite to cellular processes, such as phagocytosis (Henderson et al., 1987).

The whole cell currents of the voltage-gated proton channel exhibit an unusually high temperature dependence (Byerly and Suen, 1989; Kuno et al., 1997; DeCoursey and Cherny, 1998). The high Q_{10} s (three to five) of the measured currents have been related to temperature dependence of proton permeation (DeCoursey and Cherny, 1998), which further suggests that protons may permeate through the channel with “unusually” high

temperature-dependent processes compared with those of other types of channels (DeCoursey, 2003). This conjecture, however, still remains an open question because features of the proton channel have made quantitative evaluations of the temperature dependence difficult. Among other things, the single-channel conductance of the proton channel is of the order of femto Siemens (Cherny et al., 2003), so that an evaluation of changes in conductance necessitates whole cell recordings. We have observed, however, that the proton currents vary in amplitudes, even at a fixed temperature (Morihata et al., 2000a). This phenomenon can be explained by an alteration in the number of activatable channels upon repeated application of depolarization pulses being compatible with the results observed for other types of membrane proteins (Morgan et al., 2003). These features of the channel raise concerns as to whether the reported temperature dependence actually reflects that of permeation through the channel.

Correspondence to Shigetoshi Oiki: oiki-fki@umin.ac.jp
Abbreviation used in this paper: gA, gramicidin A.

The Rockefeller University Press \$30.00
J. Gen. Physiol. Vol. 134 No. 3 191–205
www.jgp.org/cgi/doi/10.1085/jgp.200910213

© 2009 Kuno et al. This article is distributed under the terms of an Attribution–Noncommercial–Share Alike–No Mirror Sites license for the first six months after the publication date (see <http://www.jgp.org/misc/terms.shtml>). After six months it is available under a Creative Commons License (Attribution–Noncommercial–Share Alike 3.0 Unported license, as described at <http://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/3.0/>).

To address the permeation issues of proton channels, the consideration of the physicochemical principles for proton transfer is crucial. In bulk solution, proton transfer is characterized by the Grotthuss mechanism (de Grotthuss, 1806; Eigen, 1964; Agmon, 1995, 1996, 1999; Robinson and Stokes, 2002; Swanson et al., 2007) and buffered diffusion (Eigen et al., 1964; Keener and Sneyd, 1998; Swietach et al., 2003; Zifarelli et al., 2008). These additional "proton-specific" factors modify channel access resistance, the concentration polarization at the cell membrane, and changes in ion concentration in the cytosol, factors expected to affect the properties of ion permeation through all types of channels. Each issue has been studied separately (DeCoursey and Cherny, 1996; Gordienko et al., 1996), but the findings have not been integrated to produce a picture of the whole process of proton permeation. For example, the magnitudes of the measured currents may be determined, in part, by proton-transfer processes outside the channel molecule, and the proton fluxes may cause local concentration changes (decreases at the "upstream" membrane-solution interface and increases at the "downstream" membrane-solution interface). These interrelated issues should be treated in a systematic manner with quantitative evaluation. To this end, the theoretical basis for the proton-transfer processes was reviewed to estimate the relative contributions of proton-transfer events, which were exploited for the experimental design.

Experimental strategy

Protons are transferred from the bulk solution to the channel entrance through the access region, which induces depletion of protons upstream and accumulation downstream in the bulk, in the vicinity of the membrane, and at the channel entrance. These events, which develop with spatially different scales, are termed as the bulk concentration change, concentration polarization, and access resistance. For the proton channels, experiments were performed in the presence of low concentrations of protons and high concentrations of buffer. The latter was a prerequisite as a resource of the proton reservoir, which helps the proton flux to endure under the limited supply from the patch pipette. Even if the high concentration buffer facilitates proton transfer in bulk solutions (Keener and Sneyd, 1998), the persistent efflux eventually leads to cytosolic depletion of the proton concentration (concentration polarization and depletion of the cytosolic concentration) (Gordienko et al., 1996). Recently, local changes in proton concentration were estimated by Zifarelli et al. (2008) using a simulation technique at low buffer concentrations. Following their method, we estimated the time courses of the concentrations in our highly buffered experimental conditions (see Appendix). The changes of pH at the vicinity of the membrane during maximum currents in our experiments were negligible, and their time courses were

several tens of milliseconds. These predictions, especially for the time order of development, were important considerations for experimental design.

To address the proton-transfer process at the molecular level, the concentration profiles of protons treated with a one-dimensional regimen are no longer valid (Berg and Purcell, 1977). At the pore entrance, proton fluxes converge and proton depletion develops locally when the transfer of ions within the pore occurs at a faster rate than diffusion toward the pore. This diffusion-limited process in the vicinity of the pore and the convergence of ion trajectories toward the narrow pore opening lead to additional resistance outside the channel pore (access resistance [R_{AR}]) (Hille, 1968; Hall, 1975; Lauger, 1976; Andersen, 1983; Hladky, 1984; Peskoff and Bers, 1988; Aguilera-Arzo et al., 2005). The theory estimated that the development of the access resistance is very fast (10^{-10} s; see Appendix) (Crank, 1975) compared with the accessible speed of electrophysiological measurements (see Appendix).

Each of these proton-specific issues developing outside of the channel should contribute somewhat to the measured proton currents. We focused on the large discrepancies in time scale for the development of each event. The concentration polarization and bulk depletion develop on the order of a second or slower. Therefore, if we change the temperature of the channel in a rapid stepwise manner and measure the changes in proton current immediately before and after the step, the measured current changes are little affected by slowly developing events. In the present study, stepwise changes in temperature for a cell undergoing whole cell current recording were applied within a few milliseconds by the pulse method (Ando et al., 2005). This rapid system enabled experiments in a wide temperature range and repeated applications of temperature changes for a single cell under patch clamp. Furthermore, the temperature changes were rapid enough to minimize changes in the gating status because the voltage-gated proton channel exhibits slow activation gating (several tens or hundreds of milliseconds).

The next issue to be addressed was to determine the contribution of the access resistance to the total resistance. The access resistance grows with a time constant of 10^{-10} s and cannot be discriminated by the "rapid" temperature change method. Here, we exploited the facts that (1) R_{AR} changes with the resistivity of the bulk solution (Hall, 1975), (2) R_{AR} for the extracellular side can be changed by perfusing extracellular solution, and (3) changes in R_{AR} leads to changes in R_{total} . Therefore, measuring changes in R_{total} upon perturbation of the extracellular solution would provide estimates of the relative contribution of R_{AR} to R_{total} . We applied a resistivity pulse method and estimated the ratio of R_{AR} to R_{Ch} , the value of which was used to decompose the temperature dependence of the proton channel.

With all appropriate caveats in mind, the native proton channel expressed in microglial cells was examined. We have elucidated the temperature dependence of proton permeation through the voltage-gated proton channel.

MATERIALS AND METHODS

Electrophysiology

Rat microglia (GMI-R1) (Sawada et al., 1998) were cultured in Dulbecco's modified Eagle's medium supplemented with granulocyte/macrophage colony-stimulating factor, glucose, and insulin. Whole cell recordings were performed with an AxoPatch 200B amplifier (MDS Analytical Technologies). Currents were filtered at 1 kHz and sampled at 5 kHz with DigiData1322A (MDS Analytical Technologies). The pipette solution contained 120 mM Mes, 65 mM NMDG aspartate, 3 mM MgCl₂, 1 mM BAPTA, and 1 mM Na₂ATP, pH 5.5–6.2. The extracellular solution contained 100 mM HEPES, 75 mM NMDG aspartate, 1 mM CaCl₂, 1 mM MgCl₂, and 50 μM 4,4'-diisothiocyanatostilbene-2,2'-disulphonic acid (DIDS). The pH (7.3) was adjusted by CsOH. Pipette resistances ranged between 5 and 15 MΩ.

Estimation of the shift of the reversal potential

The reversal potentials (V_{rev}) were estimated from two methods, one from the I-V curve and another from current measurements at two different membrane potentials. The I-V curves were obtained as follows. Ramp potentials were applied at the end of a long depolarization pulse and at the end of a mock 10-ms depolarization pulse. Ramp current traces after the long depolarization pulse were subtracted by those for a mock 10-ms depolarization pulse. In the second method, V_{rev} was estimated from the current amplitudes at two different membrane potentials. Proton currents were elicited by a depolarization pulse to 0 mV (V_{Depo}), and then repolarized to -40 mV (V_{Tail}). The reversal potentials were interpolated from the current amplitudes at the end of the depolarization pulse (I_{Depo}) and at the peak of the tail current (I_{Tail}) using the following equation.

$$V_{rev} = -\frac{V_{Depo} - V_{Tail}}{1 - I_{Tail} / I_{Depo}} \quad (1)$$

Temperature pulse experiments

A rapid temperature pulse system was built with the ultrafast solution-switching system (LSS-3200; EXFO) equipped with a double-barreled tube from which solutions of different temperatures were perfused (Fig. 1 A). The system (Ando et al., 2005) included (1) a piezoelectric device (LSS-3200; EXFO) to shift the outflow, (2) a double-barreled tube (the temperatures of the outflows were controlled independently), (3) a patch-clamped microglia, and (4) an ultrafine thermocouple (ANBE SMT Ltd.). Two solutions of different temperatures flowed at rates of 3–6 μl/s (an injection pump; TE-221; Terumo). A voltage-clamped microglial cell was placed in the midst of one of the outflows. The tube was shifted by the piezoelectric device, by which the cell was perfused with different temperatures. The positions of the tube were reversed after 1 s. The movements of the piezoelectric device (200 μm) were controlled by pClamp software so as to coincide with the voltage command. The driving voltages for the piezoelectric device were started and terminated with a finite slope to dampen the mechanical oscillations produced by the movements. This method allowed repeated brief applications of both warming and cooling jumps.

Double-barreled tube

The double-barreled tubes for the perfusing solutions were made of copper pipe (length, 100 mm; diameter, 1 mm) for better heat conduction. The surface of the copper pipe was silanized (Siliconise L-25; Nacalai Tesque, Inc.). A small Peltier device (5 × 5 mm; Miniature Module; Ferrotec Corp.) was mounted on a copper plate at the base of each tube. The two Peltier devices were controlled independently by a constant current source (PD18-10A; Regulated DC Power Supply; Kenwood). The pipes were insulated by tubing (Tygon) and were bundled in parallel with epoxy resin. A fine-fused silica tube coated with polyimide (MicroFil; WPI) was attached to the tip of the copper pipe to define a small outlet of fixed size (inner diameter of the tip, 250 μm). The temperatures of the outflow monitored by the ultrafine thermocouple reached

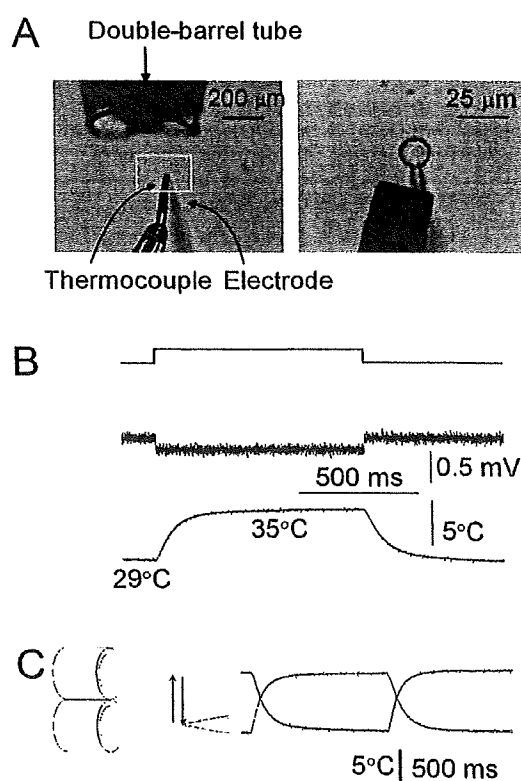


Figure 1. Temperature jump experiments. (A) The experimental setup. (Left) A photograph of the temperature pulse system. Solutions with different temperatures flowed from the double-barreled tube. A voltage-clamped microglial cell was placed close to one of the outflows. The piezoelectric device was driven by 5-V pulses, which were triggered by a program simultaneously controlling the membrane potential. (Right) An enlarged photograph for a patch-clamped cell and an ultrafine thermocouple located as close as 15 μm downstream of the cell. (B) Temperature measurements. (Top) The voltage drive for the piezoelectric device. (Middle) Temperature measured by a liquid junction potential using an open-tip electrode under current clamp mode. (Bottom) Temperature monitored by an ultrafine thermocouple. (C) Temperature measurements during the shift of the outflow from the double-barreled tube. Reversals of the shift motion and the responses of the thermocouple were recorded. The traces for 1-s pulses for reverse directions were mirror images of each other, indicating that the fast changes of temperature during a pulse were detected by the ultrafine thermocouple.

the steady state within a minute when the driving currents for the Peltier device were changed.

Evaluation of temperature changes

The local temperatures in the vicinity of the cell were monitored by an ultrafine thermocouple with a thermometer (BAT-12; Physitemp Instruments Inc.). The thermocouple with the tip size of 26 μm (ANBE SMT Ltd.) was insulated in a glass capillary with the fine tip exposed. The thermocouple was calibrated before use with a standard thermometer.

Time courses of the temperature changes upon the jumps were monitored by the changes of the liquid junction potentials (Fig. 1 B, middle). An open-tip electrode filled with 3 M KCl was placed in the midst of the flow, and the liquid junction potentials were measured under the current clamp mode. Positive pressure was applied continually to the pipette to prevent the mixing of the solutions. The changes in temperature upon the shift of the flow were measured with a time constant of 0.9 ms.

The responses of the ultrafine thermocouple were evaluated under the temperature jump experiments. Output of the thermocouple is shown (Fig. 1 B, bottom trace), which was fitted by a single-exponential function with the time constant of ~ 70 ms. After a pulse, the temperature returned to the prepulse level within the error of 0.5%. To see whether the temperature signal from the thermocouple reached the steady state during a 1-s pulse, the sensor tip was placed in the outflows for minutes and the signal levels before and during a pulse were compared (Fig. 1 C, red trace). Conversely, the sensor tip was placed in the high temperature outflow for minutes and the temperature outflow was jumped to the low temperature for a second (Fig. 1 C, black trace). The responses to the shifts of the outflows in the opposite direction looked like mirror images of each other, indicating that the temperatures during the short jumps reached the steady-state values and were maintained there.

In addition to the changes in current amplitudes at different temperatures, the driving forces may be affected by several physicochemical factors. The temperature dependence of the Nernst potential and intracellular and extracellular pH changes by altered pK_a values for buffers were evaluated (see Appendix in detail). These factors develop instantaneously, but the theoretical prediction indicates that the contributions of these factors are negligible.

Evaluation of temperature dependence

The temperature coefficient for a 10° change in temperature, Q_{10} , is defined from current ratios as $I_{\text{ratio}}(\Delta T)^{10/\Delta T}$, where $I_{\text{ratio}}(\Delta T)$ is the temperature coefficient for an arbitrary temperature interval ΔT . Q_{10} as a function of the measured temperature was evaluated in several different ways. For the jump vector plot, a slope for each temperature jump vector was calculated. Q_{10} of the conductivity for the buffered solution was analyzed by the following method. Temperature-dependent conductivity was plotted and a slope was calculated by a linear fit of five neighboring data points. Slopes were obtained successively as the data points for evaluation were shifted. These slopes gave Q_{10} values at mean temperatures of five data points.

Resistivity pulse experiments

To estimate the access resistance, resistivity pulse experiments were performed in which the extracellular solution was changed to a solution with higher resistivity by use of a high concentration of sorbitol (Stojilkovic et al., 2003). The solution composition was 100 mM Mes, 105 mM NMDG, 90 mM aspartate, 1 mM CaCl_2 , 1 mM MgCl_2 , 50 μM DIDS, and 0.14–2 M sorbitol. The pH of the solutions was adjusted to 5.5 by CsOH, such that the pH of the extracellular and intracellular solution was symmetrical. The pipette solution was the same as in the previous experiments. The resis-

tivities of the buffered solutions as a function of the sorbitol concentration and that of temperature were measured by a conductivity meter (DS-8M; HORIBA).

Proton currents were elicited by the depolarization pulses to +100 mV, and after reaching the steady state of the activation, the cells were exposed to the solution with high resistivity for short periods of time (the resistivity pulse method) (Ando et al., 2005). Current amplitudes immediately before and after a resistivity jump were measured. The ratios of the current amplitudes were evaluated as a function of the resistivities of the solutions. The relative resistivity of the channel to that of the total resistance was obtained.

All the algebraic calculations were performed using Mathematica (Wolfram Research Inc.), and the graphs were drawn using Origin (OriginLab Corporation). Data were expressed as mean \pm SEM.

Online supplemental material

Fig. S1 provides reciprocal relationships of I_{ratio} s at the beginning and end of a pulse, which supports negligible contribution of the concentration polarization to the measured currents. Fig. S2 demonstrates all the experimental data points for temperature dependence in a three-dimensional plot. Fig. S3 shows discrepancies in temperature dependence measured by the temperature pulse method and by the earlier method measuring the steady-state current amplitudes. Figs. S1–S3 and supplemental text are available at <http://www.jgp.org/cgi/content/full/jgp.200910213/DC1>.

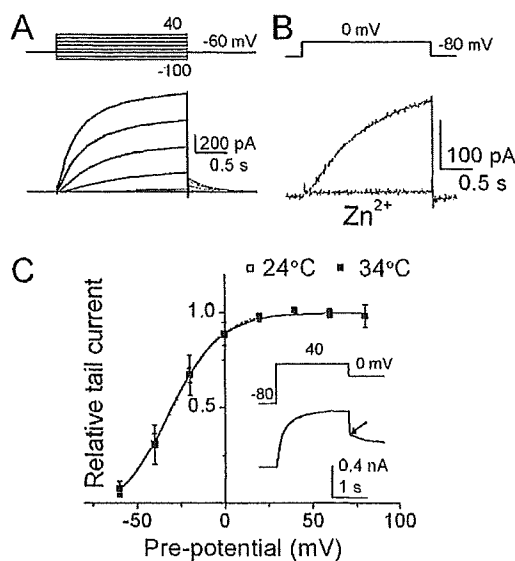


Figure 2. Proton channel currents. (A) Whole cell proton currents from a microglial cell. Voltage-dependent activation of the proton currents are shown. Currents were elicited by pulses from -100 to 40 mV. Inset represents the voltage protocol. (B) Block of the proton currents by $100 \mu\text{M}$ of extracellular Zn^{2+} . (C) Steady-state gating curves (G - V curve) of proton channel and its temperature dependence. The current amplitudes at the peak of the tail currents were plotted as a function of preceding voltages and were normalized. G - V curves were obtained from six cells at 24 and 34°C . The curves were fitted by the Boltzmann function. The $V_{1/2}$ values were -32.2 and -30.2 mV for 24 and 34°C . Inset shows a representative current trace for depolarizing pulse to $+40$ mV, followed by repolarization to 0 mV. The arrow indicates the peak of tail current.

RESULTS

Proton channels of microglial cells

Proton currents were recorded from microglial cells in the whole cell voltage-clamped configuration. In the asymmetric pH condition (pH_i/pH_o , 5.5/7.3), depolarizing pulses elicited a slowly activating outward current, the time course of which was accelerated with further depolarization (Fig. 2 A) (Moriyama et al., 2000b). This current was inhibited by a proton channel blocker, Zn^{2+} (Mahaut-Smith, 1989), indicating negligible contributions from other endogenous channels (Fig. 2 B).

To examine the temperature dependence of the steady-state gating, depolarizing pulses to various membrane potentials were applied and the tail currents at 0 mV were recorded (see Fig. 4 C, inset). The normalized peak amplitudes of the tail currents as a function of the depolarizing potentials were plotted (G - V curve; Fig. 2 C). The two curves at different temperatures overlapped; thus, the steady-state gating of the proton channel was not temperature dependent.

Cytosolic protons are depleted slowly

Before studying the temperature dependence of proton permeation through the channel, factors affecting the driving force upon temperature change were examined. Proton effluxes should deplete cytosolic protons (cytosolic depletion), and the degree of the depletion and its time course were evaluated. Proton effluxes were elicited by repeated application of depolarizing pulses that were prolonged successively (Fig. 3 A). A ramp potential was applied at the end of a depolarization pulse to give I - V curves (Fig. 3 B). The reversal potentials (V_{rev} s) shifted

notably toward the positive direction for longer depolarizations. Because the bath concentrations of protons were held constant by continual perfusion, the positive shifts of V_{rev} indicate decreases in the intracellular concentrations of protons.

The proton currents sometimes decayed gradually after reaching the peak level of activation (Fig. 3 C). This is called current droop. In parallel to the current droop, V_{rev} shifted slowly within the time range of seconds (Fig. 3 D, ■; 24°C). When the temperature was raised to 34°C, the degrees and speeds of the V_{rev} shift were dramatically enhanced (Fig. 3 D, ○), although the time range was still of the order of seconds.

Evaluation of the temperature pulse method

Temperature dependence of proton currents was examined by measuring the immediate changes in current amplitude upon temperature jumps (see Materials and methods). To verify that the fast temperature changes were sensed by the channels in cell membrane, the time courses of whole cell currents upon a temperature pulse were examined. The thermocouple signals displayed reproducible changes for the repetitive temperature pulses (Fig. 4, middle). When a pulse was applied early during the gating activation, a small jump of the current was followed by accelerated gating activation during the pulse (Fig. 4, bottom, red arrows). As the onset of the temperature pulse on top of the depolarization pulse was delayed, the instantaneous changes in the current traces predominated, and these were followed by residual activation. These observations, of the current jumps superimposed on temperature jumps and accelerated activation gating during a temperature pulse, were consistent

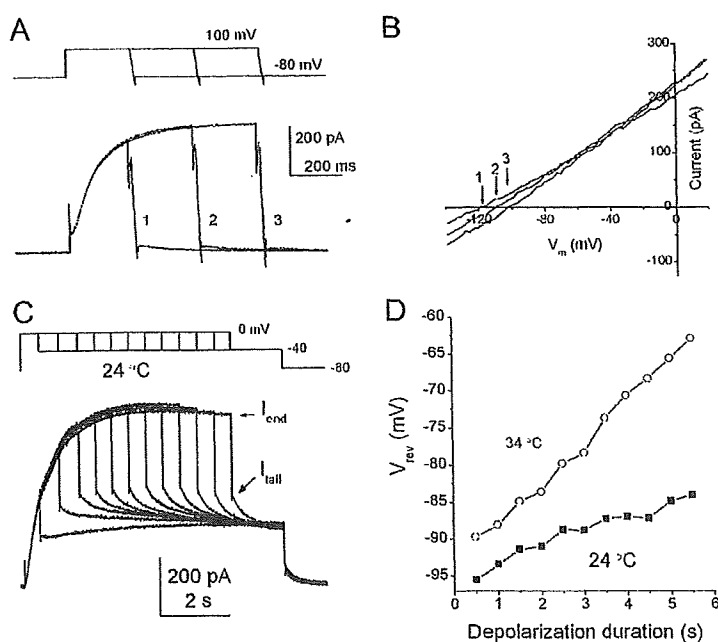


Figure 3. Changes in the intracellular pH after proton flux. (A) Current traces for depolarization pulses, followed by the ramp potential from 100 to -100 mV. (B) The I - V curves for depolarization pulses of different durations. The V_{rev} is indicated by arrows, and the number represents current traces shown in A. V_{rev} shifted toward the depolarization potential as the depolarization pulse was prolonged. (C) Current traces with droop. As the depolarization pulses were prolonged, current amplitudes reached nearly steady state and slightly decayed. The tail currents were measured at -40 mV. Current amplitudes at the end of the depolarization pulse (I_{end}) and those at the peak of tail currents (I_{tail}) are indicated by arrows. (D) Time courses of the shifts for V_{rev} . V_{rev} s were estimated from a current ratio ($I_{\text{tail}}/I_{\text{end}}$). Shift of V_{rev} for the higher temperature was accelerated.