

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

【差し替え】

平成19年度～21年度 総合研究報告書

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 19 年度～21 年度 総合研究報告書

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. パーキン蛋白の機能解析と治療法の開発	13
服部 信孝	
2. パーキンノックインマウスの作製・解析	21
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	29
高橋 良輔	
4. ミクログリアの二相性毒性転換とパーキンソン病発症や病態形成の関わりについて	36
澤田 誠	
III. 研究成果の刊行に関する一覧表	53
IV. 研究成果の刊行物・別刷	71

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 19-21 年度の 3 年間の研究成果で特記すべき点は、(1) パーキンは（膜電位が低下した）損傷ミトコンドリアに移行すること（この移行にはパーキンのユビキチンリガーゼ活性は必要でないこと）、(2) その後、パーキンによってミトコンドリアの外膜タンパク質がユビキチン化されること、(3) その結果、mitophagy が誘導されて損傷ミトコンドリアが分解除去されること、(4) AR-JP の変異パーキンでは、（全てではないが）パーキンのミトコンドリア移行阻害が見られること、(5) PINK1 はパーキンのミトコンドリア移行を促進する因子であること、(6) ミトコンドリア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、(7) 健康なミトコンドリアでは、全長パーキン（60-kDa）が短鎖パーキン（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、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、(8) 膜電位依存的に PINK1 を限定分解するプロテアーゼがミトコンドリアの損傷を感知していること、(9) Early-onset のパーキンソン病を発症させる PINK1 の変異では、（全てではないが）パーキンのミトコンドリア移行阻害が見られること、等である。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、一種のミトコンドリア病であることが判明した。

更に 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にて、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る。また 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。既報告のあるドー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。

従来、ドーパミン欠乏マウスモデルは、運動障害を呈さない。従ってドーパミン欠乏状態を評価する方法には限界があった。そこで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、運動学習能力はドー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マウス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。細胞死のメカニズムに関してはカテプシン D の活性増加の関与が推定されている。

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

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) 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。

4) 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。

5) 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。

6) 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生型 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。

7) 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。

8) 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。

9) 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。

10) 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。

11) 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。

12) α -synuclein multiplication の分子臨床学的検討

浸透率約 33-50%の家系において変異を持つ発症者と未発症者の違いを示すような因子の同定を試みた。PD では嗅覚障害が早期に現れるとの報告がある。そこで未発症者において UPSIT にて嗅覚の障害有無を検討したが、発症者は全員嗅覚の障害を認めたが、未発症者は正常であった。浸透率が 100%でない家系でのバイオマーカーや臨床的違いを見出すことは重要であるが今回の検討では未発症者に特異的な所見や早期サブクリニカルな兆候を見出すことは出来なかった。

13) 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。

14) 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。

15) 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 125 I 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则认为される。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。

16) 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た。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、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 K0 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。

新規遺伝性 PD の原因遺伝子同定はドーパミン選択的細胞死の全貌を明らかにするためには重要な課題である。現在感受性遺伝子を含めて遺伝子座は Park1-16 までが同定されている。そのうち H21 年度に明らかにされた Park16 は新規遺伝子座として Nature Genetics に報告した (Satake et al. Nat Genet 2009)。現在、既知遺伝子のスクリーニングを進めながら新規遺伝子を同定・単離を目指している。

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 ミクログリアは、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 ミ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。善玉的機能をなすミクログリアと悪玉的機能をなすミ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ろう。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。

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。3 年間の成果として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に注目し、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インスリン分泌の破綻のメカニズムを明らかにした。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

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

2007 年度

1. 論文発表

Kono S, Shirakawa K, Ouchi Y, Sakamoto M, Ida H, Sugiura T, Tomiyama H, Suzuki H, Takahashi Y, Miyajima H, Hattori N, Mizuno Y. Dopaminergic neuronal dysfunction associated with parkinsonism in both a Gaucher disease patient and a carrier. *J Neurol Sci.* 252:181-184, 2007

Ishihara L, Gibson RA, Warren L, Amouri R, Lyons K, Wielinski C, Hunter C, Swartz JE, Elango R, Akkari PA, Leppert D, Surh L, Reeves KH, Thomas S, Ragone L, Hattori N, Pahwa R, Jankovic J, Nance M, Freeman A, Gouider-Khouja N, Kefi M, Zouari M, Ben Sassi S, Ben Yahmed S, El Euch-Fayeche G, Middleton L, Burn DJ, Watts RL, Hentati F. Screening for Lrrk2 G2019S and clinical comparison of Tunisian and North American Caucasian Parkinson's disease families. *Mov Disord.* 2007;22:55-61, 2007

Ephraty L, Porat O, Israeli D, Cohen OS, Tunkel O, Yael S, Hatano Y, Hattori N, Hassin-Baer S. Neuropsychiatric and cognitive features in autosomal-recessive early parkinsonism due to PINK1 mutations. *Mov Disord.* 22: 566-569, 2007

Funayama M, Li Y, Tomiyama H, Yoshino H, Imamichi Y, Yamamoto M, Murata M, Toda T, Mizuno Y, Hattori N: LRRK2 G2385R variant is a risk factor for Parkinson disease in Asian population *NeuroReport* 18:273-275, 2007

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

Hatano T, Kubo S, Imai S, Maeda M, Ishikawa K, Mizuno Y, Hattori N. Leucine-rich repeat kinase 2 associates with lipid rafts. *Hum Mol Genet.* 16:678-690, 2007

2. 学会発表

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

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

服部信孝. 遺伝性パーキンソン病の発症メカニズム. 「病態脳」平成 19 年度夏の班会議. 2007 年 8 月 21 日, 札幌

Nobutaka Hattori, Clinical Features and Molecular mechanisms of Nigral Neuronal Death in Parkinsonism with parkin Gene Mutation (PARK2), Taiwan Movement disorders, Taiwan, 2007.4.7

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

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

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

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

2008 年度

1. 論文発表

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. 2008. *Parkinsonism Relat Disord.* 14. 166-169

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;70:1491-1493.

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;64:88-92.

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., (2008) Genomic investigation of alpha-synuclein multiplication and parkinsonism. *Ann Neurol* 63: 743-50.

Mizuno Y, Hattori N, Kubo SI, Sato S, Nishioka K, Hatano T, Tomiyama H, Funayama M, Machida Y, Mochizuki H. Progress in the pathogenesis and genetics of Parkinson's disease. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*. 2008. 27;363. 2215-2227.

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;23:1461-1465.

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.

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's disease. *Arch Neurol*. 2008;65:802-828.

Mizuta I, Tsunoda T, Satake W, Nakabayashi Y, Watanabe M, Takeda A, Hasegawa K, Nakashima K, Yamamoto M, Hattori N, Murata M, Toda T, (2008) Calbindin 1, fibroblast growth factor 20, and alpha-synuclein in sporadic Parkinson's disease. *Hum Genet* 124: 89-94.

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; 53:1012-1015.

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;27;363:2215-2227.

服部信孝、遺伝性パーキンソン病の遺伝子産物の

機能解析から黒質神経変性のメカニズムを探る、*脳*2111巻3号 Page372-376

服部信孝、久保紳一郎、ここまでわかったパーキンソン病(PD)の成因 遺伝性PDの病態からわかったこと、*臨床神経学*、47巻11号 Page774-778

2. 学会発表

船山学, 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.

船山学, 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.

船山学, 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.

船山学, 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.

富山弘幸, 高橋祐二, 関尚美, 高橋裕秀, 村田美穂, 山本光利, 戸田達史, 後藤順, 服部信孝, 辻省次. 常染色体優性遺伝性パーキンソン病における *LRRK2* 変異解析 (2008 日本神経学会総会, 横浜)

Tomiyama H, Hattori N. Genetic Epidemiology Of Parkinson's Disease Consortium 3rd annual meeting data blitz from Juntendo University, Japan (2008 3rd GEO-PD. Norway, Trondheim).

Tomiyama H, Mizuta I, Li Y, Funayama M, Yoshino H, Li L, Murata M, Yamamoto M, Kubo S, Toda T, Mizuno Y, MD Nobutaka Hattori, *LRRK2* P755L variant in Japanese sporadic Parkinson's disease. (2008 3rd GEO-PD. Norway, Trondheim).

富山弘幸, 水田依久子, 李元哲, 船山学, 吉野浩代, 李林, 村田美穂, 山本光利, 久保紳一郎, 水

野美邦, 戸田達史, 服部信孝 孤発性パーキンソン病における LRRK2 P755L (2008 MDSJ, 京都)

富山弘幸, 小久保康昌, 佐々木良元, 李元哲, 今道洋子, 舩山学, 水野美邦, 服部信孝, 葛原茂樹. 紀伊半島 Amyotrophic Lateral Sclerosis /parkinsonism-dementia complex (ALS/PDC)の候補遺伝子解析 (2008 平成 20 年度 神経変性疾患に関する調査研究班班会議, 東京)

Hattori N, Parkinson's Disease genetics in Asia, GEOPD meeting, Norway, 2008.6.9

Hattori N, Chair. Parallel Session: Genetics of Parkinson's Disease: Dominant, recessive and complex associations including Gaucher's disease, MDS 12th International Congress Session, Chicaga, 2008.6.25

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.

Tomiya 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