

マンガンは小胞体での異常蛋白の蓄積をもたらす神経細胞死を惹起している可能性が示されていた。

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ドパミン神経に選択的な神経細胞障害のメカニズムを明らかにすることを目的として、昨年度は黒質ドパミン神経の神経細胞障害ならびにパーキンソニズムを惹起する金属マンガンの神経毒性におけるパーキン蛋白の役割について検討した。そして、ドパミン神経細胞 CATH.a 細胞, SH-SY5Y 細胞へのマンガン暴露により、用量依存的な細胞死に先行して、小胞体シャペロンの protein disulfide isomerase (PDI), Bip (GRP78)の発現が増加し、caspase-12 の活性化が惹起され、それに引き続きパーキン蛋白が著明に誘導されるが、非ドパミン神経細胞 Neuro2A 細胞はマンガン暴露に対して抵抗性であり、PDI やパーキン蛋白の誘導はみられなかった。野生型パーキンの遺伝子の導入により、ドパミン神経細胞でのマンガンにより誘発される細胞死は有意に抑制されたが、非ドパミン神経細胞では細胞死は不変であった。以上の結果から、マンガンのドパミン神経毒性の発現機構において、パーキン蛋白は小胞体ストレスとともに誘導され保護的に機能している可能性を明らかにできた。

小胞体ストレスに引き続いてゴルジ体-ユビキチン・プロテアソーム系が活性化されることは知られており、パーキンもユビキチン・プロテアソーム系での unfolded protein の処理に関わっていると考えられている。また、マンガンなどの金属は酸化ストレスを惹起することも知られている。さらに昨年までの検討により、ドパミンの存在がマンガン誘発神経毒性発現に関与している可能性も考えられる。したがって、本年度はマンガン誘発ドパミン神経毒性に対するパーキンの保護効果の発現機序をさらに詳細に検討するために、ドパミン神経細胞, 非ドパミン神経細胞を用いて、マンガン暴露によるパーキン蛋白の細胞内局在, プロテアソーム活性, 活性酸素種生成の変化について検討した。また、マンガン+ドパミン添加による細胞死に対する野生型パーキンの遺伝子導入の効果, マンガン暴露による小胞体シャペロンの増加に対する野生型パーキンの遺伝子導入の効果, ならびにマンガン誘発ドパミン神経死に対するアンチセンスパーキン cDNA の遺伝子導入の

効果について検討した。

近年、ドパミン神経特有の細胞障害因子として、ドパミン, L-DOPA の自動酸化により生成されるドパミンキノン, DOPA キノンといったキノン体が注目されている。そこで、マンガン暴露あるいはパーキン発現抑制のドパミンキノン生成への効果をみるために、ドパミン神経細胞にマンガン添加あるいはアンチセンスパーキンの遺伝子導入を行い、ドパミンキノン, DOPA キノン生成の指標となるドパミン・DOPA クロム (アミノクロム), キノプロテイン (キノン-蛋白結合体) の変化を検討した。

## 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 CATH.a 細胞は RPMI1640 培地 (含 8%ウマ血清, 4%ウシ胎児血清) で、ヒト神経芽細胞株 SH-SY5Y 細胞は RPMI1640 培地 (含 10%ウマ血清, 5%ウシ胎児血清) で、マウスアセチルコリン産生神経細胞株である Neuro2A 細胞はダルベッコ変法イーグル培地 (含 10%ウシ胎児血清) で、それぞれ 37°C, 5% CO<sub>2</sub> で培養した。

### 2. マンガン添加によるパーキン蛋白の細胞内局在の変化

SH-SY5Y 細胞, Neuro2A 細胞に、塩化マンガン(800 μM)を添加し、24 時間培養し細胞を固定し、ポリクローナル抗パーキン抗体ならびに FITC 標識二次抗体を用いた蛍光免疫染色を行った。さらにゴルジ体の指標の TRITC-WGA による染色も同時に行った。

### 3. マンガン暴露によるプロテアソーム活性の変化

SH-SY5Y 細胞, Neuro2A 細胞に、塩化マンガン(800 μM)を添加し、24 時間あるいは 48 時間培養しプロテアソーム抽出用バッファーにより lysate を抽出した。キモトリプシン様活性, ポストグルタミルペプチダーゼ様活性は、それぞれ蛍光基質の Suc-LLVY-MCA, Z-LLE-b-NA と lysate をインキュベートし、蛍光強度を測定することにより評価した。

### 4. マンガン暴露による活性酸素種生成

SH-SY5Y 細胞, Neuro2A 細胞に、塩化マンガン(800 μM)を添加し、4 時間あるいは 24 時間培養し、carboxy-H<sub>2</sub>DCFDA あるいは hydroethidine を加えインキュベートし、それぞれ過酸化水素, スーパーオキ

シドの生成を蛍光で検出した。

## 5. マンガン+ドパミンによる細胞毒性と野生型パーキン cDNA の一過性遺伝子導入の効果

SH-SY5Y 細胞に塩化マンガン(100-200  $\mu\text{M}$ )とドパミン(100  $\mu\text{M}$ )を添加し、Neuro2A 細胞に塩化マンガン(100-200  $\mu\text{M}$ )とドパミン(50-100  $\mu\text{M}$ )を添加し、24 時間後に生存細胞数を MTT 変法で測定した。

次に、SH-SY5Y 細胞、Neuro2A 細胞にそれぞれ同種のマウスあるいはヒト野生型パーキン 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 b-ガラクトシダーゼ遺伝子の発現ベクターとともにリポフェクション法で一過性に遺伝子導入をした。遺伝子導入 24 時間後に塩化マンガン(SH-SY5Y: 100  $\mu\text{M}$ , Neuro2A: 200  $\mu\text{M}$ )とドパミン(SH-SY5Y: 100  $\mu\text{M}$ , Neuro2A: 50  $\mu\text{M}$ )を添加し、さらに 24 時間培養し b-ガラクトシダーゼ遺伝子の導入された細胞を染色し定量した。

## 6. マンガンによる小胞体シャペロン増加に対する野生型パーキン cDNA 導入の効果

CATH.a 細胞にマウス野生型パーキン 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リポフェクション法で遺伝子導入し、24 時間後に塩化マンガン(100  $\mu\text{M}$ )を添加し、さらに 24 時間培養し total cell lysate を抽出した。小胞体シャペロン PDI のウエスタンブロットは定法に従い、蛋白質を SDS-polyacrylamide gel で電気泳動後、ニトロセルロース膜に転写し、抗 PDI 抗体を用いて ECL 発光法で検出した。

## 7. アンチセンスパーキン cDNA の一過性遺伝子導入によるマンガン誘発細胞毒性の変化

CATH.a 細胞を培養ディッシュで 24 時間培養し、マウスのアンチセンスパーキン 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リポフェクション法で一過性に遺伝子導入をした。遺伝子導入 24 時間後に塩化マンガン(50, 100  $\mu\text{M}$ )を添加し、さらに 24 時間培養し、生細胞数をトリパンブルー排除法で計測した。

## 8. アンチセンスパーキン cDNA の遺伝子導入およびマンガン暴露によるドパミン・DOPA クロム、キノプロテインの変化

CATH.a 細胞にアンチセンスパーキン cDNA の発現ベクターあるいは空ベクターをリポフェクション法で

遺伝子導入し、24 時間後に塩化マンガン(100  $\mu\text{M}$ )を添加し、さらに 24 時間培養した。ドパミン・DOPA クロムは 1% Triton X-100 による抽出液の吸光度測定により、キノプロテインは RIPA バッファー抽出 total cell lysate を用いて NBT/glycinate 法により定量した。

## C. 研究結果

### 1. マンガン添加によるパーキン蛋白の細胞内局在の変化

ドパミン産生細胞株としてヒト SH-SY5Y 細胞、非ドパミン産生神経細胞株としてマウス Neuro2A 細胞に塩化マンガンを添加し、それぞれの細胞におけるパーキン蛋白の細胞内局在を免疫染色で検討した。マンガン暴露によりドパミン神経細胞の SH-SY5Y 細胞において核周囲にパーキン蛋白の著明な発現誘導と集積が認められ、これは TRITC-WGA 陽性のゴルジ体に一致していた。一方、非ドパミン産生神経細胞の Neuro2A 細胞ではマンガン添加によってもパーキン蛋白の発現誘導や集積は認められなかった。

### 2. マンガン暴露によるプロテアソーム活性の変化

SH-SY5Y 細胞および Neuro2A 細胞に、細胞死を惹起する濃度の塩化マンガンを添加し、プロテアソーム活性を測定したが、いずれの細胞においてもキモトリプシン様活性、ポストグルタミルペプチダーゼ様活性ともに、添加 48 時間後まで有意な変化は認められなかった。

### 3. マンガン暴露による活性酸素種生成

さらに、SH-SY5Y 細胞および Neuro2A 細胞に、塩化マンガン(800  $\mu\text{M}$ )を添加し、4 時間あるいは 24 時間後の活性酸素種の生成を蛍光指示薬で検討した。マンガン暴露によりいずれの細胞においても過酸化水素、スーパーオキシドの生成が惹起されたが、細胞間の明らかな差異は認められず、むしろ Neuro2A 細胞において多く生成されている傾向がみられた。

### 4. マンガン+ドパミンによる細胞毒性と野生型パーキン cDNA の一過性遺伝子導入の効果

ドパミン神経細胞 SH-SY5Y 細胞、非ドパミン神経細胞 Neuro2A 細胞に塩化マンガンとドパミンの同時添加を行い、細胞毒性を検討した。両細胞とも塩化マンガンあるいはドパミンの単独添加において濃度依存性の細胞死を惹起するが、単独では軽度の障

害を誘発するあるいは障害がみられない濃度の塩化マンガンとドパミンを同時暴露すると著明な細胞死が惹起され、その効果は相乗的であり濃度依存性であった。

次に、このマンガン+ドパミン同時暴露による細胞死に対する野生型パーキン cDNA 遺伝子導入の効果について検討するために、SH-SY5Y 細胞および Neuro2A 細胞に野生型パーキン cDNA の発現ベクターを遺伝子導入し、24 時間の暴露で細胞生存率が約 30-50%となる濃度のマンガン+ドパミン (SH-SY5Y: マンガン 100  $\mu$ M+ドパミン 100  $\mu$ M, Neuro2A: マンガン 200  $\mu$ M+ドパミン 50  $\mu$ M)を添加し、細胞毒性の変化を検討した。マンガン+ドパミン同時暴露で惹起される $\beta$ -ガラクトシダーゼ陽性の細胞数の低下が、ドパミン系 SH-SY5Y 細胞では野生型パーキン遺伝子導入により有意に抑制された。しかし、非ドパミン系 Neuro2A 細胞では野生型パーキン遺伝子を導入してもマンガン+ドパミン同時暴露による細胞死は不変であった。

#### 5. マンガンによる小胞体シャペロン増加に対する野生型パーキン cDNA 導入の効果

昨年度、マンガン暴露によりドパミン産生細胞において、小胞体シャペロンの PDI, Bip の発現が増加し、パーキン蛋白が著明に誘導されること、さらにマンガンによる細胞死が野生型パーキン遺伝子導入により有意に抑制されることを明らかにした。パーキン遺伝子導入による保護効果と小胞体ストレスとの関連を明らかにするために、CATH.a 細胞におけるマンガンによる小胞体シャペロン増加に対する野生型パーキン遺伝子導入の効果について検討した。野生型パーキン cDNA の遺伝子導入により、マンガン暴露による CATH.a 細胞の細胞死は抑制されたにもかかわらず、マンガンによる小胞体シャペロン PDI の増加は不変であった。

#### 6. アンチセンスパーキン cDNA の一過性遺伝子導入によるマンガン誘発細胞毒性の変化

CATH.a 細胞を用いて、マンガン誘発細胞死に対するアンチセンスパーキン cDNA の遺伝子導入の効果について検討した。アンチセンスパーキン遺伝子導入によりマンガンによる細胞生存率の低下は有意に増悪した。

#### 7. アンチセンスパーキン cDNA の遺伝子導入およびマンガン暴露によるドパミン・DOPA クロム、キノプロテインの変化

CATH.a 細胞へのマンガン(100  $\mu$ M)暴露あるいはアンチセンスパーキン遺伝子導入により、細胞内のドパミン・DOPA クロムおよびキノプロテインは増加した。

#### **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。パーキン蛋白がユビキチンリガーゼ活性を有することから、その基質の検索が行われ、小胞体の Pael レセプターが発見され、パーキンの小胞体ストレスとの関連が注目されている。一般に小胞体ストレスの際に生じた小胞体の異常蛋白はユビキチン-プロテアソーム系により分解される。パーキン蛋白はそのユビキチンリガーゼ活性により、小胞体ストレス時に小胞体に集積する異常な Pael レセプター蛋白を CHIP と共役してユビキチン化する。しかし、パーキン遺伝子の変異による神経細胞障害のドパミン神経選択性のメカニズムは未だ明らかにされていない。

そこで、ドパミン神経におけるパーキン蛋白の機能や ARJP でパーキン遺伝子の変異によって惹起されるドパミン神経に選択的な細胞死の発現機序を解析するために、昨年度は黒質ドパミン神経の神経細胞障害ならびにパーキンソニズムを惹起するマンガンの神経毒性におけるパーキン蛋白の役割について検討し、マンガン暴露によりドパミン神経細胞において、小胞体シャペロンの PDI, Bip の発現が増加し、パーキン蛋白が著明に誘導されること、さらにマンガンによるドパミン神経細胞死が野生型パーキン遺伝子導入により有意に抑制されることを明らかにした。

本年度はまず、マンガン暴露によるパーキン蛋白の細胞内局在を検討した。既報と同様に、ドパミン、非ドパミン神経細胞ともにパーキン蛋白は、神経細胞体や神経突起に沿ったゴルジ体にび慢性に局在していた。マンガンを暴露することにより、ドパミン神経細胞ではゴルジ体に一致したパーキン蛋白の著明な誘導と集積が認められ、非ドパミン神経細胞ではみられなかった。パーキン蛋白はプロテアソーム

阻害剤による unfolded protein ストレスの際に核周囲にアグリソームを形成し、細胞死を抑制していることが報告されている。したがって、このマンガン暴露によるゴルジ体でのパーキン蛋白の著明な集積は、マンガン誘発ドパミン神経細胞死を抑制するための代償機転とも考えられる。

小胞体ストレスによりゴルジ体-ユビキチン・プロテアソーム系が活性化されること、パーキンはユビキチンリガーゼとしてユビキチン・プロテアソーム系での unfolded protein の処理に関わっていると考えられていることから、マンガン暴露によりプロテアソーム活性が上昇すると予測されたが、実際にはドパミン、非ドパミン神経細胞ともにマンガン添加によりプロテアソーム活性は変化しなかった。マンガン暴露はドパミン神経細胞において小胞体ストレスを誘導し、パーキン陽性のゴルジ体の凝集を惹起するが、プロテアソーム系には影響しないのかもしれない。また、一般にマンガンなどの重金属は酸化ストレスを誘導し細胞死を惹起することも知られていることから、マンガンによる酸化ストレスの誘導性がドパミン神経細胞では高いことも考えられた。そこで、マンガン暴露による活性酸素種の発生を検討したが、ドパミン神経細胞、非ドパミン神経細胞のいずれにおいても活性酸素種の生成が惹起されるものの、細胞間の明らかな差異は認められなかった。

さらに、昨年度明らかにしたドパミン神経細胞でのマンガン暴露による小胞体ストレスと野生型パーキン遺伝子導入による神経保護効果の関連について明らかにするために、マンガン暴露による CATH.a 細胞での小胞体シャペロン PDI の増加に対する野生型パーキンの遺伝子導入の効果について検討したが、マンガンによる細胞死は抑制されたにもかかわらず、PDI の増加は不変であった。これらの結果から、マンガン誘発細胞死に対するパーキン蛋白のドパミン神経特異的な保護効果は、小胞体ストレスやユビキチン・プロテアソーム系への作用に基づくものではないと考えられる。

昨年度、ドパミン神経細胞でのマンガンによる細胞死が野生型パーキン遺伝子導入により有意に抑制されることを明らかにしたが、本年度は逆にアンチセンスパーキン遺伝子導入によるパーキン蛋白発現抑制により、マンガンによる細胞死が増悪することを明らかに

できた。したがって、パーキン蛋白はマンガン誘発神経細胞毒性の発現機構において、ドパミン神経において選択的に誘導され、保護的に機能していると考えられる。また、ドパミンの存在がマンガン誘発神経毒性発現に関与している可能性も考えられる。そこで、マンガンとドパミンの神経毒性連関とパーキン発現の関係を明らかにするために、マンガン+ドパミン同時暴露による細胞死の変化とそれに対する野生型パーキン遺伝子導入の効果について検討した。マンガン+ドパミンの同時暴露により単独暴露に比して相乗的な著明な細胞死がドパミン神経細胞、非ドパミン神経細胞どちらにおいても惹起された。このマンガン+ドパミン同時暴露による細胞死は、ドパミン神経細胞では野生型パーキン遺伝子導入により有意に抑制されたが、非ドパミン神経細胞では効果はなかった。これらの結果から、マンガン誘発ドパミン神経毒性に対するパーキン蛋白の保護効果には、外来性のドパミンではなくドパミン神経細胞のドパミンなどの内在性因子が関与していることが示唆された。実際に、ドパミン枯渇薬によりあらかじめ細胞内ドパミン濃度を低下させておくと、マンガンによるドパミン神経毒性が有意に抑制できた。

近年、ドパミン神経特有の細胞障害因子として、細胞内小胞外のドパミン、L-DOPA の自動酸化により生成されるドパミンキノン、DOPA キノンといったキノン体が注目されている。ドパミンキノン、DOPA キノンは $\alpha$ シヌクレインと複合体を形成することで、神経毒性のある $\alpha$ シヌクレインのプロトフィブリルが重合して安定なフィブリル(Lewy小体を構成)となるのを阻害し、プロトフィブリルが増加し神経変性を促進する可能性がある。一般に、ドパミンキノン、DOPA キノンは酵素などの機能蛋白のシステイン残基に結合することによってその蛋白の機能を障害する。特にドパミンキノン、DOPA キノンによってチロシン水酸化酵素が不活性化されることが知られている。われわれはドパミン、L-DOPA の自動酸化によるドパミンキノン、DOPA キノンの生成およびそれらによる神経細胞死が、キノン体を還元し無害化するキノンオキシドレダクターゼ活性を有するスーパーオキシドジスムターゼ、それ自身のシステイン残基で機能蛋白と競合してキノン体を

結合しキノン体毒性を消去するグルタチオンによって抑制されるが、カタラーゼは無効であることを見いだした。そこで、マンガン暴露あるいはパーキン発現抑制のドパミンキノン生成への効果をみるために、ドパミン神経細胞にマンガン添加あるいはアンチセンスパーキンの遺伝子導入を行い、ドパミンキノン、DOPAキノン生成の指標となるドパミン・DOPA クロム（アミノクロム）、キノン体の蛋白との結合体であるキノプロテインの変化を検討した。ドパミン神経細胞へのマンガン暴露により、細胞内のドパミン・DOPA クロムおよびキノプロテインは増加した。また、アンチセンスパーキンの遺伝子導入によっても、ドパミン・DOPA クロムおよびキノプロテインは有意に増加し、アポトーシスが惹起された。これらの結果から、マンガン誘発ドパミン神経毒性に対するパーキン蛋白の保護効果は、細胞内小胞外のドパミンあるいはその自動酸化で生成されるキノン体の神経毒性への作用である可能性が示唆された。すなわち、パーキン蛋白はキノン体によるドパミン神経毒性に対し保護的に作用していると考えられる。

このマンガンによるドパミン神経細胞障害は、パーキン遺伝子の変異を有する ARJP の病態モデルとして有用であるかもしれない。また、マンガン誘発ドパミン神経毒性に対するパーキン蛋白の保護効果に関する昨年度からの本検討は、パーキン蛋白のドパミン神経選択的なプロファイルをはじめ示したものであり、パーキン蛋白のドパミン神経細胞における生理的機能ならびにその変異によるドパミン神経選択的な細胞障害のメカニズムを解明するうえで重要な資料となると考えられる。さらに、パーキン蛋白の発現抑制によりキノン体によるドパミン神経毒性が惹起していることを明らかにできた。これはパーキン蛋白がキノン体毒性に対して保護的に働くという生理的機能を示唆している。

今後は、ARJP での変異型パーキンの遺伝子導入のマンガン誘発ドパミン神経毒性に対する効果、パーキン蛋白とドパミン・DOPA キノンとの相互作用機構について検討する必要がある。

## E. 結論

本研究により、マンガン誘発神経細胞毒性はドパミ

ン神経に比較的選択的であり、マンガン暴露によりドパミン神経細胞では小胞体ストレスならびにゴルジ体に一致したパーキン蛋白の著明な誘導と集積が惹起されること、さらにパーキン蛋白はドパミン神経細胞において特異的にマンガン神経毒性に対して保護的に機能していることを明らかにすることができた。このパーキン蛋白のマンガン誘発細胞死に対するドパミン神経特異的な保護効果は、小胞体ストレスやユビキチン・プロテアソーム系への作用に基づくものではなく、細胞内小胞外のドパミンあるいはその自動酸化で生成されるキノン体などのドパミン神経細胞の内在性因子への作用に基づく可能性があることを示した。パーキン蛋白の発現抑制によりドパミンの自動酸化によるキノン体生成を介してドパミン神経細胞毒性が惹起されることから、パーキン蛋白はキノン体によるドパミン神経毒性に対し保護的に作用していると考えられる。

本検討の結果は、パーキン蛋白のドパミン神経選択的なプロファイルを示すものであり、パーキン蛋白のドパミン神経細胞における生理的機能ならびにその変異によるドパミン神経選択的な細胞障害のメカニズムを解明するうえで重要である。

## F. 研究発表

### [英文原著]

- 1) Haque, M.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.
- 2) 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.
- 3) Haque, M.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 their glutathione level. *Neurosci. Res.*, 47: 31-37, 2003.

- 4) Asanuma, M., Tsuji, T., Miyazaki, I., Miyoshi, K. and Ogawa, N.: Methamphetamine-induced neurotoxicity in mouse brain is attenuated by ketoprofen, a non-steroidal anti-inflammatory drug. *Neurosci. Lett.*, 352: 13-16, 2003.
- 5) Diaz-Corrales, F.J., Asanuma, M., Miyazaki, I. and Ogawa, N.: Rotenone induces disassembly of the Golgi apparatus in the rat dopaminergic neuroblastoma B65 cell line. *Neurosci. Lett.*, 354: 59-63, 2004.
- 6) Higashi, Y., Asanuma, M., Miyazaki, I. and Ogawa, N.: Expression of metallothionein-III and cell death in differentiated catecholaminergic neuronal cells. *Neurol. Res.*, in press.
- 7) Tanaka, K., Asanuma, M. and Ogawa, N.: Molecular basis of anti-apoptotic effects of immunophilin ligands on hydrogen peroxide-induced apoptosis in human glioma cells. *Neurochem. Res.*, in press.
- 8) Higashi, Y., Asanuma, M., Miyazaki, I., Hattori, N., Mizuno, Y. and Ogawa, N.: Parkin attenuates manganese-induced dopaminergic cell death. *J. Neurochem.*, in press.

**[英文総説]**

- 1) 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.
- 2) Tanaka, K. and Ogawa, N.: Possibility of non-immunosuppressive immunophilin ligands as potential therapeutic agents for Parkinson's disease. *Current Pharmaceutical Design*, 10: 669-677, 2004.
- 3) Asanuma, M., Miyazaki, I. and Ogawa, N.: Neuroprotective effects of nonsteroidal anti-inflammatory drugs on neurodegenerative diseases. *Current Pharmaceutical Design*, 10: 695-700, 2004.

**研究協力者**

浅沼 幹人

宮崎 育子

Francisco J. Diaz-Corrales

(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保護： $\alpha$ -Synuclein 蛋白の定量法の 開発とパーキンソン病態への関与

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** Parkin がユビキチンリガーゼであることより、基質の同定が ARJP の病態解明に重要である。Parkin の基質候補の1つとして $\alpha$ -Synuclein の可能性が指摘されている。 $\alpha$ -Synuclein は、優性遺伝性パーキンソン病の原因遺伝子であり、孤発型パーキンソン病(PD)の病理学的マーカーである Lewy 小体の主要構成蛋白である。そこで Levy 小体 (LB) に蓄積する $\alpha$ -Synuclein の脳内での変動や、凝集 $\alpha$ -Synuclein がドパミン神経の脱落や機能異常を招来するメカニズムを検討するため、15 年度は、 $\alpha$ -Synuclein 蛋白の、脳や黒質・線条体における局在や加齢による変動を検討するとともに、 $\alpha$ -Synuclein の RIA 系を確立し定量を行った。また、 $\alpha$ -Synuclein 蛋白の PD 病態への関与を検討するため、MPTP 誘発 PD モデルサルおよび PD 患者における血中 $\alpha$ -Synuclein 量の定量を行った。

$\alpha$ -Synuclein : 1) ヒト $\alpha$ -Synuclein の特異抗体を作製し、RIA 系の構築を試みたところ、C 末ペプチド抗体を用いた RIA 法で最も良好な結果が得られた (感度: 0.5ng/ml)。2) これを用いて、血中 $\alpha$ -Synuclein 量を測定した結果、痴呆を伴う重症の PD 病患者で高値を示す症例が、痴呆をとまなわない患者より多く見られた。本結果は、抗 $\alpha$ -Synuclein 抗体が、孤発性 PD 病における脳幹型 LB やびまん性 Levy 小体病 (DLB) の皮質型 LB を強く染色するというこれまでの免疫組織化学的結果を支持するものであり、患者の障害部位での $\alpha$ -Synuclein の凝集とともに血清中への漏出の可能性が考えられた。3) MPTP 誘発 PD モデルサル (5 匹) を作製する際、MPTP 投与前および投与 1、2、4、7 日後の血中の $\alpha$ -Synuclein 量を定量した結果、MPTP 投与により血中 $\alpha$ -Synuclein 量は徐々に上昇し、5 匹中 3 匹で投与後 4 日目に血中濃度が最大ピークとなる変動が観察され、障害部位からの $\alpha$ -Synuclein の血中への漏出説をサルで示唆するものであった。4) ラット脳分画中の $\alpha$ -Synuclein 量は、大脳皮質、海馬、線条体が最も多く、これらの部位での週齢による変化は、2 週、4 週、10 週と、加齢とともに増加傾向を示し、20 週齢では 10 週齢とほぼ同等か若干の減少を示した。5) ウェスタンブロット法を用いて、ラット脳中の $\alpha$ -Synuclein 量の加齢による量的変動を検討したところ、RIA 法による結果と一致した傾向を示した。一方、ヒトニューロブラストマ培養細胞 (SH-SY5Y) を用いて、6-OHDA による酸化ストレス誘導による細胞死を検討し、これが Apomorphine や t-BHQ により抑制され、その抑制メカニズムに活性酸素種 (ROS) の産生抑制や、JNK のリン酸化抑制、アポトーシス抑制などの神経保護作用が関わっていることを示した。

### A. 研究目的

[研究 1] 脳内および血中 $\alpha$ -Synuclein の定量：  
 $\alpha$ -Synuclein は、家族性 PD の1つの病因遺伝子産物であり、Parkin 蛋白の基質の1つとされ、Lewy 小体の構成成分でもあることから、脳内および血中の $\alpha$ -Synuclein の定量を目的として、 $\alpha$ -Synuclein の高感度測定系 (RIA 法) を確立した。次に、構築され

た測定法を用いて、ラット脳各分画における局在や加齢による変動を検討した。また、PD との病態学的関連を明らかにする目的で、PD モデルサルおよび PD 患者血中 $\alpha$ -Synuclein の定量を行った。

[研究 2] 酸化ストレスにより誘導される SH-SY5Y の細胞死に対する Apomorphine の保護効果：ドパミン

D1/D2 受容体アゴニストである Apomorphine は、酸化ストレスによる神経細胞死に対し保護作用を示す薬物であることが知られている。この保護作用は、Apomorphine のもつラジカルスカベンジャーとしての作用が、薬理作用とともに重要であると考えられているが、その機構は明らかでない。今回我々はニューロブラストーマ SH-SY5Y 細胞を用いた *in vitro* の系でその保護効果を検討した。

## B. 研究方法

### [研究 1]

#### $\alpha$ -Synuclein の測定系の作製

1] ヒト $\alpha$ -Synuclein 蛋白特異抗体の作製：ヒト $\alpha$ -Synuclein 蛋白の推定アミノ酸配列を基に、N 末領域 (MDVFMKGLSKAKEGVVAAAYC)、中央部領域 (GILEDMPVDPNEAYEMPSEEG)、C 末端領域 (CKEGVLYVGSKTKEGVVH) の 3 種のペプチドを合成し、これらのペプチドと KLH の複合体を作製し、これを免疫源としてウサギにおいて特異抗体を作製した。

2] RIA 系の構築：Recombinant human  $\alpha$ -Synuclein をスタンダードとして RIA 法による測定系を検討した結果、 $\alpha$ -Synuclein の C 末ペプチド抗体を用いた競合 RIA 法が最も高感度な結果が得られた。確立した測定手順は、血清検体 20  $\mu$ L に 200 倍希した $\alpha$ -Synuclein C 末ペプチド抗体溶液 100  $\mu$ L、 $^{125}$ I 標識した recombinant human  $\alpha$ -Synuclein (25,000 cpm/tube) を加え、4°C、一晚反応した後、抗ウサギ IgG 抗体（第一アイソトープ）を 100  $\mu$ L 加えて室温、3 時間反応後、沈澱を 2 度 PBS で遠心洗浄後、 $\gamma$ -カウンターにて測定した。

#### ウエスタンブロット法による脳内各分画中の $\alpha$ -Synuclein 量

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検体とした。還元変性後、5~20%グラジエントゲルを用いて SDS 電気泳動後、これをニトロセルロース膜に転写した。膜を 10%ブロッッキング液でブロッッキング後、抗血清（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。なお、実験動物

の使用に関しては当院の実験動物取り扱いに関する倫理規定に従った。

### [研究 2]

ヒトニューロブラストーマ培養細胞による *In vitro* 実験系

SH-SY5Y 細胞培養系を用いて Apomorphine 存在下および非存在下で 6-ヒドロキシドパミン (6-OHDA) を添加し、その 24 時間後に alamarBlue を用いて細胞障害性を測定した。6-OHDA によるアポトーシスの誘導は、DNA の断片化により確認した。C-jun N-terminal kinase (JNK) の活性化はウエスタンブロット法にて検出した。

## C. 研究結果

### [研究 1]

1]  $\alpha$ -Synuclein の競合型 RIA 法の確立に成功した。測定感度は、0.5 ng/ml であり、中および組織中 $\alpha$ -Synuclein 量の定量が可能であった。

2] PD 患者血清を用いて、血中 $\alpha$ -Synuclein 量を測定した結果、正常者血清より痴呆を伴う重症 PD 患者で高値を示す症例が多く見られた。

3] PD モデルサルを作製する際、MPTP 投与前および 1, 2, 4, 7 日後に採血したサルの血中 $\alpha$ -Synuclein 量は、5 匹中 3 匹で、投与後 4 日目に急性症状の出現に一致して血中濃度がピークを示す変動が観察された。

4] RIA 法により、ラット脳分画 PBS 抽出液中の $\alpha$ -Synuclein 量を定量したところ、大脳皮質、海馬、線条体が最も多く、またこれらの部位での週齢による変化は、2 週、4 週、10 週と増加傾向を示し、20 週では 10 週に比べ同等か若干の減少を示した。

5] ウエスタンブロット法によりラット脳分画中の $\alpha$ -Synuclein 量を解析した結果、RIA 法による定量結果と同じ傾向を示した。

### [研究 2]

酸化ストレスにより誘導される SH-SY5Y の細胞死に対するアポモルフィンの保護効果：

1] 6-OHDA により引き起こされる SH-SY5Y 細胞の細胞死は、Apomorphine を共存させることにより濃度依存的に抑制された。また、この Apomorphine の細胞保護作用は、細胞を Apomorphine で 24 時間前処理するこ

とによっても Apomorphine 濃度依存的に抑制された。

2] 6-OHDA による活性酸素種 (ROS) の産生は、Apomorphine を共存させることにより抑えられることから、6-OHDA により誘導される細胞死に対するアポモルフィンの細胞保護作用には、アポモルフィンのラジカルスカベンジャーとしての作用が関与していると考えられた。

3] 6-OHDA により誘導される JNK のリン酸化や DNA の断片化が、Apomorphine との共存下で抑制された。Apomorphine を 24 時間前処理することにより、DNA の断片化は、Apomorphine 同時処理に比べさらに抑制されたが、JNK のリン酸化については、Apomorphine 前処理効果は認められなかった。

4] 6-OHDA による細胞死に対する Apomorphine の細胞保護作用は、ドパミン D1/D2 受容体アンタゴニストにおいても完全には阻害されないことから、Apomorphine の細胞保護作用にはドパミン受容体を介さない機構が部分的に関与していると考えられた。

5] アポモルフィンは、細胞内グルタチオン量に影響を及ぼさなかった。

#### D. 考察

[研究 1] 今回確立した  $\alpha$ -Synuclein の RIA 測定系は、血清および脳抽出液で測定可能であり、検出感度は 0.5ng/ml であった。血中  $\alpha$ -Synuclein 量を測定した結果、痴呆を伴う重症の PD 患者で高値を示す症例が多く見られた。この結果は、孤発性 PD における脳幹型 LB、および DLB の皮質型 LB を抗  $\alpha$ -Synuclein 抗体が強く染色するというこれまでの報告を支持するものであった。今後、患者臨床病態と  $\alpha$ -Synuclein 量との関係についてさらに詳細な解析を試みる予定である。

[研究 2] 6-OHDA により誘導される SH-SY5Y 細胞のアポトーシスは、Apomorphine 存在下で有意に抑制された。また、6-OHDA により引き起こされる JNK の活性化も Apomorphine により抑制されたことより、Apomorphine の細胞保護作用には、Apomorphine のラジカルスカベンジャーとしての作用が重要であると考えられた。しかし、この Apomorphine による細胞保護作用は、SH-SY5Y 細胞培養系に 6-OHDA を添加するまでに、Apomorphine で 24 時間前処理した時の方が、

6-OHDA を同時添加した時に比べ有意に亢進したことから、この作用以外のメカニズムも細胞保護に関与している可能性が示唆された。

#### E. 結論

$\alpha$ -Synuclein の競合 RIA 法の確立に成功し、血中および組織中  $\alpha$ -Synuclein 量の測定を行った。その結果、血清中  $\alpha$ -Synuclein 量は、痴呆を伴う重症 PD 患者で高値を示す症例が多く見られた。また、PD モデルサルを作製する際 MPTP 投与前後に採血したサル血中  $\alpha$ -Synuclein 量は、投与後 4 日目に血中濃度が最大ピークとなる変動が観察された。ラット脳分画 PBS 抽出液における  $\alpha$ -Synuclein 量の解析では、大脳皮質、海馬、線条体が最も多く、これらの部位での週齢による変化は、2 週、4 週、10 週と加齢とともに増加傾向を示し、20 週では 10 週とほぼ同等か若干の減少を示した。

6-OHDA による細胞死に対する Apomorphine の細胞保護作用には、Apomorphine のラジカルスカベンジャーとしての作用が重要であると考えられたが、Apomorphine を前処理することによりその細胞保護作用が増強されることから、この作用以外のメカニズムも細胞保護に関与している可能性が示唆された。

#### F. 研究発表

[論文発表]

- Mizuno Y, Takubo H, Mizuta E and Kuno S. Malignant syndrome in Parkinson's disease: concept and review of the literature. *Parkinsonism Relat. Disord.* 2003; 9: 3-9
- Ichinose H, Ohye T, Shinotoh H, Arai K, Yamazaki S, Mizuta E, Kuno S and Nagatsu T. Biopterin metabolism in patients with malignant syndrome. *Parkinsonism Relat. Disord.* 2003; 9: 11-14
- Takubo H, Harada T, Hashimoto T, Inaba Y, Kanazawa I, Kuno S, Mizuno Y, Mizuta E, Murata M, Nagatsu T, Nakamura S, Yanagisawa

- N and Narabayashi H. A coraborative study on the malignant syndrome in Parkinson's disease and related disorders. *Parkinsonism Relat. Disord.* 2003; 9: 31-41
- Ikebe S, Harada T, Hashimoto T, Kanazawa I, Kuno S, Mizuno Y, Mizuta E, Murata M, Nagatsu T, Nakamura S, Takubo H, Yanagisawa N and Narabayashi H. Prevention and treatment of malignant syndrome in Parkinson's disease: a consensus statement of the malignant syndrome research group. *Parkinsonism Relat. Disord.* 2003; 9: 47-49
- Ohta K, Kuno S, Mizuta I, Fujinami A, Matsui H and Ohta M. Effects of dopamine agonists bromocriptine, pergolide, cabergoline, and SKF-38393 on GDNF, NGF, and BDNF synthesis in cultured mouse astrocytes. *Life Sci.* 2003; 73: 617-626
- Yoshimura N, S Kuno S, Chancellor MB, W C de Groat and Seki S. Dopaminergic mechanisms underlying bladder hyperactivity in rats with a unilateral 6-hydroxydopamine(6-OHDA) lesion of the nigrostriatal pathway. *Br. J. Pharmacol.* 2003; 139:1425-1432
- Araki I, Matsui M, Ozawa K, Takeda M, and Kuno S. Relationship of bladder dysfunction to lesion site in Multiple Sclerosis. *J. Urol.* 2003; 169: 1384-1387
- Nishimura M, Kuno S, Mizuta I, Maruyama H, Kaji R and Kawakami H. Influence of monocyte chemoattractant protein (MCP)-1 gene polymorphism on age-at-onset of sporadic Parkinson's disease. *Mov. Disord.* 2003; 18: 953-955
- Hara H, Ohta M, Ohta K, Kuno S and Adachi T. Apomorphine attenuates 6-hydroxydopamine-induced apoptotic cell deth. *Redox Report* 2003; 8: 193-197
- Hara H, Ohta M, Ohta K, Kuno S and Adachi A. Increase of antioxidative potential by tert-butylhydroquinone protects cell death associated with 6-hydroxydopamine-induced oxidative stress in neuroblastoma SH-SY5Y cells. *Mol. Brain. Res.* 2003; 119: 125-131

## パーキンノックアウトマウス作製・解析

分担研究者：田中 啓二 東京都臨床医学総合研究所 副所長（分子腫瘍学部門 事務取扱）

**研究要旨** 常染色体劣性遺伝性若年性パーキンソニズム（autosomal recessive juvenile parkinsonism, AR-JP）の原因遺伝子であるパーキンの病態生理に関する研究を、生化学的・細胞生物学的・分子遺伝学的・構造生物学的方法を駆使して包括的に遂行した。

<研究 1> マウスパーキンの発生工学的手法に基づいた遺伝学的機能解析：パーキン遺伝子のエクソン 2 の最初の 5 塩基にインフレームする形で GFP を融合したノックインマウスを作製した。

<研究 2> アンチセンス RNA を用いた細胞レベルにおけるパーキンの loss-of-function 機能解析：パーキンのアンチセンス RNA を神経細胞内に過剰発現してパーキンのレベルを低下させると、アポトーシスが誘導されると共に、ドーパミン代謝の異常が観察された。

<研究 3> パーキンと 26S プロテアソームの物理的相互作用の解析：パーキンの N 末端にある Ubl（ユビキチン様ドメイン）と 26S プロテアソームの Rpn10（ユビキチンレセプター）が物理的に相互作用することを NMR（核磁気共鳴）スペクトラムで解明した。

<研究 4> パーキンと相互作用し、その機能を制御する分子の同定：パーキン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  $\alpha$  シヌクレイン）の同定に成功した。

<研究 5> ERAD（小胞体関連分解）に関係するユビキチンリガーゼの解析：ERAD に関与するニューロン特異的なユビキチンリガーゼ SCF<sup>Fbs1</sup> とユビキタスに発現している普遍的 SCF<sup>Fbs1</sup> の構造と機能について分子から細胞レベルまで解析した。

### A. 研究目的

パーキンの機能異常によって発症する AR-JP についての遺伝学的研究からパーキンソン病の発症機構解明に迫ることを目標とした。具体的には、パーキンの病態生理を解明するために、パーキンの物性・機能・病態に関わる諸問題について、分子から固体に至る包括的研究を推進し、AR-JP 発症の原因解明のヒントを得ることを目標とした。

[研究 1]：マウスパーキンの発生工学的手法に基づいた遺伝学的機能解析。パーキンの遺伝子改変マウスを作製し、パーキン変異による神経変性機序の解析を行う。具体的には、エクソン 2 のはじめの 5 塩基にインフレームする形で green fluorescence protein (GFP)

を融合したパーキンノックインマウスを作成し、中脳黒質細胞におけるパーキンの発現および神経の可視化によりパーキン欠損に依存したドーパミンニューロンの変性過程を明らかにする。

[研究 2]：アンチセンス RNA を用いた細胞レベルにおけるパーキンの loss-of-function 機能解析。パーキンの機能を細胞レベルで解析するためにパーキンをコードする全長鎖アンチセンス RNA を SHSY5Y ニューロプラストーマ細胞内に発現して細胞内のパーキン蛋白質をノックダウンし、神経細胞の機能動態に対する影響を調べる。

[研究 3]：パーキンと 26S プロテアソームの物理的

相互作用の解析。パーキン (52 kDa 蛋白質) の N 端側にはユビキチン (Ub) と相同性の高い領域、即ちユビキチン様ドメイン (Ubl)、が存在し、この領域にミスセンス変異をもった AR-JP の家系が存在する。しかし、なぜこの変異によって AR-JP が発症するかは不明である。そこで、Ubl ドメインの機能を、NMR 法を用いた高次構造の解明とダイナミクス (具体的には 26S プロテアソームとの相互作用) の解析を行い、パーキンのプロテアソームに対する作用機序を解明する。

[研究 4]: パーキンと相互作用し、その機能を制御する分子の同定。パーキンは、ユビキチンリガーゼ (分解マーカであるユビキチンを基質蛋白質に連結させる酵素) であるが、この活性が細胞内でどのように調節されているかは不明である。そこで、パーキンと相互作用する分子を探索して活性制御機構を明らかにすることを旨とする。

[研究 5]: ERAD (小胞体関連分解) に関係するユビキチンリガーゼの解析。すでにわれわれは ERAD に関するユビキチンリガーゼとしてニューロン特異的な SCF<sup>Fbs1</sup> を発見しているが、本年は Fbs1 とキトビオース (蛋白質の Asp に結合する糖鎖分子: GlcNAc-GlcNAc) との構造解析 (X 線結晶解析や NMR 解析) を行い、原子レベルでの相互作用解析を目指す。さらにユビキチンに発現している SCF<sup>Fbs1</sup> の新奇な仲間酵素として SCF<sup>Fbs2</sup> を見出したので、その役割を解明する。

## B. 研究方法

### [研究 1]

1) ターゲティングベクターとノックアウト (イン) マウスの作製: 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ぎ、3' 側シーヨトアーム 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。得られたヘテロマウスを交配して、パーキンを欠損したホモマウスを作製した。

### [研究 2]

パーキンの全長に対するアンチセンス RNA とセンス RNA を組み込んだアデノベクターを作製して、標的培養細胞に感染させた。対照として LacZ を組み込んだアデノベクターも作製し、実験に供した。パーキンの発現量は Western Blotting で解析した。生細胞数は tetrazolium salt WST-8 [2-(2-Methoxy-4-nitrophenyl)-3-(4-nitrophenyl)-5-(2,4-disulfophenyl)-2H-tetrazolium, monosodium salt] の代謝活性 (ミトコンドリアの代謝量) で測定した。アポトーシスは TUNEL (TdT-mediated dUTP-biotin nick end-labeling) 染色と DAPI 染色との 2 重染色で確認すると共に、PARP (poly ADP ribose polymerase) のカスパーゼによる限定分解及びカスパーゼ-3, -6, -9 の自己消化による活性型への変換でも検討した。さらにドーパミンの代謝産物 (DOPA/DA-クロム) は、分光学的方法で定量した。

### [研究 3]

パーキンの N 末端にある Ubl (ユビキチン様ドメイン) と 26S プロテアソームの Rpn10 (ユビキチンレセプター) を大腸菌で発現させ、精製した。大腸菌発現系を用いることにより安定同位体標識した Ubl を精製・単離し、異種核多次元 NMR 測定を行った。NMR によってパーキン-Ubl の立体構造を解明すると共にこの Ubl と Rpn10 の物理的な相互作用を NMR (核磁気共鳴) スペクトラル (chemical shift perturbation)

で測定した。

#### [研究 4]

ウシ脳抽出液を抗ヒトパーキン抗体で免疫沈降し、パーキンに結合する分子群を 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。同定した蛋白質については、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パーキンのユビキチンリガーゼ活性に対する影響を調べた。

#### [研究 5]

新奇な糖鎖を識別する複合体型ユビキチンリガーゼである SCF<sup>Fbs1</sup> と SCF<sup>Fbs2</sup> については、Skp1, Cullin-1, Fbs1 or Fbs2, Roc1 遺伝子を baculo virus の発現ベクターに組み込んでから、昆虫細胞に多重感染させ、細胞内で活性型の酵素複合体を分離・精製した。本精製酵素を用いて、糖鎖要求性のユビキチンリガーゼ活性を測定した。さらに Fbs1 の立体構造を X 線結晶構造解析により解明すると共に糖 (chitobiose : GlcNAc-GlcNAc) との共結晶化させた複合体についての解析も進め、3次元構造から両者の相互作用の分子機構を原子レベルで解明した。さらに Fbs1 と chitobiose の相互作用で変動する残基の同定は、NMR(核磁気共鳴)の chemical shift perturbation スペクトルの測定で解析した。

### C. 研究結果

#### [研究 1]

パーキン遺伝子のノックアウトの作製については、昨年より引き続いて進めた。本年度、新たに分離した複数のノックアウト ES 細胞をマウス 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結果、その中の一つのマウスがジャームラインに入った。そこで、このヘテロマウスの交配から、ホモパーキン欠損マウスを作製することに成功した。

しかし、ノックアウトパーキンマウスは、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・脱落を含む異常は、観察されなかった。そこで、パーキン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-methyl-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<sup>+</sup>) 等の neurotoxins や lipophilic pesticide (rotenone) など environmental toxins の影響を中心に解析中である。

#### [研究 2]

ヒト SHSY5Y (神経芽細胞腫) 細胞においてパーキン (PARK2 遺伝子産物) の全長鎖アンチセンス RNA を発現させると、細胞の生存率が導入アデノベクターの量に比例して、急激に低下した (実際、細胞内のパーキン量を Western blotting で調べても、検出限度以下にまで低下していた)。しかし、LacZ を組み込んだ対照アデノベクターでも、また同じパーキンの全長鎖アンチセンス RNA を発現させても細胞の生存率には、全く影響しなかった。しかも、アンチセンス RNA を HeLa (ヒト子宮頸癌) 細胞に発現させて場合には細胞増殖に影響しなかったことから、パーキンのノックダウンによる細胞の生存率の急激な低下はニューロンに特異的に認められる現象であることが判明した。この急激な細胞生存率の低下がアポトーシスであることは、TUNEL 法やカスパーゼ 3, 6, 9 の自己消化による活性型への変換や活性型カスパーゼによる PARP の限定分解によっても確認した。現在、このような条件下において、ドーパミン代謝経路の活性変動、等を中心に検討した結果、ドーパミンの代謝産物 (DOPA/DA-クロム) の有意な蓄積を認めた。興味深いことに、このパーキン低下による DOPA/DA-クロムの蓄積は、 $\alpha$  シヌクレイン (PARK1 の責任遺伝子産物) の共発現で顕著に抑制された。

#### [研究 3]

パーキンは、蛋白質分解のシグナル分子であるユビキチン (Ub) とアミノ酸配列上 32% の相同性をもつユビキチン様ドメイン (Ubl) を含むことが知られている。本年、ヒトパーキンの Ubl の NMR 解析を行い、その三次元構造を決定するとともに、緩和解析により

Ubl のダイナミクスを明らかにした。

NMR から得られた情報をもとに Ubl の立体構造を決定した結果、Ubl は、ユビキチンと同じように 5 つの  $\alpha$ -ストランドと 2 つの  $\beta$ -ヘリックスから構成されていることが明らかとなった。さらに多次元 NMR による緩和解析の結果から、第 1 および第 2  $\alpha$ -ストランド間に位置するターン部分 (Asn8-Ser10) は、複数のコンフォーマーの間を揺らいでいる構造平衡が存在していることが判明した。したがって、パーキン Ubl は Ub と同様のいわゆる“ユビキチンフォールド”から構築されているが、分子の動的な性質は Ub とは異なることが明らかとなった。

最近、hHR23a、Dsk2 など Ubl ドメインを有する多くの蛋白質が、26S プロテアソームと相互作用することが報告されている。今回、パーキン-Ubl とプロテアソームの相互作用を検討するため、26S プロテアソームの構成サブユニットである Rpn10 のフラグメント (196-306) とパーキン-Ubl の結合に伴う NMR スペクトルの変化を解析した。その結果、パーキン-Ubl は主に  $\alpha$ シートの第 3、4 ストランド (R40-R51) を用いて Rpn10 と相互作用していることが判明した。この結果から、パーキンとプロテアソームの相互作用の構造的基盤がはじめて明らかになった。とくに、パーキン-Ubl 上の Rpn10 の結合部位に位置する Arg42 は、AR-JP において部位特異的に Pro に変異している家系が報告されている。このミスセンス変異によりパーキンの Rpn10 結合部位に高次構造変化が誘起され、26S プロテアソームとの複合体形成に破綻をきたすものと考えられる。この結果、プロテアソームとパーキンとの相互作用の喪失、即ちパーキンによってユビキチン化された基質蛋白質の分解異常によっても AR-JP が発症することが示唆された。

#### [研究 4]

ウシ脳抽出液を抗ヒトパーキン抗体で免疫沈降し、パーキンに結合する分子群をプロテオミクスで解析した。分離した蛋白質の中に脳で高く発現している蛋白質「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、多くのリン酸化蛋白質と結合できる蛋白質であった。実際、14-3-3 とパーキンを細胞内で

導入して共発現蛋白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、パーキンの相互作用解析から、14-3-3 がパーキンのリンカー領域 (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 患者由来の変異パーキンでは、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 はパーキン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パーキン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パーキンの活性抑制は、 $\alpha$ 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、 $\alpha$ シヌクレインは、14-3-3 とパーキンの結合より高い親和性でパーキンと結合し、14-3-3 の結合を切り離すことでパーキン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  $\alpha$ シヌクレインはこの 14-3-3 との結合能及びパーキンの再活性化能が喪失していた (論文投稿中)。

#### [研究 5]

最近、小胞体ストレスとニューロン死の関係が注目されている。それは unfolded protein response (異常蛋白質による小胞体負荷応答) による小胞体ストレスが Ask1-JNK シグナリングを介した細胞死に直接カップルしていることが明らかになってきたからである。小胞体ストレスに対する応答の一つに ERAD (小胞体関連分解) がある。よく知られているように膜蛋白質や分泌蛋白質などの分泌系蛋白質は翻訳と共役して細胞質から小胞体に移行し、そこで高次構造形成が行われる。ERAD は小胞体内のミスフォールド蛋白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である。

昨年、われわれは N 結合型糖蛋白質の結合する細胞内レクチンを探索する目的で、高マンノース糖鎖をもったフェチュインをリガンドとした親和性クロマトグラフィーを作製してウシ脳抽出液を解析した結果、

Fbx2 (Fbs1 と改名) の分離に成功した。Fbs1 はニューロンに特異的に発現している F-box 蛋白質であり、SCF 複合体 (Skp1-Cullin1-F box-Roc1) 型ユビキチンリガーゼの標的識別サブユニットであった。試験管内再構成系を用いた解析から、本 SCF<sup>Fbs1</sup> 複合体が N 型糖鎖依存的に糖蛋白質をポリユビキチン化するユビキチンリガーゼであることが判明した。そして細胞内における SCF<sup>Fbs1</sup> の認識する基質の一つを同定したところ、細胞接着分子インテグリンの  $\beta$  1 サブユニット、特に小胞体中に存在する前駆体型の糖鎖構造を持つものであることを明らかにした。インテグリンは小胞体中で  $\alpha\beta$  二量体を形成して細胞膜へ輸送される細胞表面の接着分子である。その際、多く (約十種) の  $\alpha$  サブユニットを相手とする  $\beta$  1 は、過剰に作られて小胞体中にプールされていることがわかっている。SCF<sup>Fbs1</sup> はこの前駆体型  $\beta$  1 と細胞質中で会合し、プロテアソーム依存的分解に導いた。従って、SCF<sup>Fbs1</sup> は ERAD において糖鎖を認識してユビキチン化する役割を果たしているものと推定される。さらに、SCF 複合体を形成しないドミナントネガティブ Fbs1 変異体を強制発現させたところ既知の ERAD 基質の分解が抑制されたことから SCF<sup>Fbs1</sup> は ERAD 機構で作用していることが裏付けられた。さらに興味深いことに、Fbs1 を過剰発現させると、プロテアソーム阻害剤を用いた ERAD 阻止によって誘導される Aggresomes (ERAD 基質の分解異常による異常蛋白質の凝集体) の形成を完全にブロックした。この結果は、Fbs1 が封入体形成に関係している可能性を示唆するものとして注目される。

併せてごく最近、われわれは Fbs1 の X 線結晶解析による立体構造の解明に成功した。同時に Chitobiose (GlcNAc-GlcNAc 糖鎖) との共結晶構造にも成功し、Chitobiose が Fbs1 の構造変化によって生じる疎水性領域に突き刺さる様式 (水素結合) で会合していることが判明した。この結果、Fbs1 が糖鎖を結合する様式が原子レベルで判明した。本研究成果は、小胞体ストレスに関連したニューロン死の分子機構解明に大きく貢献することが期待される。言い換えれば、細胞質の蛋白分解異常によるストレスが小胞体ストレスの感受性を増加させ、引き続いてニューロン死を助長するというスキームが提案されているが、この魅力

的な提案機構において SCF<sup>Fbs1</sup> が品質管理リガーゼとして重要な役割を果たしていることが示唆された。

本年さらにわれわれは、ユビキタスに発現している SCF<sup>Fbs1</sup> のファミリー酵素として SCF<sup>Fbs2</sup> を見出した。そして SCF<sup>Fbs2</sup> も ERAD に関与することを証明し、糖鎖識別リガーゼ酵素が小胞体における品質管理機構に普遍的に重要な役割を果たしていることを解明した。

#### D. 考察

本年、われわれはパーキンの機能解析に向けての包括的研究を行った。マウスを用いた発生工学的研究においては、ノックインマウスの作製に成功した。併せて、パーキンの細胞内レベルをアンチセンス RNA 法によって低下させると、神経細胞特異的な細胞死 (アポトーシス) がおきることを見出した。また、パーキンと特異的に相互作用する分子として 14-3-3 (パーキンの阻害因子) と  $\alpha$  シヌクレイン (パーキンの活性化因子) を同定した。この結果、14-3-3 は PARK1 ( $\alpha$  シヌクレイン) と PARK2 (パーキン) を機能的に制御する新しい活性調節分子であることが明らかとなった。そしてパーキンソン病患者由来の変異 PARK1 ( $\alpha$  シヌクレイン) と変異 PARK2 (パーキン) は、14-3-3 との相互作用を喪失していたことから、3 分子の相互作用の破綻が、直接的か間接的かは別にして、パーキンソン病の発症機構解明に重要である可能性が想定された。このことに関連して、われわれはパーキンが 26S プロテアソームと会合できないことが、AR-JP の発症に繋がることも見出した。この結果はプロテアソーム依存性の蛋白質分解が AR-JP の発症に関係している可能性を強く示唆しており、興味深い知見と考えている。

他方、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、蛋白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蛋白質が累積し、細胞死ひいては神経変性に至るとの考え方である。本年、われわれは小胞体ストレスに関する新規なユビキチンリガーゼとして SCF<sup>Fbs1</sup> に加えて新たに SCF<sup>Fbs2</sup> を同定した。われわれは、AR-JP の原因遺伝子産物であるパーキンが SCF<sup>Fbs1</sup> と SCF<sup>Fbs2</sup> のよ

うな品質管理リガーゼと連携して作用していると考え  
ており、今後、この方向での研究も併せて進めていく  
計画である。

#### E. 結論

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、ユビキチン化された異常蛋白質の集積が  
残存ニューロン内に頻りに観察されていることから、  
蛋白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。われ  
われは、これらの知見を分子レベルで理解する基盤と  
なる事実として、複数の品質管理リガーゼ（パーキン、  
CHIP, SCF<sup>Fbs1</sup>,  
SCF<sup>Fbs2</sup>）を発見した。今後、これらの分子を基に蛋白  
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。

#### 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  
Imai, J., Maruya, M., Yashiroda, H., Yahara, I., and  
Tanaka, K. (2003) The molecular chaperone

Hsp90 interacts with 26S proteasomes and  
regulates their assembly. EMBO J. 2003; 22:  
3557-3567

Mizushima, T., Hirao, T., Yoshida, Y., Lee, S. J.,  
Chiba, T., Iwai, K., Yamaguchi, Y., Kato, K.,  
Tsukihara, T., and Tanaka, K. (2004) Structural  
basis of sugar-recognizing ubiquitin ligase.  
Natute Struct. & Mol. Biol. 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)

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

##### 1. 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. 知的財産権の出願・登録状況

##### 1. 特許取得

無し

##### 2. 実用新案登録

無し

##### 3. その他

無し

## 研究成果の刊行に関する一覧表

水野美邦

[英文原著]

- Gouider-Khouja N, Larnaout A, Amouri R, Sfar S, Belal S, Hamida C. B, Hamida M. B, Hattori N, Mizuno Y, Hentati F. Autosomal recessive parkinsonism linked to parkin gene in Tunisian family. Clinical, genetic and pathological study. *Parkinsonism Rel Disord* 9: 247-251, 2003
- Okuma Y, Hattori N, Mizuno Y. case report, Sensory neuropathy in autosomal recessive juvenile parkinsonism (PARK2). *Parkinsonism Rel Disord* 9: 313-314, 2003
- Intelberg R, Hattori N, Nisipeanu P, Abo Mouch S, Blumen S.C., carasso R. L., Mizuno Y. Camptocoemia, axial dystonia, and parkinsonism: Phenotypic heterogeneity of a parkin mutation. *Neurology* 60: 1393-1394, 2003
- Kobayashi T, Ota S, Tanaka K, Ito Y, Hasegawa M, Umeda Y, Motoi Y, Takanashi M, Yasuhara M, Anno M, Mizuno Y, Mori H. A novel L266V Mutation of the Tau Gene Causes Frontotemporal Dementia with a Unique Tau Pathology. *Ann Neurol* 53: 133-137, 2003
- Kobayashi T, matsumine H, Zhang J, Imamichi Y, Mizuno Y, Hattori N. Pseudo-autosomal dominant inheritance of PARK2: two families with parkin gene mutations. *J Neurol Sci* 207: 11-17, 2003
- Kobayashi H, Krger R, Markopoulou K, Wszolek Z, Chase B, Taka H, Mineki R, Murayama K, Riess O, Mizuno Y and Nobutaka. Haploinsufficiency at the  $\alpha$ -synuclein gene underlies phenotypic severity in familial Parkinson's disease. *Brain* 126: 32-42, 2003
- Tanaka, R., Komine-Kobayashi, M., Mochizuki, M., Yamada, M., Furuya, T., Migita, M., Shimada, T., Mizuno, Y., and Urabe, T. Migration of enhanced green fluorescent protein expressing bone marrow-derived microglia/macrophage into the mouse brain following permanent focal ischemia. *Neuroscience* 117: 531-539, 2003
- Furuya T, Tanaka R, Urabe T, hayakawa J, Migita M, Shimada T, Mizuno Y, Mochizuki H. Establishment of modified chimeric mice using GFP bone marrow as a model for neurological disorders. *NeuroReport* 13: 1-3, 2003

永津俊治

[論文発表]

- Ichinose H, Ohye T, Shinotoh H, Arai K., Yamazaki S, Mizuta E, Kuno S, Nagatsu T. Biopterin metabolism in patients with malignant syndrome. *Parkinsonism and Related Disorders* 2003; 9: S11-S14
- Takubo H, Harada T, Hashimoto T, Inabe Y, Kanazawa I, Kuno S, Mizuno Y, Mizuta E, Murata M, Nagatsu T, Nakamura S, Yanagisawa N, Narabayashi H. A collaborative study on the malignant syndrome in Parkinson's disease and related disorders. *Parkinsonism and Related Disorders* 2003; 9: S31-S41
- Ikebe S, Harada T, Hashimoto T, Kanazawa I, Kuno S, Mizuno Y, Mizuta E, Murata M, Nagatsu T, Nakamura S, Takubo H, Yanagisawa N, Narabayashi H. Prevention and treatment of malignant syndrome in Parkinson's disease: a consensus statement of the malignant syndrome research group. *Parkinsonism and Related Disorders* 2003; 9: S47-S49
- Lu YY, Wang LJ, Muramatsu S, Ikeguchi K, Fujimoto K, Okada T, Mizukami H, Matsushita T, Hanazono Y, Kume A, Nagatsu T, Ozawa K, Nakano I. Intramuscular injection of AAV-GDNF results in sustained expression of transgenic GDNF, and its delivery to spinal motoneurons by retrograde transport. *Neurosci Res* 2003; 45: 33-40
- Yuyama K, Yamamoto H, Nakamura K, Nishizaki I, Yamakuni T, Song SY, Sora I, Nagatsu T, Yamamoto T. Overexpression of V-1 prevents nitric oxide-induced cell death: involvement of enhanced tetrahydrobiopterin

biosynthesis. *J Neurosci Res* 2003; 72: 716-725

Shiraishi H, Kato T, Atsuta K, Sumi-Ichinose C, Ohtsuki M, Itoh M, Hishida H, Tada S, Udagawa Y, Nagatsu T, Hagino Y, Ichinose H, Nomura T. cGMP inhibits GTP cyclohydrolase I activity and biosynthesis of tetrahydrobiopterin in human umbilical vein endothelial cells. *J Pharmacol Sci* 2003; 93: 265-277

Imamura K, Hishikawa N, Sawada M, Nagatsu T, Yoshida M, Hashizume Y. Distribution of major histocompatibility complex class II-positive microglia and cytokine profile of Parkinson's disease brains. *Acta Neuropathol* 2003; 106: 518-526

永津俊治、澤田誠. サイトカインおよび神経栄養因子—パーキンソン病における変化— *脳の科学* 2004; 増刊号 121-125

[総説]

Ichinose H, Sumi-Ichinose C, Nagatsu T, Nomura T. Dopa-responsive dystonia. In: *Genetics of Movement Disorders*, ed Pulst SM, Academic Press, Amsterdam, 2003, pp 419-428

小川紀雄

[英文原著]

- 1) Haque ME, 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* 2003; 1619: 39-52.
- 2) Tanaka K, Fujita N and Ogawa N. Immunosuppressive (FK506) and non-immunosuppressive (GPI1046) immunophilin ligands activate neurotrophic factors in the mouse brain. *Brain Res* 2003; 970: 250-253.
- 3) Haque ME, 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 their glutathione level. *Neurosci Res* 2003; 47: 31-37.
- 4) Asanuma M, Tsuji T, Miyazaki I, Miyoshi K and Ogawa N. Methamphetamine-induced neurotoxicity in mouse brain is attenuated by ketoprofen, a non-steroidal anti-inflammatory drug. *Neurosci Lett* 2003; 352: 13-16.
- 5) Diaz-Corrales FJ, Asanuma M, Miyazaki I and Ogawa N. Rotenone induces disassembly of the Golgi apparatus in the rat dopaminergic neuroblastoma B65 cell line. *Neurosci Lett* 2004; 354: 59-63.

[英文総説]

- 1) 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* 2003; 5: 165-176.
- 2) Tanaka K and Ogawa N. Possibility of non-immunosuppressive immunophilin ligands as potential therapeutic agents for Parkinson's disease. *Current Pharmaceutical Design* 2004; 10: 669-677.
- 3) Asanuma M, Miyazaki I and Ogawa N. Neuroprotective effects of nonsteroidal anti-inflammatory drugs on neurodegenerative diseases. *Current Pharmaceutical Design* 2004; 10: 695-700.

久野貞子

[論文発表]

Mizuno Y, Takubo H, Mizuta E and Kuno S. Malignant syndrome in Parkinson's disease: concept and review of the literature. *Parkinsonism Relat. Disord.* 2003; 9: 3-9

Ichinose H, Ohye T, Shinotoh H, Arai K, Yamazaki S, Mizuta E, Kuno S and Nagatsu T. Biopterin metabolism in patients with malignant syndrome. *Parkinsonism Relat. Disord.* 2003; 9: 11-14

- Takubo H, Harada T, Hashimoto T, Inaba Y, Kanazawa I, Kuno S, Mizuno Y, Mizuta E, Murata M, Nagatsu T, Nakamura S, Yanagisawa N and Narabayashi H. A coraborative study on the malignant syndrome in Parkinson's disease and related disorders. *Parkinsonism Relat. Disord.* 2003; 9: 31-41
- Ikebe S, Harada T, Hashimoto T, Kanazawa I, Kuno S, Mizuno Y, Mizuta E, Murata M, Nagatsu T, Nakamura S, Takubo H, Yanagisawa N and Narabayashi H. Prevention and treatment of malignant syndrome in Parkinson's disease: a consensus statement of the malignant syndrome research group. *Parkinsonism Relat. Disord.* 2003; 9: 47-49
- Ohta K, Kuno S, Mizuta I, Fujinami A, Matsui H and Ohta M. Effects of dopamine agonists bromocriptine, pergolide, cabergoline, and SKF-38393 on GDNF, NGF, and BDNF synthesis in cultured mouse astrocytes. *Life Sci.* 2003; 73: 617-626
- Yoshimura N, S Kuno S, Chancellor MB, W C de Groat and Seki S. Dopaminergic mechanisms underlying bladder hyperactivity in rats with a unilateral 6-hydroxydopamine(6-OHDA) lesion of the nigrostriatal pathway. *Br. J. Pharmacol.* 2003; 139:1425-1432
- Araki I, Matsui M, Ozawa K, Takeda M, and Kuno S. Relationship of bladder dysfunction to lesion site in Multiple Sclerosis. *J. Urol.* 2003; 169: 1384-1387
- Nishimura M, Kuno S, Mizuta I, Maruyama H, Kaji R and Kawakami H. Influence of monocyte chemoattractant protein (MCP)-1 gene polymorphism on age-at-onset of sporadic Parkinson's disease. *Mov. Disord.* 2003; 18: 953-955
- Hara H, Ohta M, Ohta K, Kuno S and Adachi T. Apomorphine attenuates 6-hydroxydopamine-induced apoptotic cell death. *Redox Report* 2003; 8: 193-197
- Hara H, Ohta M, Ohta K, Kuno S and Adachi A. Increase of antioxidative potential by tert-butylhydroquinone protects cell death associated with 6-hydroxydopamine-induced oxidative stress in neuroblastoma SH-SY5Y cells. *Mol. Brain. Res.* 2003; 119: 125-131

田中啓二

「原著」

- 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
- Imai, J., Maruya, M., Yashiroda, H., Yahara, I., and Tanaka, K. (2003) The molecular chaperone Hsp90 interacts with 26S proteasomes and regulates their assembly. *EMBO J.* 2003; 22: 3557-3567.
- Mizushima, T., Hirao, T., Yoshida, Y., Lee, S. J., Chiba, T., Iwai, K., Yamaguchi, Y., Kato, K., Tsukihara, T., and Tanaka, K. (2004) Structural basis of sugar-recognizing ubiquitin ligase. *Nature Struct. & Mol. Biol.* 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)

「総説」

- 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.

200300757A

以降は雑誌/図書等に掲載された論文となりますので、P39の研究成果の刊行に関する一覧表をご参照ください。