

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  
総合研究報告書

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) の原因遺伝子であるパーキンの病態生理学的機能を解明するためにパーキン遺伝子の遺伝学的解析とそれを利用した細胞生物学的研究を行った。パーキンの(GFP)ノックインマウスを作出したが、予想した中脳の黒質における形態学的異常及びパーキンソン病患者に見られる運動失調を中心とした行動異常などの顕著な表現型を示さなかった。そこで最初、パーキンがユビキチンリガーゼであることを鑑み、プロテアソームと神経変性の関係を解析するためにプロテアソーム減弱マウスを作製し、その表現型を比較することにした。われわれの研究室で同定したプロテアソームの形成に必須な分子集合因子 PAC1 (Proteasome Assembly Chaperone 1) をターゲットとしてコンディショナルノックアウトマウス (cKO) を作製した。全身 PAC1 欠損マウスにおいては着床後早期胎児期に致死に至り、また Nestin プロモーターに Cre リコンビナーゼを組み込んだトランスジェニック (Tg) マウスと交配して PAC1 を中枢神経系特異的に欠損させると小脳の構造異常が起こり、発育障害、振戦、運動障害の神経変性徴候が現れ、ほぼ3週目で死に至るという結果を得た。この研究の途上で、パーキンが損傷ミトコンドリアのオートファジー (自食作用) によるクリアランス (浄化) (mitophagy) に関係するとの知見が報告された。そこで、「AR-JP 及び孤発型パーキンソン病がミトコンドリアの品質管理の破綻によって発症する」とする仮説の検証を行った。その結果、AR-JP (PARK2) のみならずもう一つ若年性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) (PARK6) が mitophagy に関与するとの証拠を得た。その要点を列記すると、(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。

A. 研究目的

1998 年、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) の責任遺伝子としてパーキンが同定され (1: 参考文献)、次いでわれわれは、2000 年、パーキンがユビキチンリガーゼであることを世界で最初に証明した (2)。

次いでパーキンの生理機能とその破綻による AR-JP の発症機序を解明するためにパーキン遺伝子の (GFP) ノックインマウスを作出した (3)。その後、今日に至るまでに膨大な数のパーキン基質の同定に関する論文が発表されたが、どれ一つとして AR-JP の発症機構を説明できなかった。

そこでわれわれはパーキンの分子機構を生化学的及び細胞生物学的に解析することを目標にした。このため作製したパーキン(GFP)ノックインマウスを有効に活用した。

## B. 研究方法

### マウスの遺伝学的解析

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

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

### 培養細胞

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

### 細胞分画

To depolarize the mitochondria, HeLa and SH-SY5Y cells were treated with 10  $\mu$ M CCCP and MEFs with 30  $\mu$ 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 MgCl<sub>2</sub>, 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.

### ウェスタンブロット分析

25mM Tris(hydroxymethyl)aminomethane [Tris]-HCl(pH7.5)、2mM ATP、1mM dithiothreitol (DTT) に調整したバッファーを用いてホモジナイズし 20,000g で 10 分間、4°C で遠心を行い、上清を回収した。さらに同条件で遠心を再度行い、上清を回収した。Protein assay (Bio-Rad) は、スタンダードに BSA (0.5mg/mL) を使用して Bradford 法により定量を行った。1mg/mL になるように 1× nupageLDS サンプルバッファー、2-mercaptoethanol を加え、95°C、5min で前処理した。ゲルは Nupage プレキャストゲル (invitrogen) を使用した。

### H/E 染色、免疫組織染色

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

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

免疫染色では脱パラフィン処理の後、0.05% 無水シトラコン酸中でマイクロウェーブ 10min × 2 回処理し抗原を賦活化させた。2% Goat-serum + 0.1% Tween20 in PBS でブロッキングし、1 次抗体反応は下記の抗体を用い 4°C (一晩) もしくは 1 時間 (室温) で行った。\*

(事項) : (GFAP の場合) Zenon Alexa Fluor 647 Mouse IgG1 Labeling Kit を用いラベリングした。次いで 2 次抗体反応は下記の抗体を用い室温で 1 時間行った。Alexa Fluor 488 anti-mouse IgG /anti-rabbit IgG (molecular probes)、Alexa Fluor 647 anti-rabbit IgG (molecular probes)。核は DAPI(molecular probes)で染色した。

### 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), anti-calbindin-D-28K (Sigma)、anti-neuN [4G2] (abcam)、anti-GFAP [2A5] \*(Novus biologicals)、anti-ubiquitin [Fk2] (medical & biological laboratories co., LTD.) anti-PAC1 (antiserum)

### C. 研究結果

2007-2009 (2010 を含む) に行った 3 年間の主な研究成果を列挙する。

#### [研究 1] PAC1 全身欠損マウスの解析

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

PAC1<sup>flx</sup> マウスと Cre トランスジェニックマウスを交配し作製した PAC1 ヘテロ接合体 (+/-) マウスは生存可能であった。このヘテロ接合体は通常通り繁殖可能であり C57BL/6J によりバッククロスを行いその後ヘテロ接合体同士で繁殖を始めた。ヘテロ接合体同士を掛け合わせるとホモ接合体 (-/-) が生まれてこなかった。そして十分な交配の結果メンデルの法

則を満たすことが明らかとなった。また出生後早期における死亡、母獣による食殺も確認できないため PAC1 のホモ接合体は胎生致死となることが明確となった。

#### [研究 2] 神経細胞特異的 PAC1 欠損マウスの解析結果

中枢神経系特異的 PAC1 欠損マウス (PAC1<sup>Flx/Flx</sup>:Nes) を作製した結果、ホモ接合体の割合はメンデルの法則に従った割合で生まれてきた。外見上生まれた直後は区別がつかなかった。P (postnatal days: 出生後日数) 3 頃からわずかではあるが、小さめの体格マウスが確認された。生後 1 週齢頃には顕著になり、それ以降は外見上の表現型でホモ接合体を識別できるようになった。自力で歩き回り始める 2 週齢以降では体格の違いに加え、手足の震え (振戦症状)、歩行困難等の異常を示した。ほとんどのホモ接合体は 3 週齢前後で死に至った。この頃の徴候としては栄養摂取障害に伴う成長障害、立毛、振戦、歩行障害・平衡感覚障害、背を丸めた姿勢、過敏・攻撃的な性格が観察された。ヘテロ欠損体については、体型・体格・行動などにおいて野生型と全く区別がつかなかった。

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

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

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

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

### [研究3] 内在性パーキンの細胞内局在の再検討

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

次にマウス脳を用いた組織分画を行った後にウエスタブロット分析に最適と思われる抗体を使用してパーキンの細胞内分布を調べた。その結果、既に報告されているラットやヒトとは異なり、少なくともマウスにおいては内在性パーキンのメインの局在部位は、一部が膜面分に存在するものの、大部分が細胞質に存在することが示唆された。

### [研究4] 損傷ミトコンドリアへのパーキンの移行

ミトコンドリアの内膜に存在する呼吸鎖、特に complex I の活性低下が、パーキンソン病と関係することを示唆した報告は、多い。そこで、HeLa 細胞 (内在性のパーキンは存在しない) に GFP-パーキンを導入した後、ミトコンドリアの uncoupler である CCCP (carbonyl cyanide m-chlorophenylhydrazone) 処理 (10  $\mu$ M) してミトコンドリア内膜の電子伝達系を破壊し、膜電位を強く低下させた。そして GFP-パーキンの細胞内局在について共焦点顕微鏡で観察した結果、30 分以内に細胞質に拡散的に存在していたパーキンが大量にミトコンドリアの表面に移行した。このミトコンドリアに移行したパーキンは、ミトコンドリア外膜のタンパク質である Tom20 と共染色した結果、両者

は完全にマージした。即ち、ミトコンドリアに移行したパーキンは、外膜に結合していると考えられた。

またこの移行に関して多数の AR-JP 変遺パーキンで検討した結果、ミトコンドリア移行がほぼ完全に抑制される変異、少し抑制される変異、全く抑制されない変異に分類されることが判明した。この結果、AR-JP の患者に見られるほとんど全ての変異が、ユビキチンリガーゼ活性を失っている場合、パーキンが凝集沈殿する場合、損傷ミトコンドリアへ移行阻害される場合の3群に分類できることが判明した (4-6)。

### [結果5] 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 (投稿準備中)。

### [結果6] 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。

### [結果7] 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  $\mu$ M, 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。

PINK1 の異常によって発症する多くの患者の PINK1 変異は、パーキンのミトコンドリア移行の抑制であった。この結果は、PINK1 の主な作用がパーキンの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。

#### [結果 8] 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<sup>(+/)</sup>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。

#### [結果 9] 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。

#### [結果 10] 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<sup>+</sup> 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。

[付記] 本課題に関連したユビキチン・プロテアソームシステムやオートファジーについても、数多くの研究を行った (13-26)。

#### D. 考察

我々はすでにオートファジーを欠失させると、神経変性疾患様の症状を呈すること (7)、そしてプリキンエ細胞でオートファジーを欠失させると軸索にミトコンドリアを含むオルガネラが蓄積してニューロンが自律的に細胞死 (cell autonomous death) を引き起こすこと (8, 9) を報告した。本研究で得られた成果は、これらの先行知見と考え合わせると、非常に興味深い。またわれわれは、選択的オートファジーのメカニズム研究 (10, 11) や新たなストレス応答との関係 (12) など先駆的な研究を展開してきており、これらの発見とを併せて考察すると、われわれの成果は、パーキンソン病の全貌解明に急接近していると考えられる。

#### E. 結論

本研究から「パーキンソン病は、ミトコンドリ

アの品質管理の破綻によって発症するミトコンドリア病である」という仮説を提唱した。この仮説は、パーキンやPINK1の遺伝子変異によって発症する青少年期に発症する常染色体劣性家族性パーキンソン病のみならず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予想されており、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。

F. 健康危険情報  
無し

G. 研究発表

1. 論文発表

- (1) Kitada T, Asakawa S, Hattori N, Matsumine H, Yamamura Y, Minoshima S, Yokochi M, Mizuno Y, Shimizu N. (1998) Mutations in the parkin gene cause autosomal recessive juvenile parkinsonism. **Nature** 392, 605-608.
- (2) Shimura, H., Hattori, N., Kubo, S., Mizuno, Y., Asakawa, S., Minoshima, S., Shimizu, N., Iwai, K., Chiba, T., Tanaka, K., and Suzuki, S. (2000) Familial Parkinson's disease gene product, parkin, is a ubiquitin-protein ligase. **Nature Genet.** 25, 302-305.
- (3) Sato, S., Chiba, T., Nishiyama, S., Kakiuchi, T., Tsukada, H., Hatano, T., Fukuda, T., Yasoshima, Y., Kai, N., Kobayashi, K., Mizuno, Y., Tanaka, K., and Hattori, N. (2006) Decline of striatal dopamine release in parkin-deficient mice revealed by ex vivo autoradiography. **J. Neurosci. Res.** 84,1350-1357.
- (4) Matsuda, N., Kitami, T., Suzuki, T., Mizuno, Y., Hattori, N., and Tanaka, K. (2006) Diverse effects of pathogenic mutations of Parkin that catalyzes multiple mono-ubiquitylation in vitro. **J. Biol. Chem.** 281, 3204-3209.
- (5) Matsuda, N., Sato, S., Shiba, K., Okatsu, K., Saisho, K., Gautier, CA Sou, Y., Saiki, S., Kawajiri, S., Sato, F., Kimura, M., Komatsu, M., Hattori, N., and Tanaka, K. (2010) PINK1 stabilized by depolarization recruits Parkin to damaged mitochondria and activates latent Parkin for mitophagy. **J Cell Biol.** in press.
- (6) Matsuda, N. and Tanaka, K. (2009) Does impairment of ubiquitin-proteasome system predispose to neurodegenerative disorders? **J Alzheimer's Dis.** 19, 1-9.
- (7) Komatsu, M., Waguri, S., Chiba, T., Murata, S., Iwata, J., Ueno, T., Koike, M., Uchiyama, Y., Kominami, E., and Tanaka, K. (2006) Loss of autophagy in the central nervous system causes neurodegeneration. **Nature** 441, 880-884.
- (8) Komatsu M., Wang QJ., Holstein GR., Friedrich VL., Iwata JI., Kominami E., Chait BT., Tanaka K., Yue Z. (2007) Essential role for autophagy protein Atg7 in the maintenance of axonal homeostasis and the prevention of axonal degeneration. **Proc Natl Acad Sci USA** 104, 14489-14494.
- (9) Yue, Z., Friedman, L., Komatsu, M., and Tanaka, K., The cellular pathways of neuronal autophagy and their implication in neurodegenerative diseases. **Biochem Biophys Acta – Mol Cell Res.** 172-180.
- (10) Komatsu, M., Waguri, S., Koike, M., Sou, Y., Ueno, T., Hara, T., Mizushima, N., Iwata, J., Ezaki, J., Murata, S., Hamazaki, J., Nishito, Y., Iemura, S., Natsume, N., Yanagawa, T., Uwayama, J., Warabi, E., Yoshida, H., Ishii, T., Kobayashi, A., Yamamoto, M., Yue, Z., Uchiyama, Y., Kominami, E., and Tanaka, K. (2007) Homeostatic levels of p62 control cytoplasmic inclusion body formation in autophagy-deficient mice. **Cell** 131, 1149-1163.
- (11) Ichimura, Y., Kumanomidou, T., Sou, Y.S., Mizushima, T., Ezaki, J., Ueno, T., Kominami, E., Yamane, T., Tanaka, K., and Komatsu, M (2008) Structural basis for sorting mechanism of p62 in selective autophagy. **J. Biol. Chem.** 283, 22847-22857.
- (12) Komatsu, M., Kurokawa, H., Waguri, S., Taguchi, K., Kobayashi, A., Ichimura, Y., Sou, Y-S., Ueno, I., Sakamoto, A., Tong, K. I., Kim, M., Nishito Y., Iemura, S., Natsume, T., Ueno, T., Kominami, E., Motohashi, H., Tanaka, K., and Yamamoto, M. (2010) The selective autophagy substrate p62 activates the stress responsive transcription factor Nrf2 through inactivation of Keap1. **Nat. Cell Biol.** 12, 213-223.
- (13) Mizushima, T., Yoshida, Y., Kumanomidou, T., Hasegawa, Y., Suzuki, A., Yamane, T., and Tanaka, K. (2007) Structural basis for selection of glycosylated substrate by SCF<sup>Fbs1</sup> ubiquitin ligase. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA** 104, 5777-5781.

- (14) Murata, S., Sasaki, K., Kishimoto, T., Niwa, S., Hayashi, H., Takahama, Y., and Tanaka, K. (2007) Regulation of CD8<sup>+</sup> T cell development by thymus-specific proteasomes. **Science** 316, 1349-1353.
- (15) Hamazaki J., Sasaki, K., Kawahara, H., Hisanaga, S., Tanaka, K., and Murata, M. (2007) Rpn10-mediated degradation of ubiquitinated proteins is essential for mouse development. **Mol. Cell. Biol.** 27, 6629-6638.
- (16) Koike, M., Shibata, M., Tadakoshi, M., Gotoh, K., Komatsu, M., Waguri, S., Kawahara, N., Kuida, K., Nagata, S., Kominami, E., Tanaka, K., and Uchiyama, Y. (2008) Inhibition of Autophagy Prevents Hippocampal Pyramidal Neuron Death after Hypoxic-Ischemic Injury. **Am. J. Pathol.** 172, 454-469.
- (17) Yashiroda, H., Mizushima, T., Okamoto, K., Kameyama, T., Hayashi, H., Kishimoto, T., Kasahara, M., Kurimoto, E., Sakata, E., Suzuki, A., Hirano, Y., Murata, S., Kato, K., Yamane, T., and Tanaka, K. (2008) Crystal structure of a chaperone complex that contributes to the assembly of yeast 20S proteasomes. **Nat. Struct. Mol. Biol.** 15, 228 - 236.
- (18) Tonoki, A., Kuranaga, E., Tomioka, T., Hamazaki, J., Murata, S., Tanaka, K., and Miura, M. (2009) Genetic evidence linking age-dependent attenuation of the 26S proteasome with aging process. **Mol. Cell. Biol.** 29, 1095-1106.
- (19) Saeki, Y., Kudo, T., Sone, T., Kikuchi, Y., Yokosawa, H., Toh-e, A., and Tanaka, K. (2009) Lysine 63-linked polyubiquitin chain may serve as a targeting signal for the 26S proteasome. **EMBO J.** 28, 359 - 371.
- (20) Kaneko, T., Hamazaki, J., Iemura, S., Sasaki, K., Furuyama, K., Natsume, T., Tanaka, K., and Murata, S. (2009) Assembly pathway of the mammalian proteasome base subcomplex is mediated by multiple specific chaperones. **Cell** 137, 914-925.
- (21) Nitta, T., Murata, S., Sasaki, K., Fujii, H., Ripen, A. M., Ishimaru, N., Koyasu, S., Tanaka, K., and Takahama, Y. (2010) Thymoproteasome shapes immunocompetent repertoire of CD8 T cells. **Immunity** 32, 29-40.
- (22) Komatsu, M., Ueno, T., Waguri, S., Uchiyama, Y., Kominami, E., and Tanaka, K. (2007) Constitutive autophagy: Vital role in clearance of unfavorable proteins in neurons. **Cell Death and Differ.** 14, 887-894.
- (23) Murata, S., Yashiroda, H., and Tanaka, K. (2009) Molecular mechanisms of proteasome assembly. **Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.** 10, 104-115.
- (24) Tanaka, K. (2009) The proteasome: Overview of structure and functions. **Proc. Jpn. Acad. Ser. B Phys Biol Sci** 85, 12-36.
- (25) Yoshida, Y. and Tanaka, K. (2010) Lectin-like ERAD players in ER and cytosol. **Biochem. Biophys. Acta** 1800, 172-180.
- (26) Kimura, Y. and Tanaka, K. (2010) Regulatory mechanisms involved in the control of ubiquitin homeostasis. **J. Biochem.** in press.
2. 学会発表
- (1) Keiji Tanaka and Masaaki Komatsu : Protein Quality Control by Constitutive Autophag. The Ubiquitin Family (CSHS Symposium): Quality Control. April 25 - 29, 2007, New York, USA.
- (2) Keiji Tanaka and Masaaki Komatsu Pathophysiology of Constitutive Autophagy. The 20th Naito Conference / Innate Immunity in Medicine and Biology [III] (October 10 - 12, 2007) 湘南国際村センター、神奈川県
- (3) 田中啓二 : Protein Degradation and Neurodegenerative Diseases. Neuroscience 2008 第 31 回日本神経科学大会.特別講演. July 10, 2008 (東京フォーラム) 東京.
- (4) 田中啓二 : タンパク質分解と病態生理学 (Proteolysis and Pathophysiology). 第 2 回 Diabetes Leading-edge Conference : 静岡県沼津市淡島ホテル (平成 20 年 8 月 9 日) 静岡
- (5) Keiji Tanaka : The Novel Thymoproteasome Regulates Development of CD8<sup>+</sup> T Cells. 33<sup>rd</sup> FEBS Congress & 11<sup>th</sup> IUBMB Conference (Symposium on the ubiquitin-proteasome system) Peace and Friendship Stadium, June 30, 2008, Athens, Greece.
- (6) Keiji Tanaka : Unexpected encounter with immunity during my proteasome study .

Japan-German Immunology Seminar 2008 :  
Immune Regulation in Health and Disease.  
(November 3-6, 2008) Fukuoka, Japan

- (7) 田中啓二：細胞内大規模タンパク質分解システムの作動機構と生理機構. 日本分子生物学会第9回春期シンポジウム (090511-12) 分子生物学の新たな胎動ー宮崎から黎明の曙光ー (平成21年5月11-12日) 宮崎
- (8) Keiji Tanaka : Molecular Assembly and Diversity of Proteasomes . Ubiquitin, Ubiquitin-like Proteins and Proteasomes: Functions and Dysfunctions, Inserm Workshop (June 10-12, 2009) Saint-Raphael, France
- (9) Keiji Tanaka : Molecular Assembly and Diversity of Eukaryotic Proteasomes. Proteolysis Research: Succession and Development, Tokyo Garden Palace (July 5th, 2009) Tokyo, Japan
- (10) Keiji Tanaka : Molecular Assembly and Diversity of Eukaryotic Proteasomes. EMBO CONFERENCE on "Ubiquitin and Ubiquitin-like Modifiers in Health and Disease" Riva Del Garda, September 22nd to 26th, 2009, Italy
- (11) 田中啓二：オートファジーと神経変性疾患. 第1回 ニューロフォーラム東京、京王プラザホテル (2009年10月1日)東京
- (12) Keiji Tanaka : Molecular Mechanisms of Chaperone-assisted Proteasome Assembly. The 4th International Congress on Stress Responses in Biology and Medicine. The 4th Annual Meeting of The Biomedical Society for Stress Response, October 6 - 9, Sapporo, Japan
- (13) Keiji Tanaka : Overview of My Proteasome Study, focusing on the Structure and Functions. International Conference on Radiation and Cancer Biology at Nagasaki 2010 (January 17th), Japan
- (14) Keiji Tanaka: In-depth Analysis of Structure and Functions of Eukaryotic Proteasomes. Global COE "Integrative Life Science" Meeting. Based on the Study of Biosignaling Mechanisms, The University of Tokyo : March 5th 2010, Japan

(15) Keiji Tanaka : The Role of the PINK1/Parkin Pathway on the Autophagic Clearance of Damaged Mitochondria. Cancer Center, Rappaport Research Institute and Faculty of Medicine. Technion -Israel Institute of Technology, The 2010 Rappaport Research Institute Ubiquitin Day, Haifa (March 11, 2010), Israel

(16) Keiji Tanaka : Immunological Roles of the Thymoproteasome. Biology of the Ubiquitin and the Ubiquitin-Like Systems, In Jerusalem, March 14-18, 2010, Israel

G. 知的財産権の取得状況

1. 特許取得  
無し
2. 実用新案登録  
無し
3. その他  
無し



パーキンソン病におけるパエル受容体の役割に関する研究

研究分担者 高橋良輔 京都大学医学研究科

研究要旨

常染色体劣性若年性パーキンソニズム (AR-JP) の原因遺伝子 *parkin* はユビキチン・プロテアソーム系で重要な役割を果たすユビキチンリガーゼであり、タンパク質分解系の破綻が PD の発症にかかわることを示す強い証拠を提供している。我々は *Parkin* の基質タンパク質として構造異常を起こした Pael 受容体 (Pael-R) を単離し、*parkin* の変異によって分解されなくなった Pael-R が蓄積すると、これが小胞体ストレスを惹起して神経変性が生じるという仮説を提唱している。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。一方 Pael-R Tg マウスでは小胞内 DA 量とその代謝産物である DOPAC 量が増加していた。また、ドーパミン神経毒に対する感受性が Pael-R Tg および KO でそれぞれ、亢進、低下していた。以上より Pael-R は線条体 DA 量を制御している可能性が示唆された。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。さらに小胞体ストレスセンサー ATF6 $\alpha$  欠損細胞では Pael-R 毒性が増強することを見出した。ATF6 $\alpha$  欠損マウスを用いて、ミトコンドリア障害に基づく酸化的ストレスが主因と考えられてきた MPTP の毒性メカニズムにも小胞体ストレスが関与していることが明らかになった。

A. 研究目的

常染色体劣性若年性パーキンソニズム (AR-JP) の原因遺伝子産物 *Parkin* は、細胞内の主要なタンパク質分解系のひとつであるユビキチン・プロテアソーム系 (UPS) で重要な役割を果たすユビキチンリガーゼ (E3) としての活性をもち、AR-JP 患者で見られる変異体はこの E3 活性が欠失または低下している。このことは、本来 *Parkin* によって分解されるべき基質の神経細胞への蓄積がその病態の原因であることを示唆している。我々が *Parkin* の基質として同定した膜タンパク質 Pael 受容体 (Pael-R) は小胞体でのフォールディングが難しく、神経系培養細胞内で過剰発現させると、高度なユビキチン化とともに細胞死が観察される。これは本来そのほとんどが小胞体関連分解 (ERAD) で分解されている、うまくフォールディングされなかった Pael-R が ERAD の処理能力を超えて小胞体および細胞質に蓄積し小胞体ストレスを引き起こすためであると考

えられる。

本研究ではまず初年度、Pael-R のドーパミン代謝への影響を、Pael-R トランスジェニック (Tg) マウスと Pael-R ノックアウト (KO) マウスを用いて検討した。次年度には Pael-R 複合体構成分子が *Parkin* の基質になるかどうかを検討した。ドーパミン作動性神経特異的に発現しているドーパミントランスポーター (DAT) と Pael-R の結合および Pael-R KO マウス線条体における細胞表面 DAT レベルの増加がすでに Marazziti らによって報告されている。彼らは Pael-R による DAT の膜表面への発現抑制を示唆している。さらにこの DAT は *Parkin* の基質候補タンパク質として同定されている。これらを踏まえ、我々は Pael-R および *Parkin* が DAT を介した DA 代謝のみならず、ノルエピネフリントランスポーター (NET) を介したノルエピネフリン (NE) 代謝にも関与しているのではないかと、Pael-R と複合体を形成する膜タンパク質がカテコールアミン作動

性神経選択的な細胞死のメカニズムの鍵をにぎる Parkin の基質なのではないかという仮説を立て、その検証を行った。

最終年度には小胞体ストレスセンサー ATF6 $\alpha$  のパーキンソン病モデルにおける役割を解析した。哺乳類では主として IRE1-XBP1 経路、ATF6 経路、PERK 経路の三種類の小胞体ストレス応答が知られている。このうち ATF6 は最も重要な経路である。ATF6 は小胞体膜一回貫通型の Type II 膜タンパク質であり、小胞体ストレスによって、N 末端が切断され、核に移行して小胞体シャペロンや小胞体関連分解 (ERAD) 関連分子の転写活性化に必須の転写因子として作用する。そこで ATF6 欠損細胞に Pael-R を過剰発現した場合、Pael-R の毒性が増強されるかどうか、さらに従来実験的パーキンソン病モデル作製に用いられ、ミトコンドリア毒素と考えられてきた MPTP 誘発性のドーパミン神経細胞死に ATF6 $\alpha$  が関わるかどうか検討した。

## B. 研究方法

Pael-R のドーパミン代謝への影響を解析するため、ヒト Pael-R cDNA を神経特異的な PDGF プロモーター及び prion プロモーターの下流に連結したプラスミドを作製し、それらをマウス受精卵に導入して Pael-R Tg マウスを作製した。常法により、Pael-R ノックアウト (KO) マウスを作製した。線条体におけるドーパミンおよびその代謝産物を HPLC で測定、また *in vivo dialysis* により、細胞外のドーパミン濃度を、定常状態とメタアンフェタミン投与時に測定した。さらにオープンフィールドテストで遺伝子改変マウスの行動解析を行った。またドーパミン神経毒である 6-OHDA と MPTP をそれぞれ Pael-R-Tg と Pael-R-KO マウスに投与した

Pael-R 複合体の解析に関しては HEK293T 細胞を用いた過剰発現系においてヒト Pael-R とヒト DAT または NET、あるいはヒト Parkin と各トランスポーターの結合を免疫沈降実験により確認した。また、*in vitro ubiquitination assay* を行い、各トランスポーターが Pael-R 同様に Parkin の基質となり

得るのかを解析した。さらに、HEK293T 細胞の過剰発現系を用いたプロテアソーム阻害剤 (MG-132) 処理実験で Parkin を介した基質候補タンパク質の UPS による分解を確認した。

ATF6 $\alpha$  のパーキンソン病モデルにおける役割を解明するために、ATF6 $\alpha$  ノックアウト (ATF6 $\alpha$  -KO) マウスを京都大学理学研究科・森和俊教授から供与していただいた。このマウスから MEF を作製した。Pael-R をコードするアデノウイルスを作製し、これを MEF に感染させ、Pael-R の蓄積および細胞死誘導作用への影響を解析した。

一方 ATF6 $\alpha$  ノックアウトマウスの脳内各部位で小胞体シャペロンを定量した。MPTP を腹腔内投与し、黒質ドーパミン神経細胞死および形態学的変化への影響を観察した。

## C. 研究結果

Pael-R Tg と Pael-R KO マウスを解析したところ、前者では線条体 DA および DOPAC 量と小胞内 DA、細胞外 DA 量が増加していた。後者では逆に線条体 DA 量が減少していた。また Pael-R Tg マウスではメタアンフェタミンによる DA 放出が増強しており、これに一致して運動過剰となった。オープンフィールドテストによる行動学的解析では Pael-R Tg マウスは hyperactive、Pael-R KO マウスは hypoactive となった。さらにドーパミン神経毒に対する反応を調べると、Pael-R Tg マウスは 6-OHDA に対してより脆弱になり、Pael-R KO マウスは MPTP に対してより抵抗性となった。マウス線条体スライス標本の電気生理学的解析では、Paired Pulse Stimulation による Paired Pulse Ratio (PPR) および低頻度繰り返し刺激による IPSC 振幅が Pael-R KO マウスで、特異的なドーパミン再取り込み阻害剤である nomifensine 投与、非投与下双方で減少していた。

Pael-R 複合体の解析では、免疫沈降実験により、既報告のあった DAT に加え、NET も Pael-R と結合することが明らかとなった。また、Pael-R 同様に DAT、NET が Parkin と結合することも明らかとなった。*in vitro ubiquitination assay* の結果から Parkin がユビキチンの 48 番目のリジン残基 (K48)

を介した DAT、NET のポリユビキチン鎖付加を促進することが明らかとなった。さらに、外在性 Parkin の非存在下に比べ、Parkin の過剰発現下では DAT、NET の 1% Triton X-100 不溶性分画が明らかに減少し、MG-132 処理によってほぼ完全な回復を示したことから、Parkin を介した DAT、NET の UPS による分解が示唆された。

Pael-R を過剰発現した ATF6 $\alpha$ -KO の MEF では、野生型の MEF に比べて、ミスフォールド型に相当する不溶性 Pael-R の蓄積が著しく認められた。さらに Pael-R を過剰発現した ATF6 $\alpha$ -KO では、野生型に比べて有意に細胞死が増悪していたが、その差は顕著なものではなかった。

ATF6 $\alpha$  のドーパミン神経での役割を探るため、脳内各部位での小胞体シャペロンを測定したところ、代表的な小胞体シャペロンである BiP の発現が脳幹、中脳、線条体において有意に低下していた。他の小胞体シャペロン GRP94、コシャペロン p58IPK、Derlin-3 も中脳において有意に低下しており、ATF6 $\alpha$  が黒質線条体経路において特に重要な役割を果たしていることが示唆された。しかし、黒質ドーパミン神経細胞数は野生型と変わりなく、チロシン水酸化酵素 (TH) およびドーパミントランスポーターのレベルにも変化はなかった。MPTP を野生型マウスに投与したところ、中脳で ATF6 $\alpha$  の前駆体と切断された活性化型がともに発現上昇し、その下流に位置する小胞体シャペロンの BiP と GRP94、ERAD 因子である Derlin-3 の発現上昇が見られた。また酸化ストレスで活性化される p38MAPK もリン酸化され、活性化しているのが認められた。そこで ATF6 $\alpha$ -KO マウスと野生型マウスをともに MPTP で処理したところ、ATF6 $\alpha$ -KO マウスでは線条体で多くのユビキチン陽性の封入体形成が観察された。また線条体の TH レベルおよび HPLC で測定したドーパおよび DOPAC のレベルが低下しており、ドーパミン作動性神経終末の減少が示唆された。黒質ドーパミン神経細胞数も ATF6 $\alpha$ -KO マウスで有意に減少しており、ATF6 $\alpha$  が MPTP 毒性に対して防御的に働いていることが判明した。

## D. 考察

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

トランスポーターの膜表面への発現を阻害する Pael-R が Parkin の基質であり、成熟型のトランスポーターの膜表面における発現を阻害する未成熟なトランスポーターもまた Parkin の基質であること、さらに Pael-R と結合するのは未成熟なトランスポーターであることを踏まえると、Parkin の機能低下・欠損により DAT、NET の膜表面への発現が減少し、結果として代謝変化が起こるというのは十分、検証するに値すると思われる。これは Pael-R の生理機能を明らかにすることにもつながり、Pael-R の蓄積を中心とした AR-JP におけるカテコールアミン作動性ニューロン特異的な変性の根底にあるメカニズムの解明のためにも、今後は是非検討していきたい点である。

Pael-R の過剰発現による細胞死が ATF6 $\alpha$  欠損細胞で増強されることから、ATF6 $\alpha$  が小胞体ストレスに対して細胞保護的に作用していることが示され

た。しかし野生型との差は非常に顕著なものではなかったのは、ATF6 $\alpha$ が単に小胞体ストレスに拮抗するだけでなく、小胞体ストレス誘発性神経細胞死を促進する作用があるからかもしれない。

また、ATF6 $\alpha$ -KO マウスが MPTP 毒性に対して脆弱になっていたことから、MPTP 毒性に対して ATF6 $\alpha$ が防御的に働くことが示された。これまで In vitro では p38MAPK が ATF6 $\alpha$ の活性化型をリン酸化し、転写活性を増強することが示されている。このような機序が MPTP 誘発性パーキンソン病モデルマウスでも働いているかどうか、検討中である。

## E. 結論

1) Pael-R KO マウスと Pael-R Tg マウスの解析により、Pael-R はドーパミン代謝に関与していると考えられた。

2) Pael-R は未成熟型の DAT、NET と結合し、Parkin はこれら Pael-R 複合体構成タンパク質の少なくとも一部を基質とし UPS による分解を促進している可能性が示唆された。

3) 小胞体ストレスセンサーである Pael-R 過剰発現による神経毒性を緩和する。また、MPTP による実験的パーキンソンニズムにおいて小胞体ストレス応答が惹起され、ATF6 $\alpha$  は細胞保護的に働く。

## F. 研究発表

### 1. 論文発表

(書籍)

Inoue H, Kondo T, Lin L, Mi S, Isacson O, Takahashi R (2008) Protein Misfolding and Axonal Protection in Neurodegenerative, "Disease Protein Folding and Misfolding: Neurodegenerative Diseases" Ovadi J and Orosz F, Springer, Hungary, 97-109

(雑誌)

Yamashita H, Kawamata J, Okawa K, Kanki R, Nakamizo T, Hatayama T, Yamanaka K, Takahashi R, Shimohama S. (2007) Heat-shock protein 105 interacts with and suppresses aggregation of mutant Cu/Zn superoxide dismutase; clues to a possible strategy for treating ALS. *J. Neurochem.* 102(5):1497-505

Murakami T, Moriwaki Y, Kawarabayashi T, Nagai M, Ohta Y, Deguchi K, Kurata T, Takehisa Y, Matsubara E, Ikeda M, Harigaya Y, Shoji M, Takahashi R, Abe K. (2007) PINK1, a gene product of PARK6,

accumulates in {alpha}-synucleinopathy brains. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 78:653-4.

Wang H, Imai Y, Kataoka A, Takahashi R (2007) Cell type-specific upregulation of parkin in response to ER stress. *Antioxid. Redox Signal.* 9:533-42.

Kitaguchi H, Ihara M, Saiki H, Takahashi R, Tomimoto H (2007) Capillary beds are decreased in Alzheimer's disease, but not in Binswanger's disease. *Neurosci Lett.* 417:128-31.

Igaki T, Suzuki Y, Tokushige N, Aonuma H, Takahashi R, Miura M (2007) Evolution of mitochondrial cell death pathway: Proapoptotic role of HtrA2/Omi in Drosophila. *Biochem Biophys Res Commun.* 356:993-7.

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

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

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

Moriwaki Y, Kim Y J, Ido Y, Misawa H, Kawashima K, Endo S, Takahashi R (2008) L347P PINK1 mutant that fails to bind to Hsp90/cdc37 chaperones is rapidly degraded in a proteasome-dependant manner. *Neurosci. Res.* 61, 43-8

Ogawa M, Mizuguchi K, Ishiguro A, Koyabu Y, Imai Y, Takahashi R, Mikoshina K, Aruga J (2008) Rines/RNF180, a novel RING finger gene-encoded product, is a membrane-bound ubiquitin ligase. *Gene Cells.* 13, 397-409

Imai Y, Gehrke S, Wang H Q, Takahashi R, Hasegawa K, Oota E, Lu B (2008) Phosphorylation of 4E-BP by LRRK2 affects the maintenance of dopaminergic neurons in Drosophila. *EMBO J.* 27, 2432-43.

Wang H Q., Imai Y, Inoue H, Kataoka A, Iita S,

- Nukina N, Takahashi R (2008) Pael-R transgenic mice crossed with parkin deficient mice displayed progressive and selective catecholaminergic neuronal loss. *J. Neurochem.* 107, 171-85.
- Fujiwara M, Marusawa H, Wang H Q, Iwai A, Ikeuchi K, Imai Y, Kataoka A, Nukina N, Takahashi R, Chiba T. (2008) Parkin as a tumor suppressor gene for hepatocellular carcinoma. *Oncogene* 27, 6002-11.
- Kawamoto Y, Kobayashi Y, Suzuki Y, Inoue H, Tomimoto H, Akiguchi I, Budka H, Martins L M, Downward J, Takahashi R (2008) Accumulation of Htra2/Omi in neuronal and glial inclusions in brains with alpha-synucleinopathies. *J. Neuropathol Exp Neurol.* 67, 984-93.
- 村上 学、井上治久、高橋良輔 (2009) : 筋萎縮性側索硬化症(ALS)の治療戦略、ファルマシア、45 : 1009-1112
- 高橋良輔 (2009) : パーキンソン病の神経細胞移植治療、日本医事新報、4445 : 79-80
- Takahashi R. (2009) Edaravone in ALS. (commentary) *Exp Neurol.* 217:235-6
- Takeuchi H, Yanagida T, Inden M, Takata K, Kitamura Y, Yamakawa K, Sawada H, Izumi Y, Yamamoto N, Kihara T, Uemura K, Inoue H, Taniguchi T, Akaike A, Takahashi R, Shimohama S (2009) Nicotinic receptor stimulation protects nigral dopaminergic neurons in rotenone-induced Parkinson's disease models. *J Neurosci Res.* 87:576-85.
- Uemura K, Lill CM, Banks M, Asada M, Aoyagi N, Ando K, Kubota M, Kihara T, Nishimoto T, Sugimoto H, Takahashi R, Hyman BT, Shimohama S, Berezovska O, Kinoshita A. (2009) N-cadherin-based adhesion enhances Abeta release and decreases Abeta42/40 ratio. *J. Neurochem.* 108(2): 350-60.
- Kondo T, Inoue H, Usui T, Mimori T, Tomimoto H, Vernino S, Takahashi R (2009) Autoimmune autonomic ganglionopathy with Sjögren's syndrome: significance of ganglionic acetylcholine receptor antibody and therapeutic approach. *Auton Neurosci.* 146:33-5.
- Sawada H, Oeda T, Yamamoto K, Kitagawa N, Mizuta E, Hosokawa R, Ohba M, Nishio R, Yamakawa K, Takeuchi H, Shimohama S, Takahashi R, Kawamura T (2009) Diagnostic accuracy of cardiac metaiodobenzylguanidine scintigraphy in Parkinson disease. *Eur J Neurol.* 16:174-82.
- Ikeda A, Hirasawa K, Kinoshita M, Hitomi T, Matsumoto R, Mitsueda T, Taki JY, Inouch M, Mikuni N, Hori T, Fukuyama H, Hashimoto N, Shibasaki H, Takahashi R (2009) Negative motor seizure arising from the negative motor area: is it ictal apraxia? *Epilepsia* 50:2072-84.
- Okamoto Y, Ihara M, Fujita Y, Ito H, Takahashi R, Tomimoto H (2009) Cortical microinfarcts in Alzheimer's disease and subcortical vascular dementia. *Neuroreport* 20:990-6.
- Ikeuchi K, Marusawa H, Fujiwara M, Matsumoto Y, Endo Y, Watanabe T, Iwai A, Sakai Y, Takahashi R, Chiba T (2009) Attenuation of proteolysis-mediated cyclin E regulation by alternatively spliced Parkin in human colorectal cancers. *Int J Cancer* 125: 2029-35.
- Kitaguchi H, Tomimoto H, Ihara M, Shibata M, Uemura K, Kalaria RN, Kihara T, Asada-Utsugi M, Kinoshita A, Takahashi R (2009) Chronic cerebral hypoperfusion accelerates amyloid beta deposition in APPSwInd transgenic mice. *Brain Res.* 1294:202-10.
- Kobayashi K, Okamoto Y, Inoue H, Usui T, Ihara M, Kawamata J, Miki Y, Mimori T, Tomimoto H, Takahashi R (2009) Leukoencephalopathy with cognitive impairment following tocilizumab for the treatment of rheumatoid arthritis (RA). *Intern Med.* 48:1307-9.
- Matsui H, Taniguchi Y, Inoue H, Uemura K, Takeda S, Takahashi R (2009) A chemical neurotoxin, MPTP induces Parkinson's disease like phenotype, movement disorders and persistent loss of dopamine neurons in medaka fish. *Neurosci Res.* 65:263-71.
- Kawamata J, Ikeda A, Fujita Y, Usui K, Shimohama S, Takahashi R. (2009) Mutations in LGI1 gene in Japanese families with autosomal dominant lateral temporal lobe epilepsy: The first report from Asian families. *Epilepsia.* 2009 Sep 22. [Epub ahead of print]
- Usui K, Ikeda A, Nagamine T, Matsubayashi J, Matsumoto R, Hiraumi H, Kawamata J, Matsuhashi M, Takahashi R, Fukuyama H. (2009) Abnormal auditory cortex with giant N100m signal in patients with autosomal dominant lateral temporal lobe epilepsy. *Clin Neurophysiol.* 120: 1923-6.
- Uyama N, Uchihara T, Mochizuki Y, Nakamura A, Takahashi R, Mizutani T. (2009) Selective nuclear shrinkage of oligodendrocytes lacking glial cytoplasmic inclusions in multiple system atrophy: a 3-dimensional volumetric study. *J*

Neuropathol Exp Neurol. 68:1084-91.

Yamakawa K, Izumi Y, Takeuchi H, Yamamoto N, Kume T, Akaike A, Takahashi R, Shimohama S, Sawada H. (2009) Dopamine facilitates alpha-synuclein oligomerization in human neuroblastoma SH-SY5Y cells. *Biochem Biophys Res Commun*. 2009 Nov 11. [Epub ahead of print]

Matsui H, Taniguchi Y, Inoue H, Kobayashi Y, Sakaki Y, Toyoda A, Uemura K, Kobayashi D, Takeda S, Takahashi R (2010) Loss of PINK1 in medaka fish (*Oryzias latipes*) causes late-onset decrease in spontaneous movement. *Neurosci Res*. 66:151-61.

Aoyagi N, Uemura K, Kuzuya A, Kihara T, Kawamata J, Shimohama S, Kinoshita A, Takahashi R (2010) PI3K inhibition causes the accumulation of ubiquitinated presenilin 1 without affecting the proteasome activity. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 391:1240-5.

Kawamoto Y, Ito H, Kobayashi, Y., Suzuki, Y., Ihara M, Kawamata J, Akiguchi I, Fujimura H, Sakoda S, Kusaka H, Hirano A, Takahashi R (2010) HtrA2/Omi-immunoreactive intraneuronal inclusions in the anterior horn from patients with sporadic and SOD1 mutant amyotrophic lateral sclerosis. *Neuropath. Appl. Neurobiol.* in press.

## 2. 学会発表

Wang H Q, Imai Y, Inoue H, Kataoka A, Iita S, Nukina N, Takahashi R: PAEL-R Transgenic mouse crossed with parkin deficient mouse displays persistent endoplasmic reticulum stress, reduction in mitochondrial complex I activity and selective dopaminergic neuronal death. FASEB Summer Research Conferences, Indian Wells, U. S. A. (2007. 7. 28-8. 2)

Takahashi R: The molecular mechanisms underlying parkin-related parkinsonism. Croucher Advanced Study Institute -Innovative therapies of movement disorders; basic and clinical sciences-Hong Kong, China (2007. 11. 28)

高橋良輔: 家族性パーキンソン病を起こす原因蛋白は相互に作用しあうか? 第一回Movement Disorder Society, Japan 学術集会、東京 (2007. 10. 5)

高橋良輔: 家族性パーキンソン病の分子メカニズム。第397回難研セミナー、東京 (2007. 10. 25)

高橋良輔: パーキンソン病はどこまでわかったか? 日本学術会議シンポジウム「脳と高齢者社会」、東京 (2007. 11. 26)

高橋良輔: 品質管理病としてのパーキンソン病。臨

床ストレス応答学会、福岡 (2007. 11. 30)

高橋良輔: 家族性パーキンソン病と小胞体ストレス。BMB2007、横浜 (2007. 12. 13)

高橋良輔: 「神経変性疾患のプロテオミクス」プロテオミクス講演会、岡崎 (2008. 1. 13)

高橋良輔: パーキンソン病の分子機構-最近の知見。第16回日本神経学会近畿地区生涯教育講演会、京都 (2008. 2. 11)

高橋良輔: 神経変性疾患のサイエンス-現状と今後の展望-、第120回日本神経学会東北北陸地方会ランチョンセミナー、名古屋 (2008. 3. 8.)

高橋良輔: はじめに-神経変性疾患研究の課題、第49回日本神経学会総会シンポジウム「神経変性疾患研究の焦点-新たな病的因子の登場と臨床への展望」、横浜 (2008. 5. 16)

北口浩史、富本秀和、猪原匡史、植村健吾、木原武士、浅田めぐみ、木下彩栄、高橋良輔: 慢性脳虚血はAβ沈着を促進する、第49回日本神経学会総会、横浜 (2008. 5. 15)

河本恭裕、小林芳人、高橋良輔、秋口一郎: alpha-synuclein 関連疾患脳内の封入体におけるOmi/HtrA2の蓄積第49回日本神経学会総会、横浜 (2008. 5. 15)

井上治久、高橋良輔: パーキンソン病における治療標的としての軸索再生、Neuroscience2008、シンポジウム「中枢神経系疾患に於ける軸索再生/変性のメカニズム」、東京 (2008. 7. 9)

高橋良輔: AANとMDSの取り組み、第2回Movement Disorder Society, Japan 学術集会、オープニングセミナー「パーキンソン病治療ガイドラインupdate」、京都 (2008. 10. 2)

近藤孝之、井上治久、富本秀和、高橋良輔: 自律神経障害の新たな疾患概念; Autoimmune Autonomic Ganglionopathy、第61回日本自律神経学会総会、シンポジウム「自律神経学における最近のトピックス」、横浜 (2008. 11. 7)

Ryosuke Takahashi: The molecular mechanisms underlying parkin-related parkinsonism, BMB2008、シンポジウム「神経変性疾患関連遺伝子探索と機能解析」、神戸 (2008. 12. 11)

高橋良輔: 孤発性パーキンソン病の病因: 環境要因とリスク遺伝子。第50回日本神経学会総会、仙台 (2009. 5. 22)

高橋良輔: パーキンソン病の最新の治療と展望。平成21年度日本内科学会生涯教育講演会、仙台 (2009. 9. 6)

高橋良輔：家族性パーキンソン病の分子メカニズムー神経保護治療に向けてーシンポジウム神経変性疾患の分子標的治療への新たな展開」、第 32 回日本神経科学学会、名古屋（2009. 9. 18）

#### G. 知的財産権の出願・登録状況

##### 1. 特許取得

なし

##### 2. 実用新案登録

なし

##### 3. その他

なし

厚生労働科学研究費補助金（こころの健康科学研究事業）

パーキン蛋白の機能解析と治療法の開発

分担研究報告書

ミクログリアの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

分担研究者 澤田 誠 名古屋大学教授

研究要旨

培養ミクログリアに外来遺伝子を導入して毒性転換させるモデルと脳に人為的に損傷を誘導したときの *in vivo* のミクログリアの変化を新たに創出した単一細胞解析システムで検証した。2) 薬物パーキンソン病モデルなど脳に人為的に損傷を誘導したときの *in vivo* のミクログリアの変化を生体でイメージングにより検出した。3) パーキンソン病の病態形成の各段階におけるミクログリアのサブタイプの役割のちがいを調べる事により発症や病態形成におけるミクログリアの関与を示した。

A. 研究目的

脳に器質性および機能性の障害が生じたときにミクログリアは活性化され様々な生体応答を生じる。このとき、ミクログリアの活性化には2相性があり、脳内細胞を保護するような活性化とダメージを受けた細胞を積極的に排除するような活性化の両者が見られる。これまでの研究から、ミクログリアの活性化には2段階のステップ、軽度な活性化では神経保護的な作用を示すミクログリアが、何らかの因子の作用を受けて神経毒性を持つようになると考えている。本研究では、

- 1) 培養ミクログリアに外来遺伝子を導入して毒性転換させるモデルと脳に人

為的に損傷を誘導したときの *in vivo* のミクログリアの変化を新たに創出した単一細胞解析システムで検証する

- 2) 薬物パーキンソン病モデルなど脳に人為的に損傷を誘導したときの *in vivo* のミクログリアの変化を生体でイメージングにより検出すること
- 3) パーキンソン病の病態形成の各段階におけるミクログリアのサブタイプの役割のちがいを調べる事により発症や病態形成におけるミクログリアの関与を明らかにすることを目的に行った。

HIV が中枢神経系に感染すると神経細胞死や神経機能障害を誘発し痴呆が生じる



ことが知られている。このとき生じる生物反応はパーキンソン病などの神経変性疾患が発症する場合にも共通性がみられると考えられている。ミクログリアはこのときに中心的な役割を果たすと考えられているが、その詳細や実体は明らかでない。最近我々は、本来神経保護的に働くミクログリアに HIV 由来 nef 遺伝子を導入することによって神経障害性の活性酸素を産生ようになること (J Biol. Chem. 277:42136-43, 2002) を見いだした。多くの神経変性疾患の場合、脳実質内で産生される活性酸素により神経障害が生じることから、nef 遺伝子導入によるミクログリアの形質転換が神経変性の引き金となっている可能性が強く考えられる。そこで、nef 遺伝子導入によるミクログリアの毒性転換の性質と nef 遺伝子産物の細胞内での作用点である細胞内因子を特定することを目的とし、nef 導入ミクログリアと非導入ミクログリアおよび変異型 nef 導入ミクログリアに於いてそのタンパク質発現を解析し、毒性転換に関与するシグナル調節タンパク質について SST-REX 法により同定することを目的とした。さらに、毒性転換したミクログリアが及ぼす細胞毒性について最近注目されているオートファジー細胞死が誘導されるか否かの検討も行った。

次に、毒性転換したミクログリアを特異的にイメージング検出する方法について検討した。ミクログリアは様々な生理的な刺激により、活性化される。しかし、

軽度な活性化においては、ミクログリアは神経保護的因子、及び神経栄養因子などを放出し、神経保護的に働くと考えている。その時、さらに神経変性疾患の病因になるような、例えばアルツハイマー病の場合 A $\beta$ 、パーキンソン病の場合  $\alpha$ シヌクレインのような蛋白、またはウイルス、及び炎症性細胞などにより、2段階に活性化されると、ミクログリアは toxic change すると考えている。したがって、様々な中枢神経疾患の診断技術や治療法を開発する上で、ミクログリアの性質を把握する事は不可欠であり、さらにサブタイプによる活性化の相違や、2段階 toxic change という新しい見解を考慮する事が重要であると考ええる。また、傷害性と保護的なミクログリアが in vivo で非侵襲的に区別できると病態形成の初期段階の検出だけでなく重症度や予後の予測までできると考えられる。

このような中、活性化したミクログリアにはいくつかの特徴的な変化があり、そのうちのひとつとして末梢性ベンゾジアゼピン受容体 (peripheral benzodiazepine receptor:以下 PBR と略する) へのリガンドの結合性の変化が病変部に関連したミクログリアの活性化状態と密接に関連している可能性が示唆されている。特に PBR リガンドのうち脳移行性がありポジロン標識体が容易に合成できる PK11195 を用いて活性化ミクログリアと PBR 信号の関連について研究されてきた。しかし、PK11195 は結合の特異性が低

いためバックグラウンドシグナルが強く、その信号がミクログリアの変化に由来しているか否か、その生物学的意義などについては十分な検討がなされていない。

そこで本年度の研究では活性化ミクログリアの性質を *in vivo* イメージングで峻別するためにトロント大学の Alan A. Wilson 博士が合成したリガンドで親和性が PK11195 の 18 倍以上高い FEPPA (N-(2-(2-fluoroethoxy)benzyl)-n-(4-phenoxy)pyridin-3-yl)) を用いて片側 6-OHDA 投与パーキンソンモデルラットにおけるミクログリアの活性化について検討した。

本研究の最終年度においてはミクログリアの脳保護作用について検討を行った。アルツハイマー病やパーキンソン病などの神経変性を伴う疾患だけでなく、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見られることが報告されている。脳全体に広汎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持つようになるため、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見える。さらに、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が付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。このような視点から本研究ではミクログリアの毒性転換のメカニズムについて研究を行い、パーキンソン病発症や病態形成との関係について検討を行ってきた。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限局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。

## B. 研究方法

ミクログリア遺伝子発現のプロファイル解析：保護的作用を持つミクログリア細胞株と毒性転換した細胞株から total RNA を回収し PROGENEX 法および body mapping 法により発現遺伝子のプロファイリング解析を行った。

SST-REX 法による膜タンパク質発現クローンの作成：保護的作用を持つミクログリア細胞株から回収した mRNA を pMX-SST (レトロウイルスベクター-pMX にトロポポエチン受容体の部分長(MPL)を導入したもの) に組み込み、IL-3 依存的に増殖する性質を持つ BaF/3 細胞に導入して

MPL と融合したタンパク質を発現する細胞（膜タンパク質が組み込まれたクローン）を限界希釈法によりクローン化して目的クローンを FACS により同定した。

高次構造を保持した膜タンパク質の Cell Immunization 法による抗体作成と機能調節抗体のスクリーニング：FACS により同定した TREM2b 発現の SST クローンをマウスに免疫し、モノクローナル抗体候補を取得した。抗体のクローンについて活性化したミクログリア細胞に添加し、iNOS 遺伝子の誘導を指標にしてミクログリアに対する機能調節抗体のスクリーニングを行った。

cell viability assay, Ds Red 発現マウスグリオーマ細胞 (GL261) とマウスミクログリア株化細胞を 96 well plate に播種し、共培養の後、蛍光強度を測定した。

Analysis of apoptosis, Ds Red 発現マウスグリオーマ細胞 (GL261) とマウスミクログリア株化細胞を chamber slide に播種し、ヘキスト核染色、TUNEL 染色を行った。

Analysis of autophagy, オートファジーは飢餓時の細胞応答であり、自己細胞質構成成分の分解である。その際、細胞質成分がオートファゴソームと呼ばれる二重膜構造体で包み込まれ、それがライソソームと融合して分解が進むことが特徴である。まず、ライソソーム、オートライソソームなど AVO (acidic vesicular organelles) の誘導を、アクリジンオレン

ジ染色を行い、FACS で定量的に解析した。LC3 蛋白はオートファゴソームの膜構成蛋白であり、オートファジーの誘導に伴い、細胞質からオートファゴソームに動員される。その際、LC3- I (18K) から LC3- II (16K) にプロセスされる。この性質を用い、GFP-LC3 融合蛋白発現ベクターを悪性脳腫瘍細胞に遺伝子導入して GFP の動態を経時的に観察し、また、western blotting により LC3- I (18K) および LC3- II (16K) の定量的な解析を行った。

動物モデルの作製：生後 9 週・体重 280 ~ 300g の雄 Wistar ラット (日本チャールス・リバー) を用い、ペントバルビツール麻酔 (50mg/kg) で全身麻酔を行った。脳定位固定装置 (ナリシゲ) にて頭部を固定後、頭部皮膚を切開して頭蓋骨を露出した。Bregma (冠状縫合および矢状縫合の会合部にあたる頭蓋上の点) から anterior = 0.4mm、lateral = 3mm、ventral = 4.5mm の位置に骨削ドリルで頭蓋骨に穴を開け、10  $\mu$ l Hamilton シリンジで右側線条体に 6-hydroxydopamine を注入し傷害を作製した。

MRI の撮像：パーキンソン病モデルラット作製後、以前に我々が報告した方法 (*Ann. Nucl. Med.* 22, 417-424, 2008) に基づき、定量的な撮像法で位置を決定し、ラット線条体の傷害の程度や血液脳関門崩壊の有無を T1 強調像、T2 強調像、Gd-DTPA 造影 T1 強調像で評価した。使用した MRI 装置は、臨床用に用いている SIGNA INFINITY EXCITE (1.5 テスラ、GE

Healthcare, USA) と手首用コイル (Q-WRIST : GE Healthcare, USA) を使用した。

PET の撮像 : Sakiyama ら (*Ann. Nucl. Med.* 21. 447-453, 2007) および我々が報告した方法 (*Ann. Nucl. Med.* 22. 417-424, 2008) を用いて、抱水クロラル (300mg/kg) 腹腔内麻酔下において、ラットの頭部をアクリル製脳定位固定装置 (浜松ホトニクス) に固定した。尾静脈から抱水クロラル持続注入 (100mg/kg/時間) した全身麻酔下において、 $[^{11}\text{C}]$ PK11195 もしくは  $[^{18}\text{F}]$ FEPPA もしくは  $[^{11}\text{C}]$ raclopride (中枢性ドーパミン D2 受容体リガンド; 線条体の位置同定のため) を 39~64Mbq ボーラス静注直後 60 分間経時的 (1min/frame) に撮像した。撮像中は体温低下を防ぐため、ヒートマット上にラットを置き、その直腸温が  $37.0 \pm 0.5$  を維持できる様に体温調節を行った。このとき、使用した PET 装置は、SHR-2000 (浜松ホトニクス : 空間分解能 : 3.5mm FWHM) である。

PET のデータ解析 : 以前に我々が報告した方法 (*Ann. Nucl. Med.* 22. 417-424, 2008) を用いて PET 画像の解析を行った。最初に  $[^{11}\text{C}]$ raclopride の PET 画像から定位的に決定した両側線条体の断面上に関心領域 (regions of interest : 以下 ROI と略す) を設定し、その ROI を元に  $[^{11}\text{C}]$ PK11195 もしくは  $[^{18}\text{F}]$ FEPPA の PET 画像上に定位的に両側線条体上に ROI を設定した。PBR の結合量の評価は、以下の理論に基づい

て、左右線条体の時間一放射能曲線 (time activity curve: TAC) 下面積 (area under the curve: 以下 AUC と略す) の左右比を用いた。脳内分布容積 (distribution volume: 以下  $V$  とする) は、以下のように定義される (*J. Cereb. Blood Flow Metab.* 12. 709-716, 1992)。

$$V = \frac{\int_0^{\infty} ROI dt}{\int_0^{\infty} Plasma dt}$$

撮像開始 0 分から無限大までのリガンドの TAC の AUC と plasma の TAC の AUC の比であるが、今回の検討では、スキャン時間が 60 分間であることから、0 分から 60 分後までの積分値 ( $V_{60}$ ) から  $V$  を推定した。薬物処理を行った右線条体 (right striatum: 以下 RST と略する) に対する非処理側の左線条体 (left striatum: 以下 LST と略する) の  $V_{60}$  の比は、 $V_{60}(\text{RST}) / V_{60}(\text{LST}) = (\text{RST AUC}/\text{plasma AUC}) / (\text{LST AUC}/\text{plasma AUC}) = \text{RST AUC}/\text{LST AUC}$  となり、動脈採血を省略した定量法として評価した。

免疫組織学的評 : PET 撮像後、ラットをペントバルビタール腹腔内投与 (50mg/kg) による麻酔下において、0.01M PBS (pH7.4) で経心灌流を行った後、脳組織を摘出した。摘出した新鮮組織は 0. C. T コンパウンド剤に入れて封入急速冷凍した後、クリオスタットで厚さ  $10 \mu\text{m}$  の切片を作製し、ゼラチンコートしたスライドグラスに張り付けた。脳切片を 4 % para-