

20030178

厚生労働科学研究費補助金

長寿科学総合研究事業

Dorfinによる老年期神経変性疾患の治療法の開発
(H15-長寿-018)

平成15年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 祖 父 江 元
(名古屋大学大学院医学系研究科教授)

平成 1 6 (2004) 年 3 月

目 次

I. 総括研究報告書

Dorfinによる老年期神経変性疾患の治療法の開発.....	1
祖父江 元	

II. 分担研究報告書

1. Dorfinによる老年期神経変性疾患の治療法の開発.....	5
道勇 学	
2. Dorfinによる老年期神経変性疾患の治療法の開発.....	10
田中啓二	

III. 研究成果の刊行に関する一覧..... 15

IV. 研究成果の刊行物・別刷..... 23

Dorfin による老年期神経変性疾患の治療法の開発

主任研究者 祖父江 元 名古屋大学大学院医学系研究科神経内科学教授

研究要旨 パーキンソン病(PD)やアルツハイマー病(AD)は、運動・認知機能の進行性の低下をきたす老年期神経変性疾患の代表的な疾患であり、原因究明と治療法開発が急務である。近年、さまざまな神経変性疾患の原因として凝集して不溶化した異常蛋白質の蓄積が注目されており、PD や AD においても病変部位に不溶化した蛋白質からなるユビキチン化封入体が発見することが特徴である。PD においては α -synuclein や synphilin-1, AD においては $A\beta$ や tau などの蛋白質が蓄積している。ユビキチンリガーゼ Dorfin は、PD や AD のユビキチン化封入体に局在しており、Dorfin のユビキチン化基質の一つとして synphilin-1 を同定した。synphilin-1 のアンキリン様リピート、コイルドコイルドメイン、ATP・GTP 結合部位を含む中央領域が凝集体形成能と細胞毒性を有しており、Dorfin は synphilin-1 の中央領域に結合してこれをユビキチン化する。また Dorfin のユビキチン化制御因子として VCP(valosin-containing protein/p97)を同定した。Dorfin を高発現することによりユビキチン-プロテアソーム系の働きを増強して、PD や AD において毒性蛋白質の蓄積防止、除去を行うことが今後の重要な治療戦略となりうる。

分担研究者

道勇 学 名古屋大学大学院神経内科学講師
田中 啓二 東京都臨床医学総合研究所副所長

A. 研究目的

パーキンソン病(PD)やアルツハイマー病(AD)は、運動機能や認知機能の進行性の低下をきたす老年期神経変性疾患の代表的な疾患であり、患者自身の苦痛が大きいのみならず、家族・社会への負担が重く、原因究明と治療法の開発が急務である。近年さまざまな神経変性疾患の原因として、凝集する性質を持つ毒性蛋白質の中核神経組織への蓄積が注目されている。PD や AD においても、脳の病変部位にユビキチン化した不溶性蛋白質からなる封入体が発見することが病理学的に重要な特徴である。PD においては α -synuclein や synphilin-1, AD においては β -amyloid($A\beta$)や tau などの蛋白質が凝集し蓄積していることがこれまでに明らかにされており、 α -synuclein や tau を中枢神経系に過剰発現させたトランスジェニックマウスは神経変性を

生じることが報告されている。神経細胞内では神経機能を正常に保つために、不要となったタンパク質や異常タンパク質をユビキチン化した後にプロテアソームにより分解除去する蛋白質品質管理機構が働いているが、神経変性疾患においては、この蛋白質品質管理機構が何らかの原因で破綻した結果、異常蛋白質が蓄積し神経細胞の機能障害が引き起こされていると考えられる。従って、PD や AD において蓄積している毒性タンパク質をユビキチン-プロテアソーム系の働きを増強して除去することが、治療法開発において今後の重要な方向の一つである。

Dorfin は、われわれが脊髄における遺伝子発現プロファイリングを行うことから、孤発性筋萎縮性側索硬化症(ALS)脊髄において発現が増加している分子として同定した新規ユビキチンリガーゼ(E3)である。Dorfin は、孤発性および家族性 ALS 脊髄運動ニューロンに出現するユビキチン化封入体に局在し、家族性 ALS の原因となる変異 SOD1 を特異的にユビキチン化して分解を促進する活性を有

している。Dorfin は野生型 SOD1 とは反応せず、家族性 ALS の原因となる変異型 SOD1 のみを認識してユビキチン化することから、神経細胞内において蛋白質品質管理を行う活性を持つということが出来る。本研究は、Dorfin が PD や AD などの老年期神経変性疾患の治療に有用であるかどうかを、これらの神経変性疾患における Dorfin の役割の臨床病理学的検討、培養細胞モデルや動物モデルを作製することによる *in vitro* および *in vivo* での検討、Dorfin の作用機序の基礎的解明などを行うことで明らかにしようとするものである。

B. 研究方法

1) 特異抗体を用いた老年期神経変性疾患の神経病理学的解析

病理学的に PD、レビー小体性痴呆(DLB)、多系統萎縮症(MSA)、AD と診断された症例の剖検中枢神経病理組織標本を抗 Dorfin 抗体、抗ユビキチン抗体、抗 α -synuclein 抗体、抗 tau 抗体などを用いて免疫組織化学およびウェスタン解析等を用いて検討した。抗 Dorfin 抗体は、ペプチド抗原をウサギに免疫し、アフィニティー精製することにより作製した。

2) α -synucleinopathy 培養細胞モデルの構築

COS7 や神経系細胞株である Neuro2a などの培養細胞へ、 α -synuclein や synphilin-1 の発現ベクターを導入することにより α -synucleinopathy 培養細胞モデルを構築し、細胞質内凝集体形成や細胞障害の程度を定性的・定量的に解析した。また Dorfin 発現ベクターを導入することにより、 α -synuclein や synphilin-1 のユビキチン化に変化が見られるかどうかについて検討した。

3) 遺伝子改変動物の作製

β -actin プロモータ調節下に全身で全長 Dorfin を発現するコンストラクトを作製し、マウス受精卵にマイクロインジェクションすることによりトランスジェニック(Tg)マウスを作製した。導入遺伝子の確認は、マウス tail ゲノムのサザンブロットにより行った。導入遺伝子の発現の確認を RT-PCR、ウェスタンブロット、免疫組織化学により行った。

4) Dorfin 結合蛋白質の同定

Dorfin を bait とした脳 cDNA ライブラリーを用いた酵母 Two-Hybrid 解析および培養細胞より抽出した Dorfin 複合体を用いたマスマスペクトロメトリ解析の 2 つの方法を用いて行った。同定された Dorfin 結合蛋白質を発現するベクターを作製し、培養細胞を用いた機能解析を行った。

(倫理面への配慮)

本研究は事前に各々の分担研究者の所属機関の倫理委員会より承認を得ており、剖検組織および RNA・ゲノム DNA の収集にあたっては、本研究の目的や方法などについて口頭および文書により十分な説明を行った後、文書により同意を得て行った。また実験動物の扱いには各々の分担研究者の所属大学動物実験施設の指針に従い、苦痛を与えず行うよう配慮した。

C. 研究結果

1) Dorfin は、ユビキチン化した封入体である PD・DLB のレビー小体、MSA のグリア細胞内封入体、AD の神経原線維変化にユビキチンの局在と一致して存在していた。PD・DLB、MSA においては α -synuclein が不溶化して中枢神経組織内に蓄積しているが、不溶性となった高分子蛋白質複合体を検出する filter-trap アッセイや組織より抽出した蛋白質を界面活性剤への可溶性により分画することにより、Dorfin はこれらの老年期神経変性疾患において不溶性蛋白質複合体内に存在していることが明らかになった。

2) COS7 や Neuro2a へ、 α -synuclein や synphilin-1 の発現ベクターを導入することにより α -synucleinopathy 培養細胞モデルを構築した。この実験系では、 α -synuclein に比較して synphilin-1 は容易に細胞質内に凝集体を形成し、プロテアソーム阻害剤によりユビキチン-プロテアソーム系を阻害することにより synphilin-1 による細胞質内凝集体形成が促進された。synphilin-1 は単独で凝集体形成能と細胞毒性を有しており、synphilin-1 内部のアンキリン様リピート、コイルドコイルドメイン、ATP・GTP 結合部位を含む中央領域が凝集体形成能を持ち、細胞毒性発現に重要な役割を有していることが明らかとなった。Dorfin は、 α -synuclein

とは結合せず, synphilin-1 の中央領域のみを認識してユビキチン化した。

3) Dorfin-Tg マウスが 5 系統得られ, そのうち比較的高コピー数の Dorfin が導入された Tg マウスが 2 系統得られた。サザンブロットにより高コピー数の Dorfin-Tg マウスでは, 約 20 コピーの Dorfin 遺伝子が導入されていた。Dorfin-Tg マウスの各臓器より抽出した RNA を用いた RT-PCR では, Dorfin 導入遺伝子は Tg マウスの全身で発現しており, 脳および脊髄において高い発現が観察された。筋肉での Dorfin 発現が特に高かったが, これは β -actin をプロモータに用いたことに起因していると考えられた。Dorfin の高発現のみでは生後の発育は正常で, 運動機能や病理組織所見などには明らかな異常を認めなかった。

4) ユビキチン結合酵素(E2)を始めとして複数の Dorfin 結合蛋白質を同定したが, この中には微小管結合蛋白質 MAP1B や VCP(valosin-containing protein/p97)が存在していた。MAP1B はレビー小体や神経原線維変化に局在していることが知られており, PD・DLB の神経病理組織の免疫学的検討では Dorfin のレビー小体における局在と一致して存在していた。Dorfin は細胞内で 400-600kD の複合体を形成しており, 複体内で VCP と結合していた。VCP のドミナントネガティブ変異体は Dorfin の *in vivo* での E3 活性を阻害し, Dorfin の E3 活性に VCP が必要であることが明らかとなった。

D. 考察

Dorfin はわれわれが ALS において同定した E3 活性を有する新規分子であり, 蛋白質品質管理能を持つ。本研究において, Dorfin がユビキチン化された封入体である PD・DLB のレビー小体, MSA のグリア細胞内封入体, AD の神経原線維変化に存在することを報告した。PD・DLB・MSA はいずれも α -synuclein および synphilin-1 が中枢神経系内に蓄積する α -synucleinopathy として知られているが, 培養細胞モデルによる本研究の結果から synphilin-1 が凝集体形成能と細胞毒性を持ち, synphilin-1 のアンキリン様リピート, コイルドコイルドメイン, ATP・GTP 結合部位を含む中央領域が凝集体形成

と細胞毒性発揮に重要な役割を有していることが明らかとなった。Dorfin は synphilin-1 の中央領域に結合し, これをユビキチン化することで神経細胞保護的に働くと考えられた。さらに, Dorfin の E3 活性制御に必要な因子として, VCP を同定したが, VCP は小胞体関連分解における蛋白質品質管理に重要な働きをしており, レビー小体に局在していることから, 老年期神経変性疾患の病態と治療を考える上で重要な分子であると考えられた。

Dorfin を高発現する Tg マウスを作製し, ALS モデルマウスである変異 SOD1-Tg マウスとの交配実験では, 既に Dorfin による ALS 治療に有望な結果を得つつある。本研究での結果により, Dorfin が ALS と同様に, PD や AD においても異常蛋白質のユビキチン化を通して, 神経細胞内の蛋白質品質管理を行うことにより神経細胞の生存に重要な役割を果たしていることが示唆され, Dorfin を高発現させユビキチン-プロテアソーム系の活性を増強することによる老年期神経変性疾患の治療戦略は有望であると思われる。synphilin-1 は単独で凝集体を形成し細胞毒性を持つことから, 今後の α -synucleinopathy の治療法開発には, α -synuclein のみならず synphilin-1 による病態にも注目する必要がある。新たな α -synucleinopathy モデルマウスを確立すべく, synphilin-1 を中枢神経系内に過剰に発現する Tg マウスの作製を進めている。

E. 結論

Dorfin は老年期神経変性疾患の病態に深く関わっており, Dorfin を高発現することによりユビキチン-プロテアソーム系の働きを増強して, PD や AD における毒性蛋白質の蓄積防止, 除去を行うことが今後の重要な治療戦略となりうる。

F. 健康危険情報 なし

G. 研究発表

(1) Minamiyama, M, Katsuno, M, Adachi, H, Waza, M, Sang, C, Kobayashi, Y, Tanaka, F, Doyu, M, Inukai A, Sobue, G. (2004) Sodium Butyrate Ameliorates Phenotypic Expression in a Transgenic Mouse Model of

Spinal and Bulbar Muscular Atrophy. *Hum. Mol. Genet.* in press.

(2) Katsuno, M, Adachi, H, Tanaka, F, Sobue, G. (2004) Spinal and bulbar muscular atrophy: ligand-dependent pathogenesis and therapeutic perspectives. *J. Mol. Med.* in press.

(3) Takeuchi H, Niwa J, Hishikawa N, Ishigaki S, Tanaka F, Doyu M, Sobue G. (2004) Dorfin prevents cell death by reducing mitochondrial localizing mutant superoxide dismutase 1 in a neuronal cell model of familial amyotrophic lateral sclerosis. *J. Neurochem.* **89**:64-72.

(4) Katsuno, M, Sobue, G. (2004) Polyglutamine diminishes VEGF; passage to motor neuron death? *Neuron* **41**: 677-679.

(5) Katsuno, M, Adachi, H, Sobue, G. (2004) Sweet relief for Huntington disease. *Nat. Med.* **10**:123-124.

(6) Hishikawa N, Niwa J, Doyu M, Ito T, Ishigaki S, Hashizume Y, Sobue G. (2003) Dorfin localizes to the ubiquitylated inclusions in Parkinson's disease, dementia with lewy bodies, multiple system atrophy, and amyotrophic lateral sclerosis. *Am J Pathol.* **163**: 609-19.

(7) Ito T, Niwa J, Hishikawa N, Ishigaki S, Doyu M, Sobue G. (2003) Dorfin localizes to lewy bodies and ubiquitylates synphilin-1. *J Biol Chem.* **278**: 29106-14.

(8) Katsuno, M, Adachi, H, Doyu, M, Minamiyama, M, Sang, C, Kobayashi, Y, Inukai, A, Sobue, G. (2003) Leuporelin rescues polyglutamine-dependent phenotypes in a transgenic mouse model of spinal and bulbar muscular atrophy. *Nat. Med.* **9**: 768-773.

(9) Adachi, H, Katsuno, M, Minamiyama, M, Sang, C, Pagoulatos, G, Angelidis, C, Kusakabe, M, Yoshiki, A, Kobayashi, Y, Doyu, M, Sobue, G. (2003) Heat shock protein 70 chaperone overexpression ameliorates phenotypes of the spinal and bulbar muscular atrophy transgenic mouse model by reducing nuclear-localized mutant androgen receptor protein. *J. Neurosci.* **23**: 2203-2211.

(10) Katsuno, M, Adachi, H, Inukai, A, Sobue, G. (2003) Transgenic mouse models of spinal and bulbar muscular atrophy. *Cytogenet. Genome Res.* **100**: 243-251,

2003.

(11) Sobue, G, Adachi, H, Katsuno, M. (2003) Spinal and bulbar muscular atrophy (SBMA). In *Neurodegeneration: The Molecular Pathology of Dementia and Movement Disorders*. Dickson Dickson, ed. INS Neuropath Press, LA, USA, pp275-279.

(12) Ando Y, Liang Y, Ishigaki S, Niwa J, Jiang Y, Kobayashi Y, Yamamoto M, Doyu M, Sobue G. (2003) Caspase-1 and -3 mRNAs are differentially upregulated in motor neurons and glial cells in mutant SOD1 transgenic mouse spinal cord - A study using laser microdissection and real-time RT-PCR. *Neurochem Res* **28**: 839-46.

H. 知的財産権の出願・登録状況 なし

Dorfin による老年期神経変性疾患の治療法の開発

分担研究者 道勇 学 名古屋大学大学院医学系研究科神経内科学講師

研究要旨 パーキンソン病(PD)やアルツハイマー病(AD)は、運動・認知機能の進行性の低下をきたす代表的な老年期神経変性疾患であり、原因究明と治療法開発が急務である。PD においては α -synuclein や synphilin-1, AD においては A β や tau などの蛋白質が中枢神経系内に蓄積しているが、近年さまざまな神経変性疾患の原因として凝集して不溶化した異常蛋白質の蓄積が注目されている。われわれが同定したユビキチンリガーゼ Dorfin は、PD や AD のユビキチン化封入体に局在しており、Dorfin のユビキチン化基質として新たに synphilin-1 を同定した。synphilin-1 のアンキリン様リピート、コイルドコイルドメイン、ATP・GTP 結合部位を含む中央領域が凝集体形成能と細胞毒性を有しており、Dorfin は synphilin-1 の中央領域をユビキチン化して毒性から神経細胞を保護していると考えられる。Dorfin の高発現によりユビキチン-プロテアソーム系を増強することが今後の老年期神経変性疾患の重要な治療戦略となりうる。

A. 研究目的

パーキンソン病(PD)やアルツハイマー病(AD)は、運動機能や認知機能の進行性の低下をきたす老年期神経変性疾患の代表的な疾患であり、患者自身の苦痛が大きいのみならず、介護等のため家族・社会への負担が重く、原因究明と治療法の開発が急務である。近年さまざまな神経変性疾患の原因として、凝集する性質を持つ毒性蛋白質の中枢神経組織への蓄積が注目されている。PD や AD においても、脳の病変部位にユビキチン化した不溶性蛋白質からなる封入体が発現することが病理学的に重要な特徴である。PD においては α -synuclein や synphilin-1, AD においては β -amyloid(A β)や tau などの蛋白質が凝集し蓄積しており、これらの分子を中枢神経系に過剰発現させたトランスジェニック(Tg)マウスは神経変性を生じることが報告されている。神経細胞内では神経機能を正常に保つために、不要となったタンパク質や異常タンパク質をユビキチン化した後にプロテアソームにより分解除去する蛋白質品質管理機構が働いているが、神経変性疾患においては、この蛋白質品質管理機構が何らかの原因で破綻した結果、異常蛋白質が蓄

積し神経細胞の機能障害が引き起こされていると考えられる。従って、PD や AD において蓄積している毒性タンパク質をユビキチン-プロテアソーム系の働きを増強して除去することが、治療法開発において今後の重要な方向の一つである。

Dorfin は、われわれが脊髄における遺伝子発現プロファイリングを行うことから、孤発性筋萎縮性側索硬化症(ALS)脊髄において発現が増加している分子として同定した新規ユビキチンリガーゼ(E3)である。Dorfin は、孤発性および家族性 ALS 脊髄運動ニューロンに出現するユビキチン化封入体に局在し、家族性 ALS の原因となる変異 SOD1 を特異的にユビキチン化して分解を促進する活性を有している。Dorfin は野生型 SOD1 とは反応せず、家族性 ALS の原因となる変異型 SOD1 のみを認識してユビキチン化することから、神経細胞内において蛋白質品質管理を行う活性を持つことができる。本研究は、Dorfin が PD や AD などの老年期神経変性疾患の治療に有用であるかどうかを、これらの神経変性疾患における Dorfin の役割の臨床病理学的検討、培養細胞モデルや動物モデルを作製することによる in vitro および in vivo での検討、

Dorfin の作用機序の基礎的解明などを行うことで明らかにしようとするものである。

B. 研究方法

1) 抗 Dorfin 抗体を用いた老年期神経変性疾患の神経病理学的解析

PD 5 例 (67-79 歳: 男性 4 例, 女性 1 例), DLB 5 例 (65-78 歳: 男性 4 例, 女性 1 例), MSA 5 例 (60-72 歳: 男性 3 例, 女性 2 例), 孤発性 ALS 2 例 (68, 69 歳: 男性 2 例), 家族性 ALS 1 例 (57 歳: 男性 1 例), 正常対照 5 例 (61-78 歳: 男性 4 例, 女性 1 例) の剖検標本を用いた。剖検は死後 4~12 時間以内に施行され, いずれの症例も病理学的に診断を確認した。PD 中脳, DLB 側頭葉皮質, MSA 被殻・中脳, ALS 脊髄組織を 20% 中性ホルマリン固定し, パラフィン包埋を行った。Dorfin 抗体は, Dorfin のアミノ酸 396-413 およびアミノ酸 678-690 に対応するペプチド抗原をウサギに免疫し, アフィニティ精製することにより作製し, ABC 法により免疫染色を行った。ユビキチン陽性封入体中の Dorfin 陽性封入体の割合は, 連続切片を作成し, Dorfin およびユビキチンに対する抗体で各々の切片を染色して, 封入体の数をカウントし比較することで行った。抗 Dorfin 免疫染色を同様に行った切片を 1% オスミウム固定した後, エポキシ樹脂に包埋し, 超薄切片を作成し, 電子顕微鏡でも観察を行った。

2) α -synucleinopathy 培養細胞モデルの構築

α -synuclein あるいは synphilin-1 を CMV プロモータ制御下に発現するベクターを構築した。 α -synuclein については, 野生型の他, A30P, A53T の変異を QuikChange Site-directed Mutagenesis Kit を用いて導入したコンストラクトも作製した。COS7 や神経系細胞株である Neuro2a などの培養細胞へ, 各発現ベクターを導入することにより α -synucleinopathy 培養細胞モデルを構築し, 細胞質内凝集体形成や細胞障害の程度を定性的・定量的に解析した。また Dorfin 発現ベクターを導入することにより, α -synuclein や synphilin-1 のユビキチン化に変化が見られるかどうかについて in vitro および in vivo で検討した。

3) 遺伝子改変動物の作製

β -actin プロモータ調節下に全身で全長 Dorfin を発現するコンストラクトを作製し, BDF1 マウス受精卵にマイクロインジェクションすることによりトランスジェニック (Tg) マウスを作製した。導入遺伝子の確認は, マウス tail ゲノムのサザンブロットにより行った。導入遺伝子の発現の確認を RT-PCR, ウェスタンブロット, 免疫組織化学により行った。各週齢ごとに Tg マウスの臨床症状の観察, 体重測定, 行動・運動解析 (Rotarod, cage activity) を, 行った。

4) Dorfin 結合蛋白質の同定

脳 cDNA ライブラリーを用いて Dorfin を bait とした酵母 Two-Hybrid 解析により Dorfin 結合蛋白質を検索した。同定された Dorfin 結合蛋白質を発現するベクターを作製し, Dorfin および Dorfin 結合蛋白質を培養細胞に発現させ, 免疫沈降法などを用いた解析を行った。

(倫理面への配慮)

本研究は事前に各々の分担研究者の所属機関の倫理委員会より承認を得ており, 剖検組織および RNA・ゲノム DNA の収集にあたっては, 本研究の目的や方法などについて口頭および文書により十分な説明を行った後, 文書により同意を得て行った。また実験動物の扱いには各々の分担研究者の所属大学動物実験施設の指針に従い, 苦痛を与えず行うよう配慮した。

C. 研究結果

1) PD においては, 黒質, 青斑核などの Lewy 小体が抗 Dorfin 抗体により染色された。抗 Dorfin 抗体により Lewy 小体の周辺部が主に染色され, Lewy 小体の前駆体と考えられている pale body, Lewy neurite, グリア細胞内封入体なども染色された。約 92% のユビキチン陽性 Lewy 小体が Dorfin 陽性であった。DLB においては, 抗 Dorfin 抗体により皮質型 Lewy 小体が染色された。ユビキチン陽性の皮質型 Lewy 小体の約 85% が Dorfin 陽性であった。MSA においては, オリゴデンドログリア内のユビキチン陽性のグリア細胞内封入体 (GCI) の約 93% が Dorfin 陽性であった。免疫電顕により Dorfin 陽性の封入体を観察すると, PD の Lewy 小体では, 封

入体周辺部の放射状に配列した線維構造が Dorfin 陽性であり、中心部は Dorfin 陰性であった。MSA の GCI においては、線維状あるいは顆粒状の構造物が Dorfin 陽性であった。それに対し、家族性 ALS の Lewy 小体様封入体において、Dorfin の免疫反応は、中心部の線維状構造物に見られた。PD・DLB、MSA においては α -synuclein が不溶化して中枢神経組織内に蓄積しているが、不溶性となった高分子蛋白質複合体を検出する filter-trap アッセイや組織より抽出した蛋白質を界面活性剤への可溶性により分画することにより、Dorfin はこれらの老年期神経変性疾患において不溶性蛋白質複合体内に存在していた。

2) COS7 や Neuro2a へ、 α -synuclein や synphilin-1 の発現ベクターを導入することにより α -synucleinopathy 培養細胞モデルを構築した。この実験系では、 α -synuclein に比較して synphilin-1 は容易に細胞質内に凝集体を形成した。synphilin-1 の凝集体は、プロテアソーム阻害剤によりユビキチン-プロテアソーム系を阻害することにより凝集体の形成頻度やサイズが増大した。synphilin-1 全長を発現させた場合、細胞核近傍にいわゆる aggresome 様の大きな封入体を形成したのに対し、synphilin-1 内部のアンキリン様リピート、コイルドコイルドメイン、ATP・GTP 結合部位を含む中央領域のみを発現させると細胞質内に散在する微小凝集体を形成した。synphilin-1 の凝集体形成に α -synuclein を必要とせず、synphilin-1 単独で凝集体を形成した。synphilin-1 の中央領域のみが細胞毒性を有していたが、全長 synphilin-1 による凝集体がユビキチン化されているのに対し、synphilin-1 中央領域による微小凝集体はユビキチン化されておらず、ユビキチン化が封入体形成と細胞保護に重要であることが示唆された。Dorfin は、 α -synuclein とは結合せず、synphilin-1 の中央領域と結合しユビキチン化した。Dorfin は synphilin-1 による細胞毒性を、E3 活性によりユビキチン化することで軽減していると考えられた。

3) Dorfin-Tg マウスが 5 系統得られ、そのうち比較的高コピー数の Dorfin が導入された Tg マウスが 2 系統得られた。サザンブロットにより高コピー数

の Dorfin-Tg マウスでは、約 20 コピーの Dorfin 遺伝子が導入されていた。

Dorfin-Tg マウスの各臓器より抽出した RNA を用いた RT-PCR では、Dorfin 導入遺伝子は Tg マウスの全身で発現しており、脳および脊髄において高い発現が見られた。筋肉での Dorfin 発現が特に高かったが、これは β -actin をプロモータに用いたことに起因していると考えられた。マウス脳ホモジネートを用いたウェスタンブロットでは、 ~ 100 kDa の全長 Dorfin が発現しており、免疫組織化学によって神経細胞およびグリア細胞内に導入した Dorfin が発現していることを確認した。Dorfin の高発現のみでは、生後 1 年以上経過を観察した限りにおいては運動機能や病理組織所見などには、明らかな異常を認めなかった。

Dorfin-Tg マウス雌と ALS モデルマウスである変異 SOD1(mSOD1)-Tg マウス B6SJL-TgN(SOD1-G93A)1Gur (Jackson Laboratory) 雄を交配し、mSOD1/Dorfin ダブル Tg マウスを作製した。Dorfin-Tg マウスと交配することにより ALS 症状の発症時期は、mSOD1-Tg(mSOD1^{-/-})では生後 109.0 日、ダブル Tg マウス(mSOD1/Dorfin)では、109.4 日と差は認められなかったが、生存期間については、mSOD1-Tg(mSOD1^{-/-})は生後 131.5 日、ダブル Tg マウス(mSOD1/Dorfin)では、153.0 日と有意差が認められ、Dorfin の高発現は mSOD1-Tg マウスの罹病期間および生存期間を延長した。mSOD1-Tg マウス脊髄前角組織においては、運動ニューロンおよび周囲のニューロピルに SOD1 およびユビキチンの蓄積が観察され、その蓄積は ALS 症状の進行とともに増加することが知られている。Dorfin は、mSOD1 を特異的に認識して、プロテアソームによりその分解を促進する E3 活性を有することから、実際に in vivo においても mSOD1 量が減少しているかどうかを免疫組織化学的に検討した。mSOD1/Dorfin マウスでは mSOD1^{-/-}に比較して、SOD1 およびユビキチン蓄積の軽減が観察された。

4) 酵母 Two-Hybrid 解析により、ユビキチン結合酵素(E2)を始めとして複数の Dorfin 結合蛋白質を同定した。この中には微小管結合蛋白質 MAP1B が含まれていた。MAP1B はレビー小体や神経原線維

変化に局在していることが知られており、PD・DLB の神経病理組織の免疫学的検討では Dorfin のレビー小体における局在と MAP1B の局在は一致していた。

D. 考察

Dorfin はわれわれが遺伝子発現プロファイリングである分子インデックス法を用いて ALS 脊髄において同定した E3 活性を有する新規分子であり、蛋白質品質管理能を持つ。本研究において、Dorfin がユビキチン化された封入体である PD・DLB のレビー小体、MSA のグリア細胞内封入体、AD の神経原線維変化、孤発性・家族性 ALS の脊髄運動ニューロン内ユビキチン化封入体に存在することを報告した。PD・DLB・MSA はいずれも α -synuclein および synphilin-1 が中枢神経系内に蓄積する α -synucleinopathy として知られているが、培養細胞モデルによる本研究の結果から synphilin-1 が単独で凝集体形成能を持ち、synphilin-1 のアンキリン様リピート、コイルドコイルドメイン、ATP・GTP 結合部位を含む中央領域が凝集体形成に必要で、しかも細胞毒性を有していることが明らかとなった。Dorfin は synphilin-1 の中央領域と結合し、これをユビキチン化することで神経細胞保護的に働くと考えられた。また、細胞毒性のない全長 synphilin-1 による細胞質内凝集体がユビキチン化されているのに対し、synphilin-1 中央領域による細胞毒性を有する微小凝集体はユビキチン化されていないため、ユビキチン化封入体自体は細胞保護的に働いていると考えられた。

Dorfin を高発現する Tg マウスを作製し、ALS モデルマウスである変異 SOD1-Tg マウスとの交配実験では、既に Dorfin による ALS 治療に有望な結果を得つつある。本研究での結果から、Dorfin が ALS の場合と同様に、PD や AD においても蓄積する異常蛋白質のユビキチン化を通して、神経細胞内の蛋白質品質管理を行うことにより神経細胞保護的な役割を果たしていると考えられる。従って、Dorfin を高発現させユビキチン-プロテアソーム系の活性を増強することによる老年期神経変性疾患の治療戦略は非常に有望であると思われる。synphilin-1

は単独で凝集体を形成し細胞毒性を持つことから、今後の α -synucleinopathy の治療法開発には、 α -synuclein のみならず synphilin-1 による病態にも注目する必要がある。新たな α -synucleinopathy モデルマウスを確立すべく、synphilin-1 を中枢神経系内に過剰に発現する Tg マウスの作製を進めている。

E. 結論

Dorfin は老年期神経変性疾患の病態に深く関わっており、Dorfin を高発現することによりユビキチン-プロテアソーム系の働きを増強して、PD や AD における毒性蛋白質の蓄積防止、除去を行うことが今後の重要な治療戦略となりうる。

F. 健康危険情報 なし

G. 研究発表

1. Takeuchi H, Niwa J, Hishikawa N, Ishigaki S, Tanaka F, Doyu M, Sobue G. (2004) Dorfin prevents cell death by reducing mitochondrial localizing mutant superoxide dismutase 1 in a neuronal cell model of familial amyotrophic lateral sclerosis. *J Neurochem.* 89:64-72.
2. Katsuno M, Adachi H, Doyu M, Minamiyama M, Sang C, Kobayashi Y, Inukai A, Sobue G. (2003) Leuporelin rescues polyglutamine-dependent phenotypes in a transgenic mouse model of spinal and bulbar muscular atrophy. *Nat Med.* 9:768-73.
3. Hishikawa N, Niwa J, Doyu M, Ito T, Ishigaki S, Hashizume Y, Sobue G. (2003) Dorfin localizes to the ubiquitinated inclusions in Parkinson's disease, dementia with lewy bodies, multiple system atrophy, and amyotrophic lateral sclerosis. *Am J Pathol.* 163: 609-19.
4. Ito T, Niwa J, Hishikawa N, Ishigaki S, Doyu M, Sobue G. (2003) Dorfin localizes to lewy bodies and ubiquitulates synphilin-1. *J Biol Chem.* 278: 29106-14.
5. Ando Y, Liang Y, Ishigaki S, Niwa J, Jiang Y, Kobayashi Y, Yamamoto M, Doyu M, Sobue G. (2003) Caspase-1 and -3 mRNAs are differentially upregulated in motor neurons and glial cells in mutant SOD1 transgenic mouse spinal cord: a study using laser

microdissection and real-time RT-PCR. *Neurochem Res.* **28**: 839-46.

6. Adachi H, Katsuno M, Minamiyama M, Sang C, Pagoulatos G, Angelidis C, Kusakabe M, Yoshiki A, Kobayashi Y, Doyu M, Sobue G. (2003) Heat shock protein 70 chaperone overexpression ameliorates phenotypes of the spinal and bulbar muscular atrophy transgenic mouse model by reducing nuclear-localized mutant androgen receptor protein. *J Neurosci.* **23**:2203-11.

H. 知的財産権の出願・登録状況 なし

Dorfin による老年期神経変性疾患の治療法の開発

分担研究者：田中 啓二 東京都臨床医学総合研究所・副所長

研究要旨

ユビキチン・プロテアソームシステムによる異常（損傷）タンパク質の選択的分解は、タンパク質の品質管理（タンパク質の健康度、すなわち立体構造的な機能状態をモニターする仕組み）において、主要な役割を果たしている。中でも、Dorfin (double ring-finger protein) と Parkin (常染色体劣性遺伝性若年性パーキンソン症 autosomal recessive juvenile parkinsonism, AR-JP の原因遺伝子産物) は、RING-IBR-RING 型のユビキチンリガーゼ（分解マーカであるユビキチンを標的タンパク質に連結する酵素）であり、ニューロンにおけるタンパク質の品質管理に重要な役割を演じていることが示唆されている。本研究では、Dorfin と Parkin について新しい活性制御メカニズムを発見した。Dorfin と Parkin は、タンパク質、引いてはニューロンのような非分裂細胞、の恒常性を監視維持するために中心的な役割を担っている酵素である。これらの酵素の活性を制御する新規機構の発見は、老年期に多発する神経変性疾患の発症機構解明に大きく寄与することが期待される。

A. 研究目的

細胞内のタンパク質は、遺伝子変異や環境汚染などによって不断にストレスを受け、高頻度に損傷している。このようにして発生した異常タンパク質が蓄積すると、大きな凝集体（封入体）を形成する。この状態が長期間持続すると、細胞はアポトーシスをおこし死滅する。この事態は、非分裂細胞であるニューロンにおいては、致命的であり、この状況を防御するために、これらの細胞は、タンパク質の品質管理機構がより厳格に統御されている。中でも Dorfin や Parkin などのユビキチンリガーゼは、異常タンパク質の排除機構において中枢的な役割を果たしている。実際、Dorfin は家族性 ALS (amyotrophic lateral sclerosis 筋萎縮性側索硬化症) の責任遺伝子である疾患型変異 SOD1 (copper/zinc superoxide dismutase) を特異的にユビキチン化することが知られている。一方、Parkin は家族性パーキンソン病 AR-JP の責任遺伝子産物であり、Parkin のユビキチンリガーゼとしての機能喪失は、ドーパミンニューロン死、引いてはドーパミンニ

ューロンの変性を引き起こし、最終的にパーキンソン病を発症することになる。Dorfin と Parkin はニューロンに高発現している構造的に類似したユビキチンリガーゼであり、これらの活性制御機構を解明することは、細胞内のタンパク質の品質管理機構を理解する要となる。本研究を通して老年期に多発する神経変性疾患の発症機構解明とその進行を防御し治療できる薬剤の開発を目指す。

B. 研究方法

〔研究 1〕 Dorfin の研究：Dorfin に結合する分子群を探索するために HEK293 細胞に Myc-tagged Dorfin をトランスフェクションして会合してくる細胞内タンパク質を MS/MS プロテオミクス：time-of-flight hybrid mass spectrometer (Q-ToF Ultima, Micromass, Manchester, UK) で解析した。Dorfin のリガーゼ活性は、ALS 疾患変異型 SOD1（対照として野生型 SOD1）を用い、細胞にトランスフェクション（基質と酵素の両者を共発現）する方法で

測定した。大腸菌及び昆虫細胞よりタンパク質を精製し、結合実験を行った。変異SOD1とDorfinを細胞に transfection して同時に発現させた VCP とその変異体の Dorfin のユビキチンリガーゼ活性に対する影響を調べた。ERAD に対する Dorfin の影響は 35[S]を用いた pulse chase 実験を行い、ERAD の基質であることが知られている T 細胞リセプター α サブユニットの分解を指標に検定した。免疫沈降実験、Western blotting 分析、免疫細胞及び組織染色は、定法に従って行った。

〔研究2〕Parkin の研究：ウシ脳抽出液を抗ヒト Parkin 抗体で免疫沈降し、Parkin に結合する分子群を Dorfin の場合と同様に high through-put の MS/MS プロテオミクス法で解析した。同定したタンパク質については、それらの cDNA をクローニングしてから動物細胞の発現ベクターに組み込み、細胞に transfection して個別に相互作用を検討すると共に共発現させた Parkin のユビキチンリガーゼ活性に対する影響を調べた。

また定法に従って遺伝子改変（ノックアウト）マウス（染色体の Parkin 遺伝子を GFP に置換したノックインマウス）を作製した。即ち、12個のエクソンからなる Parkin 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'側シーョトアーム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。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およびサザンブローディングによりノックアウトES細胞を探索した。得られたクローンについては、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。最終的に、得られたヘテロウマスがジャームラインに入ったか否かをPCRおよびサザンブローディングで検証した後、得られたヘテロマウスを交配して、Parkin 遺伝子をホモで欠失したParkin欠損マウスを作製した。

（倫理面への配慮）

本年度の研究は、主として培養細胞およびマウスを用いたインビトロの実験系で行ったので、倫理面への配慮は不要であった。

C. 研究結果

〔研究1〕Dorfin の研究。

（その1：Dorfin と VCP の物理的相互作用の解析）High through-put の MS/MS プロテオミクス法により Dorfin と選択的に結合する分子として知られている多機能性の分子シャペロン型 ATPase complex である VCP（別名：Cdc48 or p97）を同定した。マウス脳抽出液のグリセリン密度勾配遠心法による解析から、Dorfin は 400-600 kDa の重い（大きな分子量の）分画に沈降した。一方、対照として使用した Parkin は、比較的軽い低分子量の分画に沈降した。Dorfin が沈降してくる画分には、VCP も沈降してくることから Dorfin と VCP は、マウス脳においても生理学的な状態でも会合している可能性が示唆された。この物理的な相互作用は、Dorfin と VCP を共トランスフェクションしてからの Immunoprecipitation/Western blotting 法でも直接的に確認された。さらにドメイン解析から Dorfin の C-端側領域と結合することが判明した（Dorfin の N-

端側領域には触媒部位である RING-IBR-RING 配列がある)。Dorfin の C-端側領域には、基質結合部位があるが、この領域との異同については、現在、不明である。不活性型 Dorfin (触媒部位である N-末端側の RING 配列に変異を導入した変異体) は複合体を形成せず、VCP とも結合できなかった。RING 配列の変異によって立体構造に変化が生じ、VCP との結合が出来なくなったものと考えられた。

(その 2 : VCP の機能的な役割) ALS 疾患変異型 SOD1 を基質とした Dorfin のユビキチンリガーゼ活性の測定から、VCP が Dorfin の機能 (リガーゼ活性) を促進することを見出した。また機能的に不活性型として知られている VCP^{K524A} (VCP の ATPase 活性を喪失した変異体) を強制発現させると、ドミナントネガティブ的に Dorfin の活性をほぼ完全に抑制することが判明した。この結果、VCP は Dorfin のユビキチンリガーゼ活性を正に活性化する因子であることが判明した。

(その 3) VCP は ERAD (小胞体関連分解 : 小胞体内のミスフォールドタンパク質や余剰サブユニットを細胞質へ逆行輸送しユビキチン・プロテアソーム系により分解する品質管理機構) に関与することが知られているので、既知の ERAD 基質 (余剰に生合成される T 細胞リセプター TCR α サブユニット) の分解を指標に検定した。その結果、野性型 Dorfin を強制発現させると、ERAD 経路による TCR α サブユニットの分解が有意に抑制された。この効果は、不活性型 Dorfin では、無効であった。この抑制は、対照として使用した糖鎖識別ユビキチンリガーゼ SCF^{Fbs2} の (複合体形成に必須な F-box 領域を欠損させた) ドミナントネガティブ変異体 (基質結合ドメインは保持) を発現させた場合の阻害と同程度であった。この観察は、予想外の結果であり、現在、この阻害機構とその生物学的意義につい

て検討中である。

(その 4 : 免疫染色) これまでの研究から、Dorfin は ALS やパーキンソン病の患者の病変部位に観察されている封入体に存在することが、知られているが、これらの封入体もしくは (プロテアソーム阻害剤の処理することによって) HEK293 細胞に形成させた Aggresomes を Dorfin 抗体と VCP 抗体で共染色すると、両者が co-localization することが判明した。このことは、生体内で両分子が相互作用している可能性を示唆していると共に、Dorfin と VCP が多くの神経変性疾患で観察されている封入体形成に関与している可能性を示唆している成果として注目される。

〔研究 2〕 Parkin の研究。

(その 1 : 活性制御機構の解析) ウシ脳抽出液を抗ヒト Parkin 抗体で免疫沈降し、Parkin に結合する分子群をプロテオミクスで解析した。分離したタンパク質の中に脳で高く発現しているタンパク質「14-3-3」を見出した。14-3-3 は分子シャペロン様の機能を有し、多くのリン酸化タンパク質と結合できるタンパク質であった。実際、14-3-3 と Parkin を細胞内で導入して共発現タンパク質間での相互作用について免疫学的方法で検討した結果、両者が物理的に会合していることが明らかになった。そして、Parkin の相互作用解析から、14-3-3 が Parkin のリンカー領域 (N 端側の Ubl ドメインと C 端側の RING ボックスドメインを連結させる領域) に会合することが判明し、リンカー領域にミスセンス変異を持った AR-JP 患者由来の変異 Parkin では、14-3-3 との相互作用が喪失していた。

興味深いことに 14-3-3 は Parkin (PARK2 の責任遺伝子産物) のユビキチンリガーゼ活性 (Synphilin-1 を基質とした活性のみならず Parkin

の自己ユビキチン化活性)を強く阻害した。さらにこの 14-3-3 によるユビキチンリガーゼとしての Parkin の活性抑制は、 α シヌクレイン (PARK1 の責任遺伝子産物)の強制発現によって解除されることが判明した。即ち、 α シヌクレインは、14-3-3 と Parkin の結合より高い親和性で Parkin と結合し、14-3-3 の結合を切り離すことで Parkin を再活性化することが示唆された。そして興味深いことに遺伝性パーキンソン病患者に由来する変異 α シヌクレイン (A30P; A53T) は、この 14-3-3 との結合能及び Parkin の再活性化能が喪失していた (論文投稿中)。

(その 2: ノックアウトマウスの作製) 12 個のエクソンからなる Parkin 遺伝子のエクソン 2 を欠損させたノックアウトを作製した。この遺伝子改変マウスは、エクソン 2 のはじめの 5 塩基に Green Fluorescence Protein (GFP) の cDNA をインフレームで連結したノックインマウスである。当初の予想に反して、作製した Parkin 欠損マウスは、顕著な行動異常は観察されなかった。また中脳および他の脳組織の切片を作製して形態学的に詳細に解析したが、顕著なニューロンの変性・脱落を含む異常も、観察されなかった。そこで、Parkin ノックアウトマウスにおける表現型の変化について酸化ストレス (ROS 生成薬剤) 負荷や 1-methy-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydro-pyridine (MPTP) あるいはその誘導体である 1-methyl-4-phenylpyridium (MPP⁺)等の neurotoxins や lipophilic pesticide (rotenone)など environmental toxins の影響を中心に解析中である。

D. 考察

細胞内のタンパク質は生合成 (転写翻訳)・フォールディング (立体構造形成)の誤謬や環境ストレスの負荷などによって不断に傷害を受けて

いる。これらの異常タンパク質が長期間にわたって細胞内に蓄積すると、凝集し封入体などを形成して細胞毒性を示すようになり、最終的に組織変性を引き起こす。これらの異常タンパク質は、通常、分子シャペロンの作用でリフォールディングされ機能タンパク質に変換されるが、再生不能に陥った場合には、ユビキチン・プロテアソーム系を中心としたタンパク質分解装置によって破壊される。このように、細胞内に出現した異常タンパク質を処理し細胞の恒常性を監視・維持するシステムは、品質管理機構といわれている。ニューロンのような非分裂細胞では、この品質管理機構が細胞の恒常性維持に必須であり、最近この品質管理システムの破綻が神経細胞のアポトーシスを誘導する原因となり、この状態が長期的に持続すると神経変性に至ることが明らかとなってきた。

本研究から、Dorfin や Parkin などのユビキチンリガーゼがこの封入体の形成に関与している可能性が示唆されたことは、封入体形成の分子機構解明の手掛かりを得たことになると思われる。今後も、Dorfin や Parkin から神経変性疾患の発症機構解明を進めていく。

E. 結論

タンパク質の正常と異常を区別して構造的に破綻した異常タンパク質を処理する「細胞内の品質管理」機構に関する基礎的研究を行った。本研究において、(1) ALS の発症に寄与すると考えられている Dorfin については、Dorfin の活性発現に必須な役割を担っている VCP の同定に成功した。(2) また、パーキンソン病発症の主要な因子と考えられている Parkin と物理的に会合する因子の同定から、Parkin のユビキチンリガーゼ活性を正負に調節する分子 (14-3-3 及び α シヌクレイン)の同定に成功した。また

Parkin の発現工学的手法を駆使して Parkin 遺伝子のノックアウトマウスを作製した。今後、これらの研究を基盤に細胞内の品質管理を監視・維持する機構の研究から神経変性疾患の共通の発症機構の解明に迫ることを目指す。

F. 健康危険情報

無し。

G. 研究発表

1. 論文発表

- Sakata, E., Yamaguchi, Y., Kurimoto, E., Kikuchi, J., Yokoyama, S., Yamada, S., Kawahara, H., Yokosawa, H., Hattori, N., Mizuno, Y., Tanaka, K., and Kato, K. Parkin binds the Rpn10 subunit of 26S proteasomes with the ubiquitin-like domain. *EMBO Rep.* 2003; 4: 301-306
- Tanahashi-Hori, T., Tanahashi, N., Tanaka, K., and Chiba, T. Conditional knockdown of proteasomes results in cell-cycle arrest and enhanced expression of molecular chaperones Hsp70 and Hsp40 in chicken DT40 cells. *J. Biol. Chem.* 2003; 278: 16237-16243
- Yoshida, Y., Tokunaga, F., Chiba, T., Iwai, K., Tanaka, K., and Tai, T. Fbs2 is a new member of the E3 ubiquitin ligase family that recognizes sugar chains. *J. Biol. Chem.* 2003; 278: 43877-43884
- Hirano, Y., Murata, S., Tanaka, K., Shimizu, M., and Sato, R. SREBPs are negatively regulated through SUMO-1 modification independent of the ubiquitin/26S proteasome pathway. *J. Biol. Chem.* 2003; 278: 16809-16819
- Matsuzaki, H., Daitoku, H., Hatta, M., Tanaka, K., and Fukamizu, A. Insulin-induced phosphorylation of FKHR (Foxo1) targets to proteasomal degradation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2003; 100: 11285-11290
- Kim, S.J., Sung, J.Y., Um, J.W., Hattori, N., Mizuno, Y., Tanaka, K., Paik, S.R., Kim, J., and Chung, K.C. Parkin cleaves intracellular α -synuclein's inclusions via the activation of calpain. *J. Biol. Chem.* 2003; 278: 41890-41899.
- Kim, M., Tezuka, T., Tanaka, K., and Yamamoto, T. Cbl-c suppresses v-Src-induced transformation through ubiquitin-dependent protein degradation. *Oncogene* 2003; 23: 1645-55
- Araki, K., Kawamura, M., Suzuki, T., Matsuda, N., Kanbe, D., Ishii, K., Ichikawa, T., Kumanishi, T., Chiba, T., Tanaka, K., and Nawa, H. A palmitoylated RING finger ubiquitin ligase and its homologue, both enriched in the brain membranes. *J. Neurochem.* 2003; 86: 749-762
- Imai, J., Maruya, M., Yashiroda, H., Yahara, I., and

Tanaka, K. The molecular chaperone Hsp90 interacts with 26S proteasomes and regulates their assembly. *EMBO J.* 2003; 22: 3557-3567

Ogura, T. and Tanaka, K. Dissecting various ATP-dependent steps in proteasomal degradation. *Mol Cell* 2003; 11: 3-5

Imai, J., Yashiroda, H., Maruya, M., Yahara, I., and Tanaka, K. Proteasomes and molecular chaperones: cellular machinery responsible for folding and destruction of unfolded proteins. *Cell Cycle* 2003; 2: 585-590

Mizushima, T., Hirao, T., Yoshida, Y., Lee, S. J., Chiba, T., Iwai, K., Yamaguchi, Y., Kato, K., Tsukihara, T., and Tanaka, K. Structural basis of sugar-recognizing ubiquitin ligase. *Nature Struct. & Mol. Biol.* 2004; 11: 365-370

Komatsu, M., Chiba, T., Tatsumi, K., Iemura, S., Tanida, I., Okazaki, N., Ueno, T., Kominami, E., Natsume, T., and Tanaka, K. A novel protein-conjugating system for Ufm1, a ubiquitin-fold modifier. *EMBO J.* (in press)

2. 学会発表

Keiji Tanaka: The ubiquitin-proteasome pathway and the protein quality control of the cell. 日米科学技術協力事業「組み換え DNA」2003.2.18-22 NIH (USA)

Keiji Tanaka: Ubiquitin E3 ligases responsible for the protein quality control in cells. 2003. 4.25-5.1, Clermont-Ferrand (France)

H. 知的財産権の取得状況

1. 特許取得

無し

2. 実用新案登録

無し

3. その他

無し

研究成果の刊行物に関する一覧表

研究成果の刊行に関する一覧表

祖父江 元 (名古屋大学大学院医学系研究科)
道勇 学 (名古屋大学大学院医学系研究科)

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
Katsuno M, Adachi H, Tanaka F, Sobue G	Spinal and bulbar muscular atrophy (SBMA): Ligand-dependent pathogenesis and therapeutic perspective.	J Mol Med	in press		2004
Koike H, Misu K, Sugiura S, Iijima M, Mori K, Yamamoto M, Hattori N, Mukai E, Ando Y, Ikeda S, Sobue G	Pathologic differences between early-and late-onset type I (TTR Met30) familial amyloid polyneuropathy.	Neurology	in press		2004
Takeuchi H, Niwa J, Hishikawa N, Ishigaki S, Tanaka F, Doyu M, Sobue G	Dorfin prevents cell death by reducing mitochondrial localizing mutant superoxide dismutase 1 in a neuronal cell model of familial amyotrophic lateral sclerosis.	J Neurochem	in press		2004
Katsuno M, Sobue G	Polyglutamine diminishes VEGF: Passage to motor neuron death?	Neuron	41	677-679	2004
Katsuno M, Adachi H, Sobue G	Sweet relief for Huntington's disease.	Nature Med	10	123-124	2004
Watanabe H, Fukatsu H, Katsuno M, Sugiura M, Hamada K, Okada Y, Hirayama M, Ishigaki T, Sobue G	Multiple regional 1H-MR spectroscopy in multiple system atrophy: NAA/Cr reduction in pontine base as a valuable diagnostic marker.	J Neurol Neurosurg Psychiatry	75	103-109	2003
Nodera H, Bostock H, Kuwabara S, Sakamoto T, Asamura K, Jia-Ying S, Ogawara K, Hattori N, Hirayama M, Sobue G, Kaji R	Nerve excitability properties in Charcot-Marie-Tooth disease type 1A.	Brain	127	203-211	2003
Katsuno M, Adachi H, Doyu M, Minamiyama M, Sang C, Kobayashi Y, Inukai A, Sobue G	Leuporelin rescue polyglutamine-dependent phenotypes in a transgenic mouse model of spinal and bulbar muscular atrophy.	Nature Med	9	768-773	2003

Ito T, Niwa J, Hishikawa N, Ishigaki S, Doyu M, Sobue G	Dorfin localizes to Lewy bodies and ubiquitylates synphilin-1.	J Biol Chem	278	29106-29114	2003
Ishihara K, Yamagishi N, Saito Y, Adachi H, Kobayashi Y, Sobue G, Otsuka K, Hatayama T	Hsp 105 a suppresses the aggregation of truncated androgen receptor with expanded CAG repeats and cell toxicity.	J Biol Chem	278	25143-25150	2003
Hishikawa N, Niwa J, Doyu M, Ito T, Ishigaki S, Hashizume Y, Sobue G	Dorfin localizes to the ubiquitinated inclusions in Parkinson's disease, dementia with Lewy bodies, multiple system atrophy, and amyotrophic lateral sclerosis.	Am J Pathol	163	609-619	2003
Hattori N, Yamamoto M, Yoshihara T, Koike H, Nakagawa N, Yoshikawa H, Ohnishi A, Hayasaka K, Onodera O, Baba M, Yasuda H, Saito T, Nakashima K, Kira J, Kaji R, Oka N, Sobue G and the Study Group for Hereditary Neuropathy in Japan	Demyelinating and axonal features of Charcot-Marie-Tooth disease with mutations of myelin-related proteins (PMP22, MPZ and Cx32): a clinicopathological study of 205 Japanese patients.	Brain	126	134-151	2003
Hishikawa N, Hashizume Y, Yoshida M, Sobue G	Clinical and neuropathological correlates of Lewy body disease.	Acta Neuropathol	105	341-350	2003
Hamada K, Hirayama M, Watanabe H, Kobayashi R, Ito H, Ieda T, Koike Y, Sobue G	Onset age and severity impairment are associated with reduction of myocardial ¹²³ I-MIBG uptake in Parkinson's disease.	J Neurol Neurosurg Psychiatry	74	423-426	2003
Adachi H, Katsuno M, Minamiyama M, Sang C, Pagoulatos G, Angelidis C, Kusakabe M, Yoshiki A, Kobayashi Y, Doyu M, Sobue G:	Heat shock protein 70 chaperone overexpression ameliorates phenotypes of the spinal and bulbar muscular atrophy transgenic mouse model by reducing nuclear-localized mutant androgen receptor protein.	J Neurosci	23	2203-2211	2003
Abe Y, Kachi T, Arahata Y, Yamada T, Washimi Y, Iwai K, Ito K, Yanagisawa N, Sobue G	Occipital hypoperfusion in Parkinson's disease without dementia: correlation to impaired cortical visual processing.	J Neurol Neurosurg Psychiatry	74	419-422	2003

Koike H, Iijima M, Sugiura M, Mori K, Hattori N, Ito H, Hirayama M, Sobue G	Alcoholic neuropathy is clinicopathologically distinct from thiamine- deficiency neuropathy.	Ann Neurol	54	19-29	2003
Wada M, Kimura M, Daimon M, Kurita K, Kato T, Johmura Y, Johkura K, Kuroiwa Y, Sobue G	An usual phenotype of McLeod syndrome with late onset axonal neuropathy.	J Neurol Neurosurg Psychiatry	74	1697-1698	2003
Katsuno M, Adachi H, Inukai A, Sobue G	Transgenic mouse models of spinal and bulbar muscular atrophy (SBMA).	Cytogenet Genome Res	100	243-251	2003
Mori K, Iijima M, Sugiura M, Koike H, Hattori N, Ito H, Hirayama M, Sobue G	Sjögren's syndrome associated painful sensory neuropathy without sensory ataxia.	J Neurol Neurosurg Psychiatry	74	1320-1322	2003