

図2 ドミナントネガティブSEK1による細胞死の阻害

しめした⁵ (図2)。一方、GFP-DN-SEK1発現ベクターのトランスフェクションでは、GFPポジティブな細胞の80%以上の細胞が健康な形態をとっていた⁵ (図2)。また、これらの健康にみえるGFP-DN-SEK1を発現した細胞ではc-Junの活性化は観察されず、実際にSEK1-JNKのカスケードがブロックされていると考えられた。さらに、核外移行シグナルをつないで核外に発現させたDN-SEK1では、このようなQ79による細胞死に対する阻害効果は認められなかった⁵。以上の結果を総合して、我々は、核内で凝集したポリグルタミンがSEK1を活性化して、神経細胞の細胞死を引き起こすと結論した。

考察と今後の展望

本年度の研究では、培養神経細胞を用いたポリグルタ

ミン病のモデル系の構築に成功し、ポリグルタミンが引き起こす神経細胞死を分子レベルで解析する見通しがたってきた。今後、ポリグルタミンが引き起こす細胞死の分子機構をより詳細に解析し、SEK1が活性化される分子機構やそれがどのようにCPP32の活性化に繋がって行くかというような点を明らかにしていく。加えて、現在進行中のモデル動物 (マウス・ドロソフィラ) を作り上げる計画を押し進め、多角的にポリグルタミンが引き起こす神経変性・細胞死の解析を進めていく。

文献

- (1) Kawaguchi Y, Okamoto, T, Taniwaki M, et al.: CAG expansions in a novel gene for Machado-Joseph disease at chromosome 14q32.1 *Nature Genetics*, 8: 221-228, 1994
- (2) Kakizuka A: Protein Precipitation: A common etiology in neurodegenerative disorders? *Trends in Genetics*, 14: 396-402, 1998
- (3) Ikeda H, Yamaguchi M, Sugai S, et al.: Expanded polyglutamine in the Machado-Joseph disease protein induces cell death in vitro and in vivo. *Nature Genetics*, 13: 196-202, 1996
- (4) Gossen M, Bujard H: Tight control of gene expression in mammalian cells by tetracycline-responsive promoters. *Natl. Acad. Sci. USA* 89: 5547- 5551, 1992
- (5) Yasuda S, Inoue K, Hirabayashi M, et al.: Nuclearly accumulated polyglutamine activates SEK1 and induces cell death in neuronal PC12 cells. (in revision)
- (6) Fernandes-Alnemri T, Litwack G, Alnemri ES: CPP32, a novel human apoptotic protein with homology to *Caenorhabditis elegans* cell death protein Ced-3 and Mammalian Interleukin-1 β -converting enzyme. *J. Biol. Chem.* 269: 30761- 30764, 1994
- (7) Davis RJ: MAPKs: new JNK expands the group. *Trends Biochem. Sci.* 19: 470-473, 1994
- (8) Sanchez I, Hughes RT, Mayer BJ, et al.: Role of SAPK/ERK kinase-1 in the stress-activated pathway regulating transcription factor c-jun. *Nature* 372: 794-798, 1994

Abstract

Molecular analysis of polyglutamine-induced cell death

by

Akira Kakizuka

from

Osaka Bioscience Institute

A novel class of inherited neurodegenerations is now known to be caused by expanded CAG repeats encoding polyglutamines. We report here the characterization of polyglutamine-expressing PC12 neuronal cells, in which nuclear but not cytoplasmic polyglutamine aggregations appear to activate SEK1, which consequently triggers cell death. Cell death was inhibited by a dominant-negative SEK1, but not by a nuclear export signal-tagged dominant-negative SEK1. In addition, spontaneously arisen death-resistant cells contain cytoplasmic, but not nuclear polyglutamine aggregations. This study represents a direct molecular link between commonly expanded polyglutamines from human hereditary neurodegenerations and cell death signalling kinase cascades.

歯状核赤核・淡蒼球ルイ体萎縮症蛋白の伸長ポリグルタミン鎖のアデノ

ウイルスベクターを用いた発現による神経細胞障害機構の解析

辻 省次 佐藤 晶 下畑享良 小出玲爾 高野弘基

小宅陸郎 佐藤俊哉 五十嵐修一 田中恵子 犬塚 貴

はじめに

歯状核赤核・淡蒼球ルイ体萎縮症(以下DRPLA)は、常染色体優性遺伝形式の神経変性疾患で、spinocerebellar ataxia (SCA)1¹⁾, SCA2^{2,4)}, SCA6⁵⁾, SCA7⁶⁾, Machado-Joseph disease (MJD)⁷⁾, spinal and bulbar muscular atrophy⁸⁾, Huntington's disease (HD)⁹⁾と同様、翻訳領域内のCAGリピートの異常な伸長によって引き起こされるいわゆるCAGリピート病^{10,11)}である。これらに共通の病態としてポリグルタミン鎖を有する蛋白の神経細胞に対するgain of toxic functionのメカニズムが想定されており、培養細胞におけるMJD, DRPLA, SCA1 およびHDの蛋白発現実験からポリグルタミン鎖を含む蛋白断片の細胞障害がCAGリピート病の共通の病態であることが想定されている。一方、伸長したCAGリピートを有するHDの原因遺伝子のエクソン1を導入したトランスジェニックマウスにおいて、神経細胞内に核内封入体(NII)が見い出された¹²⁾のに続き、HD¹³⁾, MJD¹⁴⁾, DRPLA¹⁵⁾, SCA7¹⁶⁾, SBMA¹⁷⁾の剖検例においても中枢神経の病変部位にNIIが発見され、NIIがCAGリピート病の発症機構の重要な役割を担っている可能性がある。我々は、正常または伸長したポリグルタミン鎖を含む蛋白の断片または全長の神経細胞に対する作用を解析しCAGリピート病の神経細胞障害機構を明らかにすることを目的として、アデノウイルスベクターを用いて神経系培養細胞について発現実験を行った。

対象および方法

1. アデノウイルスベクターの作成

COS-TPC (cosmid cassettes and adenovirus DNA terminal protein complex) 法に従い、(CAG)15及び(CAG)78と、その上流33塩基対、下流の21塩基対を含むDRPLA cDNA断片を有するアデノウイルスベクター、および(CAG)15及び(CAG)78を含む全長cDNAを含むアデノウイルスベクターを作成した。tagとして5'側にFLAGをコードする配列を付加した。(CAG)15及び(CAG)78を含むDNAを用いて作成した組み換えアデノウイルスの内、リピート数が正しく保たれているクローンを増殖・精製し

た。ウイルス感染の対照としてlacZを含むAdex1CALacZを用いた。

2. 培養細胞への感染

PC12細胞及び分化型PC12細胞は、チャンバースライドで $1 \times 10^4/cm^2$ の密度で培養した。培地は5%FBS, 10%馬血清(HS)を含むDMEMを用い、分化型PC12細胞を誘導するために、50ng/mlの2.5S NGFと1%HSを含むDMEMで10-12日間培養した。正常ヒト線維芽細胞は10%FBS-DMEMを用い培養し、感染前日にチャンバースライド上に 1×10^4 cell/cm²でまいた。培地を除去した細胞に 10^6 pfu/100 μ lのウイルス液を加え37°Cで1h感染させ、培地を加え培養した。

3. 組織化学

Adex1CALacZを感染させた細胞は4%paraformaldehyde(4PFA)で2h固定し、1mg/ml β -D-galactosideを添加し、37°C 2h反応させた。DRPLA蛋白断片を発現させた細胞は同様に固定した後10%ヤギ血清, 0.02% triton X-100を含むPBSで室温で1h処理し、抗FLAG抗体(x1000)を2h反応させた後ロダミンラベル2次抗体(x200)を1h反応させた。Hoechst33342を添加し核染色を行った。

In Situ細胞死検出キットを用いてTUNEL法を行った。抗FLAG抗体陽性細胞200個中のTUNEL陽性率を計算した。

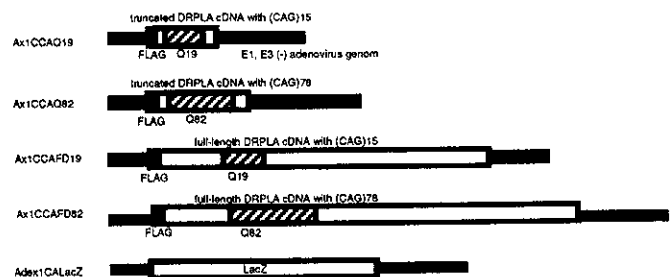


図1. アデノウイルスベクターのゲノム

結果

線維芽細胞においては正常蛋白断片は細胞質に均一に存在したが、変異蛋白断片を発現させると細胞内に凝集体形成を認めた。凝集体が核内に存

在した細胞は3日目には31 ± 21%, 6日目には52 ± 35%, 9日目には71 ± 23%であった。変異蛋白断片を発現させた線維芽細胞の維芽細胞で4日後に100%の陽性率が得られた。

分化型PC12細胞にAx1CAAQ82を感染させ3日後にはFLAG陽性細胞のうち97.7%の細胞に球形の核内封入体が認められ、0.3%の細胞において細胞質にaggregate bodyを認めた。核内封入体は6日目、9日目には99%以上の細胞に存在した。Ax1CAAQ19を感染させた分化型PC12細胞は細胞が均一に染色され、aggregate bodyは認められなかった。Ax1CAAQ82を感染させた分化型PC12細胞のTUNEL陽性率は感染3日後で4.7 ± 3.1%, 6日後は39.0 ± 16.1%, 9日後には70.1 ± 11.0%と著明に増加した。Ax1CAAQ19を感染させた細胞ではそれぞれ5.7 ± 6.4%, 14.3 ± 8.1%, 19.7 ± 8.6%であり、Adex1CALacZを感染させた細胞では8.0 ± 5.0%, 13.3 ± 3.5%, 13.0 ± 5.3%であった。線維芽細胞にAx1CAAQ82を感染させたところ3日目には不整形のaggregate bodyが細胞質に出現した。核内に封入体を有する細胞は3日目には31.3 ± 20.6%存在し、6日目には51.7 ± 34.5%, 9日目には71.3 ± 23.1%と増加した。一方Ax1CAAQ19を感染させた細胞では3日後には細胞質に均一に発現しており、その後もaggregate bodyや核内封入体は認められなかった。

また、Ax1CAAQ19を感染させた線維芽細胞におけるTUNEL陽性率は感染3日後で2.3 ± 3.0%, 6日後で3.7 ± 5.2%, 9日後で4.7 ± 4.0%であったのに対し、Ax1CAAQ82を感染させた細胞ではそれぞれ、5.0 ± 1.7%, 18.0 ± 6.4%, 37.0 ± 6.1%と増加した。

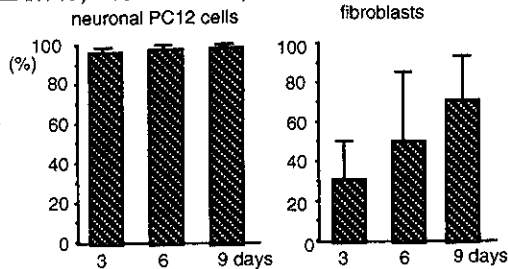


図2. FLAG陽性細胞中の核内封入体陽性細胞の頻度

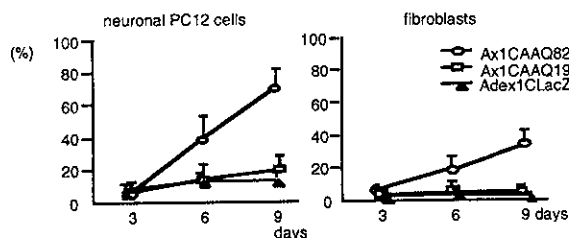


図3. FLAG陽性細胞中のTUNEL陽性細胞の頻度

正常蛋白全長を発現させた分化型PC12細胞では核が均一に染色され、封入体は認めなかったが、変異蛋白全長を発現させた細胞では核が均一に染

色され、1-2個の核内封入体を認めた。線維芽細胞においては正常蛋白全長は核に均一に染色され、変異全長蛋白は細胞質および核に発現し細胞質に凝集体が認められた。全長蛋白を発現させた細胞においてはTUNEL陽性細胞の有意な増加は認められなかった。

考察

正常および伸長したポリグルタミン鎖を有するDRPLA蛋白断片高率に発現可能なアデノウイルスベクターを作成した。伸長したポリグルタミンを含む変異DRPLA蛋白断片を発現せると細胞内にaggregate bodyが形成された。分化型PC12細胞においては、発現が確認される初期から核内に封入体として存在したのが特徴的であった。非神経細胞である線維芽細胞においては核内外にaggregate bodyを認め、核内封入体を有する細胞の頻度は初期に少なく経時的に増加した。このことから、変異蛋白断片は非神経細胞よりも神経細胞において核へ移送されやすいと考えられた。HDのトランスジェニックマウスの脳¹⁸⁾およびHD¹⁹⁾、MJD²⁰⁾、DRPLA¹⁷⁾患者剖検脳の神経細胞で核内封入体が見いだされており、今回我々がDRPLA変異蛋白断片を発現させた培養神経系細胞も類似の核内封入体が高頻度に出現し高率にアポトーシスが誘導されたことから、神経細胞の核内封入体形成はCAGリピート病の神経細胞障害の本態である可能性が高い。変異蛋白断片が高頻度に核内封入体を形成するのに対し、正常DRPLA蛋白断片は細胞質に均一に発現していることから、伸長したポリグルタミン鎖を含む蛋白断片が選択的かつ能動的に核に移送される機構が存在する可能性が考えられる。変異全長蛋白を発現させた細胞では分化型PC12細胞では核内封入体を認め、線維芽細胞においては細胞質に凝集体を認めた。核内封入体は1-2個と少なく、患者剖検脳のNIIと類似していた。また全長蛋白を発現させた分化型PC12細胞ではアポトーシスは誘導されなかったことから、核内封入体の存在が必ずしも細胞死に直結するものではないことを示すと考えられた。今回我々が作成した発現系を用い、伸長したポリグルタミン鎖を有する変異蛋白断片の核移行及び核内封入体形成の機序をさらに解析し、CAGリピート病の神経細胞障害の本態を明らかにすることが必要である。

文献

- 1) Orr HT, Chung M, Banfi S et al.: Expansion of an unstable trinucleotide CAG repeat in spinocerebellar ataxia type 1. *Nature Genet.* 4: 221-226, 1993
- 2) Sanpei K, Takano H, Igarashi S et al: Identification of the spinocerebellar ataxia type 2 gene using indirect identification of repeat expansion and

- cloning technique DIRECT. *Nature Genet.* 14: 277-284, 1996
- 3) Pulst SM, Nechiporuk A, Nechiporuk T et al.: Moderate expansion of a normally biallelic trinucleotide repeat in spinocerebellar ataxia type 2. *Nature Genet.* 14: 269-276, 1996
 - 4) Imbert G, Saudou F, Yvert G et al.: Cloning of the gene for spinocerebellar ataxia 2 reveals a locus with high sensitivity to expanded CAG/glutamine repeats. *Nature Genet.* 14: 285-291, 1996
 - 5) Zhuchenko O, Bailey J, Bonnen P et al.: Autosomal dominant cerebellar ataxia (SCA6) associated with small polyglutamine expansions in the alpha1A-voltage-dependent calcium channel. *Nature Genet.* 15: 62-69, 1997
 - 6) Lindblad K, Savontaus ML, Stevanin G et al.: An expanded CAG repeat sequence in spinocerebellar ataxia type 7. *Genome Res.* 6: 965-971, 1996
 - 7) Kawaguchi Y, Okamoto T, Taniwaki M et al.: CAG expansions in a novel gene for Machado-Joseph disease at chromosome 14q32.1. *Nature Genet.* 8: 221-228, 1994
 - 8) La Spada AR, Wilson EM, Lubahn DB et al.: Androgen receptor gene mutations in X-linked spinal and bulbar muscular atrophy. *Nature* 352: 77-79, 1991
 - 9) Huntington's Disease Collaborative Research Group.: A novel gene containing a trinucleotide repeat that is expanded and unstable on Huntington's disease chromosomes. *Cell* 72: 971-983, 1993
 - 10) Koide R, Ikeuchi I, Onodera O et al.: Unstable expansion of CAG repeat in hereditary dentatorubral-pallidolusian atrophy (DRPLA). *Nature Genet.* 6: 9-13, 1994
 - 11) Nagafuchi S, Yanagisawa H, Sato K et al.: Dentatorubral and pallidolusian atrophy expansion of an unstable CAG trinucleotide on chromosome 12p. *Nature Genet.* 6: 14-18, 1994
 - 12) Davis SW, Turmaine M, Cozens BA et al.: Formation of neuronal intranuclear inclusions underlies the neurological dysfunction in mice transgenic for the HD mutation. *Cell* 90: 537-548, 1997
 - 13) DiFiglia M, Sapp E, Chase KO et al.: Aggregation of huntingtin in neuronal intranuclear inclusions and dystrophic neurites in brain. *Science* 277: 1990-1993, 1997
 - 14) Paulson H.L., Perez MK, Trotter Y et al.: Intranuclear inclusions of expanded polyglutamine protein in spinocerebellar ataxia type 3. *Neuron* 19: 333-344, 1997
 - 15) Igarashi S, Koide R, Shimohata T et al.: Suppression of aggregate formation and apoptosis by transglutaminase inhibitors in cells expressing truncated DRPLA protein with an expanded polyglutamine stretch. *Nature Genet.* 18, 111-117, 1998
 - 16) Li, M., Miwa, S., Kobayashi, Y. et al. Nuclear inclusions of the androgen receptor protein in spinal and bulbar muscular atrophy. *Ann. Neurol.*, 44: 249-54, 1998
 - 17) Miyake S, Makimura M, Kanegae Y et al.: Efficient generation of recombinant adenoviruses using adenovirus DNA-terminal protein complex and a cosmid bearing the full-length virus genome. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 93: 1320-1324, 1996

DRPLA is an autosomal dominant neurodegenerative disorder caused by unstable expansion of a CAG trinucleotide repeat of DRPLA gene. To elucidate molecular mechanisms of neurodegeneration caused by expanded CAG repeats in DRPLA, we established an efficient expression system of truncated DRPLA proteins with normal or expanded polyglutamine stretches. Using COS/TPC method, we constructed adenovirus vectors containing full-length and truncated DRPLA cDNA coding for normal or expanded polyglutamine stretches (19 or 82 glutamines). Using them, truncated or full-length DRPLA proteins with normal or expanded polyglutamine stretches were expressed in neuronal PC12 cells and human fibroblasts. Formation of aggregate bodies was observed in cells expressing the truncated and full-length DRPLA protein with the expanded polyglutamine stretch. In neuronal PC12 cells, more than 97% of cells expressing truncated Q82 showed intranuclear inclusions. Numbers of apoptotic cells were higher in cells expressing the expanded polyglutamine stretch than in those expressing the normal polyglutamine stretch, especially in neuronal PC12. When the full-length DRPLA protein with Q82 was expressed, aggregate bodies were found exclusively in the nuclei of the neuronal PC12 cells, while they were found in the cytoplasm of fibroblasts. Apoptosis was not induced by expression of the full-length DRPLA protein with Q82 in either neuronal PC12 cells or fibroblasts. This expression system of DRPLA proteins is proved to be a useful system to analyze the toxicity of mutant proteins containing expanded polyglutamine stretches in neuronal cells.

V. 班構成員名簿

特定疾患に関する分子病態研究班

区 分	氏 名	所 属	職 名
班 長	辻 省 次	新潟大学脳研究所神経内科	教 授
班 員	赤 池 孝 章	熊本大学医学部微生物学教室	助 教 授
	岩 井 一 宏	京都大学大学院医学研究科 感染・免疫学講座免疫細胞生物学教室	助 教 授
	垣 塚 彰	大阪バイオサイエンス研究所 第四研究部	部 長
	木 下 タロウ	大阪大学微生物病研究所 免疫不全疾患研究分野	教 授
	小 嶋 哲 人	名古屋大学医学部第一内科	助 手
	児 玉 龍 彦	東京大学先端科学技術研究センター 分子生物医学部門	教 授
	末 松 誠	慶應義塾大学医学部医化学教室	助 教 授
	道 勇 学	名古屋大学医学部神経内科	講 師
	永 井 良 三	群馬大学医学部第二内科	教 授
	中 川 正 法	鹿児島大学医学部第三内科	講 師
	西 本 育 夫	慶應義塾大学医学部薬理学教室	教 授
	三 谷 絹 子	東京大学医学部 血液腫瘍内科	助 手
	安河内 幸 雄	東京医科歯科大学難治疾患研究所 遺伝疾患研究部門分子遺伝	教 授
(監 事)	井 上 正 康	大阪市立大学医学部第一生化学教室	教 授
(難病特別研究員)	石 橋 俊	東京大学医学部附属病院 糖尿病・代謝内科	助 手
	今 井 圓 裕	大阪大学医学部病態情報内科学	助 手
	金 田 安 史	大阪大学大学院医学研究科 先端応用医学 遺伝子治療講座	教 授
	慶 長 直 人	東京大学医学部呼吸器内科	医 員
	後 藤 公 宣	九州大学医学部附属病院総合診療部	助 手
	佐 谷 秀 行	熊本大学医学部腫瘍医学	教 授
	東海林 幹 夫	群馬大学医学部神経内科	講 師
	滝 山 嘉 久	自治医科大学神経内科	助 手
	工 田 昌 也	広島大学医学部耳鼻咽喉科	講 師
	塚 田 聡	大阪大学大学院医学系研究科 C 4 分子病態内科学講座	助 手
	辻 肇	京都府立医科大学輸血部	助 教 授
	長谷川 一 子	北里大学医学部東病院神経内科	講 師
	藤 原 作 平	大分医科大学皮膚科	助 教 授
	細 田 公 則	京都大学大学院 人間・環境学研究科	助 手
	矢 野 公 一	旭川医科大学小児科	講 師
研 究 協 力 者	岩 坪 威	東京大学大学院薬学系研究科臨床薬学教室	教 授
	山 田 正 夫	国立小児病院小児医療研究センター先天異常研究部	部 長
(事 務 局) 経理事務連絡担当責任者	辻 省 次	新潟大学脳研究所神経内科 〒951-8585 新潟市旭町通1番町757番地 TEL (025)-227-0663, 0664 FAX (025)-227-0820	教 授

VI. 業 績 目 録

研究成果の刊行に関する一覧表

(No.1)

刊行書籍又は雑誌名 (雑誌のときは雑誌名、巻号数、論文名)	刊行年月日	刊行書店名	執筆者氏名
Nature Genet. 18:111-117 Suppression of aggregate formation and apoptosis by transglutaminase inhibitors in cells expressing truncated DRPLA protein with an expanded polyglutamine stretch.	1998		Igarashi, S., Koide, R., Shimohata, T., Yamada, M., Hayashi, Y., Takano, H., Date, H., Oyake, M., Sato, T., Sato, A., Egawa, S., Ikeuchi, T., Tanaka, H., Nakano, R., Tanaka, K., Hozumi, I., Inuzuka, T., Takahashi, H. and <u>Tsuji, S.</u>
Ann. Neurol. 43:288-296 Progressive atrophy of cerebellum and brainstem as a function of age and the size of the expanded CAG repeats in the MJD1 gene in Machado-Joseph disease.	1998		Onodera, O., Idezuka, J., Igarashi, S., Takiyama, Y., Endo, K., Takano, H., Oyake, M., Tanaka, H., Inuzuka, T., Hayashi, T., Yuasa, T., Ito, J., Miyatake, T. and <u>Tsuji, S.</u>
Neuropathology 18:111-115 Alzheimer's disease as a polygenic disease.	1998		Okuizumi, K. and <u>Tsuji, S.</u>
J. Hum. Genet. 43:22-31 Refinement of the gene locus for autosomal recessive juvenile parkinsonism (AR-JP) on chromosome 6q25.2-27 and identification of markers exhibiting linkage disequilibrium.	1998		Saito, M., Matsumine, H., Tanaka, H., Ishikawa, A., Shimoda-Matsubayashi, S., Schaffer, A. A., Mizuno, Y. and <u>Tsuji, S.</u>
Neurobiol. Aging 19(1S):S47-S51 mtDNA polymorphisms in Japanese sporadic Alzheimer's disease.	1998		Tanno, Y., Okuizumi, K. and <u>Tsuji, S.</u>
Genomics 49:321-326 A novel long and unstable CAG/CTG trinucleotide repeat on chromosome 17q.	1998		Ikeuchi, T., Sanpei, K., Takano, H., Sasaki, H., Tashiro, K., Cancel, G., Brice, A., Bird, T. D., Schellenberg, G. D., Pericak-Vance, M., Welsh-Bohmer, K. A., Clark, L. N., Wilhelmsen, K. and <u>Tsuji, S.</u>
Arch. Neurol. 55(6):789-792 The GTP cyclohydrolase I gene in Russian families with dopa-responsive dystonia.	1998		Illarioshikin, S. N., Markova, E. D., Slominsky, P. A., Miklina, N. I., Popova, S. N., Limborska, S. A., <u>Tsuji, S.</u> , Ivanova-Smolenskaya, I. A.
Neurology 51:595-598 Spinocerebellar ataxia type 2 in China: Molecular analysis and genotype-phenotype correlation in nine families.	1998		Zhou, Y.-X., Wang, G.-X., Tang, B.-S., Li, W.-D., Wang, D.-A., Lee, H.-S., Sambuughin, N., Zhou, L.-S., <u>Tsuji, S.</u> , Yang, B.-X. and Goldfarb, L. G.
Am. J. Hum. Genet. 63(4):1060-1066 Close associations between prevalence rates of dominantly inherited spinocerebellar ataxias with CAG-repeat expansions and frequencies of large normal CAG alleles in Japanese and Caucasian populations.	1998		Takano, H., Cancel, G., Ikeuchi, T., Lorenzetti, D., Mawad, R., Stevanin, G., Didierjean, O., Durr, A., Oyake, M., Shimohata, T., Sasaki, R., Koide, R., Igarashi, S., Hayashi, S., Takiyama, Y., Nishizawa, M., Tanaka, H., Zoghbi, H., Brice, A., <u>Tsuji, S.</u>

研究成果の刊行に関する一覧表

(No.2)

刊行書籍又は雑誌名 (雑誌のときは雑誌名、巻号数、論文名)	刊行年月日	刊行書店名	執筆者氏名
Am. J. Hum. Genet. 62(6):1548-1551 A triplet repeat on 17q accounts for most expansions detected by the repeat expansion detection technique.	1998		Sidransky, E., Burgess, C., Ikeuchi, T., Lindblad, K., Long, R. T., Philibert, R. A., Rapoport, J., Shalling, M., <u>Tsuji, S.</u> and Ginns, E. I.
Acta Neuropathol. 96:547-552 Hereditary dentatorubral-pallidoluysian atrophy: detection of widespread ubiquitinated neuronal and glial intranuclear inclusions in the brain.	1998		Hayashi, Y., Kakita, A., Yamada, M., Koide, R., Igarashi, S., Takano, H., Ikeuchi, T., Wakabayashi, K., Egawa, S., <u>Tsuji, S.</u> and Takahashi, H.
Hum. Mol. Genet. 8(1):99-106 Transgenic mice harboring a full-length human mutant DRPLA gene exhibit age-dependent intergenerational and somatic instabilities of CAG repeats comparable to those in DRPLA patients.	1999		Sato, T., Oyake, M., Nakamura, K., Nakao, K., Fukusima, Y., Onodera, O., Igarashi, S., Takano, H., Kikugawa, K., Ishida, Y., Shimohata, T., Koide, R., Ikeuchi, T., Tanaka, H., Futamura, N., Matsumura, R., Takayanagi, T., Tanaka, F., Sobue, G., Komure, O., Takahashi, M., Sano, A., Ichikawa, Y., Goto, J., Kanazawa, I., Katsuki, M. and <u>Tsuji, S.</u>
Arch. Neurol. (in press) Mutational analysis and genotype-phenotype correlation of 29 unrelated Japanese patients with X-linked adrenoleukodystrophy (ALD).	1999	(in press)	Takano, H., Koike, R., Onodera, O., Sasaki, R. and <u>Tsuji, S.</u>

研究成果の刊行に関する一覧表

10.1

刊行書籍又は雑誌名 (雑誌のときは雑誌名、巻号数、論文名)	刊行年月日	刊 行 書 店 名	執筆者氏名
Am-J-Physiol 274 : Nitric oxide regulates energy metabolism and Bcl-2 expression in intestinal epithelial cells	1998		M. Nishikawa, K. Takeda, E. F. Sato, T. Kuroki and <u>M. Inoue</u>
Hepatology 27 : Role of glutathione in nitric oxide-dependent regulation of energy metabolism in rat hepatoma cells	1998		M. Nishikawa, E. F. Sato, M. Kashiba, T. Kuroki, K. Utsumi and <u>M. Inoue</u>
Acta-Anaesthesiol-Scand 42 : Effects of inhaled nitric oxide on platelet-activating factor-induced pulmonary hypertension in dogs	1998		T. Yamada, H. Yukioka, M. Hayashi, A. Asada and <u>M. Inoue</u>
Hepatology Research 13 : Extracellular nucleotides modulate the portal circulation with generation of nitric oxide.	1998		Takemura, S., Minamiyama, Y., Kawada, N., <u>Inoue, M.</u> , Kudo, S., Hirohashi, K., Kinoshita, H.
Biochimica et Biophysica Acta 1407 : Inhibition of post-ischemic reperfusion injury of the kidney by diamine oxidase	1998		Kaneko, H., Koshi, S., Hirota, T., Miyauchi, Y., Kitamura, N., <u>Inoue, M.</u>
Acta Histochem. Cytochem. 31 : Multiple-labeling of oligonucleotide probes for in situ hybridization.	1998		Sasaki, J., Yamamoto, H., Nomura, T., Matsuura, J., Seno, M., Sato, E. F., <u>Inoue, M.</u>
Free Rad.Res 28 : Biochemical properties of human oral polymorphonuclear leukocytes	1998		H. Nakahara, E.F. Sato, R. Ishisaka, T. Kanno, T. Kanno, T. Yoshioka, T. Yasuda, <u>M. Inoue</u> , K. Utsumi
Hepatology 28 : Macrophage-derived nitric oxide induces apoptosis of rat hepatoma cells in vivo	1998		M. Nishikawa, E.F. Sato, T. Kuroki, K. Utsumi, <u>M. Inoue</u>

研究成果の刊行に関する一覧表

No.2

刊行書籍又は雑誌名 (雑誌のときは雑誌名、巻号数、論文名)	刊行年月日	刊行書店名	執筆者氏名
Journal of Cosmetic Science 20 : Uric acid photo-oxidation assay: in vitro comparison of sunscreens agents. International	1998		W. C. Dunlap, Y. Yamamoto, <u>M. Inoue</u> , M. Kashiba and K. Tomita
FEBS Letters 435 : Activation of caspase-3-like protease by digitonin-treated lysosomes.	1998		R. Ishisaka, T. Utsumi, M. Yabuki, T. Kanno, T. Furuno, <u>M. Inoue</u> and K. Utsumi
Hepatology 27 : Effect of antioxidants, resveratrol, quercetin, and N-acetylcysteine, on the functions of cultured rat hepatic stellate cells and Kupffer cells	1998		N. Kawada, S. Seki, <u>M. Inoue</u> and T. Kuroki
J-Hepatol 28 : Role of nitric oxide in extracellular nucleotide-induced contractile status of assorted vessels including parts of the portal vasculature	1998		Y. Minamiyama, S. Takemura, N. Kawada and <u>M. Inoue</u>
J. Nutr Sci Vitaminol 1998 : A processed grain food inhibits hepatic injury in endotoxemic rats.	1998		Y. Minamiyama, S. Takemura, S. Toyokuni, Y. Tanimoto, E. F. Sato and <u>M. Inoue</u>
Diabetic Res. Clin. Pract. 1998 : Insulin-induces hypoglycemia elicits apoptosis in the rat.	1998		S. Morishita, E. F. Sato, K. Takahashi, M. Manabe and <u>M. Inoue</u>
J-Biol-Chem 273 : Helicobacter pylori generates superoxide radicals and modulates nitric oxide metabolism	1998		K. Nagata, H. Yu, M. Nishikawa, M. Kashiba, A. Nakamura, E. F. Sato, T. Tamura and <u>M. Inoue</u>
J-Trauma 44 : Thermal injury induces thymocyte apoptosis in the rat	1998		T. Nakanishi, Y. Nishi, E. F. Sato, M. Ishii, T. Hamada and <u>M. Inoue</u>

研究成果の刊行に関する一覧表

刊行書籍又は雑誌名（雑誌のときは雑誌名、巻号数、論文名）	刊行年月日	刊 行 書 店 名	執筆者氏名
<p>Br. J. Haematol. in press. CD59-deficient blood cells and PIG-A gene abnormalities in Japanese patients with aplastic anaemia.</p>	<p>1999 印刷中</p>		<p>Y Azenishi, E Ueda, T Machii, J Nishimura, T Hirota, M Shibano, S Nakao, <u>T Kinoshita</u>, H Mizoguchi, T.Kitani</p>
<p>Lab. Invest. in press. Developmental abnormalities of glycosyl phosphatidylinositol-anchor deficient embryos revealed by Cre/loxP system.</p>	<p>1999 印刷中</p>		<p>M Nozaki, K Ohishi, N Yamada, <u>T Kinoshita</u>, A Nagy, J Takeda</p>

研究成果の一覧

1. Wellington, C.L., Ellerby, L.M., Hackam, A.S., Margolis, R.L., Trifiro, M.A., Singaraja, R., McCutcheon, K., Salvesen, G.S., Propp, S.S., Bromm, M., Rowland, K.J., Zhang, T., Rasper, D., Roy, S., Thornberry, L., Pinsky, L., Kakizuka, A., Ross, C.A., Nicholson, D.W., Bredesen, D.E., and Hayden, M.R.

Caspase Cleavage of gene products associated with triplet expansion disorders generates truncated fragments containing the polyglutamine tract.

J. Biol. Chem. 273: 9158-9167, 1998, April 10.

2. Nakamoto, M. Ikeda, H., & Kakizuka, A.

Genetic and Molecular Studies of Machado-Joseph Disease.

In Genetic Instabilities and Hereditary Neurological Diseases. eds Wells, R.D. and Warren, S.T.

(Academic Press, SanDiego), pp283-297, 1998, May 1.

Segawa, T., Takebayashi, H., Kakehi, Y., Yoshida, O., Narumiya, S. & Kakizuka, A.

Prostate-specific amplification of expanded polyglutamine expression: A novel approach for cancer gene therapy.

Cancer Res. 58: 2282-2287, 1998, June 1.

4. Kakizuka, A.

Protein Precipitation: A common etiology in neurodegenerative disorders?

Trends in Genetics, 14: 396-402, 1998, November 1.

研究成果の刊行に関する一覧表

刊行書籍又は雑誌名（雑誌のときは雑誌名、巻号数、論文名）	刊行年月日	刊行書店名	執筆者氏名
CLINICAL NEUROSCIENCE 16, p.43-46 発症年齢特異性のある中枢神経疾患； 「脊髄小脳変性症と好発年齢」	1998 (1)	中外医学社	田中章景, <u>道勇</u> 学, 祖父江元
CLINICAL NEUROSCIENCE 16, p.867-869 運動ニューロン疾患—update；「球脊髄性筋萎縮症」	1998 (8)	中外医学社	<u>道勇</u> 学, 祖父江元
CLINICAL NEUROSCIENCE 17, in press. ニューロサイエンスの新しい研究方法； 「分子インデックス法」	1999 (4)	中外医学社	<u>道勇</u> 学, 祖父江元
Neurochem Res 23: 25-32, Somatic mosaicism of the expanded CAG trinucleotide repeat in mRNAs for the responsible gene of Machado-Joseph disease (MJD), dentatorubral-pallidoluysian atrophy (DRPLA), and spinal and bulbar muscular atrophy (SBMA).	1998		Ito Y, Tanaka F, Yamamoto M, <u>Doyu M</u> , Nagamatsu M, Riku S, Mitsuma T, Sobue G
Acta Neuropathol 95: 555-558, Advanced glycation end products co-localized with astrocytes and microglial cells in Alzheimer's disease brain.	1998		Takeda A, Yasuda T, Miyata T, Goto Y, Wakai M, Watanabe M, Yasuda Y, Horie K, Inagaki T, <u>Doyu M</u> , Maeda K, Sobue G
Neurology 51: 882-884, CAG repeat number correlates with the rate of brainstem and cerebellar atrophy in Machado-Joseph disease.	1998		Abe Y, Tanaka F, Matsumoto M, <u>Doyu M</u> , Hirayama M, Kachi T, Sobue G
Ann Neurol 44: 249-254, Nuclear inclusions of the androgen receptor protein in spinal and bulbar muscular atrophy.	1998		Li M, Miwa S, Kobayashi Y, Merry DE, Yamamoto M, Tanaka F, <u>Doyu M</u> , Hashizume Y, Fischbeck KH, Sobue G
Am J Pathol 153: 695-701, Nonneural nuclear inclusions of androgen receptor protein in spinal and bulbar muscular atrophy.	1998		Li M, Nakagomi Y, Kobayashi Y, Merry DE, Tanaka F, <u>Doyu M</u> , Mitsuma T, Hashizume Y, Fischbeck KH, Sobue G
Biochem Biophys Res Commun 252: 145-150, Caspase-3 cleaves the expanded androgen receptor protein of spinal and bulbar muscular atrophy in a polyglutamine repeat length-dependent manner.	1998		Kobayashi Y, Miwa S, Merry DE, Kume A, Li M, <u>Doyu M</u> , Sobue G

研究成果の刊行に関する一覧表

刊行書籍又は雑誌名（雑誌のときは雑誌名、巻号数、論文名）	刊行年月日	刊 行 書 店 名	執筆者氏名
<p>Hepatology 28: 286-295, 1998 Carbon monoxide as a regulator of bile canalicular contractility in cultured rat hepatocytes</p>			<p>Shinoda, Y., Suematsu, M. Wakabayashi, Y., et al.</p>
<p>Hepatology 28: 286-295, 1998 Discontinuous Total Parenteral Nutrition Prevents Postischemic Mitochondrial Dysfunction in Rat Liver</p>			<p>Morikawa, N., Suematsu, M., et al.</p>

研究成果の刊行に関する一覧表

刊行書籍又は雑誌名（雑誌のときは雑誌名、巻号数、論文名）	刊行年月日	刊 行 書 店 名	執筆者氏名
<p>Exp Hematol 27,203-209 Interferon-γ impairs physiologic downregulation of cyclin-dependent kinase inhibitor, p27^{Kip1}, during G1 phase progression in macrophages</p>	1999	Elsevier Science Inc	Matsuoka M., <u>Nishimoto, I.</u> , Asano S.
<p>Neurobiology of Aging 19, S33-S38 A new paradigm for neurotoxicity by FAD mutants of bAPP : A signaling abnormality.</p>	1998	Elsevier Science Inc	<u>Nishimoto, I.</u>
<p>Recept. Signal. Transduct 7, 231-240 IGF-I receptor protection from apoptosis in cells the IRS proteins.</p>	1998	Human Press Inc	Dews , M., <u>Nishimoto, I.</u>
<p>臨床成人病、28 巻、1246-1248 頁 「家族性アルツハイマー病の成因の解明：APP 突然変異体の細胞死標的分子の同定 - アルツハイマー病変異体による G 蛋白 $\beta \gamma$ 依存性細胞死の発見」</p>	1998 年 10 月	東京医学社	<u>西本育夫</u>

研究成果の刊行に関する一覧表

刊行書籍又は雑誌名	刊行年月日	刊行書店名	執筆者氏名
Human Genet 102: 435-439, 1998 Genomic organization and mutational analysis of HERG, a gene responsible for familial long QT syndrome.		Springer-Verlag	Itoh T, Tanaka T, <u>Nagai R</u> , Kamiya T, Sawayama T, Nakayama T, Tomoike H, Sakurada H, Yazaki Y, Nakamura Y
Human Genet 103: 290-294, 1998 Genomic organization and mutational analysis of KVLQT1, a gene responsible for familial long QT syndrome		Springer-Verlag	Itoh T, Tanaka T, <u>Nagai R</u> , Kikuchi K, Ogawa S, Okada S, Yamagata S, Yano K, Yazaki Y, Nakamura Y
Circ Res 83:415-422, 1998 A novel mechanism of HERG current suppression in LQT2 shift in voltage dependence of HERG inactivation.		American Heart Association, Inc.	Nakajima T, Furukawa T, Tanaka T, Katayama Y, <u>Nagai R</u> , Nakamura Y, Hiraoka M
Biochem. Biophys. Res. Commun., 248, 324-329 (1998) Klotho protein protects against endothelial dysfunction.		Academic Press	Saito Y, Yamagishi T, Nakamura T, Ohyama Y, Aizawa H., Suga T., Matsumura Y, Masuda H., Kurabayashi M., Kuro-o M., Nabeshima Y, and <u>Nagai R</u> .
Biochem. Biophys. Res. Commun., 249, 865-871 (1998) Downregulation of the <i>Klotho</i> gene in the kidney under sustained circulatory stress in rats.		Academic Press	Aizawa H., Saito Y, Nakamura T., Inoue M., Imanari T., Ohyama Y, Matsumura Y, Masuda H., Oba S., Mise N., Kimura K., Hasegawa A., Kurabayashi M., Kuro-o M., Nabeshima Y, and <u>Nagai R</u> .
Biochem. Biophys. Res. Commun., 251, 920-925 (1998) Molecular Cloning of Rat <i>klotho</i> cDNA: Markedly Decreased Expression of <i>klotho</i> by Acute Inflammatory Stress.		Academic Press	Ohyama Y, Kurabayashi M., Matsumura Y, Nakamura T., Aihara Y, Kaname T., Suga T., Arai M., Aizawa H., Matsumura Y, Kuro-o M., Nabeshima Y, and <u>Nagai R</u> .

研究成果の刊行に関する一覧表

NO 1

刊行書籍又は雑誌名 (雑誌のときは雑誌名、巻号数、論文名)	刊行年月日	刊 行 書 店 名	執筆者氏名
Biol. Chem 379, 193-200. Human matrix metalloprotease activation by insults of bacterial infection involving proteases and free radicals.	1998		H. Maeda, T. Okamoto and <u>T. Akaike</u>
Am. J. Respir. Crit. Care Med. , 157, 853-857. Therapeutic effect of erythromycin on influenza virus-induced lung injury in mice.	1998		K. Sato, M. Suga, <u>T. Akaike</u> , S. Fujii, H. Muranaka, T. Doi, H. Maeda and M. Ando
Biochemistry (Moscow) , 63, 854-865. Nitric oxide and oxygen radicals in infection, inflammation, and cancer.	1998		H. Maeda and <u>T. Akaike</u>
Eur. J. Pharmacol. , 357, 213-219. The possible effect of nitric oxide on relaxation and noradrenaline release in the isolated rabbit urethra.	1998		M. Yoshida, <u>T. Akaike</u> , A. Inadome, W. Takahashi, H. Seshita, M. Yono, S. Goto, H. Maeda and S. Ueda
Biol. Pharm. Bull. , 21, 1247-1250. Improved nitric oxide detection using 2,3-diaminonaphthalene and its application to the evaluation of novel nitric oxide synthase inhibitors.	1998		N. Nakatsubo, H. Kojima, K. Sakurai, K. Kikuchi, H. Nagoshi, Y. Hirata, <u>T. Akaike</u> , H. Maeda, Y. Urano, T. Higuchi and T. Nagano
Br. J. Cancer (in press). Induction of heme oxygenase-1 by nitric oxide and ischemia in experimental solid tumors and implications for tumor growth.	1999		K. Doi, <u>T. Akaike</u> , S. Fujii, S. Tanaka, N. Ikebe, T. Beppu, S. Shibahara, M. Ogawa and H. Maeda
Virology (in press). Role of nitric oxide in pathogenesis of herpes simplex virus encephalitis in rats.	1999		S. Fujii, <u>T. Akaike</u> and H. Maeda

研究成果の刊行に関する一覧表

NO.2

刊行書籍又は雑誌名（雑誌のときは雑誌名、巻号数、論文名）	刊行年月日	刊行書店名	執筆者氏名
Nitric Oxide and Infection (ed. F.C. Fang) (in press). Nitric oxide in influenza pathogenesis.	1999	Plenum Publishing Co., New York	T. Akaike and H. Maeda
J. Biol. Chem. Nitrosothiol formation catalyzed by ceruloplasmin.	投稿中		K. Inoue, T. Akaike, Y. Miyamoto, M. Otagiri, S. Suzuki, T. Yoshimura and H. Maeda
Nature. Viral mutation accelerated by oxidative stress caused by nitric oxide.	投稿中		T. Akaike, S. Fujii, A. Kato, J. Akaki, Y. Miyamoto, T. Sawa, M. Asakawa, S. Okamoto, M. Suga, Y. Nagai and H. Maeda