

厚生科学研究費補助金
(脳科学研究事業)

神経変性疾患におけるユビキチン
システムの分子病態解明と
治療法開発への応用に関する研究
(H 1 2—脳—0 0 8)

平成 1 3 年度総括・分担研究報告書

主任研究者 和田 圭司
平成 1 4 (2 0 0 2) 年 3 月

目 次

I. 総括研究報告書

神経変性疾患におけるユビキチン システムの分子病態解明と治療法 開発への応用に関する研究 和田圭司	_____	1
--	-------	---

II. 分担研究報告書

生体内ユビキチン-蛋白質結合体の 単離・同定に関する研究 高田耕司	_____	9
---	-------	---

ユビキチンシステムと神経伝達に 関する研究 野田百美	_____	12
----------------------------------	-------	----

III. 研究成果の刊行に関する一覧表	_____	17
---------------------	-------	----

IV. 研究成果の刊行物・印刷	_____	18
-----------------	-------	----

厚生科学研究費補助金（脳科学研究事業）

総括研究報告書

神経変性疾患におけるユビキチンシステムの分子病態
解明と治療法開発への応用に関する研究

主任研究者 和田 圭司 国立精神・神経センター神経研究所疾病研究第四部長

有効な治療法の乏しい難治性の神経変性疾患に対して、ユビキチンシステムの制御というこれまでとは全く異なった新しい視点から神経変性の予防・治療法を開発し臨床的に確立することをめざした。そのため我々が独自に gad マウスで見出した神経変性の原因遺伝子の一つである脱ユビキチン化酵素を中心に研究を展開した。申請した3年間の研究期間中に1) ユビキチンシステムを基盤に神経変性疾患が共有する分子機序を解明し、2) ユビキチンシステムの機能の適正化をベースにした画期的な変性疾患治療法を開発することを目標とする。研究2年目の今年度は世界に先駆けて UCH-L1 がユビキチンの安定化を決定しユビキチン依存的蛋白分解を制御する因子であることを見出し、新たな脱ユビキチン化酵素遺伝子として UCH-L4 を同定した。また新たな神経変性モデルとして UCH-L1/UCH-L3 二重機能欠失マウスを開発した。UCH-L1 の機能欠失を有する gad マウスではユビキチンモノマー量が特に神経軸索で低下し、その結果ユビキチン依存的蛋白分解を受ける蛋白質が蓄積していた。このことが神経変性に結びついている可能性が示唆されたため、それを証明すべくマルチユビキチン化蛋白質の単離・同定技術を開発した。また、神経科学の新局面としてユビキチンシステムが神経伝達を制御することを電気生理学的に見出した。さらに神経変性防止だけでなく神経細胞の機能修復を図る方法論の開拓も視野に入れた研究を展開し、実際、治療用ツールとして TAT 蛋白を付加した UCH-L1 あるいはユビキチンを開発し、細胞内への移行および末梢投与後の脳内への移行を確認した。我々の成果は神経変性疾患の基本メカニズムの抽出を世界に先駆けて行うだけでなく蛋白質導入など新規の治療法開発をめざすもので、その独自性は極めて高い。

分担研究者 高田耕司 慈恵会医科大学・助教授
野田百美 九州大学大学院薬学研
究院・助教授

ル破綻の面から解析することでまだまだ不明の点の多い神経変性疾患の分子機序解明に新たなメスを入れる。ごく最近我々は、逆行性神経軸索変性ならびに軸索末端の異常物蓄積を特徴とする軸索ジストロフィーマウス（略して gad マウス）のポジショナルクローニングを行い、その原因が脱ユビキチン化酵素の一つで神経特異的な発現を示す ubiquitin C-terminal hydrolase I (UCH-

A. 研究目的

本研究では、蛋白質分解系として近年重要性が高まっているユビキチンシステムに焦点を当て、神経変性の分子機序を蛋白質の品質コントロー

L1) 遺伝子の欠失であることを明らかにした (Nature Genetics, 1999)。「ユビキチン化された蛋白質の凝集」が共通して認められることが多い神経変性疾患の研究において、ユビキチンシステムの変異により実際神経変性が直接もたらされることを初めて示した重要な報告である。本研究ではこの成果をもとに、脱ユビキチン化酵素と相互作用する蛋白質の同定・機能解明を行い、神経変性疾患が共有する分子機構を解き明かす。また、ユビキチンサイクルの補正という新しい観点から治療法を開拓する。

今年度は1)ユビキチンがライソゾームで分解されることを世界で初めて見出し、さらに2)UCH-L1はユビキチン保護蛋白質としてユビキチンのライソゾームでの分解を防護しユビキチンの代謝を制御する因子であることを見出した。また、3)UCH-L1機能が欠失している gad マウスではユビキチンモノマー量が特に神経軸索で低下しユビキチン依存的蛋白分解を受ける蛋白質が蓄積していること、逆にUCH-L1トランスジェニックマウスでは逆に神経軸索におけるユビキチン量が増加していることを見出した。さらに4)蛋白質の蓄積が実際神経変性に結びつく機序を解析するためマルチユビキチン化蛋白質の単離・同定技術を開発した。他方、5)神経伝達におけるユビキチンシステムの重要性を世界に先駆けて示すために電気生理学的研究を行いUCH-L1が神経伝達物質受容体反応を増強させることを見出した。これらの結果に基づき、6)治療ツールとしてTAT蛋白を付加したUCH-L1あるいはユビキチンを開発し、細胞内への移行および末梢投与後の脳内への移行を確認した。さらに、7)新たな脱ユビキチン化酵素遺伝子UCH-L4を同定し、8)gadマウスとUCH-L3ノックアウトマウスとの交配で二重変異マウスを作製した。

B. 研究方法

(1) ユビキチン代謝の測定

パルスラベル法と特異的抗体を使用してユビキチンの代謝を測定した。proteasome 阻害剤とライソゾーム阻害剤を使用し、ユビキチン代謝に与える影響を検討した。

(2) UCH-L1 と相互作用する因子の解析

UCH-L1の活性中心のシステインをセリンに置換した変異UCH-L1は酵素活性を消失するがユビキチンとの解離定数は野生型と比べて不変であることを利用しUCH-L1の基質などの検索をおこなった。また免疫共沈降法、yeast two-hybrid法などによりUCH-L1と結合する蛋白質の検索を行った。

(3) ユビキチン、ユビキチン依存性蛋白分解に対するUCH-L1の作用の解析

gadマウスあるいはUCH-L1導入神経細胞やUCH-L1トランスジェニックマウスを用いてユビキチンの免疫組織染色を行った。またUCH-L1のユビキチンとの結合性や酵素活性をUCH-L3と比較した。さらに、gadマウスにおける蛋白質の蓄積を特異的抗体を用いたwestern blot法で解析した。

(4) マルチユビキチン化蛋白質の単離・同定技術の開発

ユビキチン結合領域部分に注目し、endoprotease Asp-Nで切断生成されるユビキチンC末端領域ペプチド(UCP)を含むペプチド断片群をUCP特異的抗体で分離・分画することを試みた。

(5) UCH-L1による神経伝達物質受容体反応増強作用の解析

UCH-L1発現PC12細胞におけるP2X型ATP受容体の活性をホールセル・パッチクランプ法で解析した。UCH-L1によるP2X受容体反応の増大へのPKAの活性化の関与を検討するためPKA阻害剤H-89の効果を検討した。またプロテインフォスファターゼ1(PP1)とプロテインフォスファターゼ2A(PP2A)の関与を検討するためPP1・PP2A阻害剤であるOkadaic Acidの効果を検討し

た。

(6) TAT-UCH-L1 の作用解析

HIV 由来 TAT 蛋白配列を付加した UCH-L1 及びユビキチンを開発し、細胞内への取り込み、末梢投与後の脳内への取り込みを検討した。

(7) UCH-L1 ホモログの同定

UCH-L1 遺伝子と相同性のある新規遺伝子を通常のクローニング法で同定し解析した。

(8) UCH-L1/UCH-L3 二重変異マウスの作製

gad マウスと UCH-L3 欠損マウスとの交配による二重変異マウスを開発した。

(倫理面への配慮)

動物を使用する研究計画はすべて国立精神・神経センター神経研究所動物実験倫理問題検討委員会や分担研究者の所属する施設の倫理問題検討委員会で審議され承認を受けた。実際の動物使用に当たっては国の法律・指針並びに米国 NIH の基準を守り動物が受ける苦痛を最小限に留めた。ヒト標本を用いた研究計画は研究対象者の不利益、危険性の排除を行い、インフォームドコンセントに十分配慮し、厚生科学審議会等の定める規定を遵守した。

C. 研究結果

(1) ユビキチンは主としてライソゾームで分解される

バルスラベル法と特異的抗体を用いた解析で、ユビキチン代謝は proteasome 阻害剤処理では遅延しないがライソゾーム阻害剤で遅延することを見出した。

(2) UCH-L1 はユビキチンと結合する

免疫共沈降法などにより UCH-L1 と結合する蛋白質としてユビキチンを確定した。また yeast two-hybrid 法などにより UCH-L1 が ERK1 や myelin basic protein と相互作用する可能性の高いことを見出した。

(3) ユビキチン安定化因子としての UCH-L1 機能解析

UCH-L1 は UCH-L3 に比べより強固にユビキチンと結合すること、しかし酵素活性は UCH-L3 に比べ低いことを見出した。さらに、UCH-L1 導入神経細胞や UCH-L1 トランスジェニックマウスでは特に神経軸索でユビキチン量が増加しユビキチンと UCH-L1 は共存していた。また gad マウスではユビキチン量が減少しておりユビキチン依存的分解を受ける蛋白質が蓄積していた。

(4) マルチユビキチン化蛋白質の単離・同定

endoproteinase Asp-N は、尿素や SDS 存在下でユビキチンを高効率に消化した。各プロテアーゼの消化によって生成が期待されるユビキチンの各 C 末端断片 (S₆₅-G₇₆, V8 protease; K₆₃-G₇₆, lysylendopeptidase; D₅₈-G₇₆, endoproteinase Asp-N) を抗原に用いて、モノクローナル抗体の作成を試みたところ、D₅₈-G₇₆ の場合のみ免疫沈降に適用できる抗体 (UC1) が得られた。以上の結果から、endoproteinase Asp-N によって生成されるユビキチン C 末端領域ペプチド D₅₈-G₇₆ (UCP) が分析に適すると結論した。K562 細胞の細胞質画分から精製したマルチユビキチン化蛋白質標品を用いて、UCP 含有ペプチドの分画・同定を試みたところ、K₄₈ を介するユビキチン鎖の結合領域断片や基質と推定される蛋白質の部分断片が得られた。また、マウス大脳皮質由来の同蛋白質標品を用いた検討においても同様の結果を得た。

(5) 神経伝達におけるユビキチンシステムの病態生理解析

5mM ATP 投与による P2X 受容体反応の大きさを保持電位 -70mV で測定したところ、UCHL1 をトランスフェクションした細胞で有意な増加が認められた。P2X 受容体反応の大きさは、PKA 阻害剤 H-89(10 μM) の 10 分間前投与で有意な抑制が認められた。また Okadaic Acid(100nM) の 30 分間前処置により有意な差は認められなかったものの P2X 受容体反応の大きさは減少した。

(6) 遊離ユビキチン量の適正化に基づいた治療法の開発

HIV 由来 TAT 蛋白のうち protein transduction domain を付加した UCH-L1 及びユビキチンを開発し、細胞内への取り込み、末梢投与後の脳内への取り込みを確認した。

(7) UCH-L4 の同定

新たな脱ユビキチン化酵素遺伝子 UCH-L4 をマウスで同定した。

(8) 新たなモデル動物の開発

gad マウスと UCH-L3 ノックアウトマウスとの交配で二重変異マウスを作製した。

D. 考察

ユビキチンシステムやシャペロン分子など蛋白質分解・蛋白質品質管理系が神経変性疾患の謎を解くキーでありその研究からブレイクスルーが生じるだろうという期待がここ1、2年急速に高まっている。若年性パーキンソンニズムにおいて同定された原因遺伝子産物の Parkin はユビキチンに相同性を示すだけでなくユビキチンリガーゼ活性を持つことが判明した。また、UCH-L1 にミスセンス変異を有するドイツ人のパーキンソン病家系も報告されている。さらにはポリグルタミン病の病態が E6-AP ユビキチンリガーゼに変異をもたらすことでより重篤化することがモデル動物を用いた系で報告されている。このように神経変性疾患におけるユビキチンシステムの重要性は疑うべくもない。しかしユビキチンシステムの全容解明はいまだなされておらず、ユビキチンシステムの機能異常が神経変性に結びつく分子カスケードはまだまだ不明の点が多い。本研究はユビキチンシステムの病態生理学的意義をとりわけ gad マウスの原因遺伝子である UCH-L1 の機能解析から明らかにし、個々の神経変性疾患が発病に至る基本メカニズムを解き明かすもので、その成果は治療技術の高度化につながる。神経変性の基本メカニズムの解明と根本的治療法の開発は社会の要求であり、世界に先駆けた成果をめざす本研究は行政的にみてもその達成が期待さ

れている。

本年度の結果からは、ユビキチンが主にライソゾームで分解されることを世界で初めて示しただけでなく、UCH-L1 がユビキチンと結合しユビキチンがライソゾームなどで分解されるのを防護する重要な因子である可能性が高いことを示した。実際 UCH-L1 は UCH-L3 に比べ、ユビキチン C 末端の水解作用は弱く、逆にユビキチン結合性は UCH-L3 に比べ高い。UCH-L1 は哺乳類にのみ存在し、しかも神経系と生殖器系に特異的に発現することを考えると、神経系においては UCH-L1 はユビキチン保護蛋白質としてユビキチンの代謝回転やユビキチン依存的蛋白分解を律速し、神経細胞の機能を維持していると推測される。その意味でマルチユビキチン化蛋白質の単離・同定法を開発した意義は大きい。生体内のマルチユビキチン化蛋白質は、複数の基質蛋白に不定長のユビキチン鎖が付加したもので質的にきわめて不均一である。そのため、直接単離分析するという手法は、非実用的と見なされていた。本研究はこの点を克服しただけでなく、ユビキチンシステムの機能異常からみた神経変性の分子カスケードの抽出に貢献する。

免疫共沈降法、yeast two-hybrid 法などにより UCH-L1 が ERK1 や myelin basic protein と相互作用する可能性の高いことを見出したことも興味深い。その生物学的意味づけと病態との関連性の追求は今後の課題であるが、myelin basic protein については神経損傷時一時的に UCH-L1 がグリアに発現することを見出しているため、神経再生との関連性での研究の展開が望まれる。

UCHL1 による P2X 受容体反応の増大の発見はユビキチンシステムがシナプス伝達を制御している可能性を示唆するものでその意義は大きい。PKA 阻害剤の H-89 投与で有意に増大が抑制されたことから、UCHL1 が PKA を活性化することにより P2X 受容体を修飾していることが示唆された。UCH が誘導されるとプロテアソーム機構が

機能し PKA の regulatory(R) subunits の分解を促進し、PKA が活性化され長期増強に至るという可能性がアメフラシで示されているが哺乳類でも同様の機序が働いている可能性がある。とりわけ、神経変性疾患における神経回路機能の解析はまだ緒についたばかりであることから本研究の1層の発展が期待される。

また TAT 配列を付加した UCH-L1 及びユビキチンが末梢投与後に脳内に取り込まれることを確認したことで、個体を用いた治療実験が開始できるようになった。平成 14 年度はその治療効果を *gad* マウスを用いて検証する予定である。

E. 結論

本研究では、UCHL1 の機能として、ユビキチンと結合しユビキチンの代謝およびユビキチン依存性蛋白分解を制御している可能性を示した。また新たに UCH-L1 の機能として、PKA を活性化する作用を持ち ATP 受容体反応を著明に増大させることを示した。これらの発見は、ユビキチンシステムから見た神経変性疾患の分子機序解明に貢献するだけでなく、ユビキチンシステムが神経伝達物質の放出およびシナプス応答を制御する可能性をも明らかにした。UCH-L1 は脳機能全体に重要な機能を果たしていると考えられる。また TAT 配列を付加した UCH-L1 などが脳血流閥門を通過して神経細胞に取り込まれることを確認したことは新たな神経変性疾患の治療法開発を予感させるものとして意義深い。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

1) Osawa, Y., Wang, Y.L., Osaka, H., Aoki, S., and Wada, K., Cloning, expression, and mapping of a mouse gene, *Uchl4*, highly homologous to human

and *Uchl3*. *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, 283, 627-633, 2001

2) Kurihara, L.J., Kikuchi, T., Wada, K. and Tilghman, S.M., Loss of *Uch-L1* and *Uch-L3* leads to neurodegeneration, posterior paralysis and dysphagia. *Hum. Mol. Genet.*, 10, 1963-1970, 2001

3) Namura, S., Maeno, H., Takami, S., Jiang, X.F., Kamichi, S., Wada, K., and Nagata, I. Inhibition of glial glutamate transporter GLT-1 augments brain edema after transient focal cerebral ischemia in mice. *Neurosci. Lett.*, in press

4) Takada, K., Hirakawa, T., Yokosawa, H., Okawa, Y., Taguchi, H., and Ohkawa, K. Isolation of Ubiquitin-E2 (Ubiquitin-Conjugating Enzyme) Complexes from Erythroleukaemia Cells using Immunoaffinity Techniques. *Biochem. J.* 356, 199-206, 2001.

5) Usuba, T., Ishibashi, Y., Okawa, Y., Hirakawa, T., Takada, K., Ohkawa, K. Purification and identification of monoubiquitin-phosphoglycerate mutase B complex from human colorectal cancer tissues. *Int. J. Cancer* 94, 662-668, 2001.

6) Higashida, H., Yokoyama, S., Hoshi, N., Hashii, M., Egorova, A., Zhong, Z-G., Noda, M., Shahidullah, M., Taketo, M., Yasuhiro, K., Takahashi, H., Chen, X-L., Shin Y. and Zhang, J-S.: Signal transduction from bradykinin, angiotensin, adrenergic and muscarinic receptors to effector enzymes, including ADP-ribosyl cyclase. *Biological Chemistry*, 382, 23-30, 2001.

7) Higashida, H., Hashii, M., Yokoyama, S., Hoshi, N., X-L. Chen, X-L., Egorova, A., Noda, M., and Zhang, J-S.: Cyclic ADP-ribose as a second messenger revisited from a new aspect of signal transduction from receptors to ADP-ribosyl cyclase. *Pharmacology & Therapeutics*, in press.

2. 学会発表
- 1) 和田圭司、小坂 仁、青木俊介、王 玉来、ubiquitin-proteasome 系と神経変性、第4 2 回日本神経学会総会シンポジウム「神経変性疾患の細胞死をめぐる」, 5.12, 2001
 - 2) Wada K, Wang YL, Aoki S, Osawa Y, Li H, Takizawa S, Sakurai M, Yuda K, Hara Y, Osaka H, THE *gad* MOUSE: A USEFUL MODEL FOR INVESTIGATING NEURO-DEGENERATION, XIV International Congress on Parkinson's Disease, Helsinki, 7.30, 2001
 - 3) 野田百美、萩野 由紀子、飯浦 幸弘、渋谷 佳子、中西 博、青木俊介、和田圭司、ラット・ミクログリアに発現するブラジキニン受容体、第4 4 回日本神経化学・第2 4 回日本神経科学合同大会（京都）9.28、2001.
 - 4) 小坂仁、王 玉来、滝沢修一、櫻井省花子、青木俊介、李航、原洋子、佐藤野衣、西川香理、竹田礼子、木村一郎、高田耕司、野田百美、和田圭司 Ubiquitin C-terminal Hydrolase L1 の機能と神経変性、第4 4 回日本神経化学・第2 4 回日本神経科学合同大会（京都）9.28、2001.
 - 5) Maeno H, Sun YJ, Kiyama H, Wada k. Analysis and characterization of the NTR1 KO mice. Society for Neuroscience, 31st Annual Meeting, San Diego, USA, 11.11. 2001.
 - 6) Osaka H, Wang Y, Takizawa S, Aoki S, Sakurai M, Li H, Hara Y, Takada K, Noda M, Wada K. Ubiquitin C-terminal hydrolase as a regulator of ubiquitin level. Society for Neuroscience, 31st Annual Meeting, San Diego, USA, 11.11, 2001.
 - 7) Takizawa S, Wang YL, Osaka H, Yuda K, Sakurai M., Aoki, S., Nishikawa K, Sato Y, Wada E, Harada T, Harada C, Takada K, Takeda A, Wada K. Novel function of ubiquitin C-terminal hydrolase and therapeutic trial. Society for Neuroscience, 31st Annual Meeting, San Diego, USA, 11.11, 2001.
 - 8) Noda M, Hagino Y, Sekiguchi M, Harada T, Wada K. Potentiating effect of PEPA (4-[2-(phenylsulfonyl-amino)ethylthio]-2,6-difluorophenoxy-acetamide) on AMPA type of glutamate receptor in rat microglia.. Society for Neuroscience, 31st Annual Meeting, San Diego, USA, 11.13, 2001.
 - 9) 滝沢修一、小坂仁、王玉来、高田耕司、櫻井省花子、千葉茂、野田百美、和田圭司、ユビキチン C 末端水解酵素 1 型の機能解析 I：—基質・相互作用蛋白の同定—、第2 4 回日本分子生物学会年会、横浜、12. 12, 2001.
 - 10) 王玉来、小坂仁、高田耕司、佐藤野衣、孫英傑、李航、青木俊介、櫻井省花子、原洋子、木村一郎、西川香里、竹田礼子、野田百美、瀧川一彦、木山博資、和田圭司、ユビキチン C 末端水解酵素 1 型の機能解析 II：—神経系におけるユビキチン量の制御—、第2 4 回日本分子生物学会年会、横浜、12. 12, 2001.
 - 11) 小坂仁、王玉来、滝沢修一、高田耕司、佐藤野衣、原田高幸、原田知加子、千葉茂、野田百美、和田圭司、ユビキチン C 末端水解酵素 1 型の機能解析 III：—ユビキチン化・ユビキチン依存性蛋白分解への影響—、第2 4 回日本分子生物学会年会、横浜、12. 12, 2001.
 - 12) 佐藤野衣、湯田和洋、小坂仁、王玉来、滝沢修一、大澤由記子、千葉茂、野田百美、和田圭司、ユビキチン C 末端水解酵素 1 型の蛋白導入治療、第2 4 回日本分子生物学会年会、横浜、12. 12, 2001.
 - 13) Kanahori Y, Shimada A, Aoki S, Wada K, Noda M, Regulation of P2X receptor by ubiquitin C-terminal hydrolase L1, 第2 回九州脳研究シンポジウム、福岡、1.25, 2002.
 - 14) Hagino Y, Sekiguchi M, Harada T, Aoki S, Wada K, Noda M, Heterogeneity of AMPA type of glutamate receptor in rat microglia 第2 回九州脳研究シンポジウム、福岡、1.25, 2002.

- 15) 野田百美、和田圭司、パーキンおよび脱ユビキチン化酵素の過剰発現による ATP 受容体の修飾、第 12 回日本病態生理学会、松山、1.26, 2002.
- 16) 和田圭司、野田百美、脱ユビキチン化酵素によるユビキチンの安定化と神経変性・神経伝達、第 12 回日本病態生理学会、松山、1.26, 2002.
- 17) Osaka H, Wang YL, Takada K, Takizawa S, Li H, Sato Y, Nishikawa K, Sun YJ, Sakurai M, Harada T, Hara Y, Kimura I, Noda M, Namikawa K, Kiyama H, Aoki S, Wada K. Ubiquitin Carboxy-Terminal Hydrolase L1 mediates ubiquitin stability and function in neurons. The COE International Symposium on Recent Advances in Research for Neurodegeneration. Tokyo, 3.6, 2002
- 18) 高田耕司、青木勝彦、平河多恵、大川 清. 生物材料からのユビキチン-タンパク質複合体の精製・同定法. 第 53 回日本動物学会関東支部総会. 習志野. 3 月. 2001.
- 19) 青木勝彦、大川 豊、高田耕司、大川 清. クロマチン画分のユビキチン化ヒストン H2A プロセシング産物. 第 53 回日本動物学会関東支部総会. 習志野. 3 月. 2001.
- 20) Takada K, Hirakawa, T., and Ohkawa, K. A novel strategy for identification of multiubiquitin-protein conjugates isolated from biological materials. FASEB Summer Research Conference: Ubiquitin and Intracellular Protein Degradation. Saxtons River, Vermont. Jun. 2001.
- 21) 高田耕司、薄葉輝之、石橋由朗、青木照明、大川 清. 大腸癌に存在するユビキチン-ホスホグリセリン酸ムターゼ B 複合体の性状. 第 60 回 日本癌学会総会. 横浜. 9 月. 2001.
- 22) 高田耕司、青木勝彦、平河多恵、大川 清. 生体に蓄積したユビキチン-タンパク質複合体の蛋白化学的解析. 第 118 回成医学会総会. 慈恵医大. 10 月. 2001.
- 23) 高田耕司、青木勝彦、南 次郎、柴田俊一、大川 清. マルチユビキチン化蛋白質の新規解析法: ユビキチン C 末端領域含有ペプチド断片の分離と同定. 第 74 回日本生化学会大会. 京都. 10 月. 2001. (生化学. 73: 783, 2001)
- 24) Takada T. Immunoaffinity purification and identification of multiubiquitin-protein conjugates accumulated in the brain. COE International Symposium on Recent Advances in Research for Neurodegeneration. Tokyo. Mar. 2002.
- 25) Higashida, H., Egorova A., Higashida, C., Zhong, Z-G., Yokoyama, S., Noda M, Zhang J-S. Increased cADP-ribose synthesis by activation of adrenergic receptors with norepinephrine in ventricular muscle cell membrane is involved in upregulation of cardiac function by sympathetic stimulation. The 9th International Catecholamine symposium. (Kyoto, Japan), Mar. 2001
- 26) Brown, D.A., Nakanishi, N., Noda M. Bradykinin receptor in rat primary cultured microglia. XXXIV International Congress of Physiological Sciences. (Christchurch, New Zealand), Aug. 2001.
- 27) Furuta, A., Noda M, Goto, Y. Suzuki, S.O. Rothstein, J.D., Iwaki. T Expressions of glutamate transporter subtypes in kainite-induced rat epilepsy. Society for Neuroscience, 31st Annual Meeting. (San Diego, USA) Nov. 2001.
- 28) Okada, M., Yamanouchi, Y., Urae, R., Noda, M., Irie, S., Ozaki, N., Iwata, N. Diverse effects of forskolin on extracellular acidification in CHO cells and C6 glioma cells as assessed with a cytosensor microphysiometer. Society for Neuroscience, 31st Annual Meeting. (San Diego, USA) Nov. 2001.
- 29) Furuta A, Noda M, Goto Y, Iwaki T, Altered expression of glutamate transporter subtypes in kainite-induced rat epilepsy. 第 2 回九州脳研究

シンポジウム、福岡、1.24, 2002.

H. 知的所有権の出願・登録状況（予定を含む）

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

厚生科学研究費補助金（脳科学研究事業）
分担研究報告書

生体内ユビキチン-蛋白質結合体の単離・同定に関する研究

分担研究者 高田耕司（東京慈恵会医科大学 生化学講座第1助教授）

ユビキチン-蛋白質結合体の中で基質蛋白にマルチユビキチン鎖が付加したものがマルチユビキチン化蛋白質である。同蛋白質は、蛋白分解の基質とシグナルの情報を保有するため、単離・同定に基づく分析が望まれる。しかし、マルチユビキチン鎖長の多様性から個々の成分を分離することは困難であり、そうした試みはほとんどない。今回、ユビキチン結合領域部分に注目し、endoproteinase Asp-N で切断生成されるユビキチン C 末端領域ペプチド (UCP) を含むペプチド断片群の分離・分画・分析法を確立した。その結果、マルチユビキチン化蛋白質精製標品から、基質蛋白候補やユビキチン鎖の断片についてアミノ酸配列などの情報が得られ有用性が認められた。脳虚血および神経系疾患における研究への応用が期待される。

A. 研究目的

ユビキチンシステムは細胞内蛋白質の選択的分解を司る。ユビキチンはユビキチン結合酵素 E2/ユビキチンリガーゼ E3 とのチオエステル結合を経て、基質蛋白にイソペプチド結合し、分解シグナル“マルチユビキチン鎖”を付与する。したがって、生体内のマルチユビキチン化蛋白質は、選択的蛋白分解の基質やシグナルの情報を内包している。昨年度、マルチユビキチン化蛋白質の簡便な精製法を確立した。本年度は、これによって得た標品を用い、基質蛋白など構成成分の単離・同定に関する検討を行った。

B. 研究方法

マルチユビキチン化蛋白質においては、同じ基質蛋白分子に対して様々な長さのユビキチン鎖が付加している。したがって、そのままの形状で個々の基質蛋白に由来するものを分けることは不可能に近い。そこで同蛋白質群を限定分解しペプチド断片化後、その中から基質同定に有用なものだけを抗体アフィニティーで分離する方法を考案した。限定分解の方法としては、ギ酸加水分解と酵素 (lysylendopeptidase, endoproteinase Asp-N, V8 protease) 消化を検

討した。また、各方法で切り出されるユビキチンの C 末端断片に対応するペプチドを合成し、それらを抗原としたモノクローナル抗体の作成を行い、各ペプチドの免疫沈降に有効なものを選択した。最適な方法を組み合わせ、K562 細胞やマウス大脳皮質由来のマルチユビキチン化蛋白質から UCP 含有ペプチド断片群を分離し、逆相 HPLC で分画後、プロテインシーケンサーでアミノ酸配列を決定した。

(倫理面への配慮)

動物使用に当たっては国の法律・指針を守り動物が受ける苦痛を最小限に留めた。

C. 研究結果

ギ酸加水分解と V8 protease では、再現性のあるユビキチン消化条件を見出せなかった。一方、lysylendopeptidase と endoproteinase Asp-N は、尿素や SDS 存在下でユビキチンを高効率に消化した。各プロテアーゼの消化によって生成が期待されるユビキチンの各 C 末端断片 (S₆₅-G₇₆, V8 protease; K₆₃-G₇₆, lysylendopeptidase; D₅₈-G₇₆, endoproteinase Asp-N) を抗原に用いて、モノクローナル抗体の作成を試みたところ、D₅₈-G₇₆ の場合のみ免疫沈降に適用でき

る抗体 (UC1) が得られた。以上の結果から、endoprotease Asp-N によって生成されるユビキチン C 末端領域ペプチド D₅₈-G₇₆

(UCP) が分析に適すると結論した。K562 細胞の細胞質画分から精製したマルチユビキチン化蛋白質標品を用いて、UCP 含有ペプチドの分画・同定を試みたところ、K₄₈ を介するユビキチン鎖の結合領域断片や基質と推定される蛋白質の部分断片が得られた。また、マウス大脳皮質由来の同蛋白質標品を用いた検討においても同様の結果を得た。

D. 考察

生体内のマルチユビキチン化蛋白質は、複数の基質蛋白に不定長のユビキチン鎖が付加したもので質的にきわめて不均一である。そのため、直接単離分析するという手法は、非実用的と見なされていた。今回、分析の対象をユビキチン-基質蛋白間およびユビキチン-ユビキチン間の結合領域部分のペプチド断片 (UCP 含有ペプチド) に絞ることでこの問題の回避をはかった。結果、実際に基質蛋白候補の断片やユビキチン鎖の興味ある情報が得られ、有用性が証明された。今後、これらの結果を他の手法で検証しながら、脳虚血や神経系疾患での同蛋白質の分析に取り組む予定である。

その一方、今回の検討で本方法の課題も明らかとなった。ひとつは、試料量の問題である。大脳皮質のマルチユビキチン化蛋白質の網羅的解析を試みたところ、マウス数 10 匹相当の組織を必要とした。今後、より少量の細胞・組織での分析が予想されるため、ペプチド解析の高感度化が望まれる。また、プロテインシーケンサーによる分析では、逆相 HPLC で分離される多数のペプチドの処理に月単位の時間を要する。これを週単位まで迅速化したいと考えている。ペプチドの同定に質量分析 (MALDI-TOF, LC-MS/MS, ESI Q-TOF 等) を積極的に導入し、問題を解決していきたい。

E. 結論

マルチユビキチン化蛋白質の限定分解に

よって生成されるユビキチン結合領域断片 (UCP 含有ペプチド) の解析は、基質蛋白やユビキチン鎖の情報を得る上で有用であり、脳研究への応用が期待される。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

論文発表

Takada, K., Hirakawa, T., Yokosawa, H., Okawa, Y., Taguchi, H., and Ohkawa, K. (2001) Isolation of Ubiquitin-E2 (Ubiquitin-Conjugating Enzyme) Complexes from Erythroleukaemia Cells using Immunoaffinity Techniques. *Biochem. J.* 356: 199-206.

Usuba, T., Ishibashi, Y., Okawa, Y., Hirakawa, T., Takada, K., Ohkawa, K. (2001) Purification and identification of monoubiquitin-phosphoglycerate mutase B complex from human colorectal cancer tissues. *Int. J. Cancer* 94: 662-668.

学会発表

高田耕司、青木勝彦、平河多恵、大川 清。生物材料からのユビキチン-タンパク質複合体の精製・同定法。第 53 回日本動物学会関東支部総会。習志野。3 月。2001。

青木勝彦、大川 豊、高田耕司、大川 清。クロマチン画分のユビキチン化ヒストン H2A プロセッシング産物。第 53 回日本動物学会関東支部総会。習志野。3 月。2001。

Takada, K., Hirakawa, T., and Ohkawa, K. A novel strategy for identification of multiubiquitin-protein conjugates isolated from biological materials. FASEB Summer Research Conference: Ubiquitin and Intracellular Protein Degradation. Saxtons River, Vermont. Jun. 2001.

高田耕司、薄葉輝之、石橋由朗、青木照明、大川 清。大腸癌に存在するユビキチン-ホスホグリセリン酸ムターゼ B 複合体の性状。第 60 回日本癌学会総会。横浜。9 月。2001。 (*Jpn. J. Cancer Res.* 92(suppl.): 420, 2001)

高田耕司、青木勝彦、平河多恵、大川 清

・ 生体に蓄積したユビキチン-タンパク質複合体の蛋白化学的解析. 第 118 回成医学会総会. 慈恵医大. 10 月. 2001.

高田耕司, 青木勝彦, 南 次郎, 柴田俊一, 大川 清. マルチユビキチン化蛋白質の新規解析法: ユビキチン C 末端領域含有ペプチド断片の分離と同定. 第 74 回日本生化学会大会. 京都. 10 月. 2001. (生化学. 73: 783, 2001)

Takada, T. Immunoaffinity purification and identification of multiubiquitin-protein conjugates accumulated in the brain. COE International Symposium on Recent Advances in Research for Neurodegeneration. Tokyo. Mar. 2002.

H. 知的所有権の出願・登録状況 (予定を含む)

なし

ユビキチンシステムと神経伝達に関する研究

分担研究者 野田 百美（九州大学・大学院・薬学研究院・病態生理学分野・助教授）

家族性パーキンソン病の原因遺伝子の一つである脱ユビキチン化酵素の変異はユビキチンシステムの機能障害をもたらしパーキンソン病など神経変性疾患を引き起こす。しかし神経系、特に神経伝達における脱ユビキチン化酵素の機能は殆ど不明である。そこで我々はまず、脱ユビキチン化酵素の一つである UCH-L1（ユビキチン C 末水解酵素）を神経様培養細胞に導入し、シナプス伝達において、新しい神経伝達物質として注目を浴びると共に、他の神経伝達物質の放出に深く関与する ATP の受容体に及ぼす影響を検討した。その結果、UCH-L1 を過剰発現した細胞では ATP 受容体の反応は著明に増大した。このことは、脱ユビキチン化酵素による脱ユビキチン化と遊離ユビキチンの増加が神経伝達を促進することを示唆しており、神経伝達においてユビキチンシステムが重要な役割を果たしていることを示唆する極めて重要な発見であると言える。

A. 研究目的

最近、神経難病のパーキンソン病で、残存ニューロンの細胞質内に沈着するレビー小体に UCHL1 がユビキチンとともに多量に蓄積していることが見出された。その後、ドイツの常染色体優性家族性パーキンソン病家系で UCHL1 遺伝子のミスセンス変異が原因となっていることが、さらにはほぼ同時期に、劣性遺伝する神経変性疾患モデルマウス（逆行性神経軸索変性マウス：gracile axonal dystrophy, 略して *gad* マウス）の原因遺伝子が UCHL1 遺伝子の部分欠失によることが報告された。このようにユビキチン-プロテアソームシステムの異常が原因で“ユビキチン化タンパク質の凝集を伴う神経変性”をきたすことが示されている。しかしながら、UCHL1 の機能喪失がどのように神経細胞死を誘導しているのかという点は詳しくわかっておらず、実際の細胞内での UCHL1 の機能解明や、遺伝子導入マウス等を用いた実験等が必要である。そこで今回、我々は神経系クローン細胞である PC12 細胞(Pheochromocytoma)を用いて PC12 細胞内での UCHL1 の機能を電気生理学的に解明することを試みた。PC12 細胞には種々の神経伝達物質受容体が発現していることがわかっており、その中で最近新しい神経伝

達物質としての重要性が次々に解明されている ATP 受容体について検討することにした。ATP 受容体にはイオンチャネル内臓型 (P2X) と G タンパク共役型 (P2Y) の 2 種類のサブタイプがある。P2X 受容体反応は P2Y 受容体反応に比較して一般により迅速であり、この性質は神経伝達において重要であると考えられていることから、まず P2X 受容体について検討を始めた。

B. 研究方法

PC12 細胞の培養法：コラーゲンコーティングを施した 35mm ディッシュに、2mM グルタミン、10%馬血清、5%胎児牛血清、50unit/mL ペニシリン、50 μ g/mL ストレプトマイシンを補った RPMI-1640 Medium を用いて PC12 細胞をまき、37°C で 10%CO₂ にて培養した。1~2 日後、2mM グルタミン、0.1%馬血清、0.05%胎児牛血清、50unit/mL ペニシリン、50 μ g/mL ストレプトマイシンを補った RPMI-1640 Medium（低血清培地）に培地交換し、100ng/mL 神経成長因子 (NGF) を加え、培養した。

トランスフェクション法：NGF にて分化誘導 3~10 日後、Lipofectamin Plus™ Reagent を用いてリポフェクション法により細胞内に蛍光標識をつけた遺伝子を導入し、24 時間後より電気生理

学的解析を開始した。

パッチクランプ法：-70mV に膜電位固定モードを設定し、5mM ATP を 60 秒間投与した際の P2X 受容体反応を測定した。細胞外液(mM)：NaOH 132, KCl 5, MgCl₂ 1, CaCl₂ 2, Glucose 10, HEPES 10, (pH7.4)。細胞内液(mM)：CsCl 120, EGTA 5, HEPES 20, MgCl₂ 1, Mg₂ATP₃ 3, (pH7.2)。

(倫理的配慮)

今年度は動物個体、ヒト標本を用いた研究は行っていない。

C. 研究結果

(1) P2X 受容体に及ぼす UCHL1 の影響

5mM ATP 投与による P2X 受容体反応の大きさを保持電位-70mV で測定したところ、UCHL1 をトランスフェクションした細胞で有意な増加が認められた。

(2) UCHL1 過剰発現で増大した P2X 受容体反応に及ぼす H-89 の影響

アメフラシでは UCH ファミリーによりサイクリック AMP 依存性プロテインキナーゼ A (PKA) の活性化が報告されている。そこで UCHL1 による P2X 受容体反応の増大への PKA の活性化の関与を検討した。5mM ATP 投与による P2X 受容体反応の大きさは、PKA 阻害剤 H-89(10 μM) の 10 分間前投与で有意な抑制が認められた。

(3) UCHL1 過剰発現で増大した P2X 受容体反応に及ぼす Okadaic Acid の影響

PKA からさらにどのような経路をたどって P2X 受容体を修飾しているかを検討した。PKA 活性化の下流にあるシグナル伝達系のうち、マウスの脳線条体では正のフィードバックによるドーパミンシグナリングの増幅が報告されている。そこで UCHL1 による P2X 受容体反応の増大へのプロテインフォスファターゼ 1(PP1)とプロテインフォスファターゼ 2 A(PP2A)の関与を検討した。5mM ATP 投与に伴う P2X 受容体反応の大きさは PP1・PP2A 阻害剤である Okadaic Acid(100nM)の 30 分間前処置により有意な差は認められなかったものの減少した。

(4) UCHL1 過剰発現で増大した P2X 受容体反応に及ぼす PP1 の影響

さらに UCHL1 による P2X 受容体反応の増大へのプロテインフォスファターゼ 1(PP1)の関与を検討した。5mM ATP 投与に伴う P2X 受容体反応の大きさは、PP1 投与により有意な差は認

められなかった。このことから PP1 は P2X 受容体を基質としていないことが考えられた。

(5) UCHL1 過剰発現で増大した P2X 受容体反応に及ぼす PD098059 の影響

次に PKA 活性化の下流にあるシグナル伝達系のうち、CREB のリン酸化を介する転写機構が報告されている。そこで、P2X 受容体反応の増大への ERK を介する CREB の活性化に伴う転写亢進の関与を検討した。ERK を阻害するため、Mitogen-Activated Protein Kinase Kinase (MAPKK) 阻害剤である PD098059 を投与すると、H-89 で効果があった短時間(10 分)では有意な抑制は認められなかった。

D. 考察

最近、温帯域の海岸に生息する軟体動物であるアメフラシを用いた短期記憶・長期記憶に関する研究が進められているが(Chain et al.,1999, Chain et al.,1995, Hegde et al.,1993)、1997年にこのアメフラシを用いた研究でユビキチン C 末端水解酵素(UCH)がサイクリック AMP プロテインキナーゼ(PKA)を活性化することが報告されている(Hegde et al.,1997)。これは、アメフラシの屈筋反射による感覚神経から運動神経間のシナプスの短期増強から長期増強への変換には PKA のリン酸化によって活性化される Ca²⁺-stimulated cAMP response element binding protein(CREB)を介する転写と新しいタンパク質の合成が必要であり、その上流の遺伝子の一つが UCH をコードしているというものである。UCH が誘導されるとプロテアソーム機構が促進され、通常長期増強を阻害している PKA の regulatory(R) subunits の分解を促進し、その結果 PKA が活性化されるのではないかと考えられている。そこで、UCHL1 による P2X 受容体反応の増大に、PKA が関与しているかどうかを検討したところ、5mM ATP 投与に伴う P2X 受容体反応の大きさは、PKA 阻害剤の H-89 投与で有意に抑制が認められた。このことから UCHL1 が PKA を活性化することにより P2X 受容体を修飾していることが示唆された。

そこで、PKA からさらにどのような経路をたどって P2X 受容体を修飾しているかを検討することを試みた。PKA 活性化の下流にあるシグナル伝達系のうち、マウスの脳線条体では正のフィードバックによるドーパミンシグナリングの増幅が報告されている(Nishi et al.,2000)。これはまずドーパミン D1 受容体の活性化に伴い PKA

が活性化されるとプロテインフォスファターゼ 2A(PP2A)が活性化され、分子量約 32,000 の dopamine and cyclicAMP-regulated phosphoprotein (DARPP-32)のリン酸化 75 スレオニンが減少する。PP2A による DARPP-32 の 75 スレオニンの脱リン酸化は PKA の抑制を減少させる。また PKA の活性化は DARPP-32 の 34 スレオニンのリン酸化を促進し、プロテインフォスファターゼ 1(PP1)は抑制される。その結果 PKA の活性化と PP1 の抑制はさまざまな基質のリン酸化を増加させることになるというものである。そこで、UCHL1 による P2X 受容体反応の増大に、PP1 や PP2A が関与しているかどうかを検討したところ、5mM ATP 投与に伴う P2X 受容体反応の大きさは、PP1・PP2A 阻害剤である Okadaic Acid 処置により有意な差は認められなかったものの減少した。PKA の活性化により PP1 は抑制されているので、この減少は、PP2A の脱リン酸化が抑制され、その結果として 75 スレオニンのリン酸化が亢進し、PKA を抑制したためではないかと考えられた。5mM ATP 投与に伴う P2X 受容体反応の大きさは、PP1 投与により有意な差は認められなかったことから PP1 は P2X 受容体を基質としていないと考えられる。また、確認のため、使用した PC12 細胞に DARPP-32 が発現しているか否かを、リアルタイム PCR を用いた遺伝子発現の相対的定量法にて解析したところ、発現が示された。さらに、分化させた PC12 細胞のほうが分化させていない PC12 細胞よりも DARPP-32 の発現が高いことが示された。このことは、分化させた PC12 細胞には脳線条体と同様のシグナリングが存在し、脳線条体ニューロンのモデル細胞として十分機能していることを示唆している。

次に PKA 活性化の下流にあるシグナル伝達系のうち、CREB のリン酸化を介する転写機構が報告されている(Impey et al.,1998)。これは、PC12 細胞や海馬ニューロンにおいて、PKA の活性化により extracellular signal -related protein kinase(ERK)の核内へのトランスロケーションが促進し、CREB がリン酸化されて活性化されるというものである。CREB の活性化を介する転写は細胞増殖や細胞分化・神経可塑性に関与している。そこで、P2X 受容体反応の増大に、ERK を介する CREB の活性化に伴う転写亢進が関与しているかどうかを検討した。つまり、P2X 受容体反応の増大が P2X 受容体の発現の増大によるものでどうか、ということである。ERK を阻

害するため、Mitogen-Activated Protein Kinase (MAPKK) 阻害剤である PD098059 を投与すると、H-89 で効果があった短時間(10 分)では有意な抑制は認められなかった。このことは、P2X 受容体反応の増大は PKA の活性化によるものであるが、PKA の活性を抑制すると短時間で P2X 受容体反応はもとのレベルにまで戻ることから、長時間必要とする転写促進の経路は関与していないことを示唆している。

以上の結果より、UCHL1 により活性化された PKA は直接的に P2X 受容体活性を制御していることが示唆された。しかし、PC12 細胞へのトランスフェクション効率は約 5~10% であり、実際にリン酸化 P2X 受容体が増加しているかどうかといった生化学的解析が困難である。今後、cell sorter(細胞分類機)が入り次第、UCHL1 によるリン酸化 P2X 受容体の増加について調べる予定である。また、UCHL1 による P2X 受容体反応の増大が P2X 受容体の反応性の増加によるものなのか、そのキネティックスを単一チャンネル電流レベルで解析する予定である。

D. 結論

本研究は、細胞内での UCHL1 の機能として、あらたに、PKA を活性化する作用を持ち ATP 受容体反応を著明に増大させることが示された。このことは、ユビキチンシステムが神経伝達物質の放出およびシナプス応答を制御している可能性を示唆しており、UCH-L1 は脳機能全体に重要な機能を果たしていると考えられる。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

Higashida, H., Yokoyama, S., Hoshi, N., Hashii, M., Egorova, A., Zhong, Z-G., Noda, M., Shahidullah, M., Taketo, M., Yasuhiro, K., Takahashi, H., Chen, X-L., Shin Y. and Zhang, J-S.: Signal transduction from bradykinin, angiotensin, adrenergic and muscarinic receptors to effector enzymes, including ADP-ribosyl cyclase. *Biological Chemistry*, 382, 23-30, 2001.

Higashida, H., Hashii, M., Yokoyama, S., Hoshi, N., X-L. Chen, X-L., Egorova, A., Noda, M., and Zhang, J-S.: Cyclic ADP-ribose as a second

messenger revisited from a new aspect of signal transduction from receptors to ADP-ribosyl cyclase. *Pharmacology & Therapeutics*, in press.

2、著書

Higashida, H., Zhang J-S., Yokoyama, S., Noda, M., Zhong, Z-G., Mochida, S., and Egorova A. Sympathetic potentiation of cyclic ADP-ribose rofamation in rat caudiac myocytes. *Proceedings of the 9th International Catecholamine Symposium (2001)*

Noda, M. Neuron-microglia interaction via glutamate. *Neurochemical Research*, 26: 275 (2001)

3、学会発表 (国際学会)

Higashida, H., Egorova A., Higashida, C., Zhong, Z-G., Yokoyama, S., Noda, M., Zhang J-S. Increased cADP-ribose synthesis by activation of adrenergic receptors with norepinephrine in ventricular muscle cell membrane is involved in upregulation of cardiac function by sympathetic stimulation. *The 9th International Catecholamine symposium. (Kyoto, Japan), Mar. 2001*

Brown, A.M., Nakanishi, N., Noda, M. Bradykinin receptor in rat primary cultured microglia. *XXXIV International Congress of Physiological Sciences. (Christchurch, New Zealand), Aug. 2001.*

Noda, M., Y. Hagino, M. Sekiguchi, T. Harada, and K. Wada. Potentiating effect of PEPA (4-[2-(phenylsulfonyl-amino)ethylthio]-2,6-difluorophenoxy-acetamide) on AMPA type of glutamate receptor in rat microglia.. *Society for Neuroscience, 31st Annual Meeting. (San Diego, USA) Nov. 2001.*

Furuta, A., Noda, M., Goto, Y. Suzuki, S.O. Rothstein, J.D.,Iwaki. T Expressions of glutamate transporter subtypes in kainite-induced rat epilepsy. *Society for Neuroscience, 31st Annual Meeting. (San Diego, USA) Nov. 2001.*

Okada, M., Yamanouchi, Y., Urae, R., Noda, M., Irie, S., Ozaki, N., Iwata, N. Diverse effects of forskolin on extracellular acidification in CHO cells and C6 glioma cells as assessed with a cytosensor microphysiometer. *Society for*

Neuroscience, 31st Annual Meeting. (San Diego, USA) Nov. 2001.

Osaka, H., Wang, Y., Takizawa, S., Aoki, S., Sakurai, M., Li, H., Hara, Y., Takada, K., Noda, M., Wada, K. Ubiquitin C-terminal hydrolase as a regulator of ubiquitin level. *Society for Neuroscience, 31st Annual Meeting. (San Diego, USA) Nov. 2001.*

Osaka H, Wang YL, Takada K, Takizawa S, Li H, Sato Y, Nishikawa K, Sun YJ, Sakurai M, Harada T, Hara Y, Kimura I, Noda M, Namikawa K, Kiyama H, Aoki S, Wada K. Ubiquitin Carboxy-Terminal Hydrolase L1 mediates ubiquitin stability and function in neurons. *The COE International Symposium on Recent Advances in Research for Neurodegeneration. Tokyo, 3.6, 2002*

(国内学会)

野田百美、萩野 由紀子、仮浦 幸弘、渋谷 佳子、中西 博、青木俊介、和田圭司ラット・ミクログリアに発現するブラジキニン受容体、第44回日本神経化学・第24回日本神経科学合同大会(京都)9月、2001.

小坂仁、王 玉来、滝沢修一、櫻井省花子、青木俊介、李航、原洋子、佐藤野衣、西川香理、竹田礼子、木村一郎、高田耕司、野田百美、和田圭司 Ubiquitin C-terminal Hydrolase L1の機能と神経変性、第44回日本神経化学・第24回日本神経科学合同大会(京都)9月、2001.

滝沢修一、小坂仁、王玉来、高田耕司、櫻井省花子、千葉茂、野田百美、和田圭司 ユビキチンC末端水解酵素1型の機能解析I：—基質・相互作用蛋白の同定—、第24回日本分子生物学会年会(横浜)12月、2001.

王玉来、小坂仁、高田耕司、佐藤野衣、孫英傑、李航、青木俊介、櫻井省花子、原洋子、木村一郎、西川香理、竹田礼子、野田百美、瀧川一彦、木山博資、和田圭司ユビキチンC末端水解酵素1型の機能解析II：—神経系におけるユビキチン量の制御—、第24回日本分子生物学会年会(横浜)12月、2001.

小坂仁、王玉来、滝沢修一、高田耕司、佐藤野衣、原田高幸、原田知加子、千葉茂、野田百美、和田圭司 ユビキチンC末端水解酵素1型の機能解析III：—ユビキチン化・ユビキチン依存性蛋白分解への影響—、第24

回日本分子生物学会年会(横浜)12月、2001.
佐藤野衣、湯田和洋、小坂仁、王玉来、滝沢修一、大澤由記子、千葉茂、野田百美、和田圭司 ユビキチンC末端水解酵素1型の蛋白導入治療、第24回日本分子生物学会年会(横浜)12月、2001.

Akiko Furuta, Mami Noda, Yoshihiro Goto and Toru Iwaki, Altered expression of glutamate transporter subtypes in kainite-induced rat epilepsy. 第2回九州脳研究シンポジウム(福岡)1月、2002.

Yoshiko Kanahori, Aki Shimada, Shunsuke Aoki, Keiji Wada and Mami Noda, Regulation of P2X receptor by ubiquitin C-terminal hydrolase L1, 第2回九州脳研究シンポジウム(福岡)1月、2002.

Yukiko Hagino, Masayuki Sekiguchi, Takayuki Harada, Shunsuke Aoki, Keiji Wada and Mami Noda, Heterogeneity of AMPA type of glutamate receptor in rat microglia 第2回九州脳研究シンポジウム(福岡)1月、2002.

野田百美、和田圭司、パーキンおよび脱ユビキチン化酵素の過剰発現によるATP受容体の修飾、第12回日本病態生理学会(松山)1月、2002.

和田圭司、野田百美、脱ユビキチン化酵素によるユビキチンの安定化と神経変性・神経伝達、第12回日本病態生理学会(松山)1月、2002.

H. 知的所有権の出願・登録状況(予定を含む)
なし

研究成果の刊行に関する一覧表レイアウト

書籍

著者氏名	論文タイトル名	書籍全体の編集者名	書籍名	出版社名	出版地	出版年	ページ

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Osawa, Y., Wang, Y.L., Osaka, H., Aoki, S., and Wada, K.,	Cloning, expression, and mapping of a mouse gene, <i>Uchl4</i> , highly homologous to human and <i>Uchl3</i> .	Biochem. Biophys. Res. Comm.	283	627-633	2001
Kurihara, L.J., Kikuchi, T., Wada, K. and Tilghman, S.M.	Loss of <i>Uch-L1</i> and <i>Uch-L3</i> leads to neurodegeneration, posterior paralysis and dysphagia.	Hum. Mol. Genet.	10	1963-1970	2001
Takada, K., Hirakawa, T., Yokosawa, H., Okawa, Y., Taguchi, H., and Ohkawa, K.	Isolation of Ubiquitin-E2 (Ubiquitin-Conjugating Enzyme) Complexes from Erythroleukaemia Cells using Immunoaffinity Techniques.	Biochem. J.	356	199-206	2001
Usuba, T., Ishibashi, Y., Okawa, Y., Hirakawa, T., Takada, K., Ohkawa, K.	Purification and identification of monoubiquitin-phosphoglycerate mutase B complex from human colorectal cancer tissues.	Int. J. Cancer	94	662-668	2001
Higashida, H., Yokoyama, S., Hoshi, N., Hashii, M., Egorova, A., Zhong, Z-G., Noda, M., Shahidullah, M., Taketo, M., Yasuhiro, K., Takahashi, H., Chen, X-L., Shin Y. and Zhang, J-S.	Signal transduction from bradykinin, angiotensin, adrenergic and muscarinic receptors to effector enzymes, including ADP-ribosyl cyclase.	Biol. Chem.	382	23-30	2001

研究成果の刊行物・印刷