

平成 21 年 5 月 18 日現在

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2007～2008

課題番号：19590067

研究課題名（和文） 赤核脊髄路 小脳におけるパーキンの発現分布および神経伝達における機能解析

研究課題名（英文） Expression and function of parkin in neurotransmission in red nucleus

研究代表者

野田 百美

九州大学・大学院薬学研究院・准教授

研究者番号：80127985

研究成果の概要：

パーキンソン病原因遺伝子の一つであり、ユビキチン・プロテアソーム系で働くユビキチン・リガーゼ酵素・パーキンは、神経伝達物質の受容体の一つ、イオンチャンネル型 ATP（アデノシン三リン酸）受容体（P2X受容体）に作用し、P2X受容体反応を有意に増強させることがわかった。また、P2X受容体のうち、P2X4を発現していない上頸交換神経節細胞ではパーキンによる増強作用が見られなかったことから、パーキンはP2X4を含むタイプの受容体（主にP2X6とのヘテロマー）に作用すると考えられた。そこで、以下のことを明らかにした。

#### 1) P2X4/6受容体サブタイプとパーキンの共発現：

赤核におけるパーキンおよびP2X4受容体の局在を免疫組織染色で詳細に観察したところ、小細胞・大細胞があるうち、主に25 μm以上の大細胞で共発現していた。

#### 2) パーキン・P2X4受容体が発現する神経細胞と神経伝達物質：

パーキン及びP2X4受容体が発現する大細胞がどのタイプの神経細胞であるかを同定するため、シナプス小胞の各種神経伝達物質トランスポーターの抗体を用いて組織免疫染色を行ったところ、大細胞の多くがコリン作動性、グルタミン酸作動性であり、GABA作動性神経細胞のマーカーではあまり染まらなかった。

#### 3) パーキンとP2X受容体の機能解明：

赤核脊髄路・小脳におけるシナプス伝達に、多様な神経伝達物質と一緒に放出されると考えられているATPとその受容体（P2X4/6）がどのように関与しているのかを電気生理学的に検証した。

ATPの還流方法は局所投与にした。大細胞に発現するP2X受容体の反応を検出できた。P2X4サブタイプに効き反応を増大させるイベルメクチンを作用させたところ、観察されたATP誘導電流は大きくなった。従って、少なくとも赤核大細胞にはP2X4を含むイオンチャンネル型受容体が発現しており、機能していることが示唆された。

今後、パーキン欠損マウスを使用するか、パッチ電極内にパーキン抗体を入れてパーキンを阻害することにより、観察されるATP誘導電流が小さいかどうかを検討する必要がある。

交付額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	2,800,000	840,000	3,640,000
2008年度	700,000	210,000	910,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：医歯薬学  
科研費の分科・細目：生物系薬学  
キーワード：神経生物学

### 1. 研究開始当初の背景

パーキンソン病原因遺伝子はいくつかあるが、その中にユビキチンC末端水解酵素(UCHL1)とパーキンがあり、いずれもユビキチン・プロテアソーム系で働く酵素である。パーキンは染色体劣性遺伝性家族性パーキンソン病 (AR-JP) の原因遺伝子として 1998 年に日本人家系から見つかったもので、ユビキチン・リガーゼの一つである。生理的には、神経伝達に重要な役割を持つであろう、と予想されており、事実、シナプス小胞に発現していることが示されている (Kubo et al., 2001)。我々は培養神経様細胞 (PC12細胞) を用いた系で、パーキンソン病原因遺伝子である UCHL1 とパーキンがいずれも神経伝達物質の受容体の一つ、イオンチャンネル型 ATP (アデノシン三リン酸) 受容体 (P2X 受容体) に作用し、P2X 受容体反応を有意に増強させることを示した (Manago et al., 2005; Sato et al., 2006)。また、パーキンソン病患者で報告されているパーキンの変異体を導入した細胞では、野生型で見られたような、受容体反応増強作用がないことが明らかとなった。P2X 受容体はシナプス前終末で神経伝達物質の放出を制御していることが報告されており、以上の結果はパーキンが神経伝達物質の放出に関与している可能性を示唆している。このような細胞レベルの結果を踏まえ、実際に脳においてパーキンと P2X 受容体に関連しているのか、或いはシナプス機能に関与しているのかどうかを確認するのが重要な課題であると考えた。それを明らかにすることによって、パーキンの機能不全によるパーキンソン病発症のメカニズムを解明する手がかりになるのではないかと考えた。

### 2. 研究の目的

パーキンが脳のどの部位に局在しているのか、パーキンと P2X 受容体は脳で本当に関連しているのか、に焦点を当て、以下のことを明らかにした。

- 1) パーキンの脳内局在
- 2) P2X4/6 受容体サブタイプとパーキンの共発現
- 3) パーキンと P2X 受容体の機能解明

### 3. 研究の方法

1) パーキンおよび P2X 受容体サブタイプの脳内局在：  
赤核および小脳にパーキンと P2X4 受容体が

強く共発現することが示唆されたので、各脳部位における局在、細胞内局在を詳細に検討した。また、他の P2X 受容体サブタイプとは共発現しないのかどうかについても検討した。

#### 免疫組織学的方法：

マウスを灌流・固定した後、脳の凍結切片を作成し、目的タンパク質の 1 次抗体および蛍光標識した 2 次抗体を用いて免疫組織学的に染色したものを共同設備の共焦点レーザー顕微鏡で観察・撮影した。

### 2) P2X 受容体の機能解析およびパーキンによる制御検討

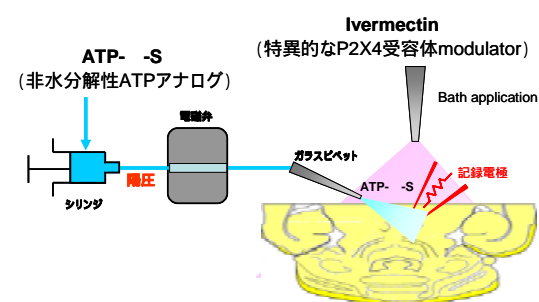
P2X 受容体のうち、パーキンによって反応増強がみられると思われる P2X4/6 サブタイプが赤核脊髄路 小脳でパーキンと共発現していることが確認できれば、その生理的意味を明らかにした。

#### 電気生理学的方法：

##### スライスパッチ法による検討：

P2X 受容体反応とパーキンの関係をより生体内に近い状態で証明するべく、赤核を含むスライス標本を作成し、運動ニューロンである大細胞で ATP による反応 (電流変化) が観察されるかどうかを検討した。ATP は局所投与を工夫した。

また、P2X4 サブタイプを含む ATP 受容体の反応であることを確認するため、P2X4 に特異的に作用して反応を増強させるイベルメクチンを用い、薬理的に検討した。



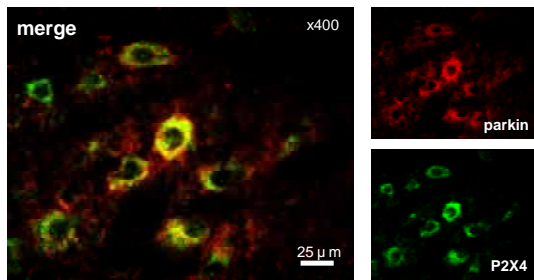
### 4. 研究成果

パーキンソン病原因遺伝子の一つであり、ユビキチン・プロテアソーム系で働くユビキチン・リガーゼ酵素・パーキンは、神経伝達物質の受容体の一つ、イオンチャンネル型 ATP (アデノシン三リン酸) 受容体 (P2X 受容体) に作用し、P2X 受容

体反応を有意に増強させることがわかった。また、P2X受容体のうち、P2X4を発現していない上頸交換神経節細胞ではパーキンによる増強作用が見られなかったことから、パーキンはP2X4を含むタイプの受容体(主にP2X6とのヘテロマー)に作用すると考えられた。そこで、以下のことを明らかにした。

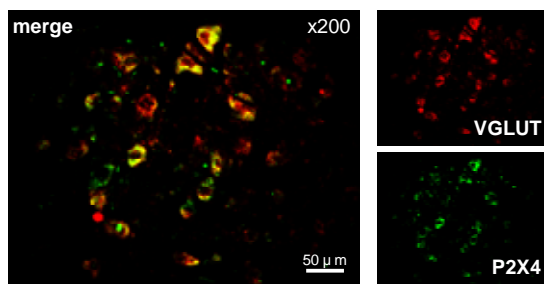
1) P2X4/6受容体サブタイプとパーキンの共発現:

赤核におけるパーキンおよびP2X4受容体の局在を免疫組織染色で詳細に観察したところ、小細胞・大細胞があるうち、主に25 μm以上の大細胞で共発現していた。

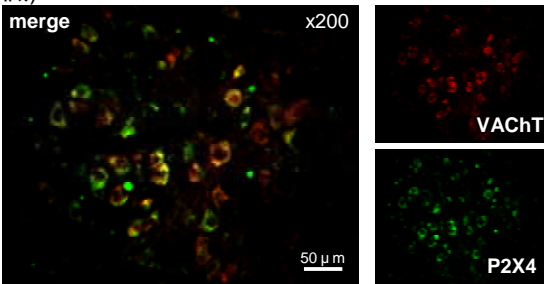


2) パーキン・P2X4受容体が発現する神経細胞と神経伝達物質:

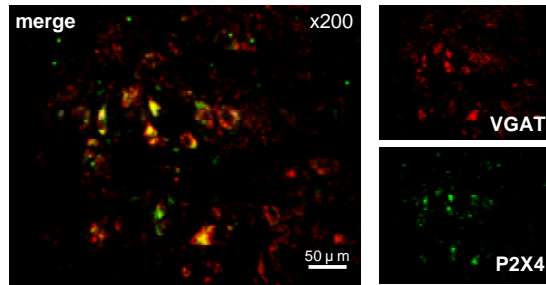
パーキン及びP2X4受容体が発現する大細胞がどのタイプの神経細胞であるかを同定するため、シナプス小胞の各種神経伝達物質トランスポーターの抗体を用いて組織免疫染色を行ったところ、大細胞の多くがコリン作動性、グルタミン酸作動性であり、GABA作動性神経細胞のマーカーではそれほど染まらなかった。



(VGluT:グルタミン酸作動性神経細胞を標識)



(VAcHt: コリン作動性神経細胞を標識)

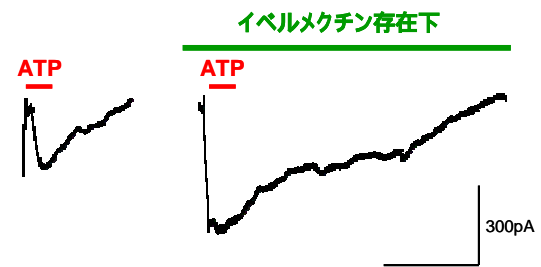


(VGAT:GABA作動性神経細胞を標識)

3) パーキンとP2X受容体の機能解明:

赤核脊髓路・小脳におけるシナプス伝達に、多様な神経伝達物質と一緒に放出されると考えられているATPとその受容体(P2X4/6)がどのように関与しているのかを電気生理学的に検証した。

膜電位固定下、保持電位-60 mV で大細胞に発現する P2X 受容体の反応(電流変化)を検出できた。P2X4サブタイプに効き反応を増大させるイベルメクチンを作用させたところ、観察された ATP 誘導電流は大きくなった。従って、少なくとも赤核大細胞にはP2X4を含むイオンチャンネル型受容体が発現しており、機能していることが示唆された。



今後、パーキン欠損マウスを使用するか、パッチ電極内にパーキン抗体を入れてパーキンを阻害することにより、観察される ATP 誘導電流が小さいかどうかを検討する必要がある。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計1件)

1. Noda M, Mizuho A, Kido A.M, Fujita K, Seike T, Tanaka T and Higashida H. Double-label immunofluorescent staining of CD38 and oxytocin in the mouse hypothalamus. *Nature Protocols*. DOI: 10.1038/nprot.2007.166 (2007) 査読無

(学会発表)(計 3件)

1. Neuro2007 (第30回日本神経科学大会・第50回日本神経化学会大会・第17回日本神経回路学会大会)(横浜)平成19年9月11日  
Y. Kamiyama, K. Fujita, T. Seike, M. Kido, T. Tanaka, H. Higashida, M. Noda.  
Immunohistochemistry of CD38 in hypothalamus.
2. 第59回西日本生理学会 平成20年10月3日(福岡)  
藤田 慶大、清家 稔博、山川 裕希子、大野 みずき、山口 浩雄、山田 英孝、高木 厚司、城戸 瑞穂、中別府 雄作、野田 百美  
水素水はパーキンソン病モデルマウスにおいてドパミン神経細胞死を抑制する
3. 薬学若手研究者セミナー 平成20年11月28日(九州大学)  
Kyota Fujita, Toshihiro Seike, Yukiko Yamakawa, Mizuki Ohno, Hiroo Yamaguchi, Hideyuki Yamada, Atsushi Takaki, Mizuho Kido, Yusaku Nakabeppu and Mami Noda  
Effects of hydrogen in drinking water on a mouse model of Parkinson's Disease

(図書)(計 1件)

野田百美:パーキンの機能:生理学的アプローチから、最新医学 特集 パーキンソン病 - 最近の進歩、最新医学社、p1643-1648(2007)

6. 研究組織

(1)研究代表者

野田 百美 (NODA MAMI)  
九州大学・大学院薬学研究院・准教授  
研究者番号: 80127985

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者

城戸 瑞穂 (KIDO MIZUHO)  
九州大学大学院歯学研究院・准教授  
研究者番号: 60253457