

D. 考察

現在, 非免疫抑制性 IPLs の中で論文報告が多いものは, 2 種類の FK506 アナログの GPI1046 と V10367 である. GPI1046 は当初その効果について疑問視する報告もされたが, 培養細胞ならびに *in vivo* の病態モデルを用いた検討で, 中程度の神経保護作用を有することを確認した. GPI1046 が示す神経保護作用の分子機序については, 我々の検討により, 細胞内 GSH 濃度の増加作用を主に介した抗酸化作用と神経栄養因子である BDNF および GDNF の活性化作用を基にした神経再生作用などが寄与していることを明らかにした. また, GPI1046 についても, FK506 同様に神経保護作用および GSH 増加作用に関しては FKBP12 は必要なかった. さらに, FK506 ならびに GPI1046 の作用, 特に GSH 増加作用については, 神経細胞よりもアストロサイトなどのグリア細胞でより強く認められたことから IPLs の脳における作用は神経細胞よりもグリア細胞でより強く認められることを示した. 一方で, V10367 についても, 培養細胞ならびに *in vivo* の病態モデルを用いた検討から, 神経保護作用を有することを明らかにした. その作用機序についても上述した GSH 増加作用ならびに神経栄養因子活性化作用に加えて, GDNF との併用により GDNF の神経再生作用を増強することが報告されている. V10367 については, 実験レベルでは有効であるという報告が大半であるが, 用量が約 100 mg/kg であるうえに疎水性が強いため取り扱いが難しい. 我々は V10367 についても, 神経保護作用, GSH 増加作用共にその作用発現が FKBP12 に依存しないことを培養細胞レベルで見出した. 同様の結果は V10367 アナログで FKBP12 への親和性が低い V13661 を用いた検討でも確認されている.

免疫抑制薬に神経保護作用があるという報告から既に 10 年以上が経っているが, 依然として盛んに研究が行われており, 特に FK506 などは脳血管性痴呆の治療薬として, 臨床応

用が試みられている. このような現状から考えても, 免疫抑制作用を持たない非免疫抑制性 IPLs の神経保護薬としての応用は決して間違った方向ではないと思われる. すなわち, 現在報告されている非免疫抑制性 IPLs の神経保護作用が充分と言えないのであって, より強力な新しい非免疫抑制性 IPLs の開発が目指せばよいのである. このことは今回我々が行った α -シヌクレイン過剰発現細胞株を用いた検討結果からも明らかと言える. そこで, 十分な神経保護作用の力価を有する非免疫抑制性 IPLs を開発するために, 候補物質の探索を目的として, 非免疫抑制性 IPLs の主要な作用機序と考えられる GSH および BDNF, GDNF に対する活性化作用を指標に探索を行った. 本検討により, 少なくとも GSH 増加作用と神経栄養因子活性化作用について, 化学構造に相関関係がある可能性を明らかにしつつある. 今後の更なる検討により, 低分子で免疫抑制作用を持たない一方で既存の非免疫抑制性 IPLs よりも強い神経保護作用を示す新しい非免疫抑制性 IPLs の開発に結びつくような知見を得ることを目指している.

E. 結論

本研究により, IPLs の神経保護作用の分子機序には免疫抑制作用ならびに FKBP12 は必要ないことを明らかにするとともに, GSH 増加作用と神経栄養因子の活性化作用が寄与していることを示唆した. これに加えて, 抗アポトーシス作用も神経保護作用の分子機序として考えられた. また, 既存の非免疫抑制性 IPLs を用いた検討結果から見出した分子機序を指標に神経保護作用の力価がより強い候補物質の探索を行い数種類の候補物質を得た. これらの候補物質が α -シヌクレイン毒性のような進行性病変に関連する病態についても効果を示すことを検証することは今後の課題といえる. そして, 我々の研究がいつの日か, PD の進行性病変など依然として根治的な治療薬を持たない多くの神経変性疾患並び

に痴呆性疾患で苦しむ患者の福音となれば望外の喜びである。

F. 研究発表

1. 論文発表

- ① Tanaka, K., Fujita, N. and Ogawa, N.: Immunosuppressive (FK506) and non-immunosuppressive (GPI1046) immunophilin ligands activate neurotrophic factors in the mouse brain. *Brain Res.*, 970: 250-253, 2003.
- ② Haque, Md E., Asanuma, M., Higashi, Y., Miyazaki, I., Tanaka, K. and Ogawa, N.: Apoptosis-inducing neurotoxicity of dopamine and its metabolites via reactive quinone generation in neuroblastoma cells. *Biochim. Biophys. Acta*, 1619: 39-52, 2003.
- ③ Haque, Md E., Asanuma, M., Higashi, Y., Miyazaki, I., Tanaka, K. and Ogawa, N.: Overexpression of Cu-Zn superoxide dismutase protects neuroblastoma cells against dopamine cytotoxicity accompanied by increase in glutathione level. *Neurosci. Res.*, 47: 31-37, 2003.
- ④ Tanaka, K. and Ogawa, N.: Possibility of non-immunophilin ligands as potential therapeutic agents for Parkinson's disease. *Curr. Pharm. Design*, 10: 669-677, 2004.
- ⑤ 田中健一, 小川紀雄: 免疫抑制薬から神経保護薬へタクロリムスの新展開 - 分子精神医学, 4: 96-97, 2004.
- ⑥ 小川紀雄, 浅沼幹人, 田中健一: Parkinson病薬物治療の将来 - 進行抑制薬実現の可能性 - 医学のあゆみ, 208: 583-588, 2004.

- ⑦ Tanaka, K., Asanuma, M. and Ogawa, N.: Molecular basis of anti-apoptotic effect of immunophilin ligands on hydrogen peroxide-induced apoptosis in human glioma cells. *Neurochem. Res.*, in press.
- ⑧ Tanaka, K. and Ogawa, N.: Molecular Basis for Neuroprotective Properties of FKBP-binding Immunophilin Ligands. *Curr. Med. Chem.*, in press.
- ⑨ 田中健一, 小川紀雄: イムノフィリンリガンド - 免疫抑制薬から神経保護薬へ - 日本神経精神薬理学会誌, 印刷中.

2. 学会発表

- ① Tanaka, K., Asanuma, M. and Ogawa, N.: Molecular Basis for Neuroprotective Properties of FKBP-binding immuno-philin ligands. 19th International Society for Neurochemistry, 2003.
- ② 田中健一, 小川紀雄: 免疫抑制薬から神経保護薬へ - イムノフィリンリガンドの新展開 - 第14回高次脳機能障害シンポジウム, 2003.
- ③ 田中健一: 免疫抑制薬から神経保護薬へ - タクロリムスの新展開 第5回感情・行動・認知研究会, 2003.
- ④ 田中健一, 小川紀雄: イムノフィリンリガンドで認められた神経保護作用と同様の作用機序を有するジペプチド化合物の探索 第33回日本神経精神薬理学会年会, 2003.

厚生労働科学研究費補助金（長寿科学総合研究事業）
分担研究報告書

酸化ストレス障害時のユビキチン系の解析に関する研究

分担研究者 岩井 一宏

大阪市立大学大学院医学研究科分子制御分野 教授

研究要旨

酸化ストレスにより蛋白質を含め、種々の生体機能分子が障害を受ける。酸化は蛋白質にダメージ与えて失活させるのみではなく、蛋白質の変性・凝集を引き起こすことから、神経変性疾患の病因と深く関与することが知られている。それゆえ、酸化された蛋白質を選択的に識別し、除去するユビキチン系の同定はそれら疾患の治療を考える上で非常に重要である。我々が新規に同定した HOIL-1 ユビキチンリガーゼはヘムと酸素により酸化された鉄代謝の制御因子：IRP2 を選択的に識別する。そこで、本年度は HOIL-1 リガーゼの酸化変化を受けた蛋白質の分解における役割を解析すべく、HOIL-1 結合蛋白質の解析を行うとともに、HOIL-1 ノックアウト細胞を作成した。

A. 研究目的

パーキンソン病を初めとする多くの神経変性疾患においては、種々のユビキチンを含んだ封入体が特徴的な病理変化として知られているばかりでなく、若年性家族性パーキンソン病の原因遺伝子として Parkin ユビキチンリガーゼが同定されるなどユビキチン修飾系の関与が強く示唆されている。ユビキチン修飾系は E1/E2/E3 の 3 種の酵素群の働きにより標的蛋白質にユビキチンを付加することにより蛋白質の機能を制御する翻訳後修飾系である。ユビキチン化蛋白質のほとんどはプロテアソームによる分解へと導かれる。しかしながら、標的蛋白質は常に分解に導かれるのではなく、状況に応じて選択的に識別されて分解される。それゆえ、基質識別を担う分子である E3：ユビキチンリガーゼが、ユビキチン修飾系の中で最も重要な分子であると考えられている。生体内には特異性を異にする 1,000 種以上の E3 が存在すると考えられており、前述の Parkin もその E3 の一つである。

一方、パーキンソン病においては病巣への

鉄の沈着・酸化ストレスのドパミンニューロン脱落への関与が知られている。酸化は蛋白質にダメージ与えて失活させるのみではなく、蛋白質の変性・凝集を引き起こすことから、神経変性疾患の病因と深く関与することが知られている。それゆえ、酸化変化を受けた蛋白質を選択的に識別し、除去するユビキチン系の同定はそれら疾患の治療を考える上で非常に重要である。しかしながら、酸化変化を受けた蛋白質を選択的に識別するユビキチンリガーゼはまだ知られていない。我々が新規に同定し、報告した HOIL-1 ユビキチンリガーゼはヘムと酸素により酸化された鉄代謝の制御因子：IRP2 を選択的に識別する。それゆえ、HOIL-1 は酸化変化を受けた蛋白質全般を識別し、蛋白質凝集を抑制する可能性が考えられる。そこで本年度は、HOIL-1 リガーゼの酸化蛋白質の分解における役割を解析すべく、HOIL-1 結合蛋白質の解析を行うとともに、HOIL-1 ノックアウト細胞を作成し、その機能を検索した。

B. 研究方法

1. HOIL-1 モノクローナル抗体の作成:

大腸菌を用いて HOIL-1 の C 末領域 (アミノ酸番号 405~468) と GST との融合蛋白質を作成し、BALB/c マウスに免疫した。最終免疫 3 日後のマウス脾細胞を P3U1 プラズマサイトーマと融合した。ELISA、ウエスタンブロットにてスクリーニングし、抗 HOIL-1 モノクローナル抗体を得た。

2. HOIL-1 複合体の精製:

HeLa S3 細胞をスピナーフラスコにて培養し、S100 ライセートを作成した。S100 ライセートを mono Q カラム、Superdex200 カラムで分画した。HOIL-1 を含むフラクションは 1. にて樹立した抗 HOIL-1 抗体を用いたウエスタンブロットで確認した。mono Q カラム、Superdex200 カラムで分画した HOIL-1 含有画分を、昨年度報告したウサギ抗 HOIL-1 抗体で免疫沈降し、その産物を SDS-PAGE に泳動した。蛋白質のバンドをゲルから切り出し、ペプチドマスフィンガープリント法にて蛋白質を同定した。

3. HOIL-1 ノックアウト細胞の作成:

細胞レベルで HOIL-1 リガーゼの機能を解析することを目指し、高等真核細胞で高頻度に遺伝子組換えを生じることが知られている細胞株であるニワトリ DT40 細胞を用いて、HOIL-1 ノックアウト細胞の作成を行った。DT40 細胞はこれまでも DNA 修復機構など種々の細胞機能の解析に用いられている。DT40 細胞はニワトリ由来であるため、ニワトリ HOIL-1 cDNA の同定を RT-PCR 法にて、ニワトリ HOIL-1 遺伝子断片の単離を LA-PCR 法にて行った。またノックアウト作成用のトランスフェクションは電圧ポレーション法で行った。ノックアウト細胞の確認はサザンブロット、ノーザンブロット、及び抗 HOIL-1 抗体を用いたウエスタンブロットで行った。

C. 研究結果

1. HOIL-1 は新規 RING フィンガー蛋白質と複合体を形成している

現在、E3 は HECT 型、RING finger 型の 2 種に大別されている。多くを占める RING 型には Mdm2 等のように単体で機能するものと複合体を形成して機能するものが存在することが知られている。HOIL-1 は RING finger 型のユビキチンリガーゼであり、一次構造からは単体で機能する可能性が示唆された。しかしながら、確認の目的で HeLa S3 細胞の S100 ライセートをゲル濾過し、HOIL-1 の存在をウエスタンブロットで確認したところ、HOIL-1 は分子量 600kD 程度の分画に存在することが明らかとなった。HOIL-1 の分子量は 52kD であることから、複合体を形成していると考えられた。そこで HOIL-1 と複合体を形成する分子を同定するために、HeLa S3 の S100 ライセートを mono Q カラム、Superdex200 カラムで分画した後、HOIL-1 含有画分をアフィニティー精製したウサギ抗 HOIL-1 抗体を用いて免疫沈降し、沈降物を SDS-PAGE にて電気泳動した。いくつかのバンドが認められたが、主たるバンドを切り出し、ペプチドマスフィンガープリント法を用いて蛋白質の同定を試みたところ、未知の RING finger 蛋白質が同定された。その未知の RING finger 蛋白質と HOIL-1 を強制発現させたところ、HOIL-1 は 600kD の分画に存在することから、HOIL-1 は今回同定した未知の RING finger 蛋白質とヘテロ多量体を形成すると考えられた。

2. HOIL-1 ノックアウト DT40 細胞の樹立

DT40 細胞はニワトリ由来細胞であるため、ニワトリの HOIL-1 cDNA 同定を進めた。ニワトリ EST データベースにヒト HOIL-1 と相同性を有する cDNA 断片が登録されていたので、その DNA 塩基配列をもとに、RT-PCR、5'-RACE にて完全長のニワトリ HOIL-1 をクローニングした。ニワトリ HOIL-1 は 695 アミノ酸で、ヒトのそれより約 200 アミノ酸長かったが、ヒト HOIL-1 に特徴的な RING

Finger 等のドメインはよく保存されており、N 末領域が約 200 アミノ酸長い構造であった。樹立した抗ヒト HOIL-1 抗体を用いたウェスタンブロットを行ったところ DT40 細胞ライセート中に約 75kD のバンドが検出されたこと、ニワトリ HOIL-1 cDNA をトランスフェクトした細胞にも同じサイズのバンドが検出されたことから、今回同定した cDNA はニワトリ HOIL-1 であると考えられた。

次に同定された HOIL-1 cDNA 塩基配列をもとに HOIL-1 遺伝子断片を LA-PCR で単離し、定法に従いノックアウトコンストラクトを作成した。DT40 細胞を用いてノックアウト細胞を作成する場合には、全ての HOIL-1 遺伝子座をノックアウトコンストラクトで置換する必要がある。DT40 細胞はウイルスでトランスフォームした株化細胞なので、遺伝子によっては遺伝子座が 2 つでない場合がある。DT40 細胞は 3 つの HOIL-1 遺伝子座を有していたので、異なる薬剤耐性遺伝子を挿入した 3 種類のノックアウトコンストラクトを順々にトランスフェクトし、スクリーニングすることにより、HOIL-1 ノックアウト細胞を作成した。ノーザンブロット・抗 HOIL-1 抗体を用いたウェスタンブロットで確認したところ、HOIL-1 ノックアウト細胞は HOIL-1 を発現しておらず、HOIL-1 がノックアウトされたことが確認された。現在、HOIL-1 ノックアウト細胞を用いて、HOIL-1 リガーゼの機能を検索中である。

D. 考察

多くの蛋白質が酸化され、ダメージを受けることにより活性を消失し、分解されることが知られている。その分解はユビキチンプロテアソーム系よると指摘されているが、その E3 は未同定である。酸化ストレス・ユビキチン修飾系は神経変性疾患の病因・病態形成に深く関与していることから、酸化変化を受けた蛋白質を選択的に識別し、ユビキチン化するユビキチンリガーゼの同定は急務であ

る。我々が昨年度の本報告書で報告した HOIL-1 ユビキチンリガーゼはヘム依存的に酸化された IRP2 を選択的に識別するユビキチンリガーゼであることから、我々は HOIL-1 の酸化変化を受けた蛋白質の分解における役割の解析を進めている。近年、RNAi 法を用いた遺伝子発現のノックダウンにより、遺伝子産物の機能解析を進めている例が数多く見られる。しかしながら、RNAi 法には完全に標的蛋白質が消失しない、また、未知の遺伝子の発現にも影響を与える可能性がある等の問題点もあるので、本研究では HOIL-1 の機能解析が全く存在しないノックアウト法で HOIL-1 に機能解析を進めることを選択した。そのため、当初の予定より、研究の進行が若干遅れ気味ではあるが、HOIL-1 ノックアウト細胞を樹立できた。予備的な段階ではあるが、HOIL-1 は蛋白質の凝集を抑制する可能性を示唆する結果を得ている。蛋白質凝集は神経変性疾患に特徴的な病理変化である。それゆえ、HOIL-1 の神経変性疾患への関与が強く示唆され、その検索が望まれることから、現在作成中の HOIL-1 ノックアウトマウスを用いてその解析を進めたいと考えている。

E. 結論

昨年度我々が同定し、報告した HOIL-1 ユビキチンリガーゼは酸化蛋白質を選択的に識別するリガーゼとして初めて同定されたものである。本年度は HOIL-1 の機能解析のために、HOIL-1 ノックアウト細胞を作成した。予備的な実験ではあるが、HOIL-1 は蛋白質凝集を抑制する可能性が示唆された。蛋白質凝集はパーキンソン病などの神経変性疾患に特徴的なものであるため、今後は HOIL-1 のそれら疾患における役割の解析を進めたい。

F. 研究発表

1. 論文発表

- ① Yamanaka, K., Ishikawa, H., Megumi, Y., Tokunaga, F., Kanie, M., Rouault,

- T.A., Morishima, I., Minato, N., Ishimori, K. and Iwai, K.: Identification of the ubiquitin-protein ligase that recognizes oxidized IRP2. *Nature Cell Biol.*, 5: 336-340, 2003.
- ② Ishida, D., Kometani, K., Yang, H., Kakugawa, K., Masuda, K., Iwai, K., Suzuki, M., Itoharu, S., Nakahata, T., Hiai, H., Kawamoto, H., Hattori, M. and Minato, N.: Myeloproliferative stem cell disorders by deregulated Rap1 activation in SPA-1-deficient mice. *Cancer Cell.*, 4: 55-65,
- ③ Iwai, K.: An ubiquitin ligase recognizing a protein oxidized by iron: implications for the turnover of oxidatively damaged proteins. *J. Biochem. (Tokyo)*, 134: 175-82, 2003.
- ④ Yoshida, Y., Tokunaga, F., Chiba, T, Iwai, K., Tanaka K, Tai T.: Fbs2 is a new member of the E3 ubiquitin ligase family that recognizes sugar chains. *J. Biol. Chem.*, 278: 43877-43884, 2003.
- ⑤ Meyron-Holtz, E.G., Ghosh, M.C., Iwai, K., LaVaute, T., Brazzolotto, X., Berger, U.V., Land, W., Ollivierre-Wilson, H., Grinberg, A., Love, P., Rouault, T.A.: Genetic ablations of iron regulatory proteins 1 and 2 reveal why iron regulatory protein 2 dominates iron homeostasis. *EMBO J.*, 23: 386-395, 2004.
- ⑥ 徳永文穂, 吉田雪子, 岩井一宏: 小胞体関連分解と品質管理型ユビキチンリガーゼ. *実験医学*, 21: 365-371, 2003.
- ⑦ 岩井一宏: 酸化変化を識別するユビキチンリガーゼ ヘムにより酸化される IRP2 を識別するユビキチンリガーゼ: HOIL-1 の同定. *実験医学*, 21: 1222-1225, 2003.
- ⑧ 桐浴隆嘉, 岩井一宏: 鉄代謝とユビキチンシステム. *細胞工学*, 22: 866-871, 2003.
- ⑨ 岩井一宏: タンパク質分解による細胞機能制御 —ユビキチン-プロテアソーム系とその機能—. *BIOClinica*, 18: 1031-1035, 2003.
- ⑩ 石川春人, 岩井一宏: 3. 酸化修飾をシグナルとしたユビキチン化. *実験医学・増刊, タンパク質修飾・分解の新機能に迫る*, 22: 143-148, 2004.
2. 学会発表
- ① Yamanaka, K., Ishikawa, H., Megumi, Y., Tokunaga, F., Kanie, M., and Iwai, K.: Identification of the ubiquitin-protein ligase that recognized oxidized IRP2. Cold Spring Harbor Laboratory Symposium "Ubiquitin family", Cold Spring Harbor, New York, 2003.
- ② Iwai, K., Yamanaka, K., Ishikawa, H., Rouault, T.A. and Ishimori, K.: Identification of the ubiquitin-protein ligase that recognizes heme-oxidized IRP2. World Congress on Iron Metabolism, Bethesda, 2003.
- ③ Iwai, K.: Functional analysis of HOIL-1 ubiquitin ligase that recognizes oxidized proteins. 第76回日本生化学会大会シンポジウム, 横浜, 2003.
- ④ Iwai, K.: Identification of HOIL-1 ubiquitin ligase that recognizes heme-oxidized IRP2. International Workshop "Proteolysis in Cellular Regulation" (招待講演), 東京, 2003.
- ⑤ Iwai, K.: Identification of HOIL-1 ubiquitin ligase that recognizes heme-oxidized IRP2. The 3rd General Meeting of the International Proteolytic Society (招待講演), 名古屋, 2003.
- ⑥ Iwai, K., Tokunaga, F., Kirisako T.: Characterization of the HOIL-1 ubiquitin ligase that recognizes heme-oxidized IRP2. 第26回日本分子生物学会年会シンポジウム, 神戸, 2003.

研究成果の刊行に関する一覧表

平成15年度 研究成果の刊行に関する一覧表

雑誌-1

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Haque, M.E., et al.	Apoptosis-inducing neurotoxicity of dopamine and its metabolites via reactive quinone generation in neuroblastoma cells.	Biochim. Biophys. Acta	1619	39-52	2003
Haque, M.E., et al.	Overexpression of Cu-Zn superoxide dismutase protects neuroblastoma cells against dopamine cytotoxicity accompanied by increase in their glutathione level.	Neurosci. Res.	47	31-37	2003
Asanuma, M., et al.	Methamphetamine-induced neurotoxicity in mouse brain is attenuated by ketoprofen, a non-steroidal anti-inflammatory drug.	Neurosci. Lett.	352	13-16	2003
Diaz-Corrales, F.J., et al.	Rotenone induces disassembly of the Golgi apparatus in the rat dopaminergic neuroblastoma B65 cell line.	Neurosci. Lett.	354	59-63	2004
Asanuma, M., Miyazaki, I. and Ogawa, N.	Dopamine- or L-DOPA-induced neurotoxicity: the role of dopamine quinone formation and tyrosinase in a model of Parkinson's disease.	Neurotox. Res.	5	165-176	2003
Asanuma, M., Miyazaki, I. and Ogawa, N.	Neuroprotective effects of nonsteroidal anti-inflammatory drugs on neurodegenerative diseases.	Curr. Pharm. Design	10	695-700	2004
浅沼幹人, 他	非ステロイド性消炎鎮痛薬の神経保護作用の新展開.	日本神経精神薬理学会雑誌	23	111-119	2003
浅沼幹人, 宮崎育子, 小川紀雄	実験的パーキンソニズムに使われる薬剤～MPTP, 6-ヒドロキシドパミンならびにロテノン.	医薬ジャーナル	40	111-116	2004
小川紀雄, 浅沼幹人, 田中健一	Parkinson病薬物治療の将来—進行抑制薬実現の可能性.	医学のあゆみ	208	583-588	2004
小川紀雄, 宮崎育子	ドパミン受容体とトランスポーター.	脳の科学	292 (2004年増刊号)	53-59	2004

雑誌-2

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Tanaka, K., et al.	Immunosuppressive (FK506) and non-immunosuppressive (GPI1046) immunophilin ligands activate neurotrophic factors in the mouse brain.	Brain Res.	970	250-253	2003
田中健一, 他	免疫抑制薬から神経保護薬へータクロリムスの新展開ー.	分子精神医学	4	96-97	2004
Tanaka, K. and Ogawa, N.	Possibility of non-immunophilin ligands as potential therapeutic agents for Parkinson's disease.	Curr. Pharm. Design	10	669-677	2004

雑誌-3

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Yamanaka, K., et al.	Identification of the ubiquitin-protein ligase that recognizes oxidized IRP2.	Nature Cell Biol.	5	336-340	2003
Ishida, D., et al.	Myeloproliferative stem cell disorders by deregulated Rap1 activation in SPA-1-deficient mice.	Cancer Cell	4	55-65	2003
Iwai, K.	An ubiquitin ligase recognizing a protein oxidized by iron: implications for the turnover of oxidatively damaged proteins.	J. Biochem.	134	175-82	2003
Yoshida, Y., et al.	Fbs2 is a new member of the E3 ubiquitin ligase family that recognizes sugar chains.	J. Biol. Chem.	278	43877-43884	2003
Meyron-Holtz, E.G., et al.	Genetic ablations of iron regulatory proteins 1 and 2 reveal why iron regulatory protein 2 dominates iron homeostasis.	EMBO J.	23	386-395	2004
徳永文稔 他	小胞体関連分解と品質管理型ユビキチンリガーゼ	実験医学	21	365-371	2003
岩井一宏	酸化変化を選択的に識別するユビキチンリガーゼへムにより酸化される IRP2 を識別するユビキチンリガーゼ: HOIL-1 の同定.	実験医学	21	1222-1225	2003
岩井一宏	タンパク質分解による細胞機能制御 - ユビキチン-プロテアソーム系とその機能.	BIOClinica	18	1031-1035	2003
桐浴隆嘉 他	鉄代謝とユビキチンシステム.	細胞工学	22	866-871	2004
石川春人 他	3. 酸化修飾をシグナルとしたユビキチン化.	実験医学・増刊タンパク質修飾・分解の新機能に迫る	22	143-148	2004