

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16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17(2005)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…………… 7  
道勇 学
2. Dorfinによる老年期神経変性疾患の治療法の開発……………11  
田中啓二

## III. 研究成果の刊行に関する一覧 …………… 17

## 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 筋萎縮性側索硬化症(ALS)、パーキンソン病(PD)、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。これらの疾患ではいずれも中枢神経の病変部位にユビキチン化した異常蛋白質が蓄積していることが病理学的特徴である。ユビキチン-プロテアソーム系による異常蛋白質の選択的分解は、神経細胞の機能を正常に保つための「蛋白質品質管理」において主要な役割を果たしている。われわれが同定した新規ユビキチンリガーゼ(E3) Dorfin は、幅広い老年期神経変性疾患のユビキチン化封入体に局在していることが判明し、Dorfin の高発現あるいは活性増強は老年期神経変性疾患の重要な治療戦略となりうる。また Dorfin の異常蛋白質認識機構の解明は老年期神経変性疾患の病態機序解明に重要な手がかりを与える。本年度は、1) ユビキタスに発現している蛋白質である Dorfin の病変特異的な異常蛋白質認識能力の発見、2) Dorfin の活性を制御する分子の同定、3) 遺伝子工学的手法を用いた安定して高発現し E3 活性を増強した Dorfin 改変人工 E3 の開発、などを行うことができ、Dorfin が老年期変性疾患の治療法開発の上で今後ますます重要な分子となることが期待される。

### 分担研究者

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

### A. 研究目的

筋萎縮性側索硬化症(ALS)、パーキンソン病(PD)、アルツハイマー病(AD)はいずれも、中高年期以降に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、患者自身の多大な苦痛のみならず、介護の必要性が大きく家族・社会への負担が重い原因究明と治療法の開発が急務となっている。

神経細胞内には「蛋白質品質管理」機構が存在し、その中心をユビキチン-プロテアソーム系が担っている。神経細胞内において遺伝子変異や酸化ストレス等の環境要因により障害を受けた蛋白質はユビキチン化されプロテアソームにより分解除去されているが、異常となった蛋白質が十分分解されず神

経細胞内に蓄積すると凝集体を形成し、カスパーゼカスケードを活性化するなどして神経細胞は変性し死滅する。ALS における変異 SOD1、PD における  $\alpha$ -synuclein、synphilin-1、AD における  $\beta$ -amyloid、tau など、いずれも中枢神経系の病変部位特異的に凝集し蓄積していることが知られており、老年期変性疾患は蛋白質品質管理機構が破綻して神経細胞に対し毒性を有する異常蛋白質が蓄積して神経細胞障害を引き起こされる「蛋白質蓄積病」と考えられる。われわれがヒトより同定した Dorfin はユビキチンリガーゼ(E3)活性を有し、ALS や PD の神経障害に関与している変異 SOD1 や synphilin-1 をユビキチン化しプロテアソームでの分解を促進することをこれまでの研究で明らかにしてきた。本研究では、Dorfin が異常蛋白質を特異的に認識することをこれまで *in vitro* で主に検討してきたが、実際に老年期神経変性疾患モデル動物の病変部位で異常蛋白質を認識しうるかどうか *in vivo* での検討を行った。

異常蛋白質を特異的に認識すると考えられるDorfinを高発現することは、「蛋白質蓄積病」であるALS、PD、ADなどの老年期神経変性疾患の治療法開発の上で非常に有望な戦略であると思われる。前年度の研究において、われわれはDorfinトランスジェニック(Tg)マウスを開発し、ALSの動物モデルである変異SOD1-Tgマウスと交配することでALS治療を試み、一定の治療効果をあげることができたことを報告した。Dorfinの外來性発現によりALSモデルマウスの生存期間および罹病期間を延長させたが、その生存期間・罹病期間の延長効果はまだ十分とは言えず、今後さらに治療効果を増強することが必要である。Dorfinによる治療効果の増大のために、本研究ではDorfinの活性制御に重要な分子の同定や、遺伝子工学的手法を用いて、安定して高発現しE3活性が高くなるようにDorfinを改変することなど多面的なアプローチを行った。

## B. 研究方法

### 1) Dorfinのin vivoにおける異常蛋白質認識様態の解析

変異SOD1が中枢神経系に進行性に蓄積し進行性の運動障害を伴うG93A変異SOD1-Tgマウス[B6SJL-TgN(SOD1-G93A)1Gur] (The Jackson Laboratory)を用いた。マウス運動能をEconomex Rotarod (Colombus Instruments)を用いて評価し病期を発症前(5週齢)、発症時(10週齢)、早期(14週齢) 末期(20週齢)に分類した。各病期のマウスおよびnon-Tgマウスそれぞれ4例について免疫組織化学的検討および生化学的解析を行った。

ケタミン・キシラジンにてマウスを十分に麻酔した後、左心室より0.1 M phosphate buffer、4% paraformaldehydeを還流して固定し、中枢神経組織(大脳、小脳、脳幹、脊髄)および一般臓器についてパラフィン包埋を行い、作製した病理標本を抗SOD1抗体、抗ユビキチン抗体、抗Dorfin抗体を用いてABC法により免疫染色を行った。抗Dorfin抗体(Dorfin-30)は、Dorfinのアミノ酸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ー精製することにより作製した。

G93A変異SOD1-Tgマウス、non-Tgマウスの中枢神

経組織および一般臓器をTBS buffer (50 mM Tris, 150 mM NaCl, 1% Nonidet P-40, 0.1% SDS)でホモゲナイズした後遠心して核分画を除去した上清を用い、抗Dorfin抗体(Dorfin-30)により免疫沈降を行い抗SOD1抗体でwestern blot解析を行った。

### 2) Dorfin結合蛋白質の大規模ハイスループットプロテオミクス解析

HEK293細胞にFLAG-tagged DorfinをトランスフェクションしてFLAG-tagged Dorfinに会合してくる細胞内蛋白質をFLAGペプチドで溶出した。このようにして精製された蛋白質を直接Lysylendopeptidaseで消化した後、MS/MSプロテオミクス: time-of flight hybrid mass spectrometer (Q-ToF Ultima, Micromass)で解析した。得られたペプチドのアミノ酸配列をヒトゲノム情報と照合し、Dorfinに結合する蛋白質を同定した。DorfinのE3活性は、Dorfinと変異SOD1(対照として野生型SOD1)をHEK293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)してから、SOD1抗体で免疫沈降後、抗SOD1抗体および抗ユビキチン抗体でwestern blotする方法で測定した。

### 3) Dorfin改変人工E3の開発

Dorfinの基質結合部位である疎水性ドメインを含む部分を、神経系で高発現しており神経変性疾患との関連も報告されているcarboxyl terminus of the Hsc70-interacting protein (CHIP)のユビキチン化活性を有するU-box領域と結合した多数のコンストラクトを作製した。作製したコンストラクトをHEK293細胞にトランスフェクションし、発現量および変異SOD1に対するin vivoユビキチン化活性を測定した。

(倫理面への配慮)

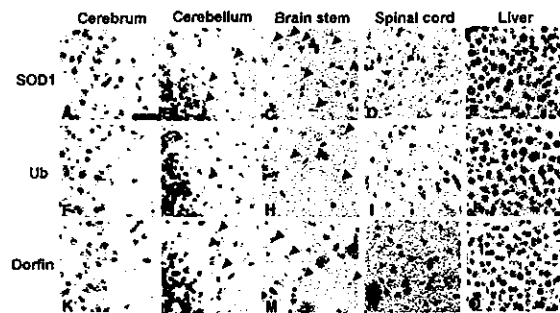
本研究は事前に各々の分担研究者の所属機関の倫理委員会より承認を得ており、剖検組織およびRNA・ゲノムDNAの収集にあたっては、本研究の目的や方法などについて口頭および文書により十分な説明を行った後、文書により同意を得て行った。また実験動物の扱いには各々の分担研究者の所属大学動物実験施設の指針に従い、実験動物に苦痛を与えないよう配慮した。

### C. 研究結果

1) Dorfinは *in vivo* において病変部位特異的に異常蛋白質を認識する

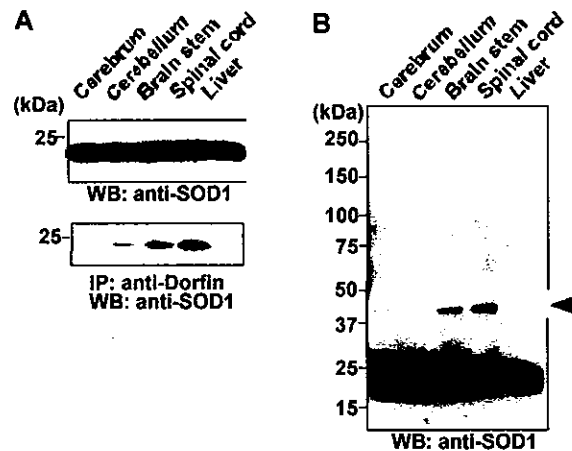
G93A 変異 SOD1-Tg マウスにおいて、抗 SOD1 抗体、抗ユビキチン抗体、抗 Dorfin 抗体陽性の凝集体形成は一般臓器には見られず、中枢神経組織のみに存在した (図 1)。

図 1 中枢神経組織 (大脳、小脳、脳幹、脊髄)、一般臓器 (肝臓) における SOD1 凝集体形成



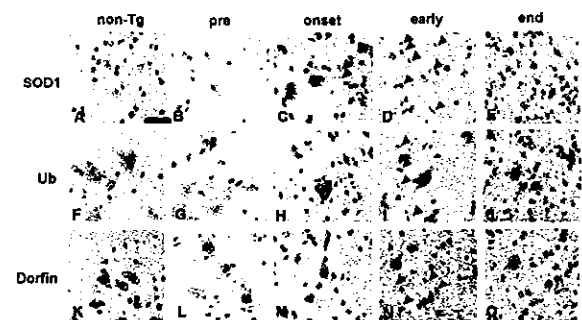
中枢神経組織における凝集体形成を詳細に検討してみると、大脳、小脳、脳幹の順に凝集体形成が増加し、脊髄において最も著明であった。Dorfin は *in vitro* では野生型 SOD1 には結合せず変異 SOD1 のみと結合するが、SOD1-Tg マウスの各組織における Dorfin と変異 SOD1 の結合の程度を免疫沈降法で検討した (図 2A)。Dorfin は肝臓では変異 SOD1 とは結合せず、病変の存在する中枢神経組織の変異 SOD1 を特異的に認識していた。さらに中枢神経組織の中で Dorfin の認識する変異 SOD1 の量は、病変の程度とよく相関しており、最も病変の強い脊髄において Dorfin は変異 SOD1 と最も強く結合した。中枢神経組織においては SDS 抵抗性の SOD1 ダイマーが病変の強いところほど多く出現し、Dorfin と変異 SOD1 の結合の程度と SOD1 オリゴマー形成量はよく相関していた (図 2B)。

図 2 中枢神経組織 (大脳、小脳、脳幹、脊髄)、一般臓器 (肝臓) における Dorfin と変異 SOD1 の結合



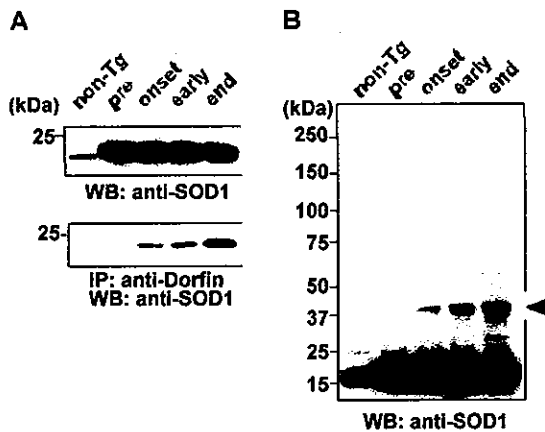
次に G93A 変異 SOD1-Tg マウスの臨床経過を発症前、発症時、発症早期、発症末期に分け各病期の SOD1 の凝集体形成と Dorfin の関連を検討した (図 3)。Dorfin およびユビキチン陽性の異常構造物は SOD1 陽性の異常構造物よりやや遅れて出現し、SOD1 の蓄積と併行して増加した。

図 3 G93A 変異 SOD1 Tg マウス脊髄における SOD1 凝集体形成の経時的な変化



さらに G93A SOD1 Tg マウス各病期の脊髄を用いて、免疫沈降法により Dorfin と変異 SOD1 の結合の強さを検討した (図 4A)。Dorfin が認識する変異 SOD1 の量は、発症から病変の進行とともに急激に増加し、SDS 抵抗性の変異 SOD1 ダイマーも onset の頃より経時的に増加する。ここでも Dorfin と変異 SOD1 との結合の強さは SDS 抵抗性の SOD1 オリゴマーの出現に程度とよく相関していた (図 4B)。

図 4 G93A 変異 SOD1Tg マウス脊髄における Dorfin と変異 SOD1 の結合の経時的変化



## 2) Dorfin 活性制御因子 VCP の同定

ハイスループットの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、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 のかなり重い分画に沈降した。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 が沈降してくる分画には VCP も沈降してくるから、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免疫沈降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 末端側領域と結合することが判明した。Dorfin の C 末端側領域には基質結合部位が存在するが、この領域における両者の機能的な関連性は今のところ不明である。

変異 SOD1 を基質とした Dorfin の E3 活性の測定から、VCP が Dorfin の機能 (E3 活性) 維持に必須であることを見出した。実際に機能的に不活性型として知られている VCP<sup>K524A</sup> (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 E3 活性をほぼ完全に抑制した。この結果、VCP は Dorfin の E3 活性を正に活性化する因子であることが判明した。

これまでの研究から、Dorfin は ALS や PD の患者の病変部位に観察されるユビキチン化封入体に存在することが知られているが、HEK293 細胞にプロテアソーム阻害剤を処理することによって形成させ

た aggresome を抗 Dorfin 抗体と抗 VCP 抗体で共染色すると両者は共局在していた。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ともに、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。

## 3) Dorfin 改変人工 E3 の開発

Dorfin 蛋白質は半減期が短いために脳および脊髄において発現量が低く、強制発現させた場合にも同様に高レベルの発現が得られにくい。老年期神経変性疾患の治療応用におけるこの Dorfin の欠点を克服するために、Dorfin を改変した人工 E3 のコンストラクトを多数作製し、HEK293 細胞にこれらのコンストラクトを導入し発現量を確認したところ、N 末端側に CHIP の U-Box を持ち C 末端側に Dorfin の基質結合部位を持つ融合蛋白質で、野生型 Dorfin に比べてはるかに高いレベルの蛋白質発現が得られ、発現も安定して継続できた。さらに、HEK293 細胞に種々の Dorfin 改変コンストラクトと変異 SOD1 を共発現し、in vivo ユビキチン化アッセイを行い、野生型 Dorfin による変異 SOD1 のユビキチン化と比較したが、N 末端側に CHIP の U-Box を持ち C 末端側に Dorfin の基質結合部位を持ついくつかの人工蛋白質で、野生型 Dorfin に比較して変異 SOD1 ユビキチン化の増強が認められた。

## D. 考察

老年期神経変性疾患の神経細胞変性は、異常蛋白質がオリゴマーや protofibril を形成して蓄積することによる神経細胞の機能障害が原因であると推定されている。ALS モデル動物である G93A 変異 SOD1-Tg マウスでは中枢神経のみならず一般臓器でも広く変異 SOD1 が発現しているが、変異 SOD1 高分子複合体は病変の生じない部位では観察されず神経障害と関連性が深いと考えられる。今回の検討から、Dorfin は病変の存在する中枢神経組織の変異 SOD1 のみを特異的に認識することが明らかになった。病変の存在する中枢神経組織では変異 SOD1 を misfold させやすい状態 (病変特異的に SOD1 を misfold させる因子の存在が推定される) が存在し、misfold した変異 SOD1 のみを Dorfin は特異的に認

識していると考えられる。Dorfin は病変の存在する組織の異常蛋白質のみ認識するため、Dorfin は老年期神経変性疾患の病変選択性や毒性獲得の機序解明に有用なツールとなりうると考えられる。

本研究では、VCP が Dorfin と会合して大きな複合体を形成していることをはじめて明らかにすると共にその活性を正に制御していることを突き止めた。これまでに VCP はプロテアソームと相互作用し、ユビキチン化された蛋白質をプロテアソームに提示して分解に供する作用のあることが知られているほか、ERAD 機構において ER 内の異常蛋白質を ATP 依存的に引き抜くことなどが示唆されている。VCP は神経変性疾患と密接に関係しているとの知見が集積しつつあり、これらのことを併せて考えると、VCP が Dorfin と会合してその活性を正に制御していることは、老年期神経変性疾患の発症機構の解明と治療法開発の上で重要な分子標的となりうると示唆している。

Dorfin による老年期神経変性疾患治療法を開発する上での問題点の一つに、中枢神経系内での Dorfin のターンオーバーが速く、結果として Dorfin の発現量が低く抑えられてしまうことがあげられる。本研究において、Dorfin の老年期神経変性疾患の原因となりうる異常蛋白質の特異的認識部位を残し、他の部分を安定に発現しユビキチン化活性の強い別の E3 のユビキチン化活性部位に置き換えることにより作製した人工 E3 により、Dorfin の基質特異性を残しつつユビキチン化活性増強に成功した。本研究により開発した人工 E3 を臨床応用に近づけるべく、今後人工 E3 の生体内での安全性の検討やアデノ随伴ウイルス等を用いた運動ニューロンへの効果的なデリバリー方法の開発が必要である。

#### E. 結論

Dorfin は老年期神経変性疾患において、病変部位特異的に異常蛋白質を認識する活性を有していることが判明し、病態機序解明および治療法開発の双方に今後ますます重要な役割を担うと考えられた。Dorfin による老年期神経変性疾患の治療効果を高めるために、Dorfin の活性を制御し治療の標的

分子となりうる VCP を同定し、さらに発現の安定性と E3 活性を高めた Dorfin 改変人工 E3 を開発した。今後臨床応用に向け、病変部位への効果的なデリバリー法の開発等さらなる検討を重ね、一刻も早く老年期神経変性疾患の有効な治療法の開発を行ってゆきたい。

#### F. 健康危険情報 なし

#### G. 研究発表

(1) Jiang YM, Yamamoto M, Kobayashi Y, Yoshihara T, Liang Y, Terao S, Takeuchi H, Ishigaki S, Katsuno M, Adachi H, Niwa J, Tanaka F, Doyu M, Yoshida M, Hashizume Y, Sobue G. (2005) Gene expression profile of spinal motor neurons in sporadic amyotrophic lateral sclerosis. *Ann Neurol.* 57:236-51.

(2) Adachi H, Katsuno M, Minamiyama M, Waza M, Sang C, Nakagomi Y, Kobayashi Y, Tanaka F, Doyu M, Inukai A, Yoshida M, Hashizume Y, Sobue G. (2004) Widespread nuclear and cytoplasmic accumulation of mutant androgen receptor in SBMA patients. *Brain* 128:659-70.

(3) Okada Y, Shimazaki T, Sobue G, Okano H. (2004) Retinoic-acid-concentration-dependent acquisition of neural cell identity during in vitro differentiation of mouse embryonic stem cells. *Dev Biol.* 275:124-42.

(4) Ishigaki S, Hishikawa N, Niwa J, Iemura S, Natsume T, Hori S, Kakizuka A, Tanaka K, Sobue G. (2004) Physical and functional interaction between Dorfin and Valosin-containing protein that are colocalized in ubiquitylated inclusions in neurodegenerative disorders. *J Biol Chem.* 279:51376-85.

(5) Katsuno M, Adachi H, Tanaka F, Sobue G. (2004) Spinal and bulbar muscular atrophy: ligand-dependent pathogenesis and therapeutic perspectives. *J Mol Med.* 82:298-307.

(6) 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.* 13:1183-92.

(7) 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.

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

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

H. 知的財産権の出願・登録状況 なし



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

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助教授

研究要旨 前年度の研究において、われわれは Dorfin トランスジェニック (Tg) マウスを開発し、中高年期以降に発症する神経変性疾患の一つである筋萎縮性側索硬化症 (ALS) のモデルマウスである変異 SOD1-Tg マウスと交配することにより ALS の治療を試み、一定の治療効果を上げることができたことを報告した。Dorfin の外来性発現により ALS モデルマウスの生存期間および罹病期間の延長させることができたが、生存期間・罹病期間の延長効果は十分とは言えず、今後さらに治療効果を増強することが必要である。Dorfin による老年期神経変性疾患治療法を開発する上での問題点の一つに、中枢神経系内での Dorfin のターンオーバーが速く結果として Dorfin の発現量が低く抑えられてしまうことがあげられる。そこで、Dorfin 蛋白質を遺伝子工学的手法を用いて改変し、高発現でユビキチンリガーゼ活性を増強した人工ユビキチンリガーゼ (E3) の開発を試みた。

A. 研究目的

筋萎縮性側索硬化症 (ALS)、パーキンソン病 (PD)、アルツハイマー病 (AD) はいずれも、中高年期以降に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る。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。

神経細胞内には「蛋白質品質管理機構」が存在し、異常蛋白質はユビキチン化されプロテアソームにより分解除去されている。ALS における変異 SOD1、PD における  $\alpha$ -synuclein、synphilin-1、AD における  $\beta$ -amyloid、tau、cystatin C など、いずれも病変部位において凝集し蓄積していることが知られており、老年期神経変性疾患においては蛋白質品質管理機構が破綻して神経細胞に対し毒性を有する異常蛋白質が蓄積するため神経障害が引き起こされていると考えることができる。われわれがヒト脊髄より同定した Dorfin はユビキチンリガーゼ (E3) であり、ALS や PD の神経障害に関与している変異 SOD1 や synphilin-1 をユビキチン化する活性を有していることをこれまでの研究で明らかにしてきた。異常

蛋白質を特異的に認識する Dorfin を高発現することは、「神経内蛋白質蓄積病」と言える ALS、PD、AD などの老年期神経変性疾患の治療法開発の上で非常に有望な戦略であると思われる。実際に前年度の研究において、われわれは Dorfin トランスジェニック (Tg) マウスを開発し、老年期神経変性疾患の一つである ALS の動物モデルである変異 SOD1-Tg マウスと交配することにより ALS 治療を試み、一定の治療効果をあげることができた。Dorfin の外来性発現により ALS モデルマウスの生存期間および罹病期間を延長させえたが、その生存期間・罹病期間の延長効果はまだ十分とは言えず、今後さらに治療効果を増強することが必要である。

Dorfin による老年期神経変性疾患治療法を開発する上での問題点の一つに、中枢神経系内での Dorfin のターンオーバーが速く、結果として Dorfin の発現量が低く抑えられてしまうことがあげられる。そこで、本研究では Dorfin 蛋白質を遺伝子工学的手法を用いて改変し、高発現と E3 活性を増強した人工 E3 の開発を行った。また、Dorfin の基質であり、神経細胞障害性を有することをわれわれが明らかにした synphilin-1 の中央領域や分泌シグナ

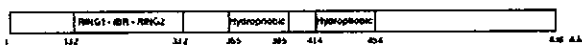
ルを欠損した cystatin C を高発現する Tg マウスを作製することにより新たな老年期神経変性疾患の動物モデルを作出することを試みた。

## B. 研究方法

### 1) Dorfin 改変人工 E3 の開発

Dorfin は、N 末端側に RING-finger/IBR ドメイン (アミノ酸残基 132-332)、C 末端側に変異 SOD1 や synphilin-1 などの基質結合部位である疎水性ドメイン (アミノ酸残基 365-454) を有する構造を持つ (図 1)。

図 1. Dorfin 蛋白質の構造



Dorfin の基質結合部位である疎水性ドメインを含む部分を、神経系で高発現しており神経変性疾患との関連も報告されている carboxyl terminus of the Hsc70-interacting protein (CHIP) のユビキチン化活性を有する U-box 部分と結合した複数のコンストラクトを作製した (図 2)。作製したコンストラクトを HEK293 培養細胞に強制発現させ、コンストラクトの発現量および変異 SOD1 に対する *in vivo* ユビキチン化活性を検討した。

図 2. Dorfin 改変人工 E3

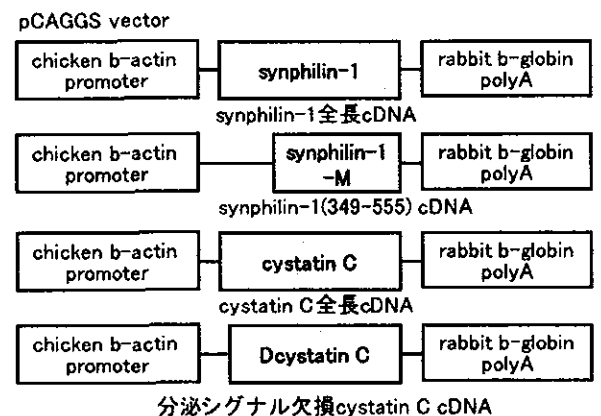


### 2) 新規老年期神経変性疾患モデル動物の作出

synphilin-1 は PD のレビー小体に  $\alpha$ -synuclein とともに蓄積していることが知られているが、われわれのこれまでの研究より 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は、細胞内で凝集形成能と細胞毒性を有していることが判明している。従って、synphilin-1 の中央領域を神経系内に高発現させることにより新たな PD モデル動物の作出を試みた。また、cystatin C の遺伝子多型は AD の危険因子であり、AD においては cystatin C の分泌が低下しているとの報告があることや、われわれの検討から分泌を阻害した cystatin C が aggresome を形成することが判明したことから、cystatin C の分泌シグナルを欠損した変異 cystatin C を神経系内で高発現させることにより新たな AD モデル動物の作出を試みた。pCAGGS ベクターを用い、chicken  $\beta$ -actin プロモータ調節下に脳・脊髄を含む全身で synphilin-1 中央領域あるいは分泌シグナル欠損 cystatin C を発現するコンストラクトを作製した (図 3)。

図 3. synphilin-1 および cystatin C 遺伝子導入コンストラクト



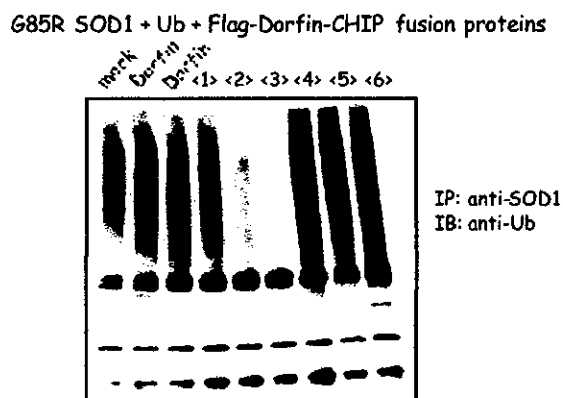
コンストラクト DNA を C57BL6 マウス受精卵にマイクロインジェクションすることにより Tg マウスを作出した。導入遺伝子の確認はマウス tail ゲノムのサザンプロットにより行った。

## C. 研究結果

1) Dorfin 蛋白質は、半減期が短いために脳および脊髄において発現量が低く、強制発現させた場合にも同様に高レベルの発現が得られにくい。本研究では、老年期神経変性疾患の治療応用におけるこの

Dorfin の欠点を克服するために、Dorfin を改変した人工 E3 のコンストラクトを複数作製した。HEK293 培養細胞にこれらのコンストラクトを導入し発現量を確認したところ、N 末端の CHIP U-Box と C 末端の Dorfin 基質結合部位を融合したコンストラクトで元の Dorfin 全長に比べてはるかに高いレベルの蛋白質発現が得られ、発現も安定して続いた。さらに、HEK293 に種々の Dorfin 改変コンストラクトと変異 SOD1 をコトランスフェクションし、in vivo ユビキチン化を元の Dorfin による変異 SOD1 のユビキチン化と比較して検討した。N 末端の CHIP U-Box と C 末端の Dorfin 基質結合部位を融合した複数の人工蛋白質で、元の Dorfin に比較して変異 SOD1 ユビキチン化の増強が認められた (図 4)。

図 4 Dorfin 改変人工 E3 による変異 SOD1 の in vivo ユビキチン化



N 末端の CHIP U-Box と C 末端の Dorfin 基質結合部位を融合した人工 E3 は安定して高発現し、ユビキチン化活性も元の Dorfin に比較して高いため、老年期神経変性疾患の治療応用に非常に有望であると考えられた。

2) 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あるいは分泌シグナル欠損 cystatin C を導入した Tg マウスを複数ライン作出した。いずれのラインも奇形・発育障害は見られておらず、現在 Rotarod や cage activity 計測による運動・行動学的計測や病

理的解析、生化学的解析を進めている。

#### D. 考察

Dorfin はわれわれが同定した新規 E3 であり、細胞内において神経変性疾患の原因となりうる変異 SOD1 や synphilin-1 などの異常タンパク質を認識しユビキチン化することでプロテアソームによる分解を促進する「蛋白質品質管理」能力を有している。われわれはこれまでに Dorfin-Tg マウスを開発し、ALS の動物モデルである変異 SOD1-Tg マウスの治療を行い一定の治療効果をあげることができたが、Dorfin の発現量が比較的低レベルに止まるためその生存期間・罹病期間の延長効果は十分ではない。そこで Dorfin を改変したより強力な人工 E3 の作製を試みた。

Dorfin による老年期神経変性疾患治療法を開発する上での問題点の一つに、中枢神経系内での Dorfin のターンオーバーが速く、結果として Dorfin の発現量が低く抑えられてしまうことがあげられる。本研究において、Dorfin の老年期神経変性疾患の原因となりうる異常蛋白質の特異的認識部位を残し、他の部分を安定に発現しユビキチン化活性の強い他の E3 のユビキチン化活性部位に置き換えることにより作製した人工 E3 により、Dorfin の基質特異性を残しつつユビキチン化活性増強に成功した。本研究により開発した人工 E3 を臨床応用に近づけるべく、今後人工 E3 の生体内での安全性の検討やアデノ随伴ウイルス等を用いた病変部位ニューロンへの効果的なデリバリー方法の開発が必要である。

#### E. 結論

半減期が短く発現量が少ない Dorfin の欠点を克服したユビキチン化活性のより高い Dorfin 改変人工 E3 は、老年期神経変性疾患の治療への応用が期待できる。

#### F. 健康危険情報 なし

#### G. 研究発表

1. Jiang YM, Yamamoto M, Kobayashi Y, Yoshihara

T, Liang Y, Terao S, Takeuchi H, Ishigaki S, Katsuno M, Adachi H, Niwa J, Tanaka F, Doyu M, Yoshida M, Hashizume Y, Sobue G. (2005) Gene expression profile of spinal motor neurons in sporadic amyotrophic lateral sclerosis. *Ann Neurol.* 57:236-51.

2. Adachi H, Katsuno M, Minamiyama M, Waza M, Sang C, Nakagomi Y, Kobayashi Y, Tanaka F, Doyu M, Inukai A, Yoshida M, Hashizume Y, Sobue G. (2004) Widespread nuclear and cytoplasmic accumulation of mutant androgen receptor in SBMA patients.

*Brain* 128:659-70.

3. 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.* 13:1183-92

4. 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.

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** Dorfin (double ring-finger protein) 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、且つ家族性 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 1) を特異的にユビキチン化する酵素であることから、運動ニューロンにおけるタンパク質の品質管理（タンパク質の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と提案してきた。本年は、Dorfin の活性調節機構について新知見を得た。Dorfin の結合タンパク質として分離したサイトソルの ATPase 型多機能性分子シャペロンである Valosin-containing protein, VCP (別称 CDC48 or p97 ATPase complex) が Dorfin の活性維持に不可欠な因子として作用することを見出した。VCP はユビキチン代謝と密接に関係する多面的なシャペロン分子であるので、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

われわれは Dorfin を家族性 ALS (amyotrophic lateral sclerosis 筋萎縮性側索硬化症) の脊髄で高発現している遺伝子として分離し、その後、Dorfin が RING-IBR (in between RING)-RING 型のユビキチンリガーゼであること (1) を明らかにした。その結果 Dorfin が Parkin (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 の責任遺伝子産物) と構造的に類似したユビキチン連結酵素 (リガーゼ) であることが判明した。その後、本酵素が家族性 ALS 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してプロテアソーム依存的に分解することを見出し、Dorfin が運動性ニューロンの破綻に伴った神経変性疾患の発症に関与することが示唆された (2)。本年、われわれは Dorfin の病態生理学的意義を解明するために高感度マス (MS/MS) スペクトロメーターを駆使した大規模なハイスループット・プロテオミクス解析を行った。その結果、Dorfin 結合タンパク質として Valosin-containing protein (VCP)

の単離に成功した (3)。VCP はサイトソルに存在する多機能性の分子シャペロンで p97 ATPase complex (出芽酵母の CDC48 ホモログ) とも呼ばれ、ユビキチン・プロテアソームシステム依存性のタンパク質分解機構に密接に関係することが知られている。そこで本年は、VCP による Dorfin のユビキチンリガーゼ活性に対する効果を中心に解析した。最終的には Dorfin の構造・機能・病態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

#### 「超高感度プロテオミクス解析」

Dorfin に結合する分子群を探索するために HEK293 細胞に FLAG-tagged Dorfin をトランスフェクションして FLAG-tagged Dorfin に会合してくる細胞内タンパク質を FLAG ペプチドで溶出した。このようにして精製されたタンパク質を直接 Lysylendopeptidase で消化した後、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(4)。得られたペプチドのアミノ酸配列をヒトゲノム情報と照合し、Dorfinに結合するタンパク質を同定した。

#### 「ユビキチンリガーゼ活性の測定」

Dorfinのリガーゼ活性は、DorfinとALS疾患変異型SOD1(対照として野生型SOD)をHEK293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)してから、SOD1抗体で免疫沈降後、SOD1抗体およびユビキチン抗体でWestern blotする方法で測定した(2)。

#### 「免疫学的解析」

免疫沈降実験、Western blotting分析、免疫細胞染色は、定法に従って行った。

#### (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組織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とVCPの物理的相互作用解析

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、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のかなり重い(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が沈降してくる分画には、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、基質結合部位が存在するが(2)、この領域における両者の機能的な関連性については、不明であり、現在、検討中である。

#### [研究2] VCPのDorfinリガーゼ活性に対する効果

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)維持に必須であることを見出した。実際、機能的に不活性型として知られているVCP<sup>K524A</sup>(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のリガーゼ活性をほぼ完全に抑制した。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。

#### [研究3] VCPのERADにおける役割の解明

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 $\alpha$ サブユニット)の分解を指標に検定した。その結果、野生型Dorfinを強制発現させると、ERAD経路によるTCR $\alpha$ 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(触媒部位であるN-末端側のRING配列を欠失させた変異体)では、みられなかった。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<sup>Fbx1</sup>(5-7)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、この野生型(WT) Dorfin による ERAD 抑制機構とその生物学的意義について検討中である。

#### [研究4] 免疫組織化学染色解析

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(8, 9) が、HEK293 細胞にプロテアソーム阻害剤を処理することによって形成させた Aggresome 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。

#### D. 考察

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。

実際、Dorfin はパーキンソン病(PD)のレビー小体(LB: PD に特徴的な封入体)に存在し、ユビキチンと共局在している(8)。また Dorfin は DLB (dementia with LB), multiple system

atrophy, ALS 等に見られるユビキチンを含む封入体にも同定されていること(9)から、これらの封入体形成と密接に関係していることが示唆されている。

本研究では、VCP が Dorfin と会合して大きな複合体を形成していることをはじめ明らかにすると共にその活性を正に制御していることを突き止めた。これまでに VCP はプロテアソームと相互作用し、ユビキチン化されたタンパク質をプロテアソームに提示して分解に供する作用のあることが知られている(10)ほか、小胞体関連分解(ERAD: endoplasmic reticulum associated degradation)機構において、ER の異常タンパク質を ATP 依存的に引き抜くことなどが示唆されている(11)。実際、われわれは N 型糖鎖を持った糖タンパク質の ERAD に係わるユビキチンリガーゼ SCF<sup>Fba1</sup>(5, 6)が VCP と会合して複合体を形成していることを突き止めている(7)。いずれにしても、VCP は神経変性疾患と密接に関係しているとの知見が集積しつつあり(12)、これらのことを併せて考えると、VCP が Dorfin と会合してその活性を正に制御していることは、老年期神経変性疾患の発症機構を解明するために重要な知見となることが期待される。

#### E. 結論

Dorfin と VCP について以下の知見を得た。

- 1) Dorfin と VCP は物理的に会合する。そして Dorfin の C-末端領域がこの相互作用に関与している(N-末端領域には触媒部位である RING-IBR-RING ドメインが存在)ことを証明した。
- 2) Dorfin と VCP は、HEK293 に形成させた Aggresome (ユビキチン化封入体)に共局在する。この結果は、以前に報告した PD や DLB 患者のニューロンに出現するレビー小体に Dorfin や

VCP が存在することを示した知見と、一致した。

4) 野生型 VCP を強制発現させると、Dorfin による顕著な SOD1 のユビキチン化が観察されたが、ドミナントネガティブ変異 VCP<sup>K523A</sup> (VCP の ATPase ドメインの変異体で ATPase 活性を喪失) は、Dorfin の変異 SOD1 を基質としたユビキチンリガーゼ活性をほぼ完全に喪失させた。この結果、VCP が Dorfin の正の制御因子であることが判明した。

5) 不思議なことに、野生型 Dorfin を強制発現させると、ERAD 経路による TCR $\alpha$ 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 (触媒部位である N-末端側の RING 配列を欠失させた変異体) では、みられなかった。この結果から、Dorfin が ERAD に関与する可能性が示唆された。

以上の結果より VCP は Dorfin の活性を正に維持している因子であることが判明した。即ち VCP は Dorfin の細胞内における機能発現に必須な因子であることが判明した。これらの知見は、今後、Dorfin と VCP の機能制御を介して神経変性疾患の治療法創成に関して新しいヒントを与えることが期待できる。

## F. 健康危険情報

無し。

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

- (1) Niwa, J., Ishigaki, S., Doyu, M., Kato, K., Suzuki, T., Tanaka, K., and 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.
- (2) Niwa, J., Ishigaki, S., Hishikawa, N., Yamamoto, M., Dyu, M., Murata, S., Tanaka, K., Taniguchi, N., Sobue, G. (2002) Dorfin ubiquitylates mutant SOD1 and prevents mutant SOD1-mediated neurotoxicity. *J. Biol. Chem.* 277, 36793-

- 36798.
  - (3) Ishigaki, S., Hishikawa, N., Niwa, J., Iemura, S., Natsume, T., Hori, S., Kakizuka, A., Tanaka, K., and Sobue, G. (2004) Physical and functional interaction between Dorfin and VCP that are colocalized in ubiquitylated inclusions in neurodegenerative disorders. *J. Biol. Chem.*, 279, 51376-51385.
  - (4) Natsume, T., Yamauchi, Y., Nakayama, H., Shinkawa, T., Yanagida, M., Takahashi, N. and Isobe, T. (2002) A direct nanoflow liquid chromatography-tandem mass spectrometry system for interaction proteomics. *Anal. Chem.* 74, 4725-4733
  - (5) Yoshida, Y., Chiba, T., Tokunaga, T., Kawasaki, H., Iwai, K., Suzuki, T., Ito, Y., Matsuoka, K., Yoshida, M., Tanaka, K., and Tai, T. (2002) E3 ubiquitin-ligase that recognizes sugar chains. *Nature* 418, 438-442.
  - (6) 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, 365-170.
  - (7) Yoshida, Y., Fukiya, K., Adachi, E., Iwai, K., Tanaka, K. Glycoprotein-specific ubiquitin-ligases recognize N-glycans in unfolded. *EMBO Rep.* in press
  - (8) Ito, T., Niwa, J., Hishikawa, N., Ishigaki, S., Doyu, M., and Sobue, G. (2003) Dorfin localizes to Lewy bodies and ubiquitylates synphilin-1. *J Biol Chem* 278, 29106-29114
  - (9) Hishikawa, N., Niwa, J., Doyu, M., Ito, T., Ishigaki, S., Hashizume, Y., and 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, 609-619
  - (10) Dai RM & Li CC (2001) Valosin-containing protein is a multi-ubiquitin chain-targeting factor required in ubiquitin-proteasome degradation. *Nat Cell Biol* 3: 740-744
  - (11) Ye Y, Meyer HH & Rapoport TA (2003) Function of the p97-Ufd1-Npl4 complex in retrotranslocation from the ER to the cytosol: dual recognition of nonubiquitinated polypeptide segments and polyubiquitin chains. *J Cell Biol* 162: 71-84
  - (12) Schroder R, Watts GD, Mehta SG, Evert BO, Broich P, Fliessbach K, Pauls K, Hans VH, Kimonis V, Thal DR. (2005) Mutant valosin-containing protein causes a novel type of frontotemporal dementia. *Ann Neurol.* 57:457-461.
- ### 2. 学会発表
- Keiji Tanaka : The Quality Control of Proteins in the Cells. workshop on "Ubiquitin in Cancer and Chronic Diseases", 2004.5.16-21, Jerusalem



(Israel)

Keiji Tanaka : Ubiquitin-Proteasome System Normal Function and Outcome of its Dysfunction in Neurodegeneration. 12th International Winter Conference on Neurodegeneration. 2004.11.29-12.2, Kyoto

Keiji Tanaka : Cellular apparatus responsible for the protein quality control in cells. The 27th Annual Meeting of the Molecular Biology Society of Japan, 2004.12.8-11, Kobe

Yoshida, Y., Mizushima, T., and Tanaka, K. : Recognition of glycosylated substrates by SCF<sup>Fbs</sup> ubiquitin ligases. Keystone Symposia Meeting entitled "Ubiquitin and Signaling" Feb 22 - Feb 27, 2005 Taos, USA

#### 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

## 研究成果の刊行に関する一覧

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
Adachi H, Katsuno M, Minamiyama M, Waza M, Sang C, Nakagomi Y, Kobayashi Y, Tanaka F, Doyu M, Inukai A, Yoshida M, Hashizume Y, Sobue G	Widespread nuclear and cytoplasmic mutant androgen receptor accumulation in spinal and bulbar muscular atrophy.	<b>Brain</b>	128	659-670	2005
Jiang YM, Yamamoto M, Kobayashi Y, Yoshihara T, Liang Y, Terao S, Takeuchi H, Ishigaki S, Katsuno M, Adachi H, Niwa J, Tanaka F, Doyu M, Yoshida M, Hashizume Y, Sobue G	Gene expression profile of motor neurons in sporadic amyotrophic lateral sclerosis.	<b>Ann Neurol</b>	57	236-251	2005
Okada Y, Shimazaki T, Sobue G, Okano H	Retinoic-acid-concentration-dependent acquisition of neural cell identity during in vitro differentiation of mouse embryonic stem cells.	<b>Dev Biol</b>	275	124-142	2004
Ishigaki S, Hishikawa N, Niwa J, Iemura S, Natsume T, Hori S, Kakizuka A, Tanaka K, Sobue G	Physical and functional interaction between Dornin and Valosin-containing protein that are colocalized in ubiquitylated inclusions in neurodegenerative disorders.	<b>J Biol Chem</b>	279	51376-51385	2004
Mitsuma N, Yamamoto M, Iijima M, Hattori N, Ito Y, Tanaka F, Sobue G	Wide range of lineages of cells expressing nerve growth factor mRNA in the nerve lesions of patients with vasculitic neuropathy: An implication of endoneurial macrophage for nerve regeneration.	<b>Neuroscience</b>	129	109-117	2004
Minamiyama M, Katsuno M, Adachi H, Waza M, Sang C, Kobayashi Y, Tanaka F, Doyu M, Inukai A, Sobue G	Sodium butyrate ameliorates phenotypic expression in a transgenic mouse model of spinal and bulbar muscular atrophy.	<b>Hum Mol Genet</b>	13	1183-1192	2004
Katsuno M, Sobue G	Polyglutamine diminishes VEGF: Passage to motor neuron death?	<b>Neuron</b>	41	677-679	2004
Watanabe H, Fukatsu H, Hisikawa N, Hashizume Y, Sobue G	Field strengths and sequences influence putaminal MRI findings in multiple system atrophy.	<b>Neurology</b>	62	671	2004

Katsuno M, Adachi H, Sobue G	Sweet relief for Huntington 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	2004
Katsuno M, Adachi H, Tanaka F, Sobue G	Spinal and bulbar muscular atrophy (SBMA): Ligand-dependent pathogenesis and therapeutic perspective.	J Mol Med	82	298-307	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	63	129-138	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	89	64-72	2004