

運動系神経変性研究チーム

Laboratory for Motor System Neurodegeneration

チームリーダー 高橋 良輔

TAKAHASHI, Ryosuke

筋萎縮性側索硬化症 (ALS) とパーキンソン病はそれぞれ運動ニューロンと中脳黒質ニューロンが選択的に変性・死滅することによって重篤な運動機能障害が引き起こされる神経変性疾患である。ALS もパーキンソン病も大多数は孤発性であるが、両疾患とも一部に遺伝性のタイプがある。我々はまず遺伝性の ALS およびパーキンソン病責任遺伝子の変異や欠損が系特異的に神経変性を誘発するメカニズムを明らかにする。さらにその成果を突破口として、全く謎に包まれている孤発性 ALS およびパーキンソン病の病因解明を目指す。

一方最近の研究により、細胞の自爆装置によって引き起こされるアポトーシスと呼ばれる細胞死が神経変性過程に関与していることが示唆されており、神経変性疾患に対する抗アポトーシス治療への期待が持たれている。そこで我々はアポトーシス阻害因子 (IAP) を用いた神経変性疾患モデル動物の遺伝子治療の基礎研究を推進する。

1. 家族性 ALS の責任遺伝子、変異 SOD1 による運動ニューロン変性メカニズムの解明 (舘野, 井上, 漆谷, 金, 定方, 宇佐美, 月田, 栗栖, 飯田, 高橋)

ALS の 5~10% は家族性に発症し、そのうちの約 20% の常染色体優性遺伝の家系が Cu,Zn-superoxide dismutase (SOD1) の変異を原因とする。SOD1 は非神経組織を含め、ubiquitous に発現しているが、疾患において変性するのは運動ニューロン系を中心とした一部の神経系のみである。これまで同定された 100 種類以上の変異がほとんど点変異であり、タンパクを欠損する例はない。さらに酵素活性がほぼ正常な変異ヒト SOD1 のトランスジェニックマウスで ALS 類似の症状と病理所見を呈することから、変異によって酵素の機能低下でなく SOD1 に新たに細胞毒性が付与される (gain of toxic function) ことが運動ニューロン変性の原因になると考えられている。しかしその毒性のメカニズムは、病因遺伝子の発見から 10 年以上を経た現在も未解明である。

(1) 変異 SOD1 のタンパク分解機構

これまでの報告から変異 SOD1 はユビキチンプロテアソーム経路によって分解されることが示唆されているが、その詳細な分子機構は不明である。我々はミスフォールド化し、オリゴマー形成した変異 SOD1 がユビキチンプロテアソーム経路で分解され、そのことが同時にプロテアソーム機能低下をもたらす、神経細胞死を引き起こすことを報告した。さらに酸化ストレスが変異 SOD1 の構造異常を悪化させ、ユビキチン化を促進することを観察した。我々は更に Hsc/Hsp70 および CHIP が変異 SOD1 の分解に関わることを明らかにした。Hsc/Hsp70 は細胞内で変異 SOD1 に特異的に結合し、*in vitro* の実験では Hsc/Hsp70 が脱金属化し

たアポ型 SOD1 または還元されたホロ型 SOD1 により結合しやすいことが分かった。一方 CHIP は変異 SOD1 に特異的に結合し、その分解を促進する。しかし興味深いことに、CHIP は変異 SOD1 そのものではなく、変異 SOD1 に結合する分子をユビキチン化する。換言すれば、変異 SOD1 は CHIP の基質そのものではないことが分かった。さらに変異 SOD1 に結合している Hsp70 は CHIP 存在下でポリユビキチン化され、ポリユビキチン化された Hsp70 は 26S プロテアソームのユビキチンレセプターである S5a に結合することが示された。CHIP は脊髄に豊富に発現しており、G93A 変異 SOD1 トランスジェニックマウスの脊髄運動ニューロンのユビキチン陽性封入体は CHIP 免疫陽性であった。以上より、我々はユビキチン化した Hsc/Hsp70 が変異 SOD1 をプロテアソームに運び、その分解を促進するという新しいモデルを提唱した。

(2) 変異 SOD1 導入 ALS マウスモデルの病勢進行におけるカスパーゼの役割

変異 SOD1 トランスジェニックマウスは家族性 ALS のよいモデルであり、ALS の治療法開発に格好の材料を提供する。これまでの研究から、カスパーゼ-9 活性化をはじめとするミトコンドリア経路のアポトーシスシグナルが変異 SOD1 マウスにみられる神経変性に重要な役割を果たしていることが示唆されている。ALS におけるカスパーゼ-9 の役割を明らかにするため、我々はカスパーゼ-3, -7, -9 を阻害する X 染色体連鎖アポトーシス阻害タンパク質 (XIAP) および広範囲のカスパーゼの阻害因子であるが、カスパーゼ-9 だけは阻害しないパキュロウイルスの p35 の ALS への影響を調べた。コリンアセチル転移酵素のプロモーターを使って XIAP を脊髄運動ニューロンに比較的特異的に発現するトランスジェニックマウスを作製し、変異 SOD1 マウスとかけ合わせたところ、発症時期には影響しなかったが、罹病期間を延長させる効果で、生存期間を延長させた。一方同様に p35 の効果を検討したところ、p35 は発症時期を遅らせることで生存期間を延長させたが、罹病期間には影響しなかった。さらにカスパーゼ-9 はマウス ALS の発症直前から活性化が観察されたばかりでなく、ヒト ALS 患者剖検脊髄運動ニューロンでも活性化されていた。以上より、カスパーゼ-9 は ALS の病勢進行に重要な役割を果たしており、よい治療のターゲットとなると考えられる。

(3) ALS マウスモデルの選択的運動ニューロン変性とカルシウム透過型 AMPA 受容体

最近の研究から、変異 SOD1 が変性が起こる部位でのみミスフォールドタンパク質となり凝集することが、SOD1 に変異を持つ ALS でみられる選択的運動ニューロン変性の原因である可能性が有力になってきた。しかし、そのような部位特異的な構造変化を促進させる因子については全く

分かっていない。我々はそのような因子として、運動ニューロンに比較的特異的に発現する GluR2 サブユニットを欠くカルシウム透過性 AMPA 型受容体に注目し、コリンアセチル転移酵素のプロモーターで GluR2 を過剰発現し、運動ニューロンでの AMPA 受容体の多くがカルシウム不透過性になるトランスジェニックマウス (chat-GluR2 マウス) を作製した。chat-GluR2 マウスと変異 SOD1 マウスを合わせたダブルトランスジェニックマウスでは、ALS の発症は 19.3% 遅延し、生存期間は 14.3% 延長した。この効果に伴って、ミトコンドリアからのチトクロム c 放出、cox2 の誘導、変異 SOD1 タンパク質の凝集形成の遅れが観察された。さらに、*in vitro* の実験で変異 SOD1 の構造変化を促進する酸化的ストレスのレベルがダブルトランスジェニックマウスで減少していた。このような結果は AMPA 受容体を介するカルシウム流入がおそらく酸化的ストレスを増悪させることによって、変異 SOD1 のミスフォールド化を促進させ、ALS における選択的運動ニューロン変性の一因となっていることを示すものである。

2. 常染色体劣性若年性パーキンソニズム (ARJP) の責任遺伝子、Parkin の機能解析 (今居^{*1}, 井上, 森脇, 祖田, 方村, 片岡, 後藤, Hoang, 高橋)

常染色体劣性若年性パーキンソニズム (autosomal recessive juvenile parkinsonism: ARJP) は DOPA 反応性のパーキンソニズム、症状の日内変動、下肢のジストニアなどの臨床症状を呈し、病理学的には黒質・青斑核の選択的変性、レビー小体の非形成を特徴とする。1998 年、順天堂大学・水野美邦教授、慶応大学・清水信義教授らの共同研究グループにより、APJP の責任遺伝子 Parkin がクローニングされた。Parkin は N 末端にユビキチン様のモチーフ、C 末端に RING-IBR-RING モチーフを有する特徴的な構造のタンパク質であり、SOD1 と同様 ubiquitous に発現している。我々は Parkin が RING 型ユビキチンリガーゼであることを見だし、その基質としてパエル受容体 (Pael-R) を同定した。Pael-R を細胞で過剰発現させると、ミスフォールド化し、不溶性となる。不溶性の Pael-R は小胞体に蓄積して、小胞体ストレスによって細胞死を引き起こす。Parkin はミスフォールド化 Pael-R を選択的にユビキチン化し、その分解を促進して、Pael-R による細胞死を抑制する。さらに不溶性 Pael-R は AR-JP 患者剖検脳でも蓄積が認められた。

(1) Parkin とその共役因子の生理機能の解析

ドーパミン作動性のヒト神経芽細胞腫 SH-SY5Y 細胞で FLAG タグ Parkin を過剰発現させ、その免疫沈降物を二次元電気泳動で解析したところ、2 つの新しい Parkin 結合タンパク質のスポットが同定された。質量分析、およびウエスタンブロットによってこれらは Hsp70 とそのコシャペロンである CHIP であることが分かった。CHIP, Hsp70, Parkin, Pael-R は *in vitro* および細胞内で複合体を形成する。この複合体の中の CHIP の量は小胞体ストレスによって増加する。CHIP は Parkin および Pael-R からの Hsp70 の解離を促進し、Parkin による Pael-R のユビキチン化を促進する。さらに Hsp70 非存在下で CHIP は Parkin を介する Pael-R の *in vitro* ユビキチン化を促進する。さらに培養細胞の実験では CHIP は Parkin の Pael-R 過剰発現による細胞死の抑制効果を強めた。以上から CHIP は酵母での

み報告されているユビキチン鎖延長因子 E4 の哺乳類ホモログのような性質をもち、Parkin の活性を増強する共役因子として働くと考えられる。

(2) AR-JP モデルマウスの作製・解析

AR-JP の動物モデルは本疾患の病態解析、治療法開発を行う上で必須である。我々はスタンフォード大学 Bingwei Lu 教授との共同研究で、Pael-R を発現するショウジョウバエを作製した。ニューロン全般に Pael-R を発現したショウジョウバエでは年齢依存的な選択的ドーパミン神経変性が観察された。また Parkin を共発現させると Pael-R の毒性は減弱したが、ハエの内因性の Parkin を RNAi で減少させると、Pael-R はより蓄積するようになり、毒性も増強した。さらに Parkin の過剰発現で α -シヌクレインによる凝集形成と毒性が緩和された。以上から、Parkin はパーキンソン病の分子経路において主要な役割を演じており、Parkin の発現を調節することによって新しい治療法の開発が可能になることが示唆された。なお、げっ歯類での AR-JP モデル動物作製のため、すでにプリオンプロモーターでニューロン特異的に Pael-R を発現するトランスジェニックマウス、およびエキソン 3 を欠損した Parkin ノックアウトマウスを作製し、解析中である。

(3) Parkin とコアプロモーターを共有する遺伝子 Glup の解析

我々および米国のグループはヒトゲノムの Parkin 遺伝子のアンチセンス鎖上に位置し、Parkin とコアプロモーターを共有する遺伝子 Glup/PARCG をクローニングした。Glup は Hsp70, Hsp90, シャペロンなどを含む巨大なタンパク質複合体を形成する。Glup は Parkin の基質であるミスフォールド化 Pael-R の蓄積による細胞死を抑制する。他方、プロテアソーム阻害剤存在下で Glup は Pael-R, 分子シャペロン, タンパク質分解関連分子, Glup 自体を含む封入体形成を促進する。Glup の発現を RNAi で低下させると、Pael-R による封入体形成は減弱するが、それとともに空胞形成を伴う細胞死が起こる。さらに Glup はレビー小体の構成要素であることが判明した。以上の結果から、Glup はレビー小体形成に重要な役割を担っており、パーキンソン病においてドーパミンニューロンを保護する機能があることが示唆された。

3. アポトーシス阻害タンパク (IAP) の作用メカニズム・生理的役割の解明 (鈴木^{*1}, 仁木, 栗栖, 新家^{*2}, 高橋)

アポトーシス阻害タンパクは昆虫からヒトまでよくその構造と機能が保存されている分子である。IAP 分子は N 末端に IAP を特徴づける約 70 アミノ酸からなる Baculovirus IAP repeat (BIR) モチーフを 1~3 個、C 末端に RING finger モチーフを有する (RING finger は持たないものもある)。また多くの IAP 分子は培養細胞で強制発現させるとさまざまな刺激によるアポトーシスを抑制する。現在ヒトでは 7 種類の IAP 分子が知られているが、そのうち、NAIP は脊髄性筋萎縮症 (SMA) の責任遺伝子 SMN の近傍にマップされ、SMN と同時に NAIP が欠損すると、症状が重症化することが知られる。この事実は IAP が運動ニューロンの生存維持に重要な役割を果たしていることを示唆し、興味深い。我々は既知のヒト IAP 分子の中で最も強い抗アポトーシス効果を有する XIAP がアポトーシスの実行分子、カスパー

ゼの阻害因子であることを明らかにした。また XIAP がカスパーゼ-3 の RING 型ユビキチンリガーゼであり、その活性が XIAP の細胞死抑制機能を高めていることを明らかにした。さらに我々は新たな IAP の阻害因子として、ミトコンドリア由来のセリンプロテアーゼ HtrA2/Omi を同定した。この二年間ほどは XIAP の制御因子として重要と考えられる HtrA2 の解析に焦点を移して研究を進めている。

(1) HtrA2 の IAP 阻害機構

HtrA2 はアポトーシスの際に細胞質の放出されるミトコンドリア膜間スペースに局在するセリンプロテアーゼであり、N 末端の IAP 結合モチーフで IAP と結合することにより、IAP の機能を阻害してチトクロム c 依存性カスパーゼ活性化を促進する。プロテアーゼ活性はアポトーシスとカスパーゼ依存性細胞死の両方に寄与する。我々は野生型 HtrA2 が酵素活性を失った変異型 HtrA2 よりも UV 刺激などのアポトーシス刺激時にカスパーゼ活性を高める効果が強いことを見いだした。野生型、変異型 HtrA2 の細胞内での発現レベル、IAP 結合活性、ミトコンドリアからの放出効率に差はみられなかったが、UV 刺激後の XIAP タンパク質の発現量は野生型 HtrA2 を導入したほうの細胞で顕著に減少していた。さらに組み換え HtrA2 が IAP を切断分解して不活性化することが分かり、IAP 阻害活性にプロテアーゼ活性が必須であることが示唆された。さらにヒラ細胞では細胞質内に発現させた HtrA2 は間接的にミトコンドリア外膜の透過性を亢進させ、それに引き続くチトクロム c 依存性のカスパーゼ活性化を増強させることも分かった。以上の結果から、HtrA2 のプロテアーゼ活性は複数の異なる経路でカスパーゼ活性化を促進することが分かった。

(2) HtrA2 の基質の分子クローニング

発現クローニングにより、*in vitro* で HtrA2 によって切断されるいくつかの基質候補分子を単離した。現在その機能解析を行っている。

*¹ 基礎科学特別研究員、*² ジュニア・リサーチ・アソシエイト

Our main research goal is to better understand the molecular mechanism underlying the development of motor-system-associated neurodegenerative diseases, including amyotrophic lateral sclerosis (ALS) and Parkinson's disease. Our current research is focused on the functional analysis of superoxide dismutase 1 (SOD1) and Parkin, which are the genes responsible for familial autosomal dominant ALS and autosomal recessive juvenile parkinsonism (AR-JP), respectively. We are currently adopting a way to develop and analyze molecular, cellular and animal models of these diseases.

We are also interested in the possibility of using anti-cell death genes as a therapy of neurodegenerative diseases. Inhibitor of apoptosis proteins (IAPs) are evolutionally very well conserved anti-apoptotic proteins. We have found that some of human IAPs are direct inhibitors of a subset of cysteine proteinases called caspases, which play central roles in the execution of apoptosis. Given that the apoptotic machinery is essential for neurodegenerative process, IAPs are promising candidates for the gene therapy of neurodegenerative diseases. We are examining whether IAPs can block neurodegenerative processes

of disease model animals.

1. Investigation of the mechanism underlying selective motor neuronal death induced by mutant SOD1

Amyotrophic lateral sclerosis (ALS) is a fatal progressive paralytic disorder of unknown cause involving motor neurons of the brain and spinal cord. Approximately 5–10% of ALS cases are familial and inherited. More than 90 kinds of mutations (mostly missense mutations) in Cu/Zn superoxide dismutase-1 (SOD1) have been identified in about 20% of patients with the familial ALS (FALS). Enzymological analysis of mutant SOD1 proteins and studies on mutant SOD1 overexpressing transgenic mice demonstrated no correlation between SOD activity and the severity of the disease, suggesting that mutant SOD1 induces motor neuron death not because of losing SOD activity but because of gain of a new adverse function. The mechanism of the new toxic function, however, is yet to be elucidated.

(1) Mechanisms whereby mutant SOD1 is degraded through ubiquitin-proteasome pathway

Previous reports have strongly suggested that ubiquitin-proteasomal pathway is involved in the degradation of mutant superoxide dismutase 1 (SOD1) proteins, although direct evidence has not been provided. We found that the misfolded and oligomerized mutant SOD1 proteins were degraded through ubiquitin-proteasome pathway, which result in impairment of the proteasomal function and motor neuronal death. Oxidative stress contributes to augmentation of abnormal conformation and enhanced ubiquitination of mutant SOD1. We further elucidated that heat-shock protein (Hsp) or heat shock cognate (Hsc) 70 and the carboxyl terminus of the Hsc70-interacting protein (CHIP) are involved in proteasomal degradation of mutant SOD1. Only mutant SOD1 interacted with Hsp/Hsc70 *in vivo*, and *in vitro* experiments revealed that Hsp/Hsc70 preferentially interacted with apo-SOD1 or dithiothreitol (DTT)-treated holo-SOD1, compared with metallated or oxidized form. CHIP, a binding partner of Hsp/Hsc70, interacted with only mutant SOD1 and promoted their degradation. Interestingly, both Hsp70 and CHIP promoted polyubiquitination of mutant SOD1-associated molecules, but not of mutant SOD1, indicating that mutant SOD1 is not a substrate of CHIP. Moreover, mutant SOD1-associated Hsp/Hsc70, a known substrate of CHIP, was polyubiquitinated *in vivo*, and polyubiquitinated Hsc70 by CHIP interacted with the S5a subunit of the 26S proteasome *in vitro*. Furthermore, CHIP was predominantly expressed in spinal neurons, and ubiquitinated inclusions in the spinal motor neurons of hSOD1^{G93A} transgenic mice were CHIP-immunoreactive. Taken together, we propose a novel pathway in which ubiquitinated Hsp/Hsc70 might deliver mutant SOD1 and facilitate its degradation at the proteasome.

(2) The role of caspases in the disease progression of mutant SOD1 transgenic ALS model

Mutant copper/zinc superoxide dismutase (SOD1) overexpressing transgenic mouse, a mouse model for familial amyotrophic lateral sclerosis (ALS), provides an excellent resource for developing novel therapies for ALS. Several observations suggest that mitochondria-dependent apoptotic signaling including caspase-9 activation may play an important role in mutant SOD1-related neurodegeneration. To elucidate the role of caspase-9 in ALS, we examined the effect of different caspase-inhibitory proteins, an inhibitor of X chromosome-linked inhibitor of

apoptosis (XIAP), a mammalian inhibitor of caspase-3, -7 and -9, and p35, a baculoviral broad caspase-inhibitor that does not inhibit caspase-9. When expressed in spinal motor neurons of mutant *hSOD1^{G93A}* transgenic mouse using transgenic techniques, XIAP attenuated disease-progression without delaying onset. In contrast, p35 delayed onset without slowing disease-progression. Moreover, caspase-9 was activated in spinal motor neurons of human ALS subjects. These data strongly suggest that caspase-9 plays a crucial role in disease-progression of ALS and constitutes a promising therapeutic target.

(3) The role of calcium permeable AMPA receptors in selective motor neuronal degeneration in ALS mouse model

Misfolding and subsequent aggregation of mutant SOD1 proteins have been suggested to be responsible for selective death of spinal motoneurons in SOD1-related familial amyotrophic lateral sclerosis (ALS), although the factors mediating such conversion are almost unknown. Focusing on motoneuron-specific expression of Ca^{2+} -permeable (GluR2 subunit-lacking) α -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazole propionic acid (AMPA)-type glutamate receptors, we generated *chat-GluR2* transgenic mice with significantly reduced Ca^{2+} -permeability of the receptors. Crossbreeding of the *hSOD1^{G93A}* transgenic mouse model of ALS with *chat-GluR2* mice led to markedly delayed disease onset (by 19.3%) and mortality (by 14.3%), with concomitantly delayed release of cytochrome c from mitochondria, induction of *cox2*, and conversion of SOD1 proteins into abnormal forms in cytoplasm and mitochondria. Moreover, levels of protein oxidation, which causes conformational changes to SOD1 *in vitro*, were reduced in double transgenic mice. These results indicate that Ca^{2+} -influx through atypical AMPA receptors thus promotes misfolding of mutant SOD1 protein, probably by enhancing cellular oxidative stress, contributing to selective motoneuron degeneration in ALS.

2. Functional analysis of Parkin, the gene responsible for autosomal recessive juvenile Parkinsonism

Autosomal recessive juvenile parkinsonism (AR-JP) is a distinct clinical entity characterized by typical parkinsonism, dystonia and superb dopa responsiveness. Neuropathological hallmarks are selective degeneration of the pigmented neurons in the substantia nigra (SN) and locus ceruleus without Lewy body formation. In 1998, a Japanese collaborative research group led by Dr. Yoshikuni Mizuno (Juntendo University) and Dr. Nobuyoshi Shimizu (Keio University) identified a novel *parkin* gene as a causative gene for AR-JP. Parkin protein is a ubiquitously expressed 465 amino-acid protein with a ubiquitin-homology domain at its NH_2 -terminus and a RING finger-like motif near its COOH -terminus. We have shown that Parkin is a RING-type E3 ubiquitin ligase and identified misfolded Pael receptor (Pael-R) as its substrate. When overexpressed in cells, Pael-R tends to become misfolded, insoluble, and ubiquitinated. The insoluble Pael receptor leads to ER stress-induced cell death. Parkin specifically promotes ubiquitination and subsequent degradation of misfolded Pael-R, resulting in suppression of the cell death induced by the accumulation of misfolded Pael receptor in the ER. Moreover, the insoluble form of Pael receptor accumulates in the brains of AR-JP patients.

(1) Analysis of the physiological function of Parkin and its cofactors

Twp-dimensional (2D) electrophoresis of co-immuno-

precipitates of FLAG-tagged Parkin expressed in SH-SY5Y cells demonstrated two different Parkin binding protein. Mass spectrometry and Western blot analysis revealed these proteins correspond to Hsp70 and Carboxy-terminal of Hsc70 interacting protein (CHIP). Further study showed that CHIP, Hsp70, Parkin, and Pael-R formed a complex *in vitro* and *in vivo*. The amount of CHIP in the complex was increased during ER stress. CHIP promoted the dissociation of Hsp70 from Parkin and Pael-R, thus facilitating Parkin-mediated Pael-R ubiquitination. Moreover, CHIP enhanced Parkin-mediated *in vitro* ubiquitination of Pael-R in the absence of Hsp70. Furthermore, CHIP enhanced the ability of Parkin to inhibit cell death induced by Pael-R. Taken together, these results indicate that CHIP is a mammalian E4-like molecule that positively regulates Parkin E3 activity.

(2) Generation and analysis of animal models for AR-JP

Establishment of an animal model for AR-JP that should be invaluable for the study of pathophysiology and development of therapy. A transgenic drosophila expressing Pael-R was created in collaboration with Dr. Bingwei Lu at Stanford University. We established an organismal system that panneuronal expression of Pael-R causes age-dependent selective degeneration of Drosophila dopaminergic (DA) neurons. Coexpression of Parkin degrades Pael-R and suppresses its toxicity, whereas interfering with endogenous Drosophila Parkin function promotes Pael-R accumulation and augments its toxicity. Furthermore, overexpression of Parkin can mitigate alpha-Synuclein-induced neuritic pathology and suppress its toxicity. Our study implicates Parkin as a central player in the molecular pathway of Parkinson's disease (PD) and suggests that manipulating Parkin expression may provide a novel avenue of PD therapy. Regarding mouse model of AR-JP, Parkin-KO mouse and Pael-R transgenic mice have been generated and currently under analysis.

(3) Analysis of gene located upstream of Parkin (Glup)

We and others have identified a reverse strand gene located upstream of the parkin gene in the human genome. The gene product, termed Glup/PACRG, forms a large molecular chaperone complex containing heat shock proteins 70 and 90 and chaperonin components. Glup suppressed cell death induced by accumulation of unfolded Pael receptor (Pael-R), a substrate of Parkin. On the other hand, Glup facilitated the formation of inclusions consisting of Pael-R, molecular chaperones, protein degradation molecules, and Glup itself, when proteasome is inhibited. Glup knockdown attenuated the formation of Pael-R inclusions, which resulted in the promotion of cell death with extensive vacuolization. Moreover, Glup turned out to be a component of Lewy bodies in Parkinson's disease cases. These data suggest that Glup may play an important role in the formation of Lewy bodies and protection of dopaminergic neurons against Parkinson's disease.

3. Elucidation of the mechanism of action and the physiological role of inhibitor of apoptosis protein (IAP) family

The inhibitor of apoptosis (IAP) family of proteins has an evolutionarily conserved role in regulating programmed cell death in animals ranging from insects to humans. Most of the IAPs of various species have been shown to block apoptosis when overexpressed in cultured cells and all contain at least one baculovirus IAP repeat (BIR) domain. We have shown that X-linked IAP (XIAP), c-IAP1 and c-IAP2 are direct inhibitors of active 3, 7 and 9, which play critical

roles in the execution of apoptosis. A structure-function analysis of XIAP revealed that BIR2 is the minimal essential domain of XIAP required for inhibition of caspase-3 and -7, whereas BIR3 and its surrounding sequences are responsible for caspase-9 inhibition. We found that caspase-3 and caspase-7 were inhibited by XIAP in distinct modes. On the other hand, IAPs with strong apoptotic-inhibitory activities including XIAP, c-IAP1 and c-IAP2 carry RING-finger motif at their COOH-termini. We have shown that XIAP is an E3 ubiquitin ligase for caspase-3 *in vivo* and the E3 activity contributes to anti-apoptotic activity of XIAP.

Moreover, we have identified HtrA2/Omi serine protease as an inhibitor of IAPs.

(1) The mechanisms whereby HtrA2 inhibits the function of IAPs

Omi/HtrA2 is a mitochondrial serine protease that is released into the cytosol during apoptosis and promotes cytochrome c (Cyt c) dependent caspase activation by neutralizing inhibitor of apoptosis proteins (IAPs) via its IAP-binding motif. The protease activity of Omi/HtrA2 also contributes to the progression of both apoptosis and caspase-independent cell death. In this study, we found that wild-type Omi/HtrA2 is more effective at caspase activation than a catalytically inactive mutant of Omi/HtrA2 in response to apoptotic stimuli, such as UV irradiation or tumor necrosis factor. Although similar levels of Omi/HtrA2 expression, XIAP-binding activity, and Omi/HtrA2 mitochondrial release were observed among cells transfected with catalytically inactive and wild-type Omi/HtrA2 protein, XIAP protein expression after UV irradiation was significantly reduced in cells transfected with wild-type Omi/HtrA2. Recombinant Omi/HtrA2 was observed to catalytically cleave IAPs and to inactivate XIAP *in vitro*, suggesting that the protease activity of Omi/HtrA2 might be responsible for its IAP-inhibiting activity. Extramitochondrial expression of Omi/HtrA2 indirectly induced permeabilization of the outer mitochondrial membrane and subsequent Cyt c-dependent caspase activation in HeLa cells. These results indicate that protease activity of Omi/HtrA2 promotes caspase activation through multiple pathways.

(2) Molecular cloning of the substrates of HtrA2

Using expression cloning, we have isolated several candidate molecules that are cleaved by HtrA2 *in vitro*. The functional analysis is underway.

Research Subjects and Members of Laboratory for Motor System Neurodegeneration

1. Investigation of the mechanism underlying selective motor neuronal death induced by mutant SOD1
2. Functional analysis of Parkin, the gene responsible for autosomal recessive juvenile Parkinsonism (AR-JP)
3. Elucidation of the mechanism of action and the physiological role of inhibitor of apoptosis protein (IAP) family

Laboratory Head

Dr. Ryosuke TAKAHASHI

Research Scientists

Dr. Minako TATENO
Dr. Haruhisa INOUE
Dr. Makoto URUSHITANI
Dr. Yeon-Jeong KIM
Dr. Yasuhiro MORIWAKI

Technical Staff I

Ms. Mariko SODA
Ms. Hisako SADAKATA
Ms. Kayoko TSUKITA
Ms. Kazuko NIKI
Ms. Junko KURISU
Ms. Miho KATAMURA
Ms. Ayane KATAOKA
Ms. Sachiko IITA
Ms. Tomomi GOTO
Ms. Tomoko USAMI

Assistants

Ms. Chikako MAKINAE

Special Postdoctoral Researchers

Dr. Yasuyuki SUZUKI
Dr. Yuzuru IMAI

Junior Research Associates

Ms. Runa ARAYA

RIKEN/BSI Collaborators

Dr. Tsutomu HASHIKAWA (Lab. for Neural Architecture)
Dr. Shigeyoshi ITOHARA (Lab. for Behavioral Genetics)
Dr. Takaomi C. SAIDO (Lab. for Proteolytic Neuroscience)

Outside Collaborators

Dr. Toshihiko AOSAKI (Neural Circuits Dyn. Res. Group, Tokyo Metrop. Inst. Geront.)
Dr. Kinji HATAKEYAMA (Med. Inst. Bioregul., Kyusyu Univ.)
Dr. Nobutaka HATTORI (Sch. Med., Juntendo Univ.)
Dr. Shinsuke KATOH (Fac. Med., Tottori Univ.)
Dr. Masayuki MIURA (Grad. Sch. Pharm. Sci., Univ. Tokyo)
Dr. Masahiro NAGAO (Dep. Neurol., Tokyo Metrop. Neurol. Hospital)
Dr. Mikio SHOJI (Sch. Med. Okayama Univ.)

Visiting Scientists

Dr. Akihiro KAWATA (Dep. Neurol., Tokyo Metrop. Neurol. Hospital)
Dr. Hidemi MISAWA (Dep. Neurol., Tokyo Metrop. Inst. Neurosci.)
Dr. Takanori YOKOTA (Dep. Neurol. Neurol. Sci.,

Trainees

Ms. My Le HOANG (MIT, USA)

誌 上 発 表 Publications

[雑誌]

(原著論文) * 印は査読制度がある論文

- Yokota T., Sugawara K., Ito K., Takahashi R., Ariga H., and Mizusawa H.: “Down regulation of DJ-1 enhances cell death by oxidative stress, ER-stress, and proteasome inhibition”, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **312**, 1342–1348 (2003). *
- Inoue H., Tsukita K., Iwasato T., Suzuki Y., Tomioka M., Tateno M., Nagao M., Kawata A., Saido T. C., Miura M., Misawa H., Itohara S., and Takahashi R.: “The crucial role of caspase-9 in the disease progression of transgenic ALS mouse model”, *EMBO J.* **22**, 6665–6674 (2003). *
- Misawa H., Nakata K., Toda K., Matsuura J., Oda Y., Inoue H., Tateno M., and Takahashi R.: “VAcT-Cre.Fast and VAcT-Cre.Slow: Postnatal expression of Cre recombinase in somatomotor neurons with different onset”, *Genesis* **37**, 44–50 (2003). *
- Imai Y., Soda M., Murakami T., Shoji M., Abe K., and Takahashi R.: “A product of the human gene adjacent to parkin is a component of Lewy bodies and suppresses Pael receptor-induced cell death.”, *J. Biol. Chem.* **278**, 51901–51910 (2003). *
- Takahashi R. and Imai Y.: “Pael receptor, endoplasmic reticulum stress, and Parkinson’s disease”, *J. Neurol.* **250**, No. Suppl.3, pp. III/25–III/29 (2003). *
- Yokota T., Miyagishi M., Hino T., Matsumura R., Andrea T., Urushitani M., Rao R. V., Takahashi R., Bredesen D. E., Taira K., and Mizusawa H.: “siRNA-based inhibition specific for mutant SOD1 with single nucleotide alternation in familial ALS, compared with ribozyme and DNA enzyme”, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **314**, 283–291 (2004). *
- Suzuki Y., Takahashi-Niki K., Akagi T., Hashikawa T., and Takahashi R.: “Mitochondrial protease Omi/HtrA2 enhances caspase activation through multiple pathways.”, *Cell Death Differ.* **11**, 208–216 (2004). *
- (総 説)
- Takahashi R., Imai Y., Hattori N., and Mizuno Y.: “Parkin and endoplasmic reticulum stress”, *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **991**, 101–106 (2003).
- 今居譲, 高橋良輔: “小胞体ストレスとパーキンソン病”, *Dementia Jpn.* **17**, 8–13 (2003).
- 高橋良輔: “家族性パーキンソン病の分子機構”, *実験医学* **21**, 2452–2458 (2003).
- 今居譲: “小胞体ストレスと神経変性疾患”, *日本臨牀* **61**, Suppl. 9, pp. 77–82 (2003).
- 高橋良輔: “新しいショウジョウバエのパーキンソン病モデル

ルの作製”, *脳* **21** **6**, 204–206 (2003).

高橋良輔: “小胞体ストレスと Parkinson 病”, *医学のあゆみ* **208**, 504–508 (2004).

高橋良輔: “Parkin は「品質管理ユビキチンリガーゼ」か?”, *神経研究の進歩* **48**, 47–54 (2004).

口 頭 発 表 Oral Presentations

(国際会議等)

- Takahashi R.: “Misfolded protein and neurodegeneration”, Udall Research Center of Excellence Seminar Series, (Center for Neuroregeneration Research), Belmont, USA, Apr. (2003).
- Inoue H.: “Differential roles of caspases in the clinical course of ALS-mouse model”, *NeuroRegeneration and Molecular Neurobiology Lab Seminar*, Belmont, USA, July (2003).
- Takahashi R.: “The function of Parkin and Parkinson’s disease”, 9th Ann. Meet. of the Deutsche Gesellschaft fur Neurogenetik, Tübingen, Germany, Sept. (2003).
- Takahashi R.: “Parkinson’s disease and ER stress-from a study of autosomal recessive juvenile parkinsonism(AR-JP)”, 9th Samsung Int. Symp. on Molecular Medicine, Seoul, Korea, Sept. (2003).
- Imai Y., Soda M., Murakami T., Shoji M., Abe K., and Takahashi R.: “A gene product adjacent to Parkin, which suppresses the cell death by Pael receptor, is a component of Lewy bodies.”, *Cold Spring Harbor Laboratory 5th Meet. on Programmed Cell Death*, Cold Spring Harbor, USA, Sept. (2003).
- Suzuki Y., Niki K., Akagi T., Hashikawa T., and Takahashi R.: “A mitochondrial protease Omi/HtrA2 enhances caspase activation through multiple pathways”, *Cold Spring Harbor Laboratory 5th Meet. on Programmed Cell Death*, Cold Spring Harbor, USA, Sept. (2003).
- Imai Y., Soda M., Kataoka A., and Takahashi R.: “A gene adjacent to parkin is co-regulated with parkin and suppresses the cell death by pael receptor”, 33rd Ann. Meet. of Soc. for Neuroscience (Neuroscience 2003), New Orleans, USA, Nov. (2003).
- Takahashi R. and Suzuki Y.: “The mitochondrial protease Omi/HtrA2 promotes cell death through multiple pathways”, 3rd General Meet. of the Int. Proteolysis Soc., Nagoya, Nov. (2003).
- Takahashi R.: “The role of Parkin and its substrates in Parkinson’s disease”, 9th Neural Workshp Verbier, Verbier, Switzerland, Jan. (2004).
- (国内会議)
- 高橋良輔: “パーキンソン病発症の分子モデル”, 第 26 回日本医学会総会, 福岡, 4 月 (2003).
- 館野美成子, 高橋良輔: “GluR2 過剰発現による G93A SOD1-Tg マウスにおける ALS 発症遅延効果”, 第 44 回日本神経学会総会, 横浜, 5 月 (2003).
- 漆谷真, 栗栖純子, 今居譲, 高橋良輔: “Hsp70 結合タンパク CHIP は変異 SOD1 のユビキチン化促進因子である”, 第 44 回日本神経学会総会, 横浜, 5 月 (2003).

- 村上哲郎, 瓦林毅, 松原悦朗, 永野功, 今居譲, 東海林幹夫, 高橋良輔, 阿部康二: “パーキンソン病および多系統萎縮症における Parkin の関与”, 第 44 回日本神経学会総会, 横浜, 5 月 (2003).
- 井上治久, 岩里琢治, 宇佐美智子, 月田香代子, 糸原重美, 三浦正幸, 三澤日出巳, 高橋良輔: “抗アポトーシス分子 p35 は ALS マウスの発症時期を遅延させ生存期間を延長する”, 第 44 回日本神経学会総会, 横浜, 5 月 (2003).
- 高橋良輔: “家族性パーキンソン病の分子機構”, 平野朝雄教授神経病理セミナー, (北野病院), 大阪, 5 月 (2003).
- 高橋良輔: “家族性パーキンソン病の分子メカニズム”, 第 26 回日本基礎老化学会大会, 名古屋, 6 月 (2003).
- 高橋良輔, 鈴木泰行, 井上治久: “A novel mitochondrial cell death factor HtrA2 and neuronal death”, 第 26 回日本神経科学大会, 名古屋, 7 月 (2003).
- 関根啓子, Hao Y., 高橋良輔, 鶴尾隆, 内藤幹彦: “アポトーシス誘導時における HtrA2 による Apollon の切断”, 第 62 回日本癌学会総会, 名古屋, 9 月 (2003).
- 今居譲: “Parkinsons disease and ER stress from a study of AR-JP”, 第 46 回日本神経化学学会年会・第 41 回日本生物物理学会年会合同年会, 新潟, 9 月 (2003).
- 鈴木泰行, 高橋良輔: “ミトコンドリアプロテアーゼ, Omi/HtrA2 による細胞死誘導”, 平成 15 年度生理学研究所研究会「細胞死の誘導と制御・その分子機構と生理病理機能」, 岡崎, 9 月 (2003).
- 高橋良輔, 鈴木泰行: “IAP family proteins regulate cell death through proteolysis”, 第 76 回日本生化学会大会, 横浜, 10 月 (2003).
- 高橋良輔: “小胞体での蛋白分解 (ERAD) と神経細胞死”, 第 8 回金沢神経科学シンポジウム「神経幹細胞」, 金沢, 10 月 (2003).
- 鈴木泰行: “IAP とその阻害因子による細胞死制御”, 産業技術総合研究所セミナー, つくば, 11 月 (2003).
- 高橋良輔: “家族性パーキンソン病の分子機構”, 第 10 回弘前大学遺伝子実験施設シンポジウム, 弘前, 11 月 (2003).
- 高橋良輔: “タンパク質の品質管理とパーキン”, 平成 15 年度熊本大学大学院セミナー, 熊本, 11 月 (2003).
- 高橋良輔: “家族性パーキンソン病の分子機構”, 平成 15 年度後期北海道大学大学院生化学共通講義, 札幌, 11 月 (2003).
- 今居譲: “Parkin と異常タンパク質による神経細胞死”, 第 26 回日本分子生物学会年会, 神戸, 12 月 (2003).
- 鈴木泰行, 仁木加寿子, 赤木巧, 端川勉, 高橋良輔: “ミトコンドリアプロテアーゼ Omi/HtrA2 によるカスパーゼ活性化メカニズム”, 第 26 回日本分子生物学会年会, 神戸, 12 月 (2003).
- 高橋良輔: “Pael 受容体と神経変性”, 第 22 回高峰カンファレンス, (三共生命科学研究振興財団), 東京, 2 月 (2004).
- 高橋良輔: “小胞体ストレスによる神経変性のシグナル伝達機構”, 第 77 回日本薬理学会年会, 大阪, 3 月 (2004).