

厚生科学研究費補助金

長寿科学総合研究事業

ストレスの老化に及ぼす影響と
その生体応答に関する研究

平成 12 年度 総括、分担研究報告書

主任研究者 磯部健一

平成 13 (2001)年 3 月

目次

I、総括研究報告書	
ストレスの老化に及ぼす影響とその生体応答に関する研究 主任研究者 磯部健一	1
II、分担研究報告書	
1. ストレスと老化 磯部健一	15
2. 老化促進ストレスとシグナル伝達 中島 泉	20
3. 生体防御の異常と老化ストレスに関する研究 谷口維紹	26
4. 老化における生体防御機構としての活性酸素消去酵素の破綻機構 谷口直之	28
5. 老化促進ストレスと神経細胞死 祖父江 元	31
6. ミクログリアとストレス 澤田誠	35
III、研究成果の刊行に関する一覧表	41

厚生科学研究費補助金（長寿科学研究事業）
総括研究報告書

ストレスの老化に及ぼす影響とその生体応答に関する研究

主任研究者 磯部健一

（国立長寿医療研究センター老化機構、部長）

研究要旨：ヒトは外界からの様々な刺激を受けたり、内的に代謝により発生するラジカルにさらされている。これらは生体の構成成分を酸化させ老化を促進するばかりでなく、シグナル伝達系とくにチロシンキナーゼ、MAP系に働き、老化を促進させる。感染ストレスはNOを産生させ、NOはGR,GPxの酵素活性を低下させ、老化を促進させる。これに対し、生体はラジカル消去酵素、SODの発現を上昇させ、老化を防御する。また、ストレスに対し生体はGADD34やHSP40を発現し、HSP40は抗アポトーシス作用を持ち、神経変性を防御する。感染ストレスに対し生体はIFNを産生するがこの過剰な働きは老化促進作用を持つ。生体内ではIRF-2転写因子が防御蛋白として働いている。このように生体はストレスに対し、蛋白レベル、遺伝子発現レベルで恒常性を保ち、老化を防御している。

分担研究者氏名 磯部健一；国立長寿医療研究センター老化機構研究部、部長
中島 泉；名古屋大学大学院医学研究科免疫学教授
谷口維紹；東京大学大学院教授
谷口直之；大阪大学 大学院 教授
祖父江 元；名古屋大学神経内科教授
澤田誠；藤田保健衛生大学・総合医科学研究所・教授

A. 研究目的

下等動物の長寿命変異体は酸化ストレスをはじめ各種ストレスに

抵抗性である。高等動物は栄養制限食により長寿命が得られることが判明しているがこれは代謝による活性酸素の産生低下によると考えられている。人は紫外線、放射線、感染、熱等種々の外的ストレス刺激にさらされている。またこれらの刺激はラジカルを産生するし、代謝によっても内部でラジカルが産生される。本研究はストレス刺激が生体にあたえる変化をシグナル伝達系を中心に詳細に検討し、それが老化をどのように引き起こすかを検索する。一方生体は老化促進ストレス刺激に対し、防御的に作用する機構を備えている。

ラジカル消去酵素 (SOD, カタラーゼ等)、HSP70 等シャペロン、さらには DNA 傷害を監視する p53, Gadd 等は異なった機構でストレスから生体を防御していると考えられる。本研究はこれら防御機構を分子レベルで詳細に解析すると同時にその生体における老化防御としての役割を遺伝子欠損マウス、老化マウスを使用し研究する。さらに高等動物であるひとはサイトカインネットワークを構築しストレス刺激に対応している。この破綻が老化に結びつくと考えられる。本研究によりストレスの老化に及ぼす影響とその防御過程を分子レベルから個体レベルで総合的に研究することで老化防御のための理想的生活習慣を提示することが可能になると期待される。

B. 研究方法

1. 遺伝子発現制御；

目的の遺伝子の mRNA 発現は細胞あるいはマウスより RNA を調整し、ノザンハイブリダイゼーションで検索した。マウスゲノムライブラリーよりゲノム遺伝子をクローニングし、塩基配列を決定後、ルシフェラーゼアッセイ用の PGL3 レポーターベクターに組み込んだ。組み換え技術を用いて、予想されるプロモーター領域、エンハンサー領域の各種欠失変異体、ミュータントを作製した。NIH3T3 細胞を代表とする培養細胞株に遺伝子移入し、転写活性をルシフェラーゼアッセイにて測定した。また、転写因子をコードする cDNA を発現ベ

クターに組み込み細胞に遺伝子移入した。細胞から核蛋白質を抽出し、ゲルシフト法にて転写因子の検討を行った。転写因子の特異性を知るために、抗体にてスーパーシフトアッセイを行った。

2. シグナル伝達系の解析

細胞に各種刺激 (紫外線、カルボニル化合物、増殖因子、NO 産生試薬等) を加え、細胞抽出物を SDS-PAGE に流し、シグナル伝達系の抗体、リン酸化抗体を使用したウエスタンブロット法および試験管内キナーゼアッセイなどにより測定した。また、シグナル伝達分子の特異性は各種 inhibitor で解析した。

3. マウス個体を使用した実験と組織染色

C57BL/6 マウス各年齢は長寿医療研究センター長寿ファームより、RET,PKC トランスジェニックマウスはすでに樹立され名古屋大学実験動物センターで飼育されている。IRF-2 欠損マウスは東京大学谷口研で確立された。GADD34 と結合する ZBP-89 ノックアウトマウスは ES 細胞からキメラマウスをつくることで hetero 欠損マウスが不妊となった。これらのマウスの病態解明のため、組織染色、免疫染色、in situ hybridization を行った。

(倫理面への配慮) 動物実験はマウス個体を使用した。長寿医療研究センター動物施設実験指針に従って研究を行った。

C. 研究結果

1、Mn-SOD の発現制御 (磯部)
活性酸素ラジカルはまず SOD で消去される。私達はミトコンドリアに存在する Mn-SOD の発現がストレス刺激でどのように調整させるか検討している。今年度は PDGF 刺激による Mn-SOD の発現制御を検討した。NIH3T3 細胞を PDGF で刺激すると、Mn-SOD mRNA 発現が約 2 倍上昇した。予想されるプロモーター領域、エンハンサー領域の各種欠失変異体、ミュータントによるルシフェラーゼアッセイとゲルシフト解析により、Mn-SOD の PDGF による転写に Egr-1, Sp1 といった転写因子が関与することが明らかになった。また、PDGF から Egr-1 への経路のシグナル伝達系を解析し、Egr-1 への経路を U0126 が特異的に抑制し、Mek1 から ERK1 を介する経路でシグナルが伝わることを判明した。

2、GADD34 とその結合蛋白 (磯部)
各種ストレス刺激により上昇する GADD 蛋白のうち、GADD153、GADD45 は比較的良好に機能がわかっている。私達は感染等ストレスで多量に発生する NO ラジカル、また H_2O_2 が GADD153 を誘導することを見いだした。一方、GADD34 はその機能がほとんどわかっていない。私達はこれまで、GADD34 に結合する蛋白として、多数報告してきた。今年度は GADD34 とそれに結合する GAHSP40 の転写解析

が最終段階にきた。すなわち、MMS 刺激による GADD34 の発現には Sp1, CREB と言った転写因子が必要なことが判明した。また、GAHSP の熱ストレスによる発現には HSF 転写因子が必要であることが判明した。GADD34 と結合する ZBP-89 のノックアウトマウスはヘテロ欠損の段階で精子形成不全、神経管閉鎖不全を呈した。

3、酸化ストレスとシグナル伝達系 (中島)

加齢とともに反復して個体に作用すると考えられる紫外線などの酸化ストレスによって、シグナル伝達の起始点で重要な働きをする受容体型、非受容体型のチロシンキナーゼの活性を中心に解析した。

1) 紫外線等酸化ストレスによるチロシンキナーゼの活性化と 2 量体化の標的となるアミノ酸は、細胞外と細胞内の両方にある。細胞内にある標的アミノ酸の一つは、細胞内キナーゼドメインの C 末端側にある特定のアミノ酸である可能性が大きいことが判明した。

2) カルボニルストレスによる細胞内シグナル伝達カスケードの解析
糖の酸化的代謝でつくられる glyoxal や methylglyoxal が細胞表面または細胞内の蛋白質を化学修飾し、これによって細胞の活性化や細胞死を誘導する。すなわち、Glyoxal や methylglyoxal は細胞表面の GPI アンカー蛋白を Schiff-base 形成によって架橋する。そしてこれが引き金となって細胞内にシグナルが伝達され

る。この場合、GPI アンカー蛋白が付着するラフトと呼ばれる膜ドメインがクラスターをつくり、ラフトに細胞内で付着する非受容体型チロシンキナーゼがまず活性化する。この非受容体型チロシンキナーゼの活性化に続いて MAK ファミリーのキナーゼが活性化する。MAK ファミリーの特定のキナーゼの活性化とリンクして細胞の増殖または細胞死が誘導される。

4、モデル動物を用いた老化における酸化ストレスの役割の解析 (中島)

先に樹立した RET がん遺伝子チロシンキナーゼ遺伝子トランスジェニックマウスを用いて、がん遺伝子の発現制御機構の破綻に関わる環境因子の作用を検討した。その結果、紫外線には、従来知られる DNA 傷害作用とは別に、シグナル伝達分子である蛋白質に作用して活性を増大させる活性があり、この活性はマウスの個体レベルでも働くこと、そしてこのことが導入したがん遺伝子による発がんのプロセスに重要であることを示唆した。

5、加齢にともない皮膚炎を発症するマウス (谷口維)

IRF-2 欠損マウス (IRF-2^{-/-})

は8週齢より、皮膚炎を発症してきた。炎症は加齢とともに全身に広がり、5カ月齢では皮膚の潰瘍と脱毛を伴ってきた。BrdU 取り込み実験で病変はケラチノサイトの異常増殖であることが判明した。皮膚基底膜に浸潤している免疫細胞の関与の有無を知るため、抗体

を投与し、病変を観察した。その結果、抗 CD8 抗体投与で皮膚病変発現が遅延した。Allogeneic な細胞で刺激すると (IRF-2^{-/-}) マウスの CD8⁺T 細胞は持続的に増殖した。IFN により誘導され chemokine である IP-10 と MIG が (IRF-2^{-/-}) マウスの皮膚で著しく上昇していた。これらが IFN α/β からのシグナルに過剰に反応していることが示唆された。

6、ミクログリアとストレス(澤田)

活性化されたミクログリアは NO を産生するが、今回 DAF2DA を用いることにより NO 産生細胞を可視化することに成功した。また、DAF2 による NO 産生の定量化により NO の産生には早い反応 (刺激直後~2-3時間後まで) と遅い反応 (刺激後6時間-24時間) の2相性が見られた。この反応には2種類の NO 合成酵素が関与しており、その分布はミクログリアのサブタイプにより異なることがわかった。ミクログリアのサブタイプでは大量の NO を生成する iNOS を発現するサブタイプ (type I, clone 6-3) と少量の生理的濃度の NO を生成する nNOS を発現するサブタイプ (type II, clone Ra2) とがありその役割が異なることがわかった。

6、老化促進ストレスと神経細胞死 (祖父江)

各種神経変性疾患は早期老化現象モデルの一つとして考えることが

できる。神経変性疾患である CAG リピート病の病態発現機序としてポリグルタミン鎖による aggregate の関与が問題となっている。そこで熱ショック蛋白(HSP)による aggregate 形成抑制効果を検討した。In vitro aggregate assay と培養神経系細胞への遺伝子導入実験において、HSP は truncated androgen receptor による aggregate 形成を著明に抑制し、また細胞生存率の改善効果を認めた。この結果は aggregate 形成が CAG リピート病の病態発現機序に関与を示唆しており、また HSP の CAG リピート病治療応用への可能性をも示している。

7、活性窒素の GR、GPx への影響 (谷口直)

NO ラジカルは精製した GR, GPx へ作用し、その酵素活性を濃度依存性に低下させる。

D. 考察

老化を促進させるもの、抑制するもの？

紫外線等ストレス刺激は直接 DNA や細胞内ストレス伝達系に作用し、老化促進作用を持つ。また、代謝によって生成される酸素ラジカルもシグナル伝達系を通して老化を促進する(中島)。さて、ストレスにより誘導される蛋白は老化を促進させるのか抑制するのか。私たちは以前 p53 蛋白はストレスにより誘導され老化を抑制することを示した。Mn-SOD も感染スト

レス、増殖刺激(代謝昂進)により誘導され、酸素ラジカルを消去することで老化を抑制する(磯部)。HSP は神経変性を抑制することで老化を抑制する(祖父江)。

一方、感染ストレスで NO が産生されると、GR, GPx 活性を低下させ老化は促進する(谷口直)。また、感染ストレスは IFN を産生させるが、生体は IRF-2 等転写抑制因子により過剰産生を防いでいる。この破綻で老化が促進される(谷口直)。どうやら、ストレスで誘導される酸素ラジカル、窒素ラジカル等は老化促進作用を持ち、ストレスで誘導される蛋白の多くは老化防御に働くといった凶式になりそうである。いずれにしろ、生体はストレスにより老化促進、抑制両方に作用する物質を誘導する。促進物質は微生物殺作用等生体の防御に役立つが、生体成分も傷つけられる。そのための防御蛋白は生体の恒常性を保つのに重要な役割を果たすと考えられる。その恒常性の破綻が老化の促進に向かわせると考えている。

E. 結論

1、増殖因子 PDGF は細胞の代謝回転をはやめ、多くのラジカルを産生させるが、生体は Mek-1 から ERK を介して Egr-1、Sp1 転写因子の活性化により Mn-SOD を発現させラジカルを消去し、老化防御作用を持つ。

2、DNA 傷害性ストレス刺激で発現が上昇する GADD34 の機能はいまだ不明である。その結合蛋白を含めた、発現調節を調べ、GADD34 は Sp1, CREB が GAHSP40 は HSF 転写因子が重要な役割を持つことが判明した。GADD34 と結合する ZBP-89 のノックアウトマウスはヘテロ欠損で精子形成不全、神経管閉鎖不全を呈した。

3、酸化ストレスとシグナル伝達系紫外線、重金属などの酸化ストレスによる蛋白質の酸化的化学修飾によって、細胞表面受容体分子と細胞膜ラフト構造のリガンド非依存性の架橋がおこり、さらに、チロシンキナーゼ分子の細胞内ドメインを標的とした構造修飾にはじまり、ストレス関連シグナル伝達系が活性化する。このことがマウス個体における加齢に伴う病態形成にかかわる可能性があることが示された。また、カルボニル化合物が起動するシグナル伝達の別経路が存在することも示唆された。

4、(IRF-2^{-/-}) マウスは加齢に伴い、皮膚病変を発症してくる。皮膚のケラチノサイトの増殖と反応性 CD8 陽性 T 細胞の増殖が病変を形成する。IRF-2 欠損により、IFN α/β に反応する IP-10 と MIG が病変形成に関与していると考えられる。

5、HSP は CAG リピート病の治療への応用が期待されうる。

6、ミクログリアには複数のサブタイプ

が存在し、ミクログリアのストレス応答の役割やメカニズムを考える場合においてサブタイプの性質を明確にすることが必要である。

8、活性窒素は GR あるいは Gpx 活性を低下させ、酸化ストレスを増大させ、老化を促進する。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

(1) 論文発表

Oh-hashii K, Maruyama W, Isobe K.

Peroxynitrite induces gadd34, 45 and 153 via p38 MAPK in human neuroblastoma SH-SY5Y cells. Free Rad. Biol. Med. 30: 213-221, 2001.

Hasegawa T, Xiao H, Hamajima F, Isobe K ;Interaction between DNA-damage protein GADD34 and a new member of the hsp40 family of heat shock proteins that is induced by a DNA-damaging reagent. Biochem J 2000 15; 795-800. 2000.

Machara, K., Hasegawa T. and Isobe K. A NF-kB p65 subunit is indispensable for activating manganese superoxide Dismutase Gene Transcription mediated by tumor necrosis factor- α . J. Cellular Biochem. 77: 474-486, 2000.

Takeuchi T., Miyaishi O., Kiuchi K. and Isobe K. Cu/Zn- and Mn-Superoxide Dismutase Are Specifically Up-regulated in Neuron After Focal

Brain Injury. *J. Neurobiology* 45:39-46, 2000.

Isobe K. Stress and aging. *Current Genomics* 1;1-10;2000

Hasegawa T., Takeuchi A., Miyaishi O., Xiao H., Mao J, and Isobe K. PTRF is tissue-specific and interacts with the BFCOL1 zinc-finger transcription factor which binds to the two mouse type I collagen gene promoters. *Biochem. J.* 347,55-59, 2000.

Xiao, H., Hasegawa, T. and Isobe, K. p300 Collaborates with Sp1 and Sp3 in p21^{waf1/cip1} promoter activation Induced by Histone Deacetylase Inhibitor. *J. Biol. Chem.* 275; 1371-1376,2000.

Hasegawa T., Yagi A. and Isobe K.; Interaction between GADD34 and kinesin superfamily, KIF3A. *Biochem Biophys Res Commun* 267; 593-596,2000.

Takeda, K., Kato, M., Wu, J., Iwashita, T., Suzuki, H., Takahashi, M. and Nakashima, I.: Osmotic stress-mediated activation of RET kinases involves intracellular disulfide-bonded dimer formation. *Antioxidants & Redox Signaling*, in press

Kato, M., Iwashita, T., Akhand, A.A., Liu, W., Takeda, K., Takeuchi, K., Yoshihara, M., Hossain, K., Wu, J., Du, J., Oh, C., Kawamoto, Y., Suzuki, K.,

Takahashi, M. and Nakashima, I. Molecular mechanism of activation and superactivation of Ret tyrosine kinases by ultraviolet light irradiation. *Antiox. Redox. Signal.*, in press.

Takeuchi, K., Kato, N., Suzuki, H., Akhand, A.A., Wu, J., Hossain, K., Miyata, T., Matsumoto, Y., Nimura, Y. and Nakashima, I.: Acrolein induces activation of the epidermal growth factor receptor of human keratinocytes for cell death. *J. Cell. Biochem.*, in press.

Wu, J., Suzuki, H., Zhou, Y.W., Liu, W., Yoshihara, M., Kato, M., Akhand, A.A., Hayakawa, A., Takeuchi, K., Hossain, K., Kurosawa, M. and Nakashima, I.: Cepharantine activates caspases and induces apoptosis in Jurkat and K562 human leukemia cell lines. *J. Cell. Biochem.*, in press.

Kato, M., Liu, W., Akhand, A.A., Hossain, K., Takeda, K., Takahashi, M. and Nakashima, I.: Ultraviolet radiation induces both full activation of Ret kinase and malignant melanocytic tumor promotion in RFP-RET-transgenic mice. *J. Invest. Dermatol.* 115:1157-1158, 2000.

Nakashima, I., Kato, M., Akhand, A.A., Du, J., Liu, W., Dai, Y., Suzuki, H., Senga, T., Hamaguchi, M., Iwashita, T., Takahashi, M., Miyata, T., Hossain, K., Takeda, K., Wu,

J., Takeuchi, K., Yoshihara, M. and Kawamoto, Y.: Chemical reaction-mediated alternative signalling pathway in cells of the immune system. *Current Trends in Immunology* 3:45-58, 2000.

Hossain, K., Akhand, A.A., Kato, M., Du, J., Takeda, K., Wu, J., Takeuchi, K., Liu, W., Suzuki, H. and Nakashima, I.: Arsenic induces apoptosis of murine T lymphocytes through membrane rafts-linked signaling for activation of c-Jun amino terminal kinase (JNK). *J. Immunol.* 165:4290-4297, 2000.

Du, J., Suzuki, H., Nagase, F., Akhand, A. A., Yokoyama, T. and Nakashima, I.: Evidence of a mercury-stimulated but interleukin 2-independent signal transduction pathway for the proliferation of acytotoxic T cell line, CTLL-2. *J. Cell. Biochem.* 78:500-508, 2000.

Kato, M., Isobe, K., Dai, Y., Takahashi, M. and Nakashima, I.: Further characterization of the Sho-saiko-to-mediated anti-tumor effect on melanoma developed in RET-transgenic mice. *J. Invest. Dermatol.* 114:599-601, 2000.

Du, J., Suzuki, H., Nagase, F., Akhand, A.A., Yokoyama, T., Miyata, T., Kurokawa, K. and Nakashima, I.: Methylglyoxal induces apoptosis in Jurkat leukemia T-cells by activating c-Jun N-terminal kinase. *J.*

Cell. Biochem. 77:333-344, 2000.

Liu, W., Kato, M., Akhand, A.A., Hayakawa, A., Suzuki, H., Miyata, T., Kurokawa, K., Hotta, Y., Ishikawa, N. and Nakashima, I.: 4-Hydroxynonenal induces a cellular redox status-related activation of the caspase cascade for apoptotic cell death. *J. Cell. Sci.* 113:635-641, 2000.

Kato, M., Iwashita, T., Takeda, K., Akhand, A.A., Liu, W., Yoshihara, M., Asai, N., Suzuki, H., Takahashi, M., and Nakashima, I.: Ultraviolet induces redox reaction-mediated dimerization and superactivation of oncogenic Ret tyrosine kinases. *Mol. Biol. Cell* 11:93-101, 2000.

Senga, T., Miyazaki, K., Machida, K., Iwata, H., Matsuda, S., Nakashima, I. and Hamaguchi, M. Clustered cysteine residues in the kinase domain of v-Src: critical role for protein stability, cell transformation and sensitivity to herbimycin A. *Oncogene* 19:273-279, 2000.

Oda, E., Ohki, R., Murasawa, H., Nemoto, J., Shibue, T., Yamashita, T., Tokino, T., Taniguchi, T. and Tanaka, N.: Noxa, a BH3-only member of the Bcl-2 family, and candidate mediator of p53-induced apoptosis. *Science*, 288, 1053-1058. 2000.

Takaoka, A., Mitani, Y., Suemori, H., Sato, S., Yokochi, T., Noguchi, S.,

Tanaka, N., and Taniguchi, T.; Crosstalk between interferon-g and -a/b signaling components at caveolar membrane domain.. *Science*, 288, 2357-2360. 2000.

Ohki, R., Nemoto, J., Murasawa, H, Oda, E., Inazawa, J., Tanaka, N., and Taniguchi, T.; Reprimo: A new candidate mediator of the p53-mediated cell cycle arrest at the G2 phase. *J. Biol. Chem.*, 275, 22627-22630. 2000.

Sato, M., Suemori, H., Hata, N., Asagiri, M., Ogasawara, K., Nakao, K., Nakaya, T., Katsuki, M., Noguchi, S., Tanaka, N., and Taniguchi, T.; Distinct and essential roles of transcription factors IRF-3 and IRF-7 in response to viruses for IFN-a/b gene induction. *Immunity*, 13, 539-548. 2000.

Hida, S., Ogasawara, K., Sato, K., Abe, M., Takayanagi, H., Yokochi, T., Sato, T., Hirose, S., Shirai, T., Taki, S., and Taniguchi, T.; CD8+ T cell-mediated skin disease in mice lacking IRF-2, the transcriptional attenuator of interferon a/b signaling. *Immunity*, 13, 643-655. 2000.

Takayanagi, H., Ogasawara, K., Hida, H., Chiba, T., Murata, S., Sato, K., Takaoka, A., Yokochi, T., Oda, H., Tanaka, K., Nakamura, K., and Taniguchi, T. ; T-cell-mediated regulation of osteoclastogenesis by signalling cross-talk between RANKL and IFN-g. *Nature*, 408, 600-605. 2000.

Okado-Matsumoto A. Matsumoto Fujii J. and—Taniguchi N.: Peroxiredoxin IV is a secretable protein with heparin-binding properties under reduced conditions., *J. Biochem.*, 127, 493-501, 2000.

Fujii T., Hamaoka R., Fujii J. and Taniguchi N.: Redox capacity of cells affects inactivation of glutathione reductase by nitrosative stress., *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 378, 123-130, 2000.

Endo T., Fujii T., Sato K., Taniguchi N. and Fujii J.: A pivotal role of Zn-binding residues in the function of the copper chaperone for SOD1., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 276, 999-1004, 2000.

Nakao C., Ookawara T., Sato Y., Kizaki T., Imazeki N., Matsubara O., Haga S., Suzuki K., Taniguchi N. and Ohno H.: Extracellular Superoxide dismutase in tissues from obese (ob/ob) mice., *Free. Rad. Res.*, 33, 229-241, 2000.

Kim Y. H., Takahashi M., Noguchi N., Suzuki E., Suzuki K., Taniguchi N. and Niki E.: Inhibition of c-Jun expression induces antioxidant enzymes under serum deprivation., *Arch. Biochem. Biophys.*, 374, 339-346, 2000.

Hisamoto K, Ohmichi M, Kurachi H, Hayakawa J, Kanda Y, Nishio Y, Adachi K, Tasaka K, Miyoshi E, Fujiwara N, Taniguchi N, Murata Y. Estrogen Induces the Akt-dependent Activation of Endothelial Nitric-oxide

Synthase in Vascular Endothelial Cells. *J Biol Chem.* 2001 Feb 2;276(5):3459-3467. *J Biol Chem.* 2;276:3459-3467.2001.

Koh YH, Park YS, Takahashi M, Suzuki K, Taniguchi N. Aldehyde reductase gene expression by lipid peroxidation end products, MDA and HNE. *Free Radic Res.*;33(6):739-46. 2000.

Nishida M., Miyagawa J., Yamashita S., Higashiyama S., Nakata A., Ouchi N., Tamura R., Yamamori K., Kihara S., Taniguchi N. and Matsuzawa Y.:Localization of CD9, an enhancer protein for proheparin-binding EGF-like growth factor, in human atherosclerotic plaques - Possible involvement of juxtacrine growth mechanism on smooth muscle cell proliferation.,*Arterioscler Thromb Vasc Biol.*, 20, 1236-1243, 2000.

Naka M., Nanbu T., Kobayashi K., Kamanaka Y., Komeno M., Yanase R., Fukutomi T., Fujimura S., Seo H. G., Fujiwara N., Ohuchida S., Suzuki K., Kondo K. and Taniguchi N.: A potent inhibitor of inducible nitric oxide synthase, ONO-1714, a cyclic amidine derivative., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 270, 663-667, 2000.

Park Y. S., Suzuki K., Mumby S.,

Taniguchi N. and Gutteridge J. M. C.: Antioxidant binding of caeruloplasmin to myeloperoxidase: myeloperoxidase is inhibited, but oxidase, peroxidase and immunoreactive properties of caeruloplasmin remain intact., *Free. Rad. Res.*, 33, 261-265, 2000.

Niwa J, Ishigaki S, Doyu M, Suzuki T, Tanaka K, Sobue G: A novel centrodome RING-finger protein, Dorfin, mediates ubiquitin ligase activity. *Biochem Biophys Res Com*, in press, 2001

Adachi H, Sobue G, et al: Transgenic mice with an expanded CAG repeat controlled by the human AR promoter show polyglutamine nuclear inclusions and neuronal dysfunction without neuronal cell death. *Hum Mol Genet*, in press, 2001

Shanlou Q, Iwashita T, Furukawa T, Yamamoto M, Sobue G, Takahashi M: Differential effects of LAR on biochemical and biological activities of RET-MEN2A and RET-MEN2B mutant protein. *J Biol Chem*, in press, 2001

McCampbell A, Taylor JP, Taye AA, Robitschek J, Li M, Walcott J, Merry D, Chai Y, Paulson H, Sobue G, Fischbeck KH: CREB-binding protein sequestration by expanded polyglutamine. *Hum. Mol. Genet*, 9: 2197-2202, 2000

Kobayashi Y, Kume A, Li M, Doyu M, Hata M, Ohtsuka K, Sobue G: Chaperones, Hsp70 and Hsp40, suppress aggregate formation and apoptosis in cultured neuronal cells expressing truncated androgen receptor protein with expanded polyglutamine tract. *J Biol Chem*, 275(12): 8772-8778, 2000

Watanabe H, Tanaka F, Doyu M, Riku S, Yoshida M, Hashizume Y, Sobue G: Differential somatic CAG repeat instability in variable brain cell lineage in dentatorubral pallidoluysian atrophy (DRPLA): a laser-captured microdissection (LCM)-based analysis. *Hum Genet*, 107: 452-457, 2000

Ishigaki S, Niwa J, Yoshihara T, Mitsuma N, Doyu M, Sobue G: Two novel genes, human neugrin and mouse m-neugrin, are upregulated with neuronal differentiation in neuroblastoma cells. *Biochem Biophys Res Com*, 279 526-533, 2000

Hasegawa, Y., T. Inagaki, M. Sawada and A. Suzumura (2000). Impaired cytokine production by peripheral blood mononuclear cells and monocytes/macrophages in Parkinson's disease. *Acta Neurol Scand* 101(3): 159-64.

Hasegawa, Y., M. Sawada, N. Ozaki, T. Inagaki and A. Suzumura (2000). Increased soluble tumor necrosis factor receptor levels in the serum of elderly people. *Gerontology* 46(4): 185-8.

Kanzawa, T., M. Sawada, K. Kato, K. Yamamoto, H. Mori and R. Tanaka (2000). Differentiated regulation of allo-antigen presentation by different types of murine microglial cell lines [In Process Citation]. *J Neurosci Res* 62(3): 383-388.

Morihata, H., J. Kawawaki, H. Sakai, M. Sawada, T. Tsutada and M. Kuno (2000). Temporal fluctuations of voltage-gated proton currents in rat spinal microglia via pH-dependent and -independent mechanisms [In Process Citation]. *Neurosci Res* 38(3): 265-271.

澤田誠：細胞を使って脳の疾患を治療する試み
治療、82, 128-130, 2000.

澤田誠：細胞周期とアポトーシス
Clinical Neuroscience 18(4) 407-409, 2000.

(2) 学会発表

宮石 理、松澤香織、金輪理佳子、磯部健一、田中 慎 F 3 4 4 / N の加齢特性-その 1.白血病の早期診断の指標。第 23 回日本基礎老化学会、6 月、大府

松澤香織、宮石 理、金輪理佳子、磯部健一、田中 慎 F 3 4 4 / N の加齢特性-その 2.左心房血栓症の成因。第 23 回日本基礎老化学会、6 月、大府

石田佳幸、城川哲也、宮石理、小松由紀夫、磯部健一 大脳皮質に投射する青斑核由来ノルアドレナリン線維の加齢変化.第 23 回日本基礎老化学会.6 月、大府

城川哲也、石田佳幸、磯部健一 青斑核ニューロン軸策終末の分枝パターンの加齢変化.、第 23 回日本基礎老化学会.6 月、大府

丸山和佳子、磯部健一、木谷健一、直井信 Propargylamine 類の抗アポトーシス作用に関する研究.第 23 回日本基礎老化学会.6 月、大府

南知予子、前原佳代子、山本貴子、丸山和佳子、磯部健一 (、木谷一、デプレニルによるラット全身諸組織の抗酸化酵素活性上昇効果.第 23 回日本基礎老化学会.6 月、大府

伊紅、磯部健一 加齢と T 細胞サイトカイン産生.第 23 回日本基礎老化学会.6 月、大府

金輪理佳子、宮石理、磯部健一 p53knockout mouse の加齢変化.第 23 回日本基礎老化学会.6 月、大府

羽根田正隆、木村祐子、長谷川忠男、磯部健一 アルキル化剤投与により誘導される gadd34 遺伝子の転写調節野解析.第 23 回日本基礎老化学会.6 月、大府

浜島史泰、長谷川忠男、磯部健一 熱刺激による GAHSP40 遺伝子の転写調節解析.第 23 回日本基礎老化学会.6 月、大府

前原佳代子、大橋憲太郎、磯部健

一 PDGF によるマンガンスーパーオキシドジスムターゼ (Mn-SOD) 遺伝子の転写調節.第 23 回日本基礎老化学会.6 月、大府

大橋憲太郎、丸山和佳子、磯部健一 パーオキシナイトライトによる SH-SY5Y 細胞への growth arrest and DNA damaged-inducible gene の誘導.第 23 回日本基礎老化学会.6 月、大府

浜島史泰、中島泉、磯部健一 GADD34 に結合する因子 GAHSP40 の解析;第 28 回日本免疫学会年会 11 月 14-15 日仙台

羽根田正隆、長谷川忠男、中島泉、磯部健一 アルキル化剤投与により誘導される GADD34 遺伝子の転写調節の解析;第 28 回日本免疫学会年会 11 月 14-15 日仙台

大橋憲太郎、磯部健一 パーオキシナイトライトによる SH-SY5Y 細胞へのアポトーシス誘導の機構;第 28 回日本免疫学会年会 11 月 14-15 日仙台

武内 章英、宮石 理、三品 裕司、磯部 健一 haplo-insufficiency により Sertoli Cell Only Syndrome を示す Kruppel-type 転写因子 PBFCOL-1 の始原生殖細胞 (PGC) における機能第 23 回日本分子生物学会年会 2000 年 12 月 13-16 日、神戸

磯部 健一、武内 章英、宮石 理、三品 裕司 haplo-insufficiency によ

り神経管閉鎖不全 (Neural Tube Defect=NTD) を示す Kruppel-type 転写因子 PBFCOL-1 の神経発生における機能第 23 回日本分子生物学会年会 2000 年 12 月 13-16 日、神戸

浜島史泰、磯部健一 GADD34 に結合する因子 GAHSP40 の解析；第 23 回日本分子生物学会年会 2000 年 12 月 15 日、神戸

前原佳代子、大橋憲太郎、磯部健一
Transcriptional regulation of manganese superoxide dismutase gene mediated by platelet derived growth factor. ; 第 23 回日本分子生物学会年会 2000 年 12 月 13-16 日、神戸
肖 恒怡、磯部健一、木内一壽
GDNF を介する Tyrosine Hydroxylase 発現調節の経路；第 23 回日本分子生物学会年会 2000 年 12 月 13-16 日、神戸

中島 泉
酸化ストレスとアポトーシス。
第 11 回 The Meeting of Liver and Immunology 特別講演 東京
平成 12 年 9 月

中島 泉、加藤昌志、アンワルル A. アカンド、武田湖州恵、川本善之、鈴木治彦
レドックス分子修飾によるチロシンキナーゼの活性調節 (Control of protein tyrosine kinase activity by a redox-mediated structural modification)

日本学術振興会レドックス生命科学第 170 委員会 第 2 回研究会 東京 平成 12 年 7 月

Izumi Nakashima, Masashi Kato, Yan Dai, Kozue Takeda, Yoshiyuki Kawamoto, Anwarul A. Akhand, Haruhiko Suzuki and Tommaso A. Dragani
MELANOMA DEVELOPMENT IN RET-TRANSGENIC MICE. The Fifth World Conference on Melanoma, Venice, Feb. 28-Mar. 3, 2001.

武田湖州恵、加藤昌志、Anwarul A. Akhand、伍江紅、吉原基、Khaled Hossain、川本善之、鈴木治彦、中島泉
浸透圧ストレスによる RET キナーゼ活性化には細胞内のジスルフィド結合による二量体形成が関与する第 30 回日本免疫学会総会 仙台 平成 12 年 1 1 月

杜軍、鈴木治彦、長瀬文彦、馬秀、Anwarul A. Akhand、中島泉
Methylglyoxal による活性酸素の産生及び ASK1 活性化とアポトーシスの誘導
第 30 回日本免疫学会総会 仙台 平成 12 年 1 1 月

Anwarul A. Akhand, Khaled Hossain, Masashi Kato, Jun Du, Kozue Takeda, Haruhiko Suzuki, Toshio Miyata and Izumi Nakashima
Carbonyl compound-mediated signaling for MAP family kinases and caspase activation in human endothelial cells.
第 30 回日本免疫学会総会 仙台
平成 12 年 1 1 月

Sawada, M., Imai, F., Suzuki, H., Kanno, T. (2000) Brain-Specific Migration and Protective Roles in

分担研究報告書

ストレスと老化

分担研究者 磯部健一

(国立長寿医療研究センター老化機構、部長)

研究要旨：活性酸素ラジカルはまず SOD で消去される。私達はミトコンドリアに存在する Mn-SOD の発現がストレス刺激でどのように調整させるか検討している。今年度は代謝回転を上げると考えられる PDGF 刺激による Mn-SOD の発現制御を検討した。NIH3T3 細胞を PDGF で刺激すると、Mn-SOD mRNA 発現が約 2 倍上昇した。プロモーター解析により、Mn-SOD の PDGF による転写に Egr-1, Sp1 といった転写因子が関与することが明らかになった。また、PDGF から Egr-1 への経路のシグナル伝達系を解析し、Egr-1 への経路を U0126 が特異的に抑制し、Mek1 から ERK1 を介する経路でシグナルが伝わることを判明した。DNA 傷害性ストレス刺激で発現が上昇する GADD34 の機能はいまだ不明である。その結合蛋白を含めた、発現調節を調べ、GADD34 は Sp1, CREB が GAHSP40 は HSF 転写因子が重要な役割を持つことが判明した。GADD34 と結合する ZBP-89 のノックアウトマウスはヘテロ欠損で精子形成不全、神経管閉鎖不全を呈した。

A. 研究目的

下等動物の長寿命変異体は酸化ストレスをはじめ各種ストレスに抵抗性である。高等動物は栄養制限食により長寿命が得られることが判明しているがこれは代謝による活性酸素の産生低下によると考えられている。人は紫外線、放射線、感染、熱等種々の外的ストレス刺激にさらされている。またこれらの刺激はラジカルを産生するし、代謝によっても内部でラジカルが産生される。本研究はストレス刺激が生体にあたえる変化をシグナル伝達系を中心に詳細に検討し、それが老化をどのように引き起こすかを検索する。一方生体は老化促進ストレス刺激に対し、防御的に作用する機構を備えている。ラジカル消去酵素 (SOD, カタラーゼ等)、HSP70 等シャペロン、さらには DNA 傷害を監視する p53, GADD 等は異なった機構でストレスから生体を防御していると考え

られる。私たちはこれまで p53 が免疫老化を防御することを p53 欠損マウスで示した。本研究班では p53 と同様ストレスにより誘導される GADD34 の機能を検索する。また、下等動物の線虫では IGF シグナルの変異体が長寿を示すことがわかっている。私たちは IGF、PDGF で細胞を刺激し、代謝を高めた時、細胞の防御蛋白である Mn-SOD の発現が上昇するか検討し、その発現メカニズムを検索する。

B. 研究方法

1. 遺伝子発現制御 ; Mn-SOD

目的の遺伝子の mRNA 発現は細胞あるいはマウスより RNA を調整し、ノザンハイブリダイゼーションで検索した。マウスゲノムライブラリーよりゲノム遺伝子をクローニングし、塩基配列を決定後、ルシフェラーゼアッセイ用の PGL3 レポーターベクターに組み

込んだ。組み換え技術を用いて、予想されるプロモーター領域、エンハンサー領域の各種欠失変異体、ミュウタントを作製した。NIH3T3細胞を代表とする培養細胞株に遺伝子移入し、転写活性をルシフェラーゼアッセイにて測定した。また、転写因子をコードする cDNA を発現ベクターに組み込み細胞に遺伝子移入した。細胞から核蛋白質を抽出し、ゲルシフト法にて転写因子の検討を行った。転写因子の特異性を知るために、抗体にてスーパーシフトアッセイを行った。

2、シグナル伝達系の解析

細胞に、増殖因子を加え、細胞抽出物を SDS-PAGE に流し、シグナル伝達系の抗体、リン酸化抗体を使用したウエスタンブロット法により測定した。また、シグナル伝達分子の特異性は各種 inhibitor で解析した。

3、マウス個体を使用した実験と組織染色

GADD34 と結合する ZBP-89 ノックアウトマウスは ES 細胞からキメラマウスをつくるところで hetero 欠損マウスが不妊となった。これらのマウスの病態解明のため、組織染色、免疫染色、in situ hybridization を行った。

(倫理面への配慮) 動物実験はマウス個体を使用した。長寿医療研究センター動物施設実験指針に従って研究を行った。

C. 研究結果

1、Mn-SOD の発現制御

活性酸素ラジカルはまず SOD で消去される。私達はミトコンドリアに存在する Mn-SOD の発現がストレス刺激でどのように調整させるか検討している。今年度は IGF、PDGF 刺激による Mn-SOD の発現制御を検討した。NIH3T3 細胞を PDGF で刺激すると、Mn-SOD mRNA 発現が約 2 倍上昇した。一方、IGF では変化がなかった。予想されるプロモーター領域、エンハンサー領域の各種欠失変異体、ミュウタントによるルシフェラーゼアッセイとゲルシフト解析により、Mn-SOD の PDGF による転写に Egr-1, Sp1 といった転写因子が関与することが明らかになった。また、PDGF から Egr-1 への経路のシグナル伝達系を解析し、Egr-1 への経路を U0126 が特異的に抑制し、Mek1 から ERK1 を介する経路でシグナルが伝わることを判明した。

2、GADD34 とその結合蛋白の発現制御と機能解析

各種ストレス刺激により上昇する GADD 蛋白のうち、GADD153、GADD45 は比較的よく機能がわかっている。私達は感染等ストレスで多量に発生する NO ラジカル、また H₂O₂ が GADD153 を誘導することを見いだした。一方、GADD34 はその機能がほとんどわかっていない。私達はこれまで、GADD34 に結合する蛋白として、

多数 (KIF3, G34BP, GAHSP40, Translin, ZBP-89) 報告してきた。今年度は GADD34 と それに結合する GAHSP40 の転写解析を進めた。すなわち、MMS 刺激による GADD34 の発現には Sp1, CREB と 言った転写因子が必要なことが判明した。また、GAHSP の熱ストレスによる発現には HSF 転写因子が必要であることが判明した。GADD34 と結合する ZBP-89 (BFCOL-1) のノックアウトマウスはヘテロ欠損の段階で精子形成不全、神経管閉鎖不全を呈した。そのため、ホモ欠損マウスを誕生させることは不可能となり、キメラ解析により、胎生期のかなり早期に精子形成となることが判明した。不全

D. 考察

1、NIH3T3 細胞を各種刺激により培養し、Mn-SOD の mRNA 発現を調べたが、PDGF のみ有意の増加を示した。PDGF は細胞の増殖を早め、代謝回転が高まって、酸素ラジカルが多量に産生されていると考えられ、Mn-SOD 産生が上昇するのは細胞の防御機構として合理的である。線虫では IGF が老化に関与するがヒトでは PDGF の関与が想像される。

2、GADD はストレス刺激によりアポトーシス誘導蛋白として働くことが報告されているが、分子メカニズムはまだ解明されていない。その結合蛋白の機能も含め今後

解析を進めたい。ZBP-89 は BFCOL-1 と呼ばれ、コラーゲンの発現を抑制することが示唆されている。GADD34 との関連、老化関連を今後調べていく。

E. 結論

1、増殖因子 PDGF は細胞の代謝回転をはやめ、多くのラジカルを産生させるが、生体は Mek-1 から ERK を介して Egr-1、Sp1 転写因子の活性化により Mn-SOD を発現させラジカルを消去し、老化防御作用を持つ。

2、DNA 傷害性ストレス刺激で発現が上昇する GADD34 の機能はいまだ不明である。その結合蛋白を含めた、発現調節を調べ、GADD34 は Sp1, CREB が GAHSP40 は HSF 転写因子が重要な役割を持つことが判明した。GADD34 と結合する ZBP-89 のノックアウトマウスはヘテロ欠損で精子形成不全、神経管閉鎖不全を呈した。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

(1) 論文発表

Oh-hashii K, Maruyama W, Isobe K. Peroxynitrite induces gadd34, 45 and 153 via p38 MAPK in human neuroblastoma SH-SY5Y cells. Free Rad. Biol. Med. 30: 213-221, 2001.

Hasegawa T, Xiao H, Hamajima F, Isobe K ;Interaction between DNA-damage protein GADD34 and a new member of the hsp40 family of heat shock proteins that is induced by a

DNA-damaging reagent. *Biochem J* 2000 15; 795-800. 2000.

Maehara, K., Hasegawa T. and Isobe K. A NF-kB p65 subunit is indispensable for activating manganese superoxide Dismutase Gene Transcription mediated by tumor necrosis factor- α . *J. Cellular Biochem.* 77: 474-486, 2000.

Takeuchi T., Miyaishi O., Kiuchi K. and Isobe K. Cu/Zn- and Mn-Superoxide Dismutase Are Specifically Up-regulated in Neuron After Focal Brain Injury. *J. Neurobiology* 45:39-46, 2000.

Isobe K. Stress and aging. *Current Genomics* 1;1-10;2000

Hasegawa T., Takeuchi A., Miyaishi O., Xiao H., Mao J, and Isobe K. PTRF is tissue-specific and interacts with the BFCOL1 zinc-finger transcription factor which binds to the two mouse type I collagen gene promoters. *Biochem. J.* 347,55-59, 2000.

Xiao, H., Hasegawa, T., and Isobe, K. p300 Collaborates with Sp1 and Sp3 in p21^{waf1/cip1} promoter activation Induced by Histone Deacetylase Inhibitor. *J. Biol. Chem.* 275; 1371-1376,2000.

Hasegawa T., Yagi A. and Isobe K.; Interaction between GADD34 and kinesin superfamily, KIF3A. *Biochem*

Biophys Res Commun 267; 593-596,2000.

(2) 学会発表

宮石 理、松澤香織、金輪理佳子、磯部健一、田中 慎 F 3 4 4 / N の加齢特性-その 1.白血病の早期診断の指標。第 23 回日本基礎老化学会. 6 月、大府

松澤香織、宮石 理、金輪理佳子、磯部健一、田中 慎 F 3 4 4 / N の加齢特性-その 2.左心房血栓症の成因. 第 23 回日本基礎老化学会. 6 月、大府

石田佳幸、城川哲也、宮石理、小松由紀夫、磯部健一 大脳皮質に投射する青斑核由来ノルアドレナリン線維の加齢変化. 第 23 回日本基礎老化学会. 6 月、大府

城川哲也、石田佳幸、磯部健一 青斑核ニューロン軸策終末の分枝パターンの加齢変化., 第 23 回日本基礎老化学会. 6 月、大府

丸山和佳子、磯部健一、木谷健一、直井信 Propargylamine 類の抗アポト-シス作用に関する研究. 第 23 回日本基礎老化学会. 6 月、大府

南知予子、前原佳代子、山本貴子、丸山和佳子、磯部健一 (、木谷一. デプレニルによるラット全身諸組織の抗酸化酵素活性上昇効果. 第 23 回日本基礎老化学会. 6 月、大府

伊紅、磯部健一 加齢と T 細胞サイトカイン産生. 第 23 回日本基礎老

化学会. 6 月、大府

金輪理佳子、宮石理、磯部健一
p53knockout mouse の加齢変化. 第 2
3 回日本基礎老化学会. 6 月、大府

羽根田正隆、木村祐子、長谷川忠
男、磯部健一アルキル化剤投与に
より誘導される gadd34 遺伝子の転
写調節野解析. 第 23 回日本基礎老
化学会. 6 月、大府

浜島史泰、長谷川忠男、磯部健一
熱刺激による GAHSP40 遺伝
子の転写調節解析. 第 23 回日本基
礎老化学会. 6 月、大府

前原佳代子、大橋憲太郎、磯部健
一 PDGF によるマンガンス-パ
ーオキシドジスムターゼ (Mn-SO
D) 遺伝子の転写調節. 第 23 回日
本基礎老化学会. 6 月、大府

大橋憲太郎、丸山和佳子、磯部健
一パーオキシナイトライトによる S
H-SY5Y 細胞への growth
arrest and DNA damaged-
inducible gene の誘導. 第 23 回日本
基礎老化学会. 6 月、大府

浜島史泰、中島泉、磯部健一
GADD34 に結合する因子 GAHSP40
の解析 ; 第 28 回日本免疫学会年
会 11 月 14-15 日仙台

羽根田正隆、長谷川忠男、中島
泉、磯部健一アルキル化剤投与に
より誘導される GADD34 遺伝子の
転写調節の解析 ; 第 28 回日本免
疫学会年会 11 月 14-15 日仙台

大橋憲太郎、磯部健一パーオキシ
ナイトライトによる SH-SY5Y 細
胞へのアポトーシス誘導の機構 ;
第 28 回日本免疫学会年会 11
月 14-15 日仙台

武内 章英、宮石 理、三品 裕司、
磯部 健一
haplo-insufficiency により Sertoli
Cell Only Syndrome を示す
Kruppel-type 転写因子 PBFCOL-1
の始原生殖細胞 (PGC) における
機能第 23 回日本分子生物学会年会
2000 年 12 月 13-16 日、神戸

磯部 健一、武内 章英、宮石 理、
三品 裕司 haplo-insufficiency に
より神経管閉鎖不全 (Neural Tube
Defect=NTD) を示す Kruppel-type
転写因子 PBFCOL-1 の神経発生
における機能第 23 回日本分子生物
学会年会 2000 年 12 月 13-16 日、
神戸

浜島史泰、磯部健一 GADD34 に結
合する因子 GAHSP40 の解析 ; 第
23 回日本分子生物学会年会 2000
年 12 月 15 日、神戸

前原佳代子、大橋憲太郎、磯部健
一 Transcriptional regulation of
manganase superoxide dismutase gene
mediated by platelet derived growth
factor. ; 第 23 回日本分子生物学
会年会 2000 年 12 月 13-16 日、神
戸

肖 恒怡、磯部健一、木内一壽
GDNF を介する Tyrosine
Hydroxylase 発現調節の経路 ; 第 23
回日本分子生物学会年会 2000 年
12 月 13-16 日、神戸