

パーキンソン病をはじめ多くの神経変性疾患での病理所見として、疾患依存的なニューロンにおいてユビキチン化された異常タンパク質の集積が頻繁に観察されていることから、タンパク質の品質管理機構の破綻がこれらの疾患に共通した発症原因になっている可能性が高まっている。そこで、タンパク質の品質管理機構を解明して、神経変性疾患の発症機能の共通のメカニズム解明を目指す。

B. 研究方法

[研究 1]

- 1) ターゲティングベクターの作製：12 個のエクソンからなるパーキン遺伝子のエクソン 2 をノックアウトするために、BAC クローンよりエクソン 2 周囲約 12K をブルースクリプトベクターにクローニングした。エクソン 2 のはじめの 5 塩基と GFP をインフレームで繋ぐ DNA を PCR で作製し、さらに neo 耐性遺伝子を lox で挟んだサイトを繋げ、3'側シークエンス 1.5K、5'側ロングアーム 8K のターゲティングベクターを構築した。
- 2) ES 細胞のスクリーニング：TT2 細胞を利用し、ターゲティングベクターをエレクトロポレーションで導入した。0.2 mg/ml の G418 存在下で培養し、薬剤耐性細胞をピックアップした。3'側にプライマーおよびプローブを設定し PCR、およびサザンブロッティングによりノックアウト ES を探索し、現在、3 クローンが得られている。
- 3) マイクロインジェクションによるキメラマウスの作製：得られた ES クローンをマウス 8 細胞期胚にマイクロインジェクションし、翌日仮親の子宮に移植した。

[研究 2]

ロテノン はミトコンドリアの阻害剤として利用されており、特発性パーキンソン病の病態を反映する可能性がある。一ヶ月持続投与可能な浸透圧

ポンプを利用し、5 週齢マウスの腹腔内に埋め込んでロテノンを継続的に投与している。

[研究 3]

線虫パーキン遺伝子のプロモーターの下流に GFP 遺伝子を連結したベクターを構築し、これを用いてトランスジェニックパーキン線虫を作製した。また、パーキン遺伝子を欠損させたノックアウト線虫を作製した。

[研究 4]

大腸菌で発現させたりコンビナント CHIP (N 端側に Hsc70 と相互作用する TPR 配列を、そして C 端側には U-box というユビキチンリガーゼ構造を有した分子) を用い、E1、E2 (Ubc5c)、ATP、GST-ユビキチンの存在下、分子シャペロン (Hsp90 や Hsp70-Hsp40) の有無で熱変性ルシフェラーゼのユビキチン化反応を行った。反応停止後、Western Blot 法でルシフェラーゼのユビキチン化の動態を観察した。

C. 研究結果

[研究 1]

現在までキメラマウスの誕生に至っており、得られたキメラは C57B6J マウスと交配を行っている。ホモノックアウトマウス完成後には、運動機能解析・黒質細胞の電気生理学的解析・病理組織学的解析・ドーパミンの定量等生化学的解析などの解析を順に行う計画である。同時に酸化的ストレス負荷実験を進め、野生型とノックアウトマウスのストレス下での黒質神経の変性過程を比較したい。

[研究 2]

ラット静脈内投与ではロテノン 2-3mg/Kg でレビー小体が出現しており、現在作製中のロテノン投与マウスにおいて、黒質細胞でのレビー小体を確認中である。モデルマウスが作製できると、病理組織学的検索を中心に行うと共に、現在、指摘さ

れているパーキンの標的基質（CDCrel1, Paeli リセプターなど）の蓄積の確認を検討したい。

〔研究3〕パーキントランスジェニック線虫の解析から、パーキンは、生体全体に広く発現しているが、とくに脳神経組織や生殖器官に強く発現していることが判明した。また、ノックアウトパーキン線虫は、顕著な行動異常は観察されなかった。そこで、パーキンノックアウト線虫における表現型の変化について酸化ストレス負荷などの影響を解析中である。

〔研究4〕

インビトロでCHIPが分子シャペロンであるHsp90やHsc70が捕捉した熱変性タンパク質（ルシフェラーゼ）を選択的にユビキチン化する活性を有することを証明した。実際、CHIPは熱変性したルシフェラーゼをHsp90やHsc70-Hsp40がトラップした場合にのみ標的分子としてポリユビキチン化した。すなわちCHIPはタンパク質のネイティブな状態とノンネイティブな状態をシャペロン依存的に識別して、後者を選択的にユビキチン化するユビキチンリガーゼ（E3）であることが判明した。

D. 考察

〔研究1-3〕は研究が進行中であり、本年は、著しく進展した〔研究4〕の成果について考察したい。CHIPが分子シャペロン依存的な品質管理リガーゼであることの発見は、異常タンパク質の処理が分子シャペロンとユビキチンシステムで精緻にハンドルされていることを直接的に証明したことになる。すなわちCHIPは分子シャペロンと提携して再生できなくなった変性タンパク質を迅速にユビキチン化すると考えられる。この意味では、分子シャペロンは様々な要因で細胞内に生じた異常タンパク質の再生と分解の配分を決定しており、過度の傷害によって再生不能に陥っ

たタンパク質に対しては、CHIPのような品質管理リガーゼを積極的に動員してユビキチン化分解に誘導する新しい役割を担っていると考えられる。21世紀の高齢化社会を眼前に迎えアルツハイマー病、パーキンソン病、筋萎縮性側索硬化症、ポリグルタミン病、プリオン病などの神経変性疾患の増加への対処が急務となっている。これらは、多かれ少なかれ、タンパク質の品質管理に破綻をきたした疾病と位置づけられる。最近話題になっている狂牛病やクロイツフェルト・ヤコブ病などのプリオン病は、悪貨が良貨を駆逐するかのよう自己触媒的にタンパク質の異常を蔓延させる典型的な“コンフォメーション病”である。これらの神経変性疾患の発症あるいは増悪化に分子シャペロンとユビキチンプロテアソームシステムが連携したタンパク質の品質管理機構の破綻が関係している可能性は高いと想定される。この観点から考えると、再生不能なニューロンの健康維持には、CHIPのような品質管理リガーゼの役割がとくに重要であると考えられる。

E. 結論

われわれはパーキンソン病やその他の神経変性疾患の発症原因として、タンパク質の品質管理機構の破綻がその一翼を担っているとの仮説を立てている。すなわちニューロン内にユビキチン化された異常タンパク質が累積し、細胞死ひいては神経変性に至るとの考え方である。本年、われわれはタンパク質の正常と異常を分子のレベルで区別することができる品質管理リガーゼCHIPの機能解析にはじめて成功した。われわれは、AR-JPの原因遺伝子産物であるパーキンがCHIPのような品質管理リガーゼとして作用すると推定している。本年は、この方向での研究の推進を計るために、モデル動物としてマウスや線虫を用いた遺伝学的解析を中心にした個体レベルでの

研究を進めた。

F. 研究発表

[論文発表]

- Wang, M., Suzuki, T., Kitada, T., Asakawa, S., Minoshima, S., Shimizu, N., Tanaka, K., Mizuno, Y., and Hattori, N. (2001) Developmental changes in the expression of parkin and UbcR7, a parkin-interacting and ubiquitin-conjugating enzyme in rat brain. *J. Neurochem.* 77, 1561-1568.
- Nishimori, S., Tanaka, Y., Chiba, T., Fujii, M., Imamura, T., Miyazono, K., Ogasawara, T., Kawaguchi, H., Igarashi, T., Fujita, T., Tanaka, K., and Toyoshima, H. (2001) Smad-mediated transcription is required for TGF- β -1-induced p57Kip2 proteolysis in osteoblastic cells. *J. Biol. Chem.* 276, 10700-10705.
- Kawakami, T., Chiba, T., Suzuki, T., Iwai, K., Yamanaka, K., Minato, N., Hidaka, Y., Shimbara, N., Suzuki, H., Osaka, F., Omata, M., and Tanaka, K. (2001) NEDD8 recruits E2-ubiquitin to SCF E3-ligase. *EMBO J.* 20, 4003-4012.
- Murata, S., Udono, H., Tanahashi, N., Hamada, N., Adachi, K., Yamano, T., Yui, K., Kobayashi, N., Kasahara, M., Tanaka, K., and Chiba, T. (2001) Immunoproteasome assembly and antigen processing in mice lacking both PA28 β and PA28 γ . *EMBO J.* 20, 5898-5907.
- Tateishi, K., Omata, M., Tanaka, K., and Chiba, T. (2001) The NEDD8 system is essential for cell cycle progression and morphogenetic pathway in mice. *J. Cell Biol.* 155, 571-580.
- Murata, S., Minami, Y., Minami, M., Chiba, T., and Tanaka, K. (2001) CHIP is a chaperone-dependent E3 ligase that ubiquitylates unfolded protein. *EMBO Rep.* 2, 1133-1138.
- Kang, M. S., Lim, B. K., Seong, I. S., Shimbara, N., Tanaka, K., and Chung, C. H. (2001) The ATP-dependent CodWX (HslVU) protease in *Bacillus subtilis* is a N-terminal serine protease. *EMBO J.* 20, 734-742.
- Matsuda, N., Suzuki, T., Uchimiya, H., Tanaka, K., and Nakano, A. (2001) Rma1, a novel type of RING finger protein conserved from Arabidopsis to human, is a membrane-bound ubiquitin ligase. *J. Cell Sci.* 114, 1949-1957.
- Ebisawa, T., Fukuchi, M., Murakami, G., Chiba, T., Tanaka, K., Imamura, T., and Miyazono, K. (2001) Smurf1 is recruited to TGF- β type I receptor by Smad7 and induces receptor degradation. *J. Biol. Chem.* 276, 12477-12480.
- Takabe, W., Kodama, T., Hamakubo, T., Tanaka, K., Suzuki, T., Aburatani, H., and Noguchi, N. (2001) Regulation of the expression and function of proteasome β -type subunits by the anti-atherogenic compounds in human endothelial cells. *J. Biol. Chem.* 276, 40497-40501.
- Niwa, J., Ishigaki, S., Doyu, M., Kato, K., Suzuki, T., Tanaka, K., Sobue, G. (2001) A novel human RING-finger/IBR family protein, Dorfin, resides in centrosome and mediates ubiquitin ligase activity. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 281, 706-713.
- Fukuchi, M., Imamura, T., Chiba, T., Ebisawa, T., Kawabata, M., Tanaka, K., and Miyazono, K. (2001) Ligand-dependent degradation of smad3 by a ubiquitin ligase complex of rocl and associated proteins. *Mol. Biol. Cell* 12, 1431-1443.

[総説]

- Tanaka, K., Suzuki, T., Chiba, T., Shimura, H., Hattori, N., and Mizuno, Y. (2001) Parkin is linked to the ubiquitin pathway. *J. Mol. Med.* 79, 482-494.
- Tanaka, K., Kawakami, T., Tateishi, K., Yashiroda, H., and Chiba, T. (2001) Control of I β Bi β proteolysis by the ubiquitin-proteasome pathway. *Biochimie* 83, 351-356.

Mizuno, Y., Hattori, N., Mori, H., Suzuki, T., and
Tanaka, K. (2001) Parkin and Parkinson's disease.
Curr. Opin. Neurol. 14, 477-482.

パーキン発現細胞作製・解析：マウスドパミン産生神経細胞における パーキン遺伝子導入およびその発現抑制の影響

分担研究者：小川 紀雄

岡山大学大学院医歯学総合研究科脳神経制御学講座神経情報学 教授

研究要旨 常染色体性劣性遺伝性の家族性パーキンソン病 (ARJP) の原因遺伝子として同定されたパーキン遺伝子は、その変異によって黒質の神経細胞死が起こることが報告されている。本研究では、パーキン蛋白のドパミン神経細胞における生理的機能およびパーキン遺伝子の変異によって起こる黒質の選択的な神経細胞死のメカニズムを解明するために、マウスドパミン産生神経細胞 CATH. a を用いて外来性の野生型または変異型のヒトパーキン cDNA の過剰発現細胞株の樹立を試みたが、野生型、変異型とも一時的にコロニーを形成するものの、安定的に株化するものはなかった。さらに、外来性の野生型、変異型のヒトパーキン cDNA あるいはパーキン遺伝子のアンチセンス cDNA を一過性に CATH. a 細胞に導入して細胞への影響を検討した。ヒトパーキン cDNA は野生型、変異型に関わらず過剰発現させると、遺伝子導入された細胞数の有意な減少が認められた。また、ヒトパーキン遺伝子のアンチセンス cDNA を CATH. a 細胞に一過性に遺伝子導入した場合にも、遺伝子導入された細胞数の減少がみられた。以上のことから、マウス CATH. a 細胞においてはヒトパーキン蛋白を過剰発現させたり、変異型遺伝子導入により変異パーキンを過剰発現させたり、あるいは逆に内在性のパーキン蛋白発現を抑制することは致死的であり、恒常的に野生型、変異型ヒトパーキン蛋白過剰発現細胞株およびパーキン発現抑制細胞株を作成することは困難であることが明らかになった。今後は CATH. a 細胞にとって同種のマウスパーキン遺伝子またはアンチセンス cDNA を導入し、その発現レベルを随時調節できる細胞株を樹立することを予定している。

A. 研究目的

近年、パーキンソン病の研究は世界中で研究が進み、数々の知見や治療法の開発が進んでいる。なかでも 1988 年に常染色体性劣性遺伝性の家族性パーキンソン病 (ARJP) の原因遺伝子として同定されたパーキン遺伝子の変異およびその遺伝子産物パーキン蛋白の欠失による黒質神経変性の機序を解明することに注目が集まっている。このパーキン蛋白の機能解析を明らかにすることにより、孤発性パーキンソン病の神経細胞死のメカニズムを解明する糸口を得ることができると考えられる。パーキン蛋白自身が蛋白質の代謝に関わるユビキチンリガーゼ活性を有することが報告されており、さらに、いくつかの遺伝子変異による活性異常も報告されている。しかしながら、

このパーキン蛋白の神経細胞特にドパミン神経細胞における機能や変異によるパーキンソン病への機序については未だ明らかになっていない。パーキン蛋白のドパミン神経細胞における生理的機能およびパーキン遺伝子の変異によって起こる細胞死のメカニズムを解析することを目的として、われわれは野生型および ARJP の患者で同定された変異型 (T240R、 Δ Ex3-5) ヒトパーキン cDNA を恒常的に高発現させた細胞株を樹立することを試み、さらにパーキン遺伝子の野生型、変異型およびアンチセンス cDNA を一過性に細胞株に遺伝子導入し、パーキンの過剰発現、発現抑制ならびに変異パーキン発現のドパミン神経細胞への影響を検討した。具体的には、まず各種ドパミン産生神経細胞におけるパーキン遺伝子の

発現レベルを予備検討し、パーキン発現量が比較的高いマウスドパミン産生神経細胞 CATH.a を選択して、野生型、変異型ヒトパーキン遺伝子 cDNA を高発現させた細胞株の樹立を試みた。また、野生型、変異型(T240R、 Δ Ex3-5)ヒトパーキン cDNA またはパーキン遺伝子のアンチセンス cDNA 発現ベクターを一過性に CATH.a 細胞に導入して細胞への影響を検討した。

B. 研究方法

1. 培養細胞と培養条件

マウスドパミン産生細胞株である CATH.a 細胞は RPMI1640 培地 (GibcoBRL) に 8%ウマ血清 (GibcoBRL)、4%ウシ胎児血清 (Hyclone)、5、000 U/ml ペニシリン (GibcoBRL)、5、000 g/ml ストレプトマイシン (GibcoBRL) を添加した培養液で 37°C、5% CO₂ 下で培養した。ヒト神経芽細胞株の SH-SY5Y 細胞は、RPMI1640 培地に 10%ウマ血清、5%ウシ胎児血清、5、000 U/ml ペニシリン、5、000 g/ml ストレプトマイシンを添加した培養液で 37°C、5% CO₂ 下で培養した。ラットドパミン産生神経細胞株である B65 細胞は、ダルベッコ変法イーグル培地に 10%ウシ胎児血清、5、000 U/ml ペニシリン、5、000 g/ml ストレプトマイシンを添加した培養液で 37°C、5% CO₂ で培養した。

2. 各種培養ドパミン神経細胞およびマウス脳におけるパーキン mRNA レベルの発現量

各種ドパミン産生細胞株におけるパーキン遺伝子の発現レベルを RT-PCR 法によって予備検討した。CATH.a 細胞の他にコントロールとして、SH-SY5Y 細胞、B65 細胞、そして C57/BL6J マウスの脳を用いて、それぞれから total RNA を AGPC 法によって抽出した。抽出した total RNA は 10 μ l / 1 RQ1 DNase (Promega) で 1 時間処理し、オリゴ dT プライマー、MMLV 逆転写酵素、反応バッファー、10 mM dNTP (CLONTECH)、リコンビナント RNase 阻害剤 (CLONTECH) とともに 42°C、60 分間、94°C、5 分間反応させて cDNA を得た。パーキン cDNA は、それぞれの cDNA とマウス、ヒト、ラットのパーキン mRNA に共通する特異的プライマー

セット (5'-cttgctgggatgatgtttta-3'、5'-gccaggttgagggtcgtg-3')、Ampli Taq DNA ポリメラーゼ、反応バッファー、10 mM dNTP を用いた PCR (94°C、45 秒間、53°C、45 秒間、72°C、2 分間、40 サイクル) で増幅した。RT-PCR 産物は 1%アガロースを用いて電気泳動し、エチジウムブロマイドで染色して、その発現量を比較した。

3. 野生型、変異型ヒトパーキン cDNA の高発現細胞株の樹立

CATH.a 細胞 (1.2×10^5 cell) を培養ディッシュに播種し、24 時間培養後に野生型および変異型 (T240R、 Δ Ex3-5) ヒトパーキン cDNA を挿入した発現ベクター (順天堂大より分与) をリン酸カルシウム法により導入した。遺伝子導入 4 時間後、新しい培養液に交換しさらに 72 時間培養した。その後遺伝子導入した CATH.a 細胞 (5×10^5 cell) を播種し直し 24 時間後、遺伝子導入の選択マーカーである G418 (Sigma) を添加して、2-3 日毎に培養液を交換した。

4. 野生型および変異型パーキン cDNA の一過性遺伝子導入による細胞毒性の検討

CATH.a 細胞 (1×10^6 cell) を培養ディッシュに播種し、24 時間培養後に野生型、変異型 (T240R、 Δ Ex3-5) ヒトパーキン cDNA の発現ベクターあるいはコントロールとして空ベクターを -ガラクトシダーゼ遺伝子の発現ベクターとともに (パーキン cDNA 発現ベクターまたは空ベクター : -ガラクトシダーゼ cDNA の発現ベクター = 5 : 1) リン酸カルシウム法で一過性に遺伝子導入をした。遺伝子導入 4 時間後、新しい培養液に交換し、さらに 48 時間後に X-gal 染色により -ガラクトシダーゼ遺伝子の導入された細胞を染色した。

5. パーキン遺伝子のアンチセンス cDNA の一過性遺伝子導入による細胞毒性の検討

CATH.a 細胞 (1×10^6 cell) を培養ディッシュに播種し、24 時間培養後にヒトパーキン遺伝子のアンチセンス cDNA 発現ベクターあるいは空ベクターを -ガラクトシダーゼ遺伝子の発現ベクターとともに (パーキンアンチセンス cDNA 発現ベクターまたは空ベクター : -ガラクトシダーゼ cDNA の発現ベクター = 5 : 1) リン酸カルシ

ウム法で一過性遺伝子導入をした。遺伝子導入 4 時間後、新しい培養液に交換し、さらに 72 時間後に X-gal 染色を行い、 β -ガラクトシダーゼ遺伝子の導入された細胞を染色した。

C. 研究結果

1. 培養ドパミン神経細胞におけるパーキン遺伝子発現

まず、マウスドパミン産生細胞株である CATH. a 細胞、ヒト神経芽細胞株の SH-SY5Y 細胞、ラットドパミン産生神経細胞株である B65 細胞の 3 種類の培養ドパミン神経細胞および C57/BL6J マウスの脳組織におけるパーキン mRNA の発現レベルを検討した。今回用いた全ての total RNA サンプルでパーキン mRNA の発現が認められた。ドパミン産生神経細胞株のうちでパーキン mRNA 発現レベルが最も低いものはラット B65 細胞で、ついでヒト SH-SY5Y 細胞、C57/BL6J マウスの脳の順に発現レベルが高かった。最も発現が高かったのはマウス CATH. a 細胞であった。この CATH. a 細胞を今回のヒトパーキン遺伝子導入細胞株作成に用いることにした。

2. 野生型および変異型パーキン cDNA 高発現細胞株の樹立

野生型または変異型パーキン cDNA 発現ベクターを CATH. a 細胞へ導入後、G418 によって遺伝子組み換えが完了した細胞を選択するのに平行して、コントロールとして非遺伝子導入細胞に対しても同様の処理を行った。その結果、非遺伝子導入細胞が死滅した時点において、野生型および変異型(T240R、 Δ Ex3-5)パーキン cDNA を導入した細胞では、生存したいくつかのコロニーが認められていた。しかし、その後これらのコロニーの細胞数を増やすため G418 を添加しながら培養を続けたところ、それ以上の細胞数増加は認められず、最終的には全てのコロニーが死滅した。

3. 野生型および変異型パーキン cDNA の一過性遺伝子導入による細胞毒性の検討

野生型、変異型(T240R、 Δ Ex3-5)ヒトパーキン cDNA の発現ベクターを CATH. a 細胞に一過性に遺伝子導入し、X-gal 染色後、 β -ガラクトシダ

ーゼ陽性の細胞数を計測したところ、空ベクターを導入した細胞と比べて野生型あるいは変異型(T240R、 Δ Ex3-5)パーキン cDNA を導入した細胞では、ともに β -ガラクトシダーゼ陽性の細胞数が減少していた。また、この減少は野生型パーキン cDNA を導入した細胞で最も強く認められた。

4. パーキン遺伝子のアンチセンス cDNA の一過性遺伝子導入による細胞毒性の検討

ヒトパーキン遺伝子のアンチセンス cDNA 発現ベクターを CATH. a 細胞に一過性に遺伝子導入し、X-gal 染色後、 β -ガラクトシダーゼ陽性の細胞数を計測したところ、空ベクターを導入した細胞と比べてパーキン遺伝子のアンチセンス cDNA を導入した細胞では β -ガラクトシダーゼ陽性の細胞数が減少していた。

D. 考察

パーキン遺伝子は、普遍的に様々な組織で発現していることが知られているが、この遺伝子の変異によって引き起こされる ARJP は、黒質ドパミン神経の選択的な神経変性を示す。したがって、ドパミン神経におけるパーキン遺伝子および蛋白の機能や ARJP での選択的な細胞死の発現機序を解析するために、マウスなどのモデル動物における実験系への応用を考慮して、本検討ではパーキンを発現しているマウスドパミン産生神経細胞株である CATH. a 細胞を用いてパーキン遺伝子の導入を行った。RT-PCR による各ドパミン産生神経細胞株でのパーキン mRNA の発現量の検討の結果、CATH. a 細胞においてパーキン遺伝子の mRNA レベルの発現量が比較的高いことが分かった。この CATH. a 細胞はパーキン蛋白が高発現しているドパミン神経細胞であると考えられ、さらにパーキン遺伝子のアンチセンス cDNA による発現抑制によって、ARJP で考えられているパーキン蛋白の欠失状態が再現できる可能性が示唆された。

野生型または変異型ヒトパーキン cDNA を高発現する細胞株の作成を試みたところ、遺伝子導入選択マーカーに耐性となった細胞コロニーは認められたが、その後死滅してしまい、野生型また

は変異型ヒトパーキン蛋白を恒常的に CATH. a 細胞に発現させることは致命的であることが判明した。次に、野生型または変異型パーキン cDNA を一過性に導入したところ、遺伝子導入された細胞数の有意な減少が認められた。CATH. a 細胞にとってヒトパーキンを一過性であっても過剰発現させることは、その遺伝子が野生型、変異型に関わらず致命的であることを示している。パーキンの一過性導入で細胞死が認められたにも関わらず、高発現細胞株の作成において、一時的にコロニーが認められたのは、外来性のヒトパーキン遺伝子の発現が中程度かまたは低いもので、長時間の培養によってその細胞毒性が現れたものと考えられる。

さらに、パーキン遺伝子のアンチセンス cDNA を一過性に過剰発現させパーキン蛋白発現を抑制した場合も、野生型、変異型パーキン cDNA を過剰発現させた場合と同様に、遺伝子導入された細胞数の有意な減少が認められ、パーキン蛋白の発現抑制は細胞障害性に働くことが明らかになった。

以上のパーキン遺伝子導入実験の結果から、マウス CATH. a 細胞においては一過性にでもヒトパーキン蛋白を過剰発現させたり、変異型遺伝子導入により変異パーキンを過剰発現させたり、あるいは逆にパーキン蛋白発現を抑制することは致命的であり、その株化は困難であることが判明した。今後は CATH. a 細胞にとって同種のマウスパーキン遺伝子またはアンチセンス cDNA を導入し、その発現レベルを随時調節できる細胞株を樹立することを予定している。

E. 結論

本研究により、マウスドパミン産生神経細胞である CATH. a 細胞において、ヒトパーキン蛋白を過剰発現させたり、反対に内在性のパーキン蛋白の発現を抑制することは致命的であり、マウスドパミン含有 CATH. a 細胞において恒常的に野生型、変異型ヒトパーキン蛋白を過剰発現した細胞株、あるいはパーキン蛋白の発現を抑制した細胞株を作成することは困難であることが明らかにな

った。本検討結果はパーキンの過剰発現・発現抑制ドパミン神経細胞株を作成するうえで重要な基礎資料となる。

F. 研究発表

[論文発表]

- Tanaka, K., Fujita, N., Yoshioka, M. and Ogawa, N.: Immunosuppressive and non-immunosuppressive immunophilin ligands improve H₂O₂-induced cell damage by increasing glutathione levels in NG108-15 cells. *Brain Res.*, 889: 236-239, 2001.
- Tanaka, K., Miyazaki, I., Fujita, N., Haque, Md. E., Asanuma, M. and Ogawa, N.: Molecular mechanism in activation of glutathione system by ropinirole, a selective dopamine D₂ agonist. *Neurochem. Res.*, 26: 31-36, 2001.
- Kondo, F., Asanuma, M., Miyazaki, I., Kondo, Y., Tanaka, K., Makino, H. and Ogawa, N.: Progressive cortical atrophy after forebrain ischemia in diabetic rats. *Neurosci. Res.*, 39: 339-346, 2001.
- Asanuma, M., Nishibayashi-Asanuma, S., Miyazaki, I., Kohno, M. and Ogawa, N.: Neuroprotective effects of non-steroidal anti-inflammatory drugs by direct scavenging of nitric oxide radicals. *J. Neurochem.*, 76: 1895-1904, 2001.
- Kabuto, H., Yokoi, I., Ogawa, N., Mori, A. and Liburdy, R.P.: Effects of magnetic fields on the accumulation of thiobarbituric acid reactive substances induced by iron salt and H₂O₂ in mouse brain homogenates or phosphatidylcholine. *Pathophysiology*, 7: 283-288, 2001.
- Haque Md.E., Tanaka, K. and Ogawa, N.: Relationship between locomotor activity and monoamines following single and double transient forebrain ischemia in gerbils. *Neurochem. Res.*, 26: 401-406, 2001.
- Tanaka, K., Hori, K., Wada-Tanaka, N., Nomura, M. and Ogawa, N.: FK506 ameliorates the discrimination learning impairment due to

preventing the rarefaction of white matter induced by chronic cerebral hypoperfusion in rats. Brain Res., 906: 184-189, 2001.

[総説]

Aoki Sogawa, C., Asanuma, M., Sogawa, N., Miyazaki, I., Nakanishi, T., Furuta, H. and Ogawa, N.: Localization, regulation, and function of metallothionein-III/ growth inhibitory factor in the brain. Acta Med. Okayama, 55: 1-9, 2001.

浅沼幹人,小川紀雄：フリーラジカルと脳障害. Clinical Neuroscience, 19: 555-559, 2001.

小川紀雄,浅沼幹人：酸化ストレスと神経細胞死. Clinical Neuroscience, 19: 665-667, 2001.

浅沼幹人,小川紀雄：酸化ストレスによる神経障害とその防御, 酸化ストレス—フリーラジカル医学生物学の最前線（吉川敏一編）, pp177-181, 医歯薬出版, 東京, 2001.

研究協力者

東 洋一郎

宮崎 育子

田中 健一

浅沼 幹人

(岡山大学大学院医歯学総合研究科
脳神経制御学講座神経情報学)

パーキン蛋白と神経細胞保護：ELISA によるパーキン蛋白の定量法の 確立とパーキン病態への関与

分担研究者：久野 貞子 国立療養所宇多野病院 臨床研究部長

研究要旨 パーキン蛋白の定量法を確立し、遺伝子・孤発型 Parkinson 病の剖検脳ならびに脳脊髄液の濃度を測定し、パーキンソン蛋白の病態への関与を明らかにする。

ヒト、ラット、マウスのパーキン遺伝子の推定アミノ酸配列を基に、パーキン蛋白の (1)N 末端部分に相当するユビキチン様ドメイン配列 (Par-N) (2)分子中央部分配列 (Par-M, Par-3) (3)C 末端部分配列 (Par-C) の 3 つの領域に相当する部分ペプチドを合成し、それらをウサギに免疫して特異抗体を作製した。これらの抗体を用いて、ラット大脳ホモジネートを用いたパーキン蛋白の Western blot 解析を行ったところ、Par-N 抗体は、分子量約 3 万と 8 千の蛋白を、Par-M 抗体は、5 万近辺の蛋白を特異的に認識することを明らかにした。一方、これらの抗血清よりアフィニティー抗体を調製し、抗体の組み合わせ実験により、ペプチドを標準品としたサンドイッチ型 ELISA 系を作製し、パーキン蛋白の高感度定量法の確立を試みている。その結果、Par-M 抗体を用いた ELISA 法により、最小感度 0.3 ng で 1-33 ng/ml を定量できる方法を確立した。

A. 研究目的

水野らによって明らかにされた常染色体劣性遺伝若年性パーキンソニズム (autosomal recessive juvenile parkinsonism, ARJP) の原因遺伝子産物パーキンは、Parkinson 病の病態解明に重要な鍵を握っている可能性が高い。そこでパーキン蛋白の機能や、脳、特に黒質線条体における局在や変動を詳しく調べる目的でパーキン蛋白の定量法を確立し、本蛋白の遺伝性・孤発型 Parkinson 病態への関与を解析することを目的とした。

B. 研究方法

1) パーキン蛋白に対する特異抗体の作製

ヒトパーキン蛋白の推定アミノ酸配列より、以下の 4 ケ所の領域を選び、特異抗体を作製した。

(1) ヒトパーキンのアミノ酸配列を基に、N 末

端領域で、ユビキチンと相同性が高く、マウス、ラットとも同一の配列ペプチド (GVPADQLRVIFAGKE: Par-N)

(2) 第 1 リングフィンガー領域と IBR ドメインの間の 2 つのペプチド (PNSLIKELHHFRILGEEQY : Par-M と EQARWEEASKETIKKTKPC : Par-3)

(3) パーキン蛋白の C 末端領域で第 2 リングフィンガー領域を含まないペプチド (EWNRACMGDHWFDV : Par-C) を合成した。

次に、これらのペプチド 5mg と KLH (4mg) をグルタルアルデヒドにより縮合させ、複合物を作製した。未反応の遊離ペプチドを透析膜(分子量 8000 カット用)により除去した後、これを完全アジュバントとともに 1

2 週間おきに計 7 回、3 匹のウサギ背部に免疫し、最終免疫の 10 日後に全採血した

2] アフィニティー精製パーキン IgG およびビオチン化 IgG の調製

ウサギ抗血清 2ml より HiTrap Protein G カラム (Amersham) を用いてマニュアルに従い IgG を調製した。次に活性化 HiTrap カラムに各ペプチド 5mg を固相化した。これに精製 IgG 10mg を通し、PBS にて素通り画分を十分に流し出した後、1M クエン酸溶液で直ちに結合画分を溶出させ、直ちに溶出液を中性にすることによりアフィニティー精製 IgG を得た。固相化カラムの作製は以下の方法に従った。すなわちペプチドを、0.2M NaHCO₃ (0.5M NaCl 含、pH8.3) に溶かし、1mM HCl であらかじめ活性化した NHS-カラムの中に導入し、室温で 1 時間反応させた。このカラムを、次に 0.5M エタノールアミン液 (0.5M NaCl 含、pH8.3) で 2 回、0.1M 酢酸 (0.5M NaCl、pH4.0) で 2 回、交互に洗浄することにより、ペプチド樹脂を作製した。各抗体 10mg より数 10 - 100 g のアフィニティー-IgG が得られた。

次に各アフィニティー精製パーキン IgG 5 g を 50 l の 0.2M NaHCO₃ に溶かし、これにビオチン化試薬 (Biotin-AC5-Osu, 同仁化学) 10 l (mg/ml DMSO) を加え、攪拌した後、25° C、2 時間反応させた。次に、1M の塩化アンモニウム 10 l を加え、さらに 25° C、1 時間反応させた後、0.1M トリス塩酸 (pH 7.6) を 925 l 加え、全量を 1ml とした。

3] パーキンリコンビナント蛋白の作製

パーキンの全長および部分タンパクの作製を試みた。大腸菌による発現系では、全長はうまく発現されなかったが、パーキン部分蛋白 (1-315) は発現できた。現在ニッケルカラムにより、精製を行っている途中段階である。

4] ウエスタンブロット法

ラット脳湿重量当たり、5 倍量の PBS を加え、ポリトロンにてホモゲナイズした後、10000xg、10 分遠心後の大脳上清をウエスタンブロット法のサンプルとした。還元変性後、5 - 20% グラジエントゲルを用いて 2 時間 SDS 電気泳動後、ニトロセルロース膜に転写した。膜を 10% ブロックエースを含む液でブロッキング後、抗血清 (25 - 100 倍希釈) と反応させた。ペルオキシダーゼの基質として 4-クロロ-1-ナフトールを用いた。

C. 研究結果

1] 4 種の異なるパーキン蛋白抗血清を用いて、ラット脳ホモジネートを用いたウエスタンブロット法による検討から以下の結果が得られた。(1) ユビキチンと高いホモロジーを有するペプチド (Par-N) 抗血清を用いたウエスタンブロット法では、分子量 8000 近辺のユビキチンに相当するバンドとともに、3 万近辺にも特異的に反応するバンドがえられた。(2) Par-3、Par-M 抗血清は、分子量 5 万を示すバンドと強く反応した。

2] リコンビナントパーキン蛋白との反応性

大腸菌に発現させたヒ His-Par (1-315) リコンビナント蛋白の C 末端部分が Par-M ペプチドの約 50% を含むことから、Par-M 抗血清は、部分パーキン蛋白 (1-315) と良好に反応した。

3] ELISA 系の作製

計 12 種のウサギ IgG よりアフィニティーカラムを用いて、それぞれのアミノ酸配列に対応したアフィニティー-IgG およびビオチン化 IgG を作製した。各ペプチドを標準品としてサンドイッチ法による測定系を検討した結果、現在の所、最も高感度に定量できる抗体の組み合わせは、

Par-M 抗体、Par-N 抗体で、1-33ng/ml の範囲で定量可能であった。他の抗体は、目下検討中である。

D. 考察

作製した抗血清のうち、Par-N 抗血清は、アミノ酸配列の 90% がユビキチンと同一であることから、分子量 8000 を示すバンドはユビキチンと推定される。分子量 30000 を示すバンドは、パーキンの部分分解物か、ユビキチンのポリマーを認識している可能性がある。一方、Par-3 や Par-M 抗血清は、分子量 50000 近辺を共通して認識したことより、完全な Parkin 蛋白を認識すると考えられた。一方、ELISA 系は、Par-M、Par-N 抗体間で作製できたが、Par-N 抗体は、ユビキチンと反応することが推定出来ることから、Par-M 抗体による測定系の改良が今後の課題である。さらに、これらの抗血清を用いてラット脳組織での Parkin 蛋白の局在を明らかにする計画である。

E. 結論

ヒト、ラット、マウスのパーキン遺伝子の推定アミノ酸配列を基準に、3 つの領域に相当する部分ペプチドを合成し、それらをウサギに免疫して特異抗体を作製した。これらの抗体を用いて、ラット大脳ホモジネートを用いたパーキン蛋白の Western blot 解析を行った。Par-N 抗体は、分子量約 3 万と 8 千の蛋白を特異的に認識し、Par-M 抗体は、5 万近辺の蛋白質を特異的に認識することを明らかにした。一方、これらの抗血清よりアフィニティー抗体を調製し、ペプチドを標準品としたサンドイッチ型 ELISA 系の作製を試みた結果、Par-M 抗体を用いた ELISA 法により、最小感度 0.3 ng で 1-33 ng/ml を定量できる方法を確立した。

F. 研究発表

[論文発表]

- Nishimura M, Mizuta I, Mizuta E, Yamasaki S, Ohta M, Kaji R, Kuno S: Tumor necrosis factor gene polymorphisms in patients with sporadic Parkinson's disease. *Neuroscience Letters*, 311:1-4, 2001
- Mizuta I, Ohta M, Ohta K, Nishimura M, Mizuta E, Kuno S: Riluzole stimulates nerve growth factor, brain-derived neurotrophic factor and glial cell line-derived neurotrophic factor synthesis in cultured mouse astrocytes. *Neuroscience Letters*, 311:117-120, 2001
- Nishimura M, Kawakami H, Maruyama H, Izumi Y, Kuno S, Kaji R, Nakamura S: Influence of interleukin-1 β gene polymorphism on age-at-onset of spinocerebellar ataxia 6(SCA6) in Japanese patients. *Neuroscience Letters*, 311:128-130, 2001
- Mogi M, Togari A, Kondo T, Mizuno Y, Kogure O, Kuno S, Ichinose H, Nagatsu T: Glial cell line-derived neurotrophic factor in the substantia nigra from control and parkinsonian brains. *Neuroscience Letters*, 311:179-181, 2001
- Mizuta I, Nishimura M, Mizuta E, Yamasaki S, Ohata M, Kuno S: Relation between the high production related allele of the interferon- γ (IFN- γ) gene and age at onset of idiopathic Parkinson's disease in Japan. *J. Neuro. Neurosurg. Psychiat.* 71:No 6, 818-819.2001.

[総説]

久野貞子：パーキンソン病とパーキンソン症候群. *老年精神医学雑誌* 12 巻 4 号, 339-342.

2001.4

久野貞子：パーキンソン病と悪性症候群.パーキンソン病を考える. SCOPE 別冊 32-33.

2001.6

山崎俊三、久野貞子：ふるえの発生機序. 治療 Vol.83.No.6 79-83. 2001. 6

久野貞子：長期治療のストラテジー. (特集：高齢者のパーキンソン病治療)

GERONTOLOGY Vol.13 増刊号 46-50.

2001.8

久野貞子：症例報告 進行性パーキンソン病の治療 (パーキンソン病長期治療の問題点と対策—ドパミンアゴニストの役割—)

GERONTOLOGY Vol.13No.2 91-93,

2001.4

久野貞子：薬の使い方について第42回日本神経学会総会 サテライトシンポジウム. パーキンソン病長期治療の戦略.

Pharma Medica Vol.19 No.8 120-123 2001

久野貞子：アテトシス, ジストニー, 片側バリスム. 今日の治療指針 2001 医学書院 244-245.

太田光照, 水田依久子, 榎本亜澄香, 藤波 綾,

太田潔江, 久野貞子：パーキンソン治療薬の培養アストログリア細胞における神経栄養因子産生促進作用 日本薬学会第121年会；平成13年3月28-30日 札幌

久野貞子, 水田依久子, 太田潔江, 太田光照：パーキンソン治療薬による神経栄養因子産生刺激作用の検討 第42回日本神経学会総会；平成13年5月 松本

水田依久子, 岩下靖史, 太田潔江, 太田壮一, 太田光照, 久野貞子：パーキンソン病治療薬によるラット初代培養アストロサイトに於ける神経栄養因子産生刺激作用の検討 第44回日本神経化学会；平成13年9月26-28日 京都

水田依久子, 岩下靖史, 太田潔江, 太田壮一, 太田光照, 久野貞子：パーキンソン病治療薬によるラット初代培養アストロサイトに於ける神経栄養因子産生刺激作用 グリア研究会；平成13年12月8日 大阪

[国際学会発表]

Mizuta I., Ohta K., Ohta M., Kuno S. : Selegiline, a monoamine oxidase B inhibitor, up-regulates synthesis of nerve growth factor (NGF), brain-derived neurotrophic factor (BDNF) and glial cell line-derived neurotrophic factor (GDNF) in cultured mouse astrocytes The 9th International catecholamine symposium ; 平成13年3月31日 4月5日 京都

Ohta K., Ohta M., Mizuta I., Kuno S.: Apomorphine up-regulates neurotrophic factors in cultured mouse astrocytes. The 9th International catecholamine symposium :

[国内学会発表]

研究成果の刊行に関する一覧表

水野美邦

[論文発表]

- Imai Y, Soda M, Inoue H, Hattori N, Mizuno Y, Takahashi R. An unfolded putative transmembrane polypeptide, which can lead to endoplasmic reticulum stress, is a substrate of parkin. *Cell* 105: 891-902, 2001
- Jeon BS, Kim JM, Lee DS, Hattori N, Mizuno Y. An apparently sporadic case with parkin gene mutation in a Korean woman. *Arch Neurol* 58: 988-989, 2001
- Kubo S, Kitami T, Noda S, Shimura H, Uchiyama Y, Asakawa S, Minoshima S, Shimizu N, Mizuno Y, Hattori N. Parkin is associated with cellular vesicles. *J Neurochem* 78: 42-54, 2001
- Lu CS, Wu JC, Tsai CH, Chen RS, Chou WYH, Hattori N, Yoshino H, Mizuno Y. Clinical and genetic studies on familial parkinsonism: The first report on a parkin gene mutation in a Taiwanese family. *Mov Disord* 16: 164-166, 2001
- Mochizuki H, Hayakawa H, Migita M, Shibata M, Tanaka R, Suzuki A, Shimo-Nakanishi Y, Urabe T, Yamada M, Tamayose K, Shimada T, Miura M, Mizuno Y. An AAV-derived apaf-1 dominant negative inhibitor prevents MPTP toxicity as antiapoptotic gene therapy for Parkinson's disease. *PNAS* 98: 10918-10923, 2001
- Mori H, Motoi Y, Kobayashi T, Hasegawa M, Yamamura A, Iwatsubo T, Mizuno Y. Tau accumulation in a patient with pallidonigroluysian atrophy. *Neurosci Lett* 309: 89-92, 2001
- Noda K, Okuma Y, Fukae J, Fujishima K, Sadamasa H, Yoshiike T, Mizuno Y. Sweet's syndrome associated with encephalitis. *J Neurol Sci* 188: 95-97, 2001
- Noda K, Miwa H, Miyashita N, Tanaka S, Mizuno Y. Monoataxia of upper extremity in motor cortical infarction. *Neurology* 56: 1418-1419, 2001
- Okuma Y, Tanaka R, Fujishima K, Kobayashi T, Mizuno Y. Cortical reflex action myoclonus in neurosyphilis. *Eur Neurol* 45: 193-194, 2001
- Shimura H, Schlossmacher MG, Hattori N, Froesch MP, Trockenbacher A, Schneider R, Mizuno Y, Kosik KS, Selkoe DJ. Ubiquitination of a new form of α -synuclein by parkin from human brain: Implications for Parkinson's disease. *Science* 293: 263-269, 2001
- Shimo-Nakanishi Y, Urabe T, Hattori N, Watanabe Y, Nagao T, Yokochi M, Hamamoto M, Mizuno Y. Polymorphism of the lipoprotein lipase gene and risk of atherothrombotic cerebral infarction in the Japanese. *Stroke* 32: 1481-1486, 2001
- Takanashi M, Mochizuki H, Yokomizo K, Hattori N, Mori H, Yamamura Y, Mizuno Y. Iron accumulation in the substantia nigra of autosomal recessive juvenile parkinsonism (ARJP). *Parkinsonism Related Disord* 7: 311-314, 2001
- Tanaka R, Mochizuki M, Suzuki A, Katsube N, Ishitani R, Mizuno Y and Urabe T: Induction of Glyceraldehyde-3-Phosphate dehydrogenase (GAPDH) expression in rat brain after focal ischemia/reperfusion. 2001 (in press)
- Wang M, Suzuki T, Kitada T, Asakawa S, Minoshima S, Shimizu N, Tanaka K, Mizuno Y, Hattori N. Developmental changes in the expression of parkin and UbcR7, a parkin-interacting and ubiquitin-conjugating enzyme, in rat brain. *J Neurochem* 77: 1561-1568, 2001

[総説]

Mizuno Y, Hattori N, Mori H, Suzuki T, Tanaka K. Parkin and Parkinson's disease. *Curr Opin Neurol* 14: 477-482, 2001

Tanaka K, Suzuki T, Chiba T, Shimura H, Hattori N, Mizuno Y. Parkin is linked to the ubiquitin pathway. *J Mol Med* 79: 482-494, 2001

[英文・単行本]

Mizuno Y, Hattori N, Kitada T, Matsumine H, Mori H, Shimura H, Kubo S, Kobayashi H, Asakawa S, Minoshima S, Shimizu N. Familial Parkinson's disease α -synuclein and parkin. *Parkinson' Disease: Advanced in Neurology* vol. 86, Calne D, Clane S, eds, Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, 2001, pp 13-21

永津俊治

[論文発表]

Sugimoto T, Ikemoto K, Murata S, Tazawa M, Nomura T, Hagino Y, Ichinose H, Nagatsu T, Wada A. A convenient determination of chiral pteridines; application of fluorescence detected circular dichroism (FDCCD) to the major pterin from *Escherichia coli*. *Heterocycles* 54: 283-290, 2001

Zabetian CP, Anderson GM, Buxbaum SG, Elson RC, Ichinose H, Nagatsu T, Kim KS, Kim CH, Malison RT, Gelernter J, Cubells JF. A quantitative-trait analysis of human plasma-dopamine β -hydroxylase activity: Evidence for a major polymorphism at the *DBH* locus. *Am J Hum Genet* 68: 515-522, 2001

Mogi M, Togari A, Kondo T, Mizuno Y, Kogure O, Kuno S, Ichinose H, Nagatsu T. Glial cell line-derived neurotrophic factor in the substantia nigra from control and parkinsonian brains. *Neurosci Lett* 300: 179-181, 2001

Ota M, Nakashima A, Ikemoto K, Nojima S, Tanaka M, Okuda M, Koga H, Mori K, Kaneko YS, Fujiwara K, Yamamoto H, Nagatsu T, Ota A. Exon 3 of tyrosine hydroxylase gene: lack of association with Japanese schizophrenic patients. *Mol Psychiat* 6: 315-319, 2001

Sugimoto T, Ikemoto K, Murata S, Tazawa M, Nomura T, Hagino Y, Ichinose H, Nagatsu T. Identification of (6R)-5,6,7,8-tetrahydro-D-monapterin (= (6R)-2-amino-5,6,7,8-tetrahydro-6-[(1R,2R)-1,2,3-trihydroxypropyl]-pteridine-4(3H)-one) as the native pteridine in *Tetrahymena pyriformis*. *Helvetica Chimica Acta* 84: 918-927, 2001

Ishiguro H, Yamada K, Sawada H, Nishii K, Ichino N, Sawada M., Kurosawa Y, Matsushita N, Kobayashi K, Goto J, Hashida H, Masuda N, Kanazawa I, Nagatsu T. Age-dependent and tissue-specific CAG repeat instability occurs in mouse knock-in for a mutant Huntington's disease gene. *J. Neurosci Res* 65: 289-297, 2001

Kaneko YS, Mori K, Nakashima A, Nagatsu I, Nagatsu T, Ota A. Determination of tetrahydrobiopterin in murine locus coeruleus by HPLC with fluorescence detection. *Brain Res Protocols* 8: 25-31, 2001

Hirata Y, Kiuchi K, Nagatsu T. Manganese mimics the action of 1-methyl-4-phenylpyridinium ion, a dopaminergic neurotoxin, in rat striatal tissue slices. *Neurosci Lett* 311: 53-56, 2001

Ohye T, Ichinose H, Yoshizawa T, Kanazawa I, Nagatsu T. A new splicing variant for human tyrosine

hydroxylase in the adrenal medulla. *Neurosci Lett* 312: 157-160, 2001

Sumi-Ichinose C, Urano F, Kuroda R, Ohye T, Kojima M, Tazawa M, Shiraishi H, Hagino Y, Nagatsu T, Nomura T, Ichinose H. Catecholamine and serotonin are differently regulated by tetrahydrobiopterin. *J Biol Chem* 276: 41150-41160, 2001

[総説]

Riederer P, Reichmann H, Janetzky B, Sian J, Lesch KP, Lange KW, Double KL, Nagatsu T, Gerlach M. Neural degeneration in Parkinson's disease. *Adv Neurol* 86: 125-136, 2001

Ichinose H, Suzuki T, Inagaki H, Ohye T, Nagatsu T. DOPA-responsive dystonia. *Adv Neurol* 86: 173-176, 2001

Ichinose H, Ohye T, Suzuki T, Inagaki H, Nagatsu T. Quantification of tyrosine hydroxylase mRNA. *Meth Mol Med* 62: 157-166, 2001

田中啓二

[論文発表]

Wang, M., Suzuki, T., Kitada, T., Asakawa, S., Minoshima, S., Shimizu, N., Tanaka, K., Mizuno, Y., and Hattori, N. (2001) Developmental changes in the expression of parkin and UbcR7, a parkin-interacting and ubiquitin-conjugating enzyme in rat brain. *J. Neurochem.* 77, 1561-1568.

Nishimori, S., Tanaka, Y., Chiba, T., Fujii, M., Imamura, T., Miyazono, K., Ogasawara, T., Kawaguchi, H., Igarashi, T., Fujita, T., Tanaka, K., and Toyoshima, H. (2001) Smad-mediated transcription is required for TGF- β 1-induced p57Kip2 proteolysis in osteoblastic cells. *J. Biol. Chem.* 276, 10700-10705.

Kawakami, T., Chiba, T., Suzuki, T., Iwai, K., Yamanaka, K., Minato, N., Hidaka, Y., Shimbara, N., Suzuki, H., Osaka, F., Omata, M., and Tanaka, K. (2001) NEDD8 recruits E2-ubiquitin to SCF E3-ligase. *EMBO J.* 20, 4003-4012.

Murata, S., Udono, H., Tanahashi, N., Hamada, N., Adachi, K., Yamano, T., Yui, K., Kobayashi, N., Kasahara, M., Tanaka, K., and Chiba, T. (2001) Immunoproteasome assembly and antigen processing in mice lacking both PA28 α and PA28 β . *EMBO J.* 20, 5898-5907.

Tateishi, K., Omata, M., Tanaka, K., and Chiba, T. (2001) The NEDD8 system is essential for cell cycle progression and morphogenetic pathway in mice. *J. Cell Biol.* 155, 571-580.

Murata, S., Minami, Y., Minami, M., Chiba, T., and Tanaka, K. (2001) CHIP is a chaperone-dependent E3 ligase that ubiquitylates unfolded protein. *EMBO Rep.* 2, 1133-1138.

Kang, M. S., Lim, B. K., Seong, I. S., Shimbara, N., Tanaka, K., and Chung, C. H. (2001) The ATP-dependent CodWX (HslVU) protease in *Bacillus subtilis* is a N-terminal serine protease. *EMBO J.* 20, 734-742.

Matsuda, N., Suzuki, T., Uchimiya, H., Tanaka, K., and Nakano, A. (2001) Rma1, a novel type of RING finger protein conserved from Arabidopsis to human, is a membrane-bound ubiquitin ligase. *J. Cell Sci.* 114, 1949-1957.

Ebisawa, T., Fukuchi, M., Murakami, G., Chiba, T., Tanaka, K., Imamura, T., and Miyazono, K. (2001) Smurf1 is recruited to TGF- β 1 type I receptor by Smad7 and induces receptor degradation. *J. Biol. Chem.* 276, 12477-12480.

Takabe, W., Kodama, T., Hamakubo, T., Tanaka, K., Suzuki, T., Aburatani, H., and Noguchi, N. (2001)

Regulation of the expression and function of proteasome β -type subunits by the anti-atherogenic compounds in human endothelial cells. *J. Biol. Chem.* 276, 40497-40501.

Niwa, J., Ishigaki, S., Doyu, M., Kato, K., Suzuki, T., Tanaka, K., Sobue, G. (2001) A novel human RING-finger/IBR family protein, Dorfin, resides in centrosome and mediates ubiquitin ligase activity. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 281, 706-713.

Fukuchi, M., Imamura, T., Chiba, T., Ebisawa, T., Kawabata, M., Tanaka, K., and Miyazono, K. (2001) Ligand-dependent degradation of smad3 by a ubiquitin ligase complex of roc1 and associated proteins. *Mol. Biol. Cell* 12, 1431-1443.

[総説]

Tanaka, K., Suzuki, T., Chiba, T., Shimura, H., Hattori, N., and Mizuno, Y. (2001) Parkin is linked to the ubiquitin pathway. *J. Mol. Med.* 79, 482-494.

Tanaka, K., Kawakami, T., Tateishi, K., Yashiroda, H., and Chiba, T. (2001) Control of I β 1, proteolysis by the ubiquitin-proteasome pathway. *Biochimie* 83, 351-356.

Mizuno, Y., Hattori, N., Mori, H., Suzuki, T., and Tanaka, K. (2001) Parkin and Parkinson's disease. *Curr. Opin. Neurol.* 14, 477-482.

小川紀雄

[論文発表]

Tanaka, K., Fujita, N., Yoshioka, M. and Ogawa, N.: Immunosuppressive and non-immunosuppressive immunophilin ligands improve H₂O₂-induced cell damage by increasing glutathione levels in NG108-15 cells. *Brain Res.*, 889: 236-239, 2001.

Tanaka, K., Miyazaki, I., Fujita, N., Haque, Md. E., Asanuma, M. and Ogawa, N.: Molecular mechanism in activation of glutathione system by ropinirole, a selective dopamine D₂ agonist. *Neurochem. Res.*, 26: 31-36, 2001.

Kondo, F., Asanuma, M., Miyazaki, I., Kondo, Y., Tanaka, K., Makino, H. and Ogawa, N.: Progressive cortical atrophy after forebrain ischemia in diabetic rats. *Neurosci. Res.*, 39: 339-346, 2001.

Asanuma, M., Nishibayashi-Asanuma, S., Miyazaki, I., Kohno, M. and Ogawa, N.: Neuroprotective effects of non-steroidal anti-inflammatory drugs by direct scavenging of nitric oxide radicals. *J. Neurochem.*, 76: 1895-1904, 2001.

Kabuto, H., Yokoi, I., Ogawa, N., Mori, A. and Liburdy, R.P.: Effects of magnetic fields on the accumulation of thiobarbituric acid reactive substances induced by iron salt and H₂O₂ in mouse brain homogenates or phosphatidylcholine. *Pathophysiology*, 7: 283-288, 2001.

Haque Md.E., Tanaka, K. and Ogawa, N.: Relationship between locomotor activity and monoamines following single and double transient forebrain ischemia in gerbils. *Neurochem. Res.*, 26: 401-406, 2001.

Tanaka, K., Hori, K., Wada-Tanaka, N., Nomura, M. and Ogawa, N.: FK506 ameliorates the discrimination learning impairment due to preventing the rarefaction of white matter induced by chronic Localization, regulation, and function of metallothionein-III/ growth inhibitory factor in the brain. *Acta Med. Okayama*, 55: 1-9, 2001.

浅沼幹人,小川紀雄: フリーラジカルと脳障害, *Clinical Neuroscience*, 19: 555-559, 2001.

小川紀雄,浅沼幹人:酸化ストレスと神経細胞死.Clinical Neuroscience,19: 665-667, 2001.
浅沼幹人,小川紀雄:酸化ストレスによる神経障害とその防御,酸化ストレス---フリーラジカル医学生物学の最前線 cerebral hypoperfusion in rats. Brain Res., 906: 184-189, 2001.

[総説]

Aoki Sogawa, C., Asanuma, M., Sogawa, N., Miyazaki, I., Nakanishi, T., Furuta, H. and Ogawa, N.: (吉川敏一編), pp177-181.医歯薬出版,東京,2001.

久野貞子

[論文発表]

Nishimura M, Mizuta I, Mizuta E, Yamasaki S, Ohta M, Kaji R, Kuno S: Tumor necrosis factor gene polymorphisms in patients with sporadic Parkinson's disease. Neuroscience Letters, 311:1-4, 2001
Mizuta I, Ohta M, Ohta K, Nishimura M, Mizuta E, Kuno S: Riluzole stimulates nerve growth factor, brain-derived neurotrophic factor and glial cell line-derived neurotrophic factor synthesis in cultured mouse astrocytes. Neuroscience Letters, 311:117-120, 2001
Nishimura M, Kawakami H, Maruyama H, Izumi Y, Kuno S, Kaji R, Nakamura S: Influence of interleukin-1 β gene polymorphism on age-at-onset of spinocerebellar ataxia 6(SCA6) in Japanese patients. Neuroscience Letters, 311:128-130, 2001
Mogi M, Togari A, Kondo T, Mizuno Y, Kogure O, Kuno S, Ichinose H, Nagatsu T: Glial cell line-derived neurotrophic factor in the substantia nigra from control and parkinsonian brains. Neuroscience Letters, 311:179-181, 2001
Mizuta I, Nishimura M, Mizuta E, Yamasaki S, Ohata M, Kuno S: Relation between the high production related allele of the interferon- γ (IFN- γ) gene and age at onset of idiopathic Parkinson's disease in Japan. J. Neuro. Neurosurg. Psychiat. 71:No 6, 818-819.2001.

[総説]

久野貞子:パーキンソン病とパーキンソン症候群. 老年精神医学雑誌 12巻4号, 339-342. 2001
久野貞子:パーキンソン病と悪性症候群,パーキンソン病を考える. SCOPE 別冊 32-33. 2001.6
山崎俊三, 久野貞子:ふるえの発生機序. 治療 Vol.83, No.6 79-83. 2001
久野貞子:長期治療のストラテジー. (特集:高齢者のパーキンソン病治療) GERONTOLOGY Vol.13 増刊号 46-50. 2001
久野貞子:症例報告 進行性パーキンソン病の治療(パーキンソン病長期治療の問題点と対策一ドパミンアゴニストの役割一). GERONTOLOGY Vol.13No.2 91-93, 2001
久野貞子:薬の使い方について第42回日本神経学会総会 サテライトシンポジウム. パーキンソン病長期治療の戦略. Pharma Medica Vol.19 No.8 120-123 2001
久野貞子:アテトーシス, ジストニー, 片側バリスム. 今日の治療指針 2001 医学書院 244-245