

「精神・神経疾患の分子病態理解に基づく診断・治療へ向けた
新技術の創出」

平成 19 年度採択研究代表者

平成 20 年度
実績報告

高橋 良輔

京都大学大学院医学研究科・教授

パーキンソン病遺伝子ネットワーク解明と新規治療戦略

1. 研究実施の概要

初年度に構築した共同研究体制により、本年度はパーキンソン病の多様なモデル系の構築が円滑に進捗し、解析結果も出始めた。高橋グループは家族性パーキンソン病モデルとしての Parkin ノックアウト(KO)/Pael-Rトランスジェニック(Tg)マウス、alpha-synuclein Tg マウスに加え、ATF6KO マウス、MPTP メダカモデルの作製と解析を行った。武田グループは parkin、PINK1、ATP13A2 欠損メダカ系統、parkin/Siah1/Siah2 遺伝子3重欠損ニワトリ細胞を作製した。森グループは ATF6 α 、PERK 欠損メダカを作製し、ATF6 α が小胞体シャペロンの制御に中心的役割を果たすことを示唆する結果を得た。服部グループは parkin 欠損マウスのドーパミン放出減弱とドーパミントランスポーター活性亢進を見出し、DJ-1 もドーパミン放出に關与する知見を得た。Parkin によるユビキチン化の基質として新たに PDCD-2 を同定した。また、変異型 ATP13A2 は野生型のようにリソソームに移行せず小胞体に停滞することが細胞死に繋がる可能性を示した。木下グループは神経変性疾患の新たなモデルとして tauP301STg/Sept4KO マウス系統の作製を完了し、解析を開始した。堀グループは小胞体ストレス制御化合物として同定したメトキシフラボン的一种タンゲレチンによる神経保護効果をパーキンソン病マウスモデル(MPTP 投与)で確認した。

2. 研究実施内容(文中にある参照番号は 4.(1)に対応する)

A. 高橋グループ

1. 平成 19 年度の成果発表について

平成 19 年度の成果として、PINK1 の結合因子として Hsp90 及び Cdc37 を同定し、それらが PINK1 の蛋白質としての安定性を強化しており、Hsp90 及び Cdc37 と結合できなくなる PINK1 の変異蛋白質の分解が速くなることを示した論文を発表した(1、以下括弧内は文献番号)。また理研脳センターの有賀純チームとの共同研究で、Parkin と類似した機能を有することが予想される小胞体の膜結合型ユビキチンリガーゼで、脳に発現する Rines/RNF180

の同定と機能解析に関する論文を発表した(2)。

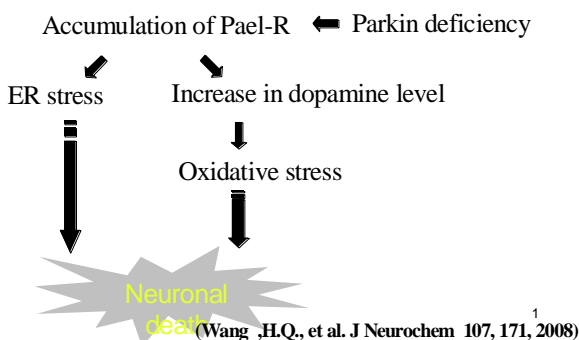
2. PARK8 原因遺伝子 LRRK2 の機能解析

常染色体優性家族性パーキンソン病 PARK8 はプロテインキナーゼと予想される LRRK2 の遺伝子変異を原因とする。LRRK2 の生理的機能は未解明であるが、PARK8 でみられる変異型 LRRK2 は酵素活性が亢進していることが示されている。今年度は東北大学加齢研・今居譲准教授グループとの共同研究で、ヒトおよびショウジョウバエの LRRK2 が共に哺乳類翻訳開始因子 eIF4E を介する翻訳開始を負に制御する、様々なストレス反応の鍵となる因子である 4E-BP をリン酸化することを見出した。LRRK2 による eIF4E/4E-BP 経路の修飾は in vivo でも in vitro でも eIF4E を介する翻訳開始を促進するにもかかわらず、ショウジョウバエにおいてはドーパミン神経の生存率と酸化ストレスへの抵抗性を低下させた。これらの結果は PARK8 関連変異 LRRK2 による 4E-BP の慢性的な不活化がタンパク翻訳制御を混乱させ、結果的に年齢依存的なドーパミン神経細胞死が生じることを示唆する (3)。

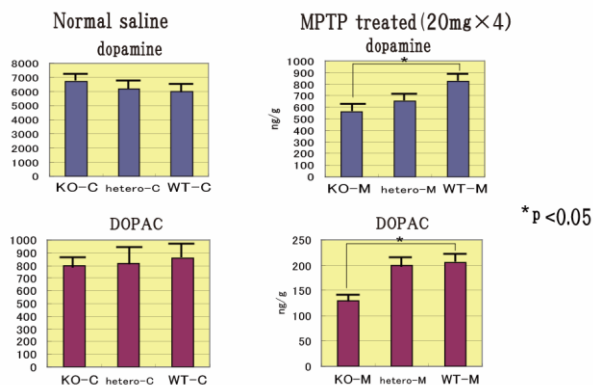
3. Parkin ノックアウト(ko)マウス/Pael-R トランスジェニック(tg)マウスのかけあわせによる家族性パーキンソン病 (PARK2) モデルの作製と解析

家族性パーキンソン病 PARK2 はユビキチンリガーゼ Parkin が欠損することにより、parkin の基質蛋白質が蓄積して発症すると考えられる。我々が見出した Parkin の基質、Pael-R の蓄積で PARK2 類似の病態が再現できるかどうかを調べるため、Parkin ノックアウト(ko)マウスと Pael-R トランスジェニック(tg)マウスのかけあわせを行った。Parkin を欠損させると、Pael-R の蓄積が加速され、ホモ接合対の tg マウスと Parkin-ko マウスの二重変異マウスは2年間で40%の黒質ドーパミン神経細胞死および青斑核ノルアドレナリン神経細胞死が起こる慢性進行性のカテコールアミン選択的神経変性モデルとなった。ドーパミン神経選択的細胞死の機序にはミスフォールド化 Pael-R の蓄積による小胞体ストレスと、Pael-R の機能増強でドーパミン産生が高まることに起因する酸化ストレスの両者が関与していることが示唆された(4)。

The cell death mechanisms underlying Pael-R Tg/Parkin KO mice



Dopamine and DOPAC levels were more decreased in the striatum of MPTP treated ATF6 α KO mice than in WT



4. MPTP 誘起性パーキンソニズムへの小胞体ストレスの関与に関する研究

小胞体ストレスセンサーの ATF6 を欠損するマウス (ATF6-ko マウス) は小胞体ストレスに脆弱である。ドーパミン神経毒として知られ、複合体 I の阻害作用を有する MPTP はマ

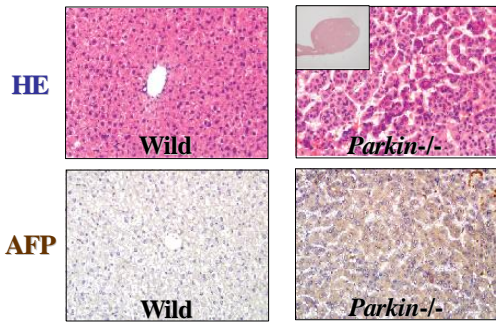
ウスで小胞体ストレス応答を引き起こし、ATF6^{-/-}マウスでは、ドーパミン細胞死を増強させた。このことより MPTP によるドーパミン神経細胞死にも小胞体ストレスが関与していることが明らかになった。(2008年7月、Neuroscience2008にて発表)

5. 癌抑制遺伝子としての Parkin の解析

Parkin は染色体上の位置から tumor suppressor gene でもある可能性が唆されていたが、我々は Parkin-ko マウスでは肝細胞癌が起りやすいことを見出した (72 週で 33% (n=36)、96 週で 45% (n=45))。マイクロアレイ解析で follistatin が高発現しており、原因の一部と考えられた。ヒトでは癌抑制遺伝子であるという積極的な証拠はないが、神経変性と癌が同一の遺伝子異常によって媒介されるというきわめて興味深い可能性を提示した(5)。

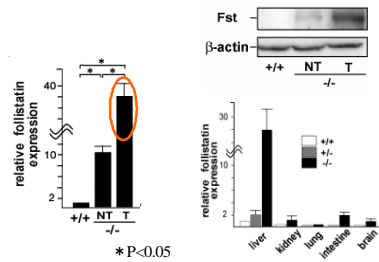
Parkinは癌抑制遺伝子である。

Hepatocellular carcinoma developed in 33% (12/36) and (19/42) 45% of the *parkin*^{-/-} mice at 72 and 96 weeks of age.



(Fujiwara M. et al. Oncogene, 2008)

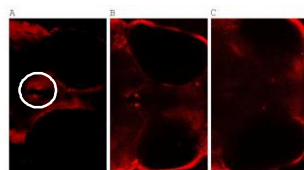
Follistatin (Fst) was upregulated in the livers of *parkin*^{-/-} mice.



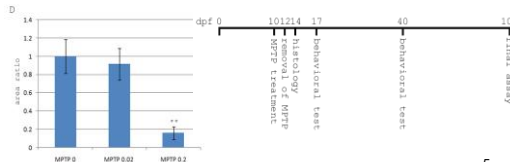
* P<0.05

4

MPTP処理でメダカのTH陽性ニューロンは減少する



The area of TH positive neurons was decreased in MPTP-treated medaka.



**p<0.01 vs 0d and 0.02

5

6. MPTP パーキンソン病メダカモデルの作製と解析

我々は生後 10 日のメダカを MPTP 入りの水に浸すことにより、パーキンソン病モデルの開発を試みた。メダカにおけるドーパミン神経細胞数の定量的計測法をはじめて確立してドーパミン神経選択的細胞死を確認し、メダカにおける MPTP 誘起性パーキンソニズムモデルの作製に成功した(2009年3月生理学研究所研究会にて発表)。

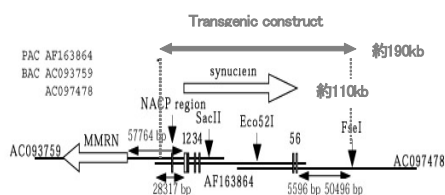
7. PARK4 マウスモデルの作製と解析

最近 PD に特徴的な封入体であるレビー小体の病理は黒質以外にも進展することが広く認識されるようになり、パーキンソン病は全身性の多系統変性疾患と理解されるようになった。我々はレビー小体の病理変化が広汎に及ぶのはその主成分である alpha-synuclein の発現様式に鍵があると考え、alpha-synuclein のゲノムを導入することで alpha-synuclein 本来の発現パターンを踏襲するモデルマウスを作製した。これは孤発性 PD と酷似する alpha-synuclein 遺伝子三重複変異 (PARK4) を模したもので、PARK4 モデルと名づけた。PARK4 モデルではおそらく発現量は不十分であることからレビー小体形成は観察されなかったが、alpha-synuclein の発現は黒質、線条体以外には大脳皮質、嗅球に高い発現がみられ、進行期パーキンソン病のレビー小体の分布と一致する発現パターンが見られた(図参照、2008年11月、北米神経科学年会にて発表)。

PARK4モデルマウス作製方法

Human α -syn 遺伝子110kb に加え、そのflanking regionを含む約190KbのconstructをC57/B6 mouse 受精卵にinjectionし作製した。

この配列には、human α -synのpromoterや遺伝子発現調節領域を含んでいると考えられ、時間的・空間的に α -syn本来のpatternでのhuman α -synの(過剰)発現が期待される。



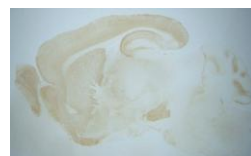
6

α -syn-BAC Tgマウスにおける

human α -syn発現の確認

導入されたhuman α -synは、endogenous mouse α -synと同様の発現patternを認める

抗 α -syn (human) 抗体で染色



Tg (heterozygous, 20ヶ月)



WT

7

B. 武田グループ

1. 遺伝子破壊メダカ

遺伝性パーキンソン病の原因遺伝子である Parkin、PINK1、ATP13A2 を欠失したメダカを作製した。これらのメダカにおいてドーパミン作動性神経細胞が減少した時に、個体としてどのような症状が現われるかは、現在のところ不明である。

魚類を用いたパーキンソン病の研究はまだ開発段階であり、行動や生化学・組織学的評価を行う上でのさまざまなアッセイ系を確立する必要がある。そこで、ドーパミン作動性神経細胞が破壊されている「ポジティブコントロール」メダカを作製する必要が出てきた。この「ポジティブコントロール」を確立するために、二つのアプローチをとっている。一つは、MPTP や 6-OHDA のような神経毒を用いたアプローチであり、もう一つは、TILLING法による遺伝子破壊によるアプローチである。我々は、後者のアプローチを取り、Nurr1 遺伝子破壊メダカの作製を試みた。

Nurr1 は、ヒトの遺伝性パーキンソン病の原因遺伝子としては特定されていない。しかし、この遺伝子を破壊したマウスは、ヘテロ接合体で加齢に伴うドーパミン作動性神経細胞の減少が見られる。したがって、Nurr1 遺伝子が破壊されたメダカは、パーキンソン病モデルの「ポジティブコントロール」としての利用が期待される。我々は、メダカの Nurr1 相同遺伝子をクローニングした。その結果、メダカ Nurr1 遺伝子は、9つのエクソンにより 578 アミノ酸をコードしていることが明らかになった。そのうち、第一エクソンは 870

ヌクレオチドと非常に長く、PCR/シーケンスをして変異をスクリーニングするための解析部位（アンプリコン）に最適であることが明らかになった。

2. ニワトリ DT40 細胞

研究代表者が見つけた E3 ユビキチンリガーゼである Parkin の遺伝子破壊細胞を樹立した。我々は、既に Parkin と構造の似た E3 ユビキチンリガーゼである Siah1、Siah2 の 2 重遺伝子破壊細胞株を樹立していた。マウスでは、この 2 重欠損は胎生致死の原因なるので、Siah1、Siah2 の機能解析は進んでいない。構造の類似性から、Parkin と Siah とのあいだでは、機能的重複があることが予想できる。そこで、Parkin/Siah1/Siah2 の 3 重遺伝子欠損細胞の作製を試み、それに成功した。

小胞体ストレス応答の表現型アッセイを樹立することを目的に、以下の 2 つの実験を実施した。第一に生理的な小胞体ストレスを誘導する実験を樹立する目的で、B リンパ細胞である DT40 をプラズマ細胞に最終分化させることを試みた。プラズマ細胞になると、細胞は大量の抗体を生産・分泌するようになるので、小胞体ストレスが増加する。我々は、既に論文発表された手法に従って、転写因子、Pax5 を遺伝子破壊した。そして、Pax5 欠損によってプラズマ細胞へ最終分化することを確認した。もう 1 つの表現型アッセイは、XBP1 と呼ばれる遺伝子の転写産物の Alternative RNA splicing である。我々は、ヒト細胞と同様に、DT40 細胞では、小胞体ストレス（ツニカマイシン添加）がかかるとすぐに Alternative RNA splicing が起ることを確認できた。

C. 森グループ

小胞体ストレス応答発動タンパク質として、哺乳動物には、ATF6 α 、ATF6 β 、PERK、IRE1 α 、IRE1 β が存在するが、メダカにも全く同じように 3 種類計 5 個存在していた。ATF6 α あるいは PERK を欠損するメダカ個体を既に同定し、変異を純化するためにバッククロスをかけている。ATF6 α については 4 回、PERK については 2 回バッククロスを掛けた段階でヘテロ同士を交配させた結果、ATF6 α 、PERK いずれも $-/-$ の個体が得られた。これらの欠損は胎生致死とならず、個体レベルでの解析が可能であると考えられた。

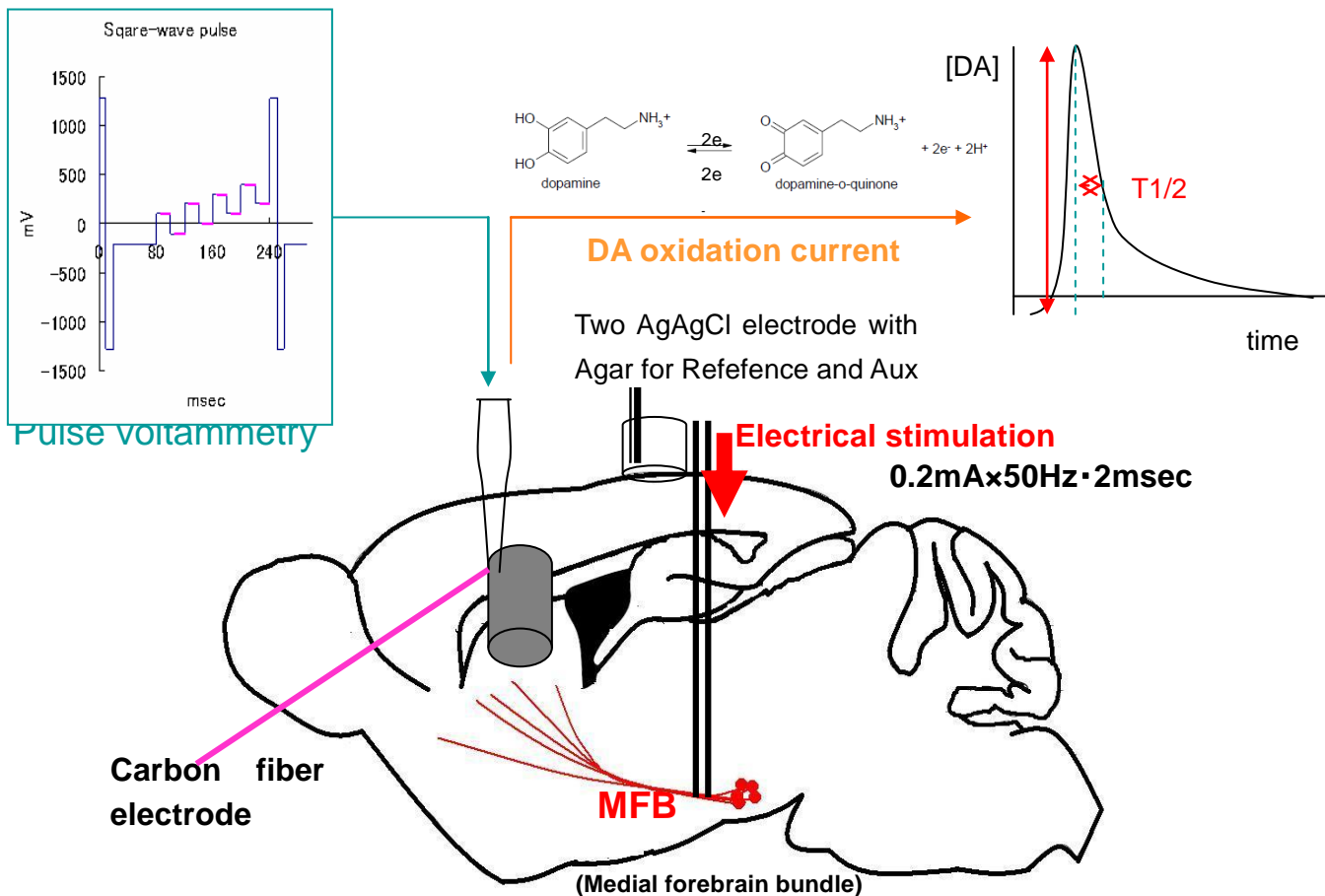
小胞体ストレス応答発動タンパク質の制御因子として知られている小胞体シャペロン BiP については、ATP 結合部位の近くに位置する 38 番目のセリンがプロリンに変わっている個体を同定した。1 回バッククロスを行った段階でヘテロ同士を交配させたところ、 $-/-$ の個体は全く得られず、この変異は胎生致死をもたらす可能性が考えられた。温度感受性があるかどうか検討中である。

ATF6 は、哺乳動物では小胞体ストレスに応答したタンパク質限定分解により活性化される。メダカの ATF6 α および ATF6 β も、メダカの細胞中で小胞体ストレスに応答したタンパク質限定分解を受けることを見いだした。分解を受けて膜から遊離した N 末端断片をメダカの細胞で過剰発現すると、ATF6 α の場合、小胞体シャペロン BiP の発現が亢進したが、ATF6 β の場合、その効果は弱かった。これらの結果は、メダカが哺乳動物と同様の制御方法を活用していることを示唆しており、メダカのモデル生物としての有用性が期待できる。

D. 服部グループ

1. Parkin ノックアウトマウスの電気生理学的解析: 服部らは In vivo voltammetry の系を導入し、

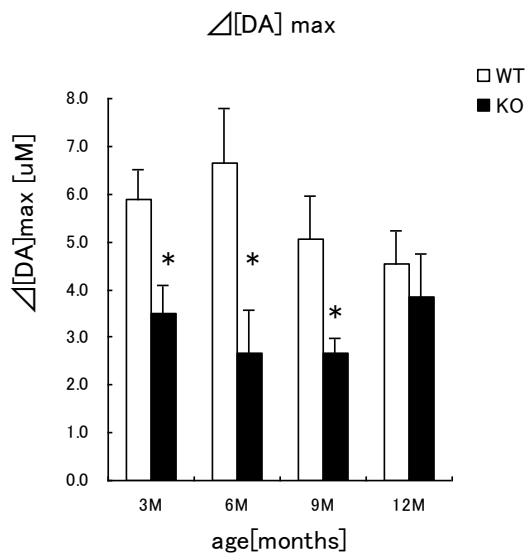
Forebrain bundle を刺激してダイナミックなドーパミン遊離を測定した。



Parkin KO mice では、右図のように3ヶ月から9ヶ月まではドーパミン遊離が低下した。しかし、12ヶ月齢では有意差を示さなかったことより基底核など脳の成熟過程において parkin が機能している可能性が推定された。更にドパミントランスポーター (DAT) 阻害剤 nomifensine を投与すると細胞外ドーパミン濃度が KO mice でより上昇することから DAT の機能亢進が推定された。

2. その他の家族性パーキンソン病原因遺伝子について

正常型 DJ-1 の細胞内局在について検討し、Rab3a と共局在することから、parkin 同様シナプスにおいてドーパミン遊離に関連することが推定された。ATP13A2 に関しては正常型ではリソソームの外膜に局在したが、変異型では ER に局在してリソソームへ移行できないことが細胞死へ誘導することが推定された。また Parkin の新たな基質蛋白質として programmed cell death-2 isoform 1 (PDCD2-1) を同定した。PDCD2-1



は AR-JP でも孤発性 PD でも中脳組織に蓄積が認められ、Parkin の関与するユビキチンプロテアソーム系の異常が AR-JP のみならず、孤発性 PD の病因にも関与していることが示唆された (6)。

E. 木下グループ

1. 本共同研究者らはこれまでに、遺伝性パーキンソン病モデルマウスの1つである変異型 alpha-シヌクレイン過剰発現マウスの病態がセリン 129 残基のリン酸化とよく相関することと、このいずれもが Sept4 の存在によって抑制されることを報告した。今年度は蛋白質発現・調製系とアッセイ系の条件検討を行い、Sept4 のカルボキシ末端 200 残基に会合領域が存在することを確認した。今後会合領域をオリゴペプチドにまで絞り込むことを目標としている。
2. PD 進行例ではドーパミンニューロン内にリン酸化 alpha-シヌクレインが増加する一方、Sept4 が欠乏する。ヒト脳脊髄液中に微量検出される Sept4、リン酸化 alpha-シヌクレイン、その他関連蛋白質の濃度の変動ないしこれらの組み合わせが PD によるドーパミン神経障害の病勢や治療効果をモニターするバイオマーカーとなる可能性がある。そこで、5 種類のオリゴペプチドおよびヒト組み換え Sept4 蛋白質 (全長) を抗原としてウサギ抗体を作製して ELISA 系を構築したが、十分な感度が得られず、さらに高力抗体価を得る必要があることがわかった。
3. Sept4 は PD のレビー小体の他、アルツハイマー病等で出現する神経原線維変化の副成分でもある。そこで、ヒト tauP301S を発現する tauopathy モデルマウスと Sept4KO マウスを交配し、遺伝子型による病態の相違を比較検討する。本年度は上記 2 系統のマウスの繁殖と遺伝子タイピングを完了し、経過観察を開始した。21 年度にかけて計 165 個体の生存曲線、神経症状、病理組織像、生化学等に関する実験結果を得る予定である。予備データとしてはあるが、既に tauP301S Tg マウスの Sept4 欠損による有意な体重減少 (42.5g vs. 38g, $p=0.005$) を認めている。tauP301S Tg および Sept4KO 単独では体重異常を認めないことから、tau-Sept4 間の機能的相互作用 (synthetic effect) を支持する所見といえる。
4. alpha-シヌクレイン (A53T) Tg マウスの遺伝学的背景を雑種系統から C57BL6 系統に均一化した。また、この系統を堀グループに分与した。

F. 堀グループ

本共同研究者らは、H19 年度に、小胞体ストレス制御物質の探索により得られたメシキフラボンの一種タンゲレチンが、急性期マウスパーキンソン病モデル (MPTP、6-OHDA 投与モデル) において神経保護作用を示す事を報告した。また、小胞体ストレスを制御する化合物を探索する過程で見出したカルバゾール誘導体 16-14[9-(3-cyanobenzyl)-1,4-dimethylcarbazole] が thapsigargin による細胞内カルシウム濃度上昇の抑制作用を介して抗細胞死効果を発揮することを明らかにした成果の論文発表を行った (7)

H20 年度は、タンゲレチンの神経保護作用を、よりヒトの病態に近いと考えられるマウスパーキ

ンソン病モデル、慢性期 MPTP 投与モデルを用いて検討した。MPTP(20mg/kgBW, s.c.)及びプロベネシド(250mg/kgBW, i.p)を週 2 回、5 週間にわたりマウスに投与すると、黒質緻密層のドーパミン作動性神経 (TH 陽性細胞) に神経変性が生じる。この時、MPTP 投与前後にタンゲレチン(5mg/kgBW, i. p.)を投与すると、黒質緻密層及び線条体における TH 陽性細胞の減少は抑制された(図)。更に、タンゲレチン投与マウスにおいては、小胞体ストレスシグナル (UPR) 標的遺伝子である GRP78 の発現がタンゲレチン非投与マウスに比べてより増加していた。このことから、慢性期 MPTP 投与モデルにおけるタンゲレチンの神経保護作用は、UPR の活性化 (小胞体内分子シャペロンの誘導) と関連している事が示唆された。今後、投与法の検討、及び他のフラボノイドとの比較等を行う予定である。また、他のパーキンソン病モデル (α -synuclein の過剰発現等) に対する効果も検証して行く予定である。

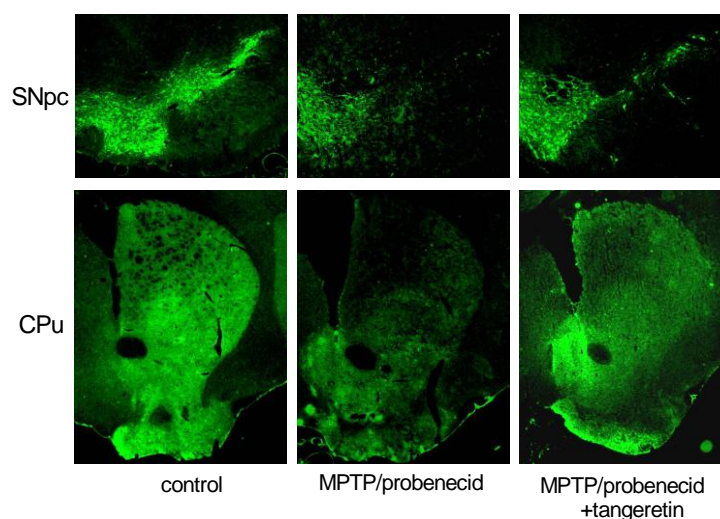


図:タンゲレチンによる MPTP 誘発性黒質ドーパミン神経細胞死抑制効果

3. 研究実施体制

A. 「京都大学 高橋」グループ

①研究分担グループ長:高橋 良輔 (京都大学、教授)

②研究項目

家族性パーキンソン病多重遺伝子変異モデルの作製と解析

B. 「京都大学 武田」グループ

①研究分担グループ長:武田 俊一(京都大学、教授)

②研究項目

家族性パーキンソン病多重遺伝子変異モデルマウス・メダカの作製と解析

C. 「京都大学 森」グループ

①研究分担グループ長:森 和俊(京都大学、教授)

②研究項目

小胞体ストレス応答欠損個体・細胞を活用したパーキンソン病発症機構の解析

D.「順天堂大学 服部」グループ

①研究分担グループ長:服部 信孝(順天堂大学、教授)

②研究項目

家族性パーキンソン病多重遺伝子変異モデルマウス・メダカの作製と解析

E.「京都大学 木下」グループ

①研究分担グループ長:木下 専(京都大学、講師)

②研究項目

モデルマウスを用いたシヌクレインおよびタウによる神経変性機構と抑制系の解析

F.「金沢大学 堀」グループ

①研究分担グループ長:堀 修(金沢大学、准教授)

②研究項目

小胞体理論に基づく新規リード化合物のスクリーニング

4. 研究成果の発表等

(1) 論文発表 (原著論文)

高橋グループ

1. Moriwaki, Y., Kim, Y.J., Ido, Y., Misawa, H., Kawashima, K., Endo, S. and 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
2. Ogawa, M., Mizuguchi, K., Ishiguro, A., Koyabu, Y., Imai, Y., Takahashi, R., Mikoshina, K. and Aruga, J. (2008) Rines/RNF180, a novel RING finger gene-encoded product, is a membrane-bound ubiquitin ligase. *Gene Cells*, 13, 397-409
3. Imai, Y., Gehrke, S., Wang, H.Q., Takahashi, R., Hasegawa, K., Oota, E. and Lu, B. (2008) Phosphorylation of 4E-BP by LRRK2 affects the maintenance of dopaminergic neurons in *Drosophila*. *EMBO J.* 27, 2432-43.
4. Wang, H.Q., Imai, Y., Inoue, H., Kataoka, A., Iita, S., Nukina, N. and Takahashi, R. (2008) Pael-R transgenic mice crossed with parkin deficient mice displayed progressive and selective catecholaminergic neuronal loss. *J. Neurochem.* 107, 171-85.
5. Fujiwara, M., Marusawa, H., Wang, H.Q., Iwai, A., Ikeuchi, K., Imai, Y., Kataoka, A., Nukina, N., Takahashi, R. and Chiba, T. (2008) Parkin as a tumor suppressor gene for hepatocellular carcinoma. *Oncogene*, 27, 6002-11..

服部グループ

6. 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 Feb 4;583(3):521-5.

堀グループ

7. A carbazole derivative protects cells against endoplasmic reticulum (ER) stress and glutathione depletion. Miura H, Takano K, Kitao Y, Hibino S, Choshi T, Murakami R, Suzuki H, Yamada M, Ogawa S, Hori O. J Pharmacol Sci. 2008 108, 164-71.

(2) 特許出願

平成 20 年度 国内特許出願件数 : 0 件 (CREST 研究期間累積件数 : 0 件)