

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を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の遺伝子治療の基礎研究を疾患モデル動物を使って推進する。さらに IAP の作用メカニズムの解明を通じて、神経変性疾患の治療薬となるアポトーシス阻害剤開発への道を開きたい。

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, 山崎, 杉本, 宇佐美, 月田; 糸原 (行動遺伝学技術研究開発チーム))

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 60 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 8 年以上を経た現在も全くの謎である。

(1) 変異 SOD1 の選択的運動ニューロン毒性の分子細胞生物学的解析

これまで変異 SOD1 特異的に毒性を示す培養細胞系の報告はいくつかあるが分子生物学的、生化学的に変異 SOD1 の機能解析が行いうる系はまだ確立されていない。我々は変異 SOD1 を発現し、はっきりした毒性を示す培養細胞系の確立をめざす。本年度はマウスで脊髄運動ニューロンが約 5 ~ 10% にエンリッチされ、4 週間以上生存する初代培養

系を確立した。

一方野性型および変異 SOD1 を発現するアデノウイルスベクターのコンストラクトを作製したので、アデノウイルスで変異 SOD1 を培養脊髄運動ニューロンに発現させ、毒性を発揮するかどうか観察する。

一方、我々はヒト剖検脳材料より、SOD1 の alternative transcript を発見した。SOD1 は 5 つの exon によってコードされる遺伝子であるが、我々は exon 2 および exon 2 + 3 を skip する alternative transcript を見いだした。これらの mRNA の組織分布は野生型と同様、ubiquitous であった。(「Neuroreport」, 2000) またこれらの mRNA は C 末端を欠損する異常な SOD1 タンパクをコードしているが、実際にタンパクが生体内で発現しているかどうか、特異的抗体を作製し、検討中である。

(2) 運動ニューロン特異的遺伝子発現・ノックアウトマウス系の確立

SOD1 の毒性メカニズムを解析する上で現在最も信頼できる実験系は変異 SOD1 のトランスジェニックマウス (Tg マウス) である。変異 SOD1 Tg マウスはヒトと類似の運動ニューロン疾患を発症して死亡する。我々は運動ニューロンの選択的脆弱性や細胞死に関与する遺伝子を過剰発現、あるいは欠損するマウスを発生工学的に作製する。次にこれらのマウスを変異 SOD1 Tg マウスと掛け合わせることで運動ニューロン変性への影響を観察する。この実験によって SOD1 の毒性のメカニズムに迫れるとともに治療へのヒントも得られものと期待される。昨年度は運動ニューロンを代表とするコリン作動性ニューロンに特異的に発現するコリンアセチル転移酵素 (ChAT) のプロモーター領域を用いた transgene 用のコンストラクトを作製した。本年度は運動ニューロン特異的遺伝子ノックアウトシステム確立のため、ChAT プロモータの下流で P1 バクテリオファージの Cre リコンビナーゼを発現するマウス (ChAT-Cre マウス) を作製した。このマウスと遺伝子組換えが起こると lacZ を発現するレポーターマウス (CAG-CAT-Z マウス) を掛け合わせたとこ、脊髄運動ニューロン、脳幹の神経核、前脳基底部などのコリン作動性ニューロンで Cre による遺伝子組換えが起こる一方、大脳皮質や小脳ではほとんど組換えがみられなかった。現在、詳細な組換え部位の分布について検討しているが、ほぼコリン作動性ニューロン特異的に遺伝子組換えの起こるマウスを作製できたと考えている。(東京都神経研の三澤日出巳博士との共同研究)

(3) 変異 SOD1 Tg マウスの Genechip による解析

変異 SOD1 の毒性メカニズムを探る上で、運動ニューロン変性にともなう遺伝子発現の変化を網羅的に調べることは大変有用な情報を提供してくれると期待される。そこで、変異 SOD1 Tg マウスおよび同胞のマウスの脊髄から mRNA

を抽出し、Genechip を用いて遺伝子発現の変化を比較する。本年度は High-copy および Low-copy の変異 SOD1Tg マウスで共通して変化する遺伝子を数十個同定した。

2. 常染色体劣性若年性パーキンソニズム (AR-JP) の責任遺伝子, Parkin の機能解析 (今居, 祖田, 程, 植木)

常染色体劣性若年性パーキンソニズム (autosomal recessive juvenile parkinsonism: AR-JP) 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, AP-JP 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。

(1) Parkin の生理機能の解析

近年 RING-finger モチーフを持つ多くのタンパク質がユビキチン・プロテアソームタンパク分解経路に関わるユビキチンリガーゼ (E3) という酵素であることが判明した。ユビキチンリガーゼの機能は RING-finger モチーフで特異的にユビキチン結合酵素 (E2) と結合し, それ以外の部位で特異的に基質タンパク質と相互作用して, 基質タンパク質のユビキチン化を促進することである。本年度, 我々は Parkin がユビキチン結合酵素である UbcH7 および UbcH8 と結合し, 神経細胞内の未同定の基質をユビキチン化する E3 ユビキチンリガーゼであることを明らかにした。一方, 小胞体でのタンパク質のフォールディングの阻害により, unfolded protein stress という細胞へのストレスがかかり, 一群の遺伝子の転写が亢進する (unfolded protein response) ことが知られるが, Parkin は unfolded protein stress によって転写が亢進し, タンパク量も増加することが分かった。さらに Parkin を神経系の細胞で過剰発現すると, unfolded protein stress による細胞死を防ぐことも判明した。面白いことにこの細胞死抑制効果は E3 活性に依存していた。おそらく Parkin は小胞体で生じたフォールディング異常を起こしたタンパクを E3 活性によって分解し, 細胞死を防ぐのではないかと考えられる。我々は以上の実験データに基づき, Parkin の機能が失われることによって, unfolded protein stress に対して黒質細胞が脆弱になり細胞死に陥り, AR-JP を発症するとの仮説を提唱している。 (「J. Biol. Chem.」, 2000)

(2) Parkin 結合タンパクのクローニングとその解析

Parkin が特異的にユビキチン化し, 分解する基質を同定するため, Yeast two-hybrid screening による結合タンパクのクローニングを行った。その結果, Parkin によって *in vitro* でも *in vivo* でもユビキチン化される基質の有力な候補となる膜タンパクを同定した。現在, 順天堂大学・水野美邦教授との共同研究で, AR-JP 患者脳でこの膜タンパクの分解が阻害され, 蓄積されるかどうか検討中である。

(3) Parkin ノックアウトマウスの作製・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ため, Parkin ノックアウトマウスを作製する計画である。

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, 中林, 新家, 瀧尾 (生体分子解析室))

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, カスパースの阻害因子であることを明らかにした。XIAP の更なる機能解析をすすめ, その生理的役割および疾患治療への応用の可能性を探るため, 下記を計画する。

(1) XIAP のアポトーシス阻害メカニズムの解明

我々はすでに XIAP の BIR2 と呼ばれる領域にカスパー 3, 7 を阻害する活性があることを見いだした。その詳細なカスパー阻害活性を明らかにし, 新規のカスパー阻害剤開発への道を開きたい。本年度は BIR2 領域がカスパー 3 に対しては拮抗的阻害因子, カスパー 7 に対しては拮抗・非拮抗の混合型阻害因子として働くことを見だし, 拮抗, 非拮抗的阻害に関わる BIR2 領域内の部位の同定に成功した。

一方, XIAP も前述の Parkin と同様, RING-finger モチーフを有する。我々は XIAP が *in vitro* で, カスパー 3, 7, 9 すべてをユビキチン化する E3 ユビキチンリガーゼ活性を有するが, *in vivo* ではカスパー 3 を主としてユビキチン化, 分解することを明らかにした。さらにカスパー 3 を分解する E3 活性が XIAP のアポトーシス阻害効果を高めることを見いだした。

(2) XIAP 結合タンパクのクローニングとその解析

XIAP は強力なカスパー阻害因子であり, BIR 領域がその機能を担っていることが明らかになったが, 他の IAP 分子ではカスパー阻害あるいはアポトーシス阻害以外の重要な生物学的役割があることが示されている。また IAP の機能を増強したり, 阻害したりする修飾因子の存在の可能性も示唆されている。XIAP の新たな機能や修飾因子を探索するため, 哺乳類培養細胞で過剰発現した XIAP に結合する約 30 kDa のタンパクを二次元電気泳動で分離した。このタンパク質の同定をエドマン分解によるアミノ酸シーケンス, および質量分析により, 行っている。このタンパク質がカスパーをはじめとする既知の XIAP 結合タンパクでないことは確認できた段階である。

(3) 神経系に発現する新規 IAP 分子のクローニング

ヒトの IAP 分子中, XIAP 以上に強力なカスパー阻害作用を有する分子はない。しかし XIAP のノックアウトマウスは無症状であったと報告されている。一方ハエの XIAP に相当する DIAP1 を欠損すると神経系をふくめ全身で発生過程のアポトーシスが過剰となり死亡する。このことより,

ヒトにおいて XIAP の欠損を補うような未知のカススペース阻害因子が存在していると考えられる。この因子のクローニングを yeast two-hybrid 法を用い、活性化型カススペース 7 との結合を指標として行った。これまで IAP のホモログは同定できていないが、*in vitro*, *in vivo* でカススペース 3 および 7 の新たな基質となるタンパク質のクローニングに成功した。

誌 上 発 表 Publications

(原著論文) * 印は査読制度がある論文誌

Imai Y., Soda M., and Takahashi R.: "Parkin suppresses unfolded protein stress-induced cell death through its E3 ubiquitin-protein ligase activity", *J. Biol. Chem.* **275**, 35661–35664 (2000). *

Kawata A., Kato S., Shimizu T., Hayashi H., Hirai S., Misawa H., and Takahashi R.: "Aberrant splicing of human Cu/Zn superoxide dismutase (SOD1) RNA transcripts", *NeuroReport* **11**, 2649–2653 (2000). *

(総 説)

高橋良輔: "IAP の作用メカニズムと神経細胞死防御", *生体の科学* **51**, 273–278 (2000).

口 頭 発 表 Oral Presentations

(国際会議等)

Takahashi R.: "Molecular mechanism of familial Parkinson's disease: Functional analysis of Parkin", BRI Seminar, (Blood Research Institute), Milwaukee, USA, Dec. (2000).

(国内会議)

鈴木泰行, 高橋良輔: "アポトーシス阻害タンパク XIAP によるカススペース阻害メカニズム", 第 41 回日本神経学会総会, 松本, 5 月 (2000).

高橋良輔, 鈴木泰行, 中林ゆい: "内因性カススペース阻害因子 XIAP の作用メカニズム", 第 7 回 FACS New Technology Seminar, (日本ベクトン・ディキンソン, 藤沢薬品工業), 豊中, 6 月 (2000).

鈴木泰行, 中林ゆい, 高橋良輔: "XIAP によるカススペース阻害の分子メカニズム", 第 59 回日本癌学会総会, 横浜, 10 月 (2000).

今居譲, 祖田真理子, 高橋良輔: "Parkin suppresses unfolded protein stress-induced cell death through its E3 ubiquitin-protein ligase activity", 第 23 回日本分子生物学会年会, 神戸, 12 月 (2000).

鈴木泰行, 中林ゆい, 高橋良輔: "XIAP のユビキチンリガーゼ活性による Caspase-3 の分解と抗アポトーシス作用の増強", 第 23 回日本分子生物学会年会, 神戸, 12 月 (2000).

石田和之, 竹内博明, 高橋良輔, 吉村和法, 山田正仁, 水澤英洋: "末梢神経障害を呈するリンパ腫患者血清の自己抗体が認識する抗原の検討", 第 23 回日本分子生物学会年会, 神戸, 12 月 (2000).

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

Staff Scientists

Dr. Yasuyuki SUZUKI

Dr. Yuzuru IMAI

Dr. Minako TATENO

Dr. Haruhisa INOUE

Dr. Makoto URUSHITANI

Technical Staffs

Ms. Noriyo YAMAZAKI

Ms. Yui NAKABAYASHI

Ms. Mariko SODA

Ms. Hisako SUGIMOTO

Mr. Xi-tong SCHENG

Ms. Tomoko USAMI

Ms. Kayoko TSUKITA

Ms. Reiko UEKI

Assistants

Ms. Harumi TANIGUCHI

Ms. Eiko SUGAWARA

Junior Research Associates

Ms. Runa ARAYA

Visiting Scientists

Dr. Hiroto MATSUMINE (Juntendo Univ.)

Dr. Akihiro KAWATA (Tokyo Metro. Neurol. Hosp.)

Dr. Hidemi MISAWA (Tokyo Metro. Inst. Neurosci.)

Dr. Yukio MIYAZAKI (Tokyo Metro. Neurol. Hosp.)

Dr. Takanori YOKOTA (Tokyo Medical Dental Univ.)

Dr. Tastuya KISHINO (Nagasaki Univ.)

Collaborators

Dr. Shigeyoshi ITOHARA (Lab. for Behavioral Genetics, BSI)

Dr. Yoshikuni MIZUNO (Juntendo Univ.)

Dr. Koji TAKIO (Biomolecular Characterization Div.)