

研究代表者：高橋良輔

研究要旨 今年度はパエル受容体(Pael-R)の in vivo でのドーパミン神経変性誘導能を明らかにするため、Pael-R を組み込んだアデノウイルスを線条体に注入し、ドーパミン神経終末から逆行性輸送によってドーパミン神経細胞体に取り込ませた。この結果、小胞体ストレスが誘導され、黒質神経細胞死が誘発された。さらにこの細胞死は Parkin ノックアウト(Parkin^{-/-})マウスと小胞体シャペロン的一种である ORP150 ノックアウトのヘテロ接合体(ORP150^{+/-})では増悪する一方、Parkin か小胞体シャペロン GRP78 の過剰発現によって軽減した。さらに Parkin^{-/-}マウスにおける Pael-R による細胞死はドーパミン合成阻害剤によって軽減した。以上の結果から、異常タンパク質の蓄積とドーパミン毒性がともに Pael-R 誘起性細胞死に関与していることが判明した。

A. 研究目的

常染色体劣性パーキンソン症（AR-JP）の病因遺伝子 Parkin はユビキチンリガーゼ(E3)であり、Parkin の機能低下により、その基質が分解されなくなり、異常蓄積することが AR-JP の原因と考えられている。これまで単離された10種類以上の基質タンパク質候補のうち、その蓄積によって AR-JP の病因が説明できる有力な基質タンパク質のひとつが Pael-R である。Pael-R はエンドセリン受容体 B 型と 50%程度の similarity を持つ G タンパク質共役型受容体でリガンド不明のオーファン受容体である。Pael-R はオリゴデンドロサイトには広く発現しているが、神経細胞では黒質ドーパミンニューロンと海馬のニューロンに比較的発現が限局している。また mRNA、たんぱく質の黒質や中脳での発現レベルは大脳などに比べても明らかに高くドーパミンニューロンでの発現レベルも高いものと考えられる。Pael-R は in vitro で Parkin によってポリユビキチン化され、細胞内でも Parkin の過剰発現で分解が促進され

る。Pael-R の分解は細胞膜ではなく、小胞体のレベルで起こっている。

小胞体は細胞内の膜タンパク質、分泌タンパク質の品質管理をするオルガネラと考えられている。新しく生合成された Pael-R のような膜タンパク質は小胞体シャペロンの助けを借りて、正しい構造に折りたたむ（フォールディングする）が、その際必ず失敗作のタンパク質（ミスフォールドタンパク質）ができる。ミスフォールドタンパク質は小胞体から細胞質に送り返され、そこで UPS によって分解される。このような小胞体でうまく折りたたまなかったミスフォールドタンパク質を分解して処理する経路を小胞体関連分解（endoplasmic reticulum-associated degradation; ERAD）と呼ぶ。Parkin は ERAD においてミスフォールド化した Pael-R を特異的にユビキチン化し、その分解を促進する作用のあることが判った。Parkin が欠損する AR-JP 患者ではミスフォールド化した Pael-R が小胞体に蓄積し、小胞体ストレスを起こす。

Pael-R を培養細胞で過剰発現させると小胞体ストレスを起こしてアポトーシスを起こすが、このアポトーシスは Parkin の過剰発現で抑制される。そのうえ、AR-JP の患者脳で Pael-R が蓄積していることも示された。さらにショウジョウバエの脳で過剰発現させるとドーパミン神経が特異的に変性脱落することが示された。本研究ではマウスにおいて Pael-R の過剰発現で黒質ドーパミン細胞死を引き起こし、細胞死の分子メカニズムを明らかにすることを目的とする。

B. 研究方法

ヒト Pael-R のコンストラクトを Takara adenovirus expression kit を用いて TPC 法によりアデノウイルスベクターに組み込み (LoxPael-R)、Cre-Lox system を用いてコンディショナルに発現する系を構築した。神経特異的発現を実現するために神経特異的な Cre の発現をドライブするアデノウイルス mSCGNCre を (大阪市大・木山博資教授より供与) 用いた。Grp78 アデノウイルス (北海道大学・小池達郎教授より供与) は細胞死の抑制実験に用いた。アデノウイルスのマウス線条体への注入は深麻酔下で、定位脳手術的手法により行い、アデノウイルスの逆行性輸送については注射後 -12 日後にレポーターとして用いた GFP アデノウイルスの蛍光を観察することによって評価した。ドーパミンの産生を抑える実験は動物を TH の阻害剤である alpha-methyl-DL-Tyrosine (AMPT) の腹腔内投与で前処理することで行った。また細胞死の評価は動物を深麻酔下で 4%パラホルムアルデヒドで固定し、組織切片を作製し、TUNEL 法および活性化カスパーゼ-3 の免疫染色により行った。Parkin^{-/-}マウスはエクソン 3 を 2 つの lox-P site ではさまれた PGK-neo カセットで置き換えることによって作製した。ORP150^{-/-}マウス、ORP150 トランスジェニックマウスはそれぞれ定法によ

り作製し、すでに金沢大学小川 智教授が発表済みのものを用いた。

C. 研究結果

定位脳手術的手法により線条体に注入した LoxPael-R と mSCGNCre は黒質に到達し、しかも神経特異的発現が確認された。コントロールとして LoxEGFP または LoxLacZ と mSCGNCre を注入した場合は黒質における ORP150 と小胞体シャペロンのレベルに差はなかったが、LoxPael-R と mSCGNCre の場合は ORP150 と小胞体シャペロンの発現レベルの著しい上昇が観察された。同じ力価の LoxPael-R と mSCGNCre を野生型マウスと Parkin^{-/-}マウスに注入したところ、Parkin^{-/-}マウスのほうでより顕著な細胞死が観察された。注入後 5 日後に TH シグナルの著明な減衰、カスパーゼ-3 の著しい活性化、7 日後には TUNEL 陽性細胞の顕著な増加が見られた。ところが LoxPael-R と mSCGNCre に加え、Grp78 アデノウイルスを共に注入すると、この細胞死は有意に抑制された。さらに ORP150^{+/+}マウス、ORP150 トランスジェニックマウスの線条体に LoxPael-R と mSCGNCre を注入したところ、前者では細胞死の表現型が増強され、後者では抑制された。さらにドーパミンが Pael-R による神経細胞死に与える影響を明らかにするため、ドーパミン合成阻害剤 AMPT を投与したところ、線条体のドーパミン含有量は 30% 以下に減少した。それとともに Pael-R による神経細胞死も著しく抑制された。

D. 考察

Pael-R の黒質における過剰発現は *in vivo* でもドーパミン神経細胞死をひきおこし、これは我々の SH-SY5Y 細胞におけるデータを裏付ける結果であった。Pael-R による細胞死が GRP78 および ORP150 の過剰発現によって抑制された結果は Pael-R による細胞死には小胞体ストレスの関与が大きいことを強く支持する。また Pael-R の線

糸体への注入が顕著な黒質ドーパミン神経細胞死を引き起こしたにもかかわらず、線糸体ニューロンはほとんど変性しなかった。このことはドーパミン神経が選択的に Pael-R 毒性に対して脆弱であることを意味する。このドーパミン神経毒性はドーパミンの産生を薬剤で抑えることによって抑制された。このメカニズムの説明の1つとしてドーパミンとその前駆体のドーパの代謝の副経路で産生されるドーパミンキノン、ドーパキノンなどが酸化ストレスとして働き組織を障害しやすい環境を作ることが考えられる。このようなキノン体が Pael-R のシステイン残基を修飾し、Pael-R のミスフォールド化をさらに促進することが培養細胞の実験ではすでに示されている。一方我々の Pael-R トランスジェニックマウスの以前の解析で Pael-R の過剰発現が線糸体でのドーパミン量を微増させるとのデータが得られている。このようなことから Pael-R の蓄積はその本来のシグナルを増強してドーパミン産生を増やし、ドーパミンからはドーパミンキノンが生成して Pael-R を修飾することによって Pael-R のミスフォールド化を進め、小胞体ストレスをさらに増悪させて、ドーパミン神経特異的細胞死が起こるのではないかと推測された。

E. 結論

アデノウイルスを用いた Pael-R のマウス線糸体での過剰発現は逆行輸送によりドーパミン神経細胞死を引き起こす。このメカニズムには小胞体ストレスとドーパミンキノンなどを含めたドーパミン毒性が深く関わっている。

F. 研究発表

1. 論文発表

1. Rezgaoui M, Susens U, Ignatov A, Gelderblom M, Glassmeier G, Franke I, Urny J, Imai Y, Takahashi R, Schaller HC. (2006) The neuropeptide head activator is a high-affinity ligand for the orphan

G-protein-coupled receptor GPR37. *J. Cell Sci.* 119, 542-9.

2. Urushitani M, Sik A, Sakurai T, Nukina N, Takahashi R, Julien JP. (2006)

Chromogranin-mediated secretion of mutant superoxide dismutase proteins linked to amyotrophic lateral sclerosis. *Nature Neurosci.*, 9, 108-18.

3. Sahara, N, Murayama M, Mizoroki T, Urushitani M, Imai Y, Takahashi R, Murata S, Tanaka K, Takashima A. (2005) In vivo evidence of CHIP up-regulation attenuating tau aggregation. *J. Neurochem.*, 94, 1254-63.

4. Yang, Y., Gehrke, S., Haque, M.E., Imai, Y., Kosek, J., Yang, L., Beal, M.F., Nishimura, I., Wakamatsu, K., Ito, S., Takahashi, R., Lu, B. (2005) Inactivation of *Drosophila* DJ-1 leads to impairments of oxidative stress response and PI3K/Akt signaling. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 102, 13670-5.

5. Kim YJ, Nakatomi R, Akagi T, Hashikawa T, Takahashi R. (2005) Unsaturated fatty acids induce cytotoxic aggregate formation of amyotrophic lateral sclerosis-linked superoxide dismutase 1 mutants. *J. Biol. Chem.*, 280, 21515-21.

2. 学会発表

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

神経変性疾患でのミクログリアの毒性転換のメカニズムに関する研究

研究代表者：澤田 誠 名古屋大学環境医学研究所 教授

研究要旨 nef 導入により形質転換したミクログリアと、遺伝子変異を持つ不活性型 nef を導入したミクログリアにおいてディファレンシャル2次元タンパク質解析法により発現タンパク質の変化を調べ、発現するタンパク質に大きな差があることを見いだした。Nef タンパク質と相互作用する因子がミクログリアの毒性転換に深く関わっていると考えるとそのタンパク質の構造分析を質量分析法により行っている。

A. 研究目的

HIV が中枢神経系に感染すると神経細胞死や神経機能障害を誘発し痴呆が生じることが知られている。このとき生じる生物反応はパーキンソン病などの神経変性疾患が発症する場合にも共通性がみられると考えられている。ミクログリアはこのときに中心的な役割を果たすと考えられているが、その詳細や実体は明らかでない。最近我々は、本来神経保護的に働くミクログリアにHIV由来 nef 遺伝子を導入することによって神経障害性の活性酸素を産生するようになること（J Biol. Chem. 277:42136-43, 2002）を見いだした。多くの神経変性疾患の場合、脳実質内で産生される活性酸素により神経障害が生じることから、nef 遺伝子導入によるミクログリアの形質転換が神経変性の引き金となっている可能性が強く考えられる。そこで、本研究では nef 遺伝子導入によるミクログリアの毒性転換の性質と nef 遺伝子産物の細胞内での作用点である細胞内因子を特定することを目的とし、nef 導入ミクログリアと非導入ミクログリアおよび変異型 nef 導入

ミクログリアに於いてそのタンパク質発現を解析した。

B. 研究方法

nef 導入により形質転換したミクログリアと、遺伝子変異を持つ不活性型 nef を導入したミクログリアにおいて

- 1) NADPH オキシダーゼ phox サブユニットに対する抗体をもちいた免疫沈降により nef タンパク質と相互作用する因子について分析した
- 2) Nef 発現細胞を PMA で刺激し、免疫蛍光染色によって Rac1 タンパク質の挙動を調べた
- 3) ディファレンシャル2次元タンパク質解析法により発現タンパク質の変化を調べた。

（倫理面への配慮）本年度は細胞のタンパク質分析を実施したため倫理的な配慮に関しては該当する事項がない。

C. 研究結果

・活性酸素産生の主体である NADPH オキシダーゼ phox サブユニットに対する抗体をもちいた免疫沈降分析から活性型 nef はすくなくとも gp91 と Rac1 サブユニットの一部に結合していることがわかった（図1）。

- ・ Nef 発現細胞を PMA で刺激したとき、Rac1 が膜へ移動することが免疫蛍光染色によって明らかになった (図 2)。
- ・ 活性型 Nef を高発現する stable clone HS1 および変異型 Nef を発現する G2A のそれぞれを 0.1 μg/ml PMA で 30 分処理して活性化したときの 2 次元電気泳動をおこない、PMA 処理により変化するタンパク質についてピックアップして質量分析装置で分析した所、PMA により活性化されたときに量的な変化を示すタンパク質が大きく異なることがわかった (図 3 および表 1)。
- ・ 活性型 Nef を高発現する stable clone HS1 および変異型 Nef を発現する G2A からタンパク質を抽出し疎水性クロマトグラフによりタンパク質の分画用出を行った所、両者で溶出パターンが大きく異なることがわかった。活性型 Nef が高発現している HS1 では対照の G2A 細胞に比べ疎水性の高い分画に多くのタンパク質ピークが見られることがわかった (図 4)。
- ・ そこで、これらについて 2 次元電気泳動を行い、発現に差が見られた 36 スポットについてゲルを切り出し、タンパク質抽出を行った (図 5)。現在、順次質量分析にて解析を行っている (図 6)。

D. 考察

今回得られた nef 導入細胞に特徴的に見られるタンパク質はミクログリアの毒性転換に重要な役割を果たしていると考えられるため、今後質量分析法、Western blot 法などで分析して同定する必要がある。また、N 末端に変異を持つ不活性型 Nef ではミクログリアの形質転換作用が見られないことから、Nef の作用もしくは細胞内因子への調節作用 (相互作用) にはそれ自身のミリス トイル化が関与すると考えられる。また、ミクログリアの毒性転換において細胞膜、もしくは細胞内膜系への相互作用も考えられ、ミクログリアでの主要な活性酸素産生酵素である NADPH オキシダーゼと nef 遺伝子産物との直接結合および活性化には重要な意味があると考えられる。

E. 結論

ミクログリアに HIV 由来 nef を導入することによ

って細胞内のたんぱく質の性質が変化し、神経細胞に対する毒性を発現することがわかった。今後解析するタンパク質の中にミクログリアの毒性転換を調節するタンパク質が存在する可能性が大いに考えられる。本研究の目的は Nef 導入によってミクログリアが毒性転換するメカニズムとその原因タンパク質の単離同定にあるため、中間段階としての達成度は十分満足できると考えている。残りの研究期間で質量分析法によりタンパク質を同定してその活性や毒性転換における役割を検討する。

F. 研究発表

1. 論文発表

- Hagihara, H., Hara, M., Tsunekawa, K., Nakagawa, Y., Sawada, M. and Nakano, K., Tonic-clonic seizures induce division of neuronal progenitor cells with concomitant changes in expression of neurotrophic factors in the brain of pilocarpine-treated mice, *Brain Res Mol Brain Res* (2005).
- Imamura, K., Hishikawa, N., Ono, K., Suzuki, H., Sawada, M., Nagatsu, T., Yoshida, M. and Hashizume, Y., Cytokine production of activated microglia and decrease in neurotrophic factors of neurons in the hippocampus of Lewy body disease brains, *Acta Neuropathol (Berl)*, 109 (2005) 141-50.
- Ito, S., Sawada, M., Haneda, M., Fujii, S., Oh-Hashi, K., Kiuchi, K., Takahashi, M. and Isobe, K., Amyloid-beta peptides induce cell proliferation and macrophage colony-stimulating factor expression via the PI3-kinase/Akt pathway in cultured Ra2 microglial cells, *FEBS Lett*, 579 (2005) 1995-2000.
- Kaneko, Y.S., Mori, K., Nakashima, A., Sawada, M., Nagatsu, I. and Ota, A., Peripheral injection of lipopolysaccharide enhances expression of inflammatory cytokines in murine locus coeruleus: possible role of increased norepinephrine turnover, *J Neurochem*, 94 (2005) 393-404.
- Nagatsu, T. and Sawada, M., Inflammatory process in Parkinson's disease: role for cytokines, *Curr Pharm Des*, 11 (2005) 999-1016.
- Nakamichi, K., Saiki, M., Sawada, M., Takayama-Ito, M., Yamamuro, Y., Morimoto, K. and Kurane, I., Rabies

Virus-Induced Activation of Mitogen-Activated Protein Kinase and NF- κ B Signaling Pathways Regulates Expression of CXC and CC Chemokine Ligands in Microglia, *J Virol*, 79 (2005) 11801-11812.

Nakamichi, K., Saiki, M., Sawada, M., Yamamuro, Y., Morimoto, K. and Kurane, I., Double-stranded RNA stimulates chemokine expression in microglia through vacuolar pH-dependent activation of intracellular signaling pathways, *J Neurochem* (2005).

2. 学会発表

1. 鈴木弘美, 外山宏, 工藤元, 旗野健太郎, 関亦克彦, 小野健治, 加藤隆司, 伊藤健吾, 澤田誠(2005): 活性型ミクログリアの In Vivo イメージング, 第9回ニューロイメージングカンファランス, 2月5日, 名古屋
2. 工藤元, 関亦克彦, 旗野健太郎, 外山宏, 鈴木弘美, 加藤隆司, 片田和廣, 澤田誠, 伊藤健吾 (2005): 「末梢性ベンゾジアゼピン受容体制剤 11C-CB148 と 11C-PK11195 の比較-動物 PET による検討-」, 核医学会中部地方会, 7月3日, 富山
3. 澤田誠, 三井健一, 鈴木弘美, 小野健治, Karl-Heinz Krause, 鈴木和男 (2005): HIV-Nef を導入したミクログリア細胞による神経細胞機能障害, 第16回日本生体防御学会学術集会, 8月4-6日
4. 鈴木弘美, 外山宏, 工藤元, 旗野健太郎, 関亦克彦, 小野健治, 中根正人, 加藤隆司, 伊藤健吾, 澤田誠: 活性型ミクログリアの In Vivo イメージング. 第14回日本バイオイメージング学会学術集会, 2005. 10. 26-28. (東京)
5. 小野健治, 澤田誠: β アドレナリン受容体を介したミクログリアの神経細胞に対する機能に関する解析. 第9回神経伝達物質研究会, 2005. 9. 10. (東京)
6. 関亦克彦, 旗野健太郎, 外山宏, 鈴木弘美, 加藤隆司, 片田和廣, 澤田誠, 伊藤健吾(2005): 末梢性ベンゾジアゼピン受容体制剤 11C-CB148 と 11C-PK11195 の比較-動物 PET による検討-, 第45回日本核医学会総会, 11月11-13日, 東京都

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

- ・発明の名称: 「金属コロイド粒子を含有する脳神経細胞内移行用キャリア」

国際出願番号: PCT/JP05/01761

国際出願日: 2005/02/07 (優先日: 2004/08/06)

【要約】ペプチドを金属コロイド粒子と結合させた分子を、実験動物へ静脈投与した結果、当該分子が脳へ移行し、さらに脳室から脳実質、特に、脳神経細胞（ニューロン）内へも移行することを見出した。金属コロイド粒子へ所望の化合物を結合させることにより、該化合物を脳神経細胞内へ移行させることが可能である。

- ・発明の名称: 「脳移行性細胞」

出願番号: 特願 2005-246256

出願日: 2005/8/26

【要約】脳移行性配列を発現させた酵母や細胞を脳移行性に変換する技術について。

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

図1 NADPH オキシダーゼサブユニットに対する抗体で免疫沈降した分画の Nef タンパク質の存在

Pull down assay of Nef with Phox protein antibodies

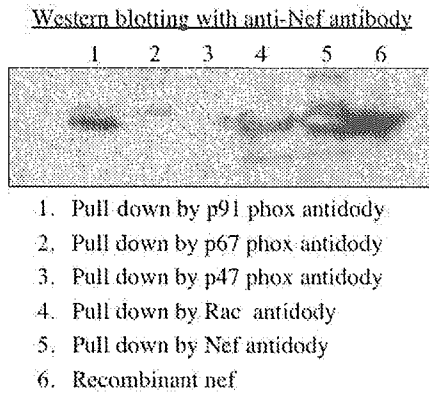


図2 PMA 刺激をおこなった nef 発現細胞における Rac1 タンパク質の細胞内局在の変化

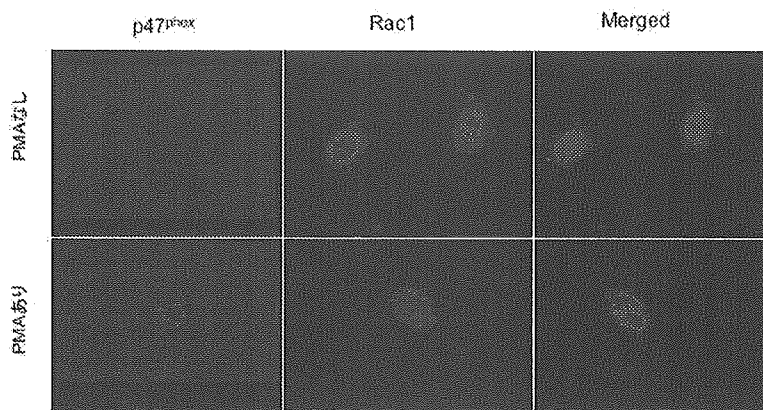


図3 活性型 Nef を高発現する stable clone HS1 を PMA で活性化したときのタンパク質の2次元電気泳動による比較 (タンパク質ディスプレイ)



表1 活性型 Nef を高発現する stable clone HS1 (上) および変異型 Nef を発現する G2A (下) のそれぞれを PMA で活性化したときのタンパク質発現量変化の2次元電気泳動による比較

1440 HSP70	+ 1.99	Stress protein
1444 HSP70	+ 1.95	Stress protein
1592 Lamin A	+ 1.95	核膜タンパク質
2231 proliferating cell nuclear antigen	+ 1.77	細胞周期関連核タンパク質
2430 Timm20	+ 2.01	translocase of inner mitochondrial msa
2509 eukaryotic translation elongation factor 1 beta 2	+ 1.89	翻訳伸張因子
2854 Transcription factor, BTF3 (RNA polymerase B transcription factor 2)	+ 1.77	転写因子
1381 propionyl CoA-carboxylase alpha-subunit	- 1.75	脂肪酸の μ -酸化
1392 similar to GMP synthase	- 2.39	GMP合成酵素
1978 WD repeat domain 1	- 1.91	WD繰り返しドメイン (actin結合性)
1491 Diat protein (dihydrolipoamide S-acetyltransferase)	+ 1.73	糖代謝系酵素
1633 HYPOTHETICAL RNA BINDING PROTEIN RDA288 homolog	+ 1.85	RNA結合タンパク質
1954 elongation factor 2	- 1.79	翻訳伸張因子
2016 similar to Eno1 protein	- 2.17	解糖系酵素
2283 aldehyde dehydrogenase 8, subfamily A1	- 1.55	GABA生成酵素
2589 26S proteasome-associated pad1 homolog	- 1.85	プロテアソーム関連
spot number	刺激/対応	分類
637 BiP	+ 1.51	Stress protein
1048 HSP70	+ 1.50	Stress protein
1051 HSP8	+ 1.68	Stress protein
1054 HSP8	+ 1.81	Stress protein
1321 HSP60	+ 1.80	Stress protein
1368 Chaperonin subunit 2	+ 1.84	Stress protein
1491 HSP70	+ 1.85	Stress protein
1851 vimentin	+ 1.83	細胞骨格タンパク質
2522 proteasome (prosome, macropain) 26S subunit, ATPase 3	+ 1.87	プロテアソーム関連
2529 peroxiredoxin 1	+ 1.60	抗酸化タンパク質
2658 transgelin-2	+ 1.97	細胞骨格タンパク質関連
1552 Tyki protein	+ 1.79	チロシンキナーゼ
1588 Ubiquinol-cytochrome c reductase complex core protein I, mitochondrial precursor	- 5.51	ミトコンドリアタンパク質
1690 vimentin	- 1.78	細胞骨格タンパク質
1710 β -actin	- 1.67	細胞骨格タンパク質
1854 actin-like	- 1.63	細胞骨格タンパク質
1889 annexin A4	- 1.69	多機能性タンパク質
1896 aldo-keto reductase family 1, member A4	- 1.58	脂質代謝
2335 similar to Glutathione S-transferase Mu 1	- 2.48	脂質過酸化物の代謝に関連する抗酸
2390 Electron transfer flavoprotein beta-subunit	- 2.28	ミトコンドリア電子伝達系
2392 prohibitin	- 1.67	乳ガン抑制遺伝子
2416 proteasome (prosome, macropain) subunit, alpha type	+ 1.54	プロテアソーム関連
2477 huntingtin interacting protein-2	- 1.73	ハンチンチン関連
2487 cathepsin G	- 1.61	リソソームプロテアーゼ
2550 peroxiredoxin 3	- 1.77	抗酸化タンパク質
2681 LMP-2	- 1.63	プロテアソーム関連 (HLA抗原分解)
2718 J4-3-3 zeta	+ 1.65	14-3-3ファミリー

図4 活性型 Nef を高発現する stable clone HS1 および変異型 Nef を発現する G2A の疎水性クロマトグラフによるタンパク質ディスプレイ

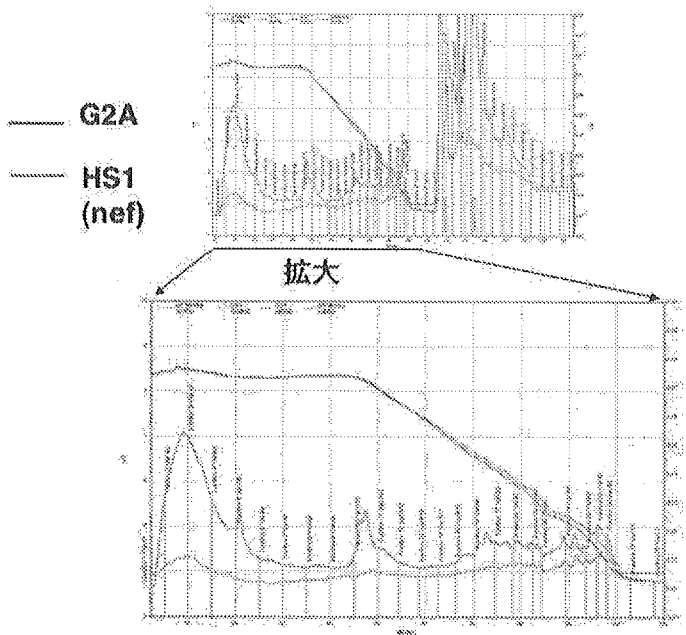


図5 活性型 Nef を高発現する stable clone HS1 に特異的に発現するスポットの分析

Nefと変異型Nef導入によって発現が大きく変化するタンパク質のうち36スポットをピックアップした

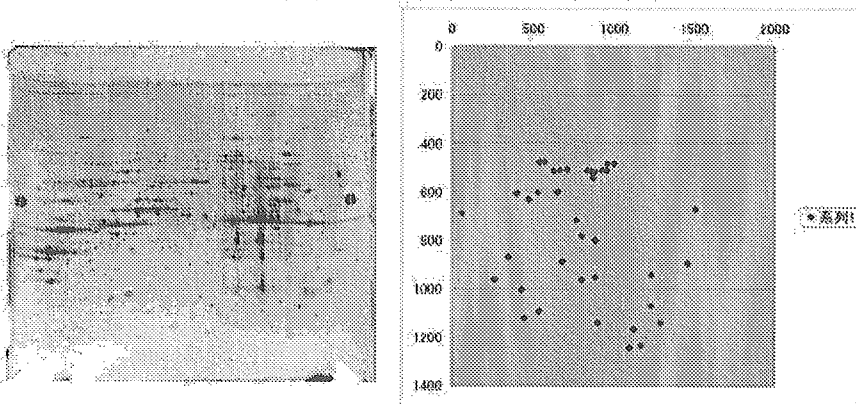
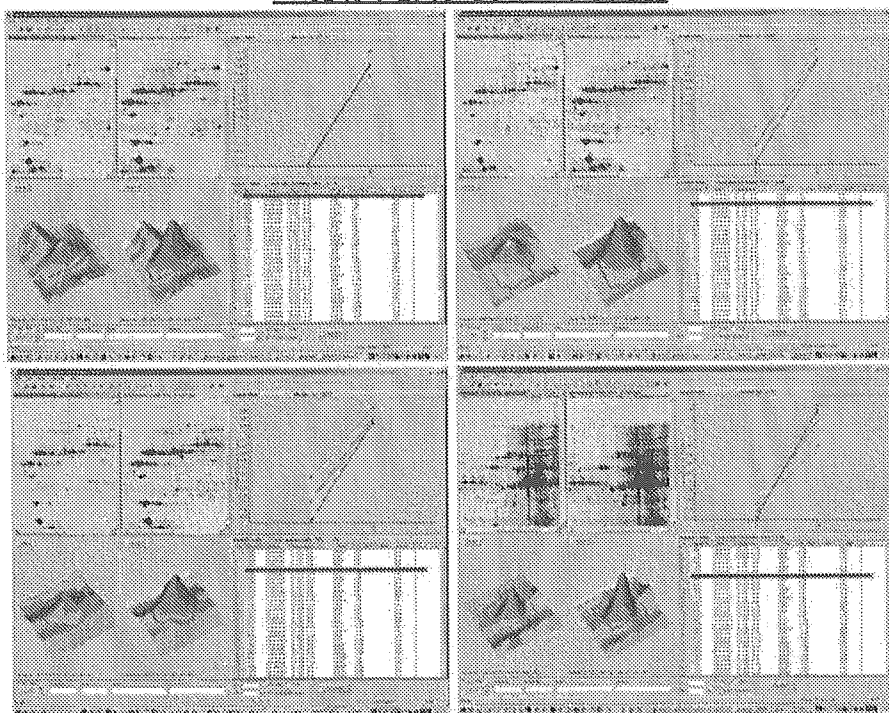
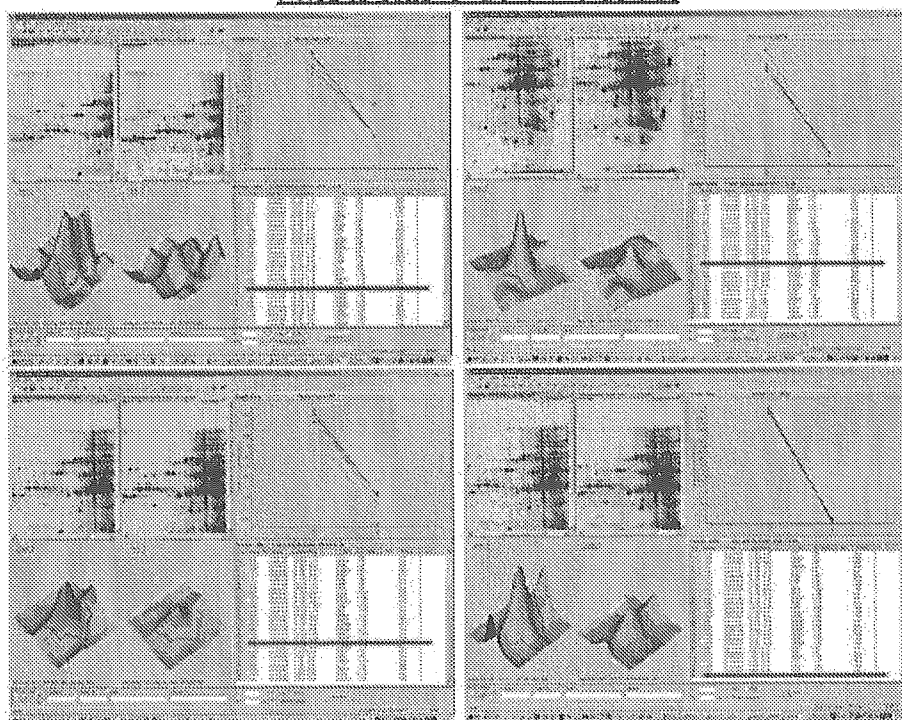


図6 nef 発現で変化するマイクログリアタンパク質

Nef発現で増大するタンパク質の例



Nef発現で減少するタンパク質の例



研究成果の刊行に関する一覧表

研究成果の刊行に関する一覧表

書籍

著者氏名	論文タイトル名	書籍全体の編集者名	書籍名	出版社名	出版地	出版年	ページ
Tanaka, K., Yashiroda, H., and Tanahashi, N.	Preparation of proteasomes, in Cell Biology	Tanaka, K.	A Laboratory Handbook" (Ed. by J. E. Celis) 3rd edition.	Academic Press	New York	2005	91-96
Hirano, Y., Murata, S. and Tanaka, K.	Large- and small-scale purification of mammalian 26S proteasomes	Tanaka, K.	Methods in Enzymology 399 (Ubiquitin and protein degradation, Part B)	Academic Press	New York	2005	227-240
Tanaka, K., Yashiroda, H., and Murata, S.	Ubiquity and diversity of the proteasome system.		In "Protein Degradation" (Eds. By Mayer, R. J., Ciechanover, A., and Rechsteiner, M.)	Wiley-VCH Verlag GmbH, Weinheim	Germany	2006	in press
王 華芹 高橋良輔	家族性 PD から孤発性 PD の病態解明にむけてー Parkin 不活性化による神経変性の分子機構	柳澤信夫他	Annual Review 神経 2006	中外医学社	日本	2006	1-8
高橋良輔 王 華芹 小林芳人	プログラム細胞死と神経変性疾患	辻本賀英	細胞死・アポトーシス 集中マスター	羊土社	日本	2006	100-110

研究成果の刊行に関する一覧表

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
Moore DJ, Zhang L, Troncoso J, Lee MK, Hattori N, Mizuno Y, Dawson TM, Dawson VL	Association of DJ-1 and parkin mediated by pathogenic DJ-1 mutations and oxidative stress	Hum Mol Genet	14	71-84	2005
Clarimon J, Johnson J, Djaldetti R, Hernandez D, Hattori N, Sroka H, Barhom Y, Singleton A	Mutation of the Parkin gene in a Persian family: Clinical progression over a 40-year period	Mov Disord	20	887-890	2005
Suzuki M, Hattori N, Orimo S, Fukumitsu N, Abo M, Kono Y, Sengoku R, Kurita A, Honda H, Inoue K	Preserved myocardial [(123)I]metaiodobenzylguanidine uptake in autosomal recessive juvenile parkinsonism: First case report	Mov Disord	20	634-636	2005
Noda K, Kitami T, Gai WP, Chegini F, Jensen PH, Fujimura T, Murayama K, Tanaka K, Mizuno Y, Hattori N	Phosphorylated IkappaBalpha is a component of Lewy body of Parkinson's disease	Biochem Biophys Res Commun	331	309-317	2005
Machida Y, Chiba T, Takayanagi A, Tanaka Y, Asanuma M, Ogawa N, Koyama A, Iwatsubo T, Ito S, Jansen PH, Shimizu N, Tanaka K, Mizuno Y, Hattori N	Common anti-apoptotic roles of parkin and alpha-synuclein in human dopaminergic cells	Biochem Biophys Res Commun	332	233-240	2005
Fukae J, Takanashi M, Kubo S, Nishioka K, Nakabeppu Y, Mori H, Yoshikuni M, Hattori N	Expression of 8-oxoguanine DNA glycosylase (OGG1) in Parkinson's disease and related neurodegenerative disorders	Acta Neuropathol	109	256-262	2005
Fukae J, Kubo S, Hattori N, Komatsu K, Kato M, Aoki M, Mizuno Y	Hoarseness due to bilateral vocal cord paralysis as an initial manifestation of familial amyotrophic lateral sclerosis	Amyotrophic lateral sclerosis	6	122-124	2005
Li Y, Tomiyama H, Sato K, Hatano Y, Yoshino H, Atsumi M, Kitaguchi M, Sasaki S, Kawaguchi S, Miyajima H, Toda T, Mizuno Y, Hattori N.	Clinicogenetic study of PINK1 mutations in autosomal recessive early-onset parkinsonism	Neurology	64	1955-1957	2005
Sato S, Mizuno Y, Hattori N.	Urinary 8-hydroxydeoxyguanosine levels as a biomarker for progression of Parkinson disease	Neurology	64	1081-1083	2005
Li G, Kitami T, Wang M, Mizuno Y, Hattori N:	Geographic and ethnic differences in frequencies of two polymorphisms (D/N394 and L/I272) of the <i>parkin</i> gene in sporadic Parkinson's disease.	Parkinsonism Relat Disord	11	485-491	2005
Kubo S, Nemami VM, Chalkley RJ, Anthony MD, Hattori N, Mizuno Y, Edwards RH, Fortin DL	A combinatorial code for the interaction of a-synuclein with membranes.	J Biol Chem	280	31664-31672	2005
Inzelberg R, Hattori N, Mizuno Y	Dopaminergic dysfunction in unrelated, asymptomatic carriers of a single parkin mutation	Neurology	65	1843	2005

Orimo S, Amino T, Yokochi M, Kojo T, Uchihara T, Takahashi A, Wakabayashi K, Takahashi H, <u>Hattori N</u> , Mizuno Y.:	Preserved cardiac sympathetic nerve accounts for normal cardiac uptake of MIBG in PARK2	Mov Disord	20	1350-1353	2005
Lu CS, Simons EJ, Wu-Chou YH, Fonzo AD, Chang HC, Chen RS, Weng YH, Rohe CF, Breedveld GJ, <u>Hattori N</u> , Gasser T, Oostra BA, Bonifati V	The LRRK2 I2012T, G2019S, and I2020T mutations are rare in Taiwanese patients with sporadic Parkinson's disease	Parkinsonism Relat Disord	11	521-522	2005
Ide M, Yamada K, Toyota T, Iwayama Y, Ishitsuka Y, Minabe Y, Nakamura K, <u>Hattori N</u> , Asada T, Mizuno Y, Mori N, Yoshikawa T: Genetic association analyses of PHOX2B and ASCL1 in neuropsychiatric disorders: evidence for association of ASCL1 with Parkinson's disease.	Genetic association analyses of PHOX2B and ASCL1 in neuropsychiatric disorders: evidence for association of ASCL1 with Parkinson's disease	Hum Genet	117	520-527	2005
Kitami MI, Kitami T, Nagahama M, Tagaya M, Hori S, Kakizuka A, Mizuno Y, <u>Hattori N</u>	Dominant-negative effect of mutant valosin-containing protein in aggresome formation	FEBS Lett	580	474-478	2006
Nishioka K, Hayashi S, Farrer MJ, Singleton AB, Yoshino H, Imai H, Kitami T, Sato K, Kuroda R, Tomiyama H, Mizoguchi K, Murata M, Toda T, Imoto I, Inazawa J, Mizuno Y, <u>Hattori N</u>	Clinical heterogeneity of alpha-synuclein gene duplication in Parkinson's disease	Ann Neurol	59	298-309	2006
Matsuda, N., Azuma, K., Saijo, M., Iemura, S-I., Hioki, Y., Natsume, T., Chiba, T., <u>Tanaka, K.</u> and Tanaka, K.	DDB2, the xeroderma pigmentosum group E gene product, is directly ubiquitylated by Cullin 4A-based ubiquitin ligase complex.	DNA Repair	4	537-545	2005
Yoshida, Y., Fukiya, K., Adachi, E., Iwai, K., <u>Tanaka, K.</u>	Glycoprotein-specific ubiquitin-ligases recognize N-glycans in unfolded substrates.	EMBO Rep.	6	239-244	2005
Jana, NR., Dikshit, P., Goswami, A., Kotliarova, S., Murata, S., <u>Tanaka, K.</u> and Nukina, N.	Co-chaperone CHIP associates with expanded polyglutamine protein and promotes their degradation by proteasomes.	J Biol Chem.	280	11635-11640	2005
Sugasawa, K., Okuda, Y., Saijo, M., Nishi, R., Matsuda, N., Chu, G., Mori, T., Iwai, S., Tanaka, K., <u>Tanaka, K.</u> , and Hanaoka, F.	UV-induced ubiquitylation of XPC protein mediated by UV-DDB-ubiquitin ligase complex.	Cell	121	387-400	2005
Komatsu, M., Waguri, S., Ueno, T., Murata, S., Tanida, I., Ezaki, E., Mizushima, N., Ohsumi, Y., Uchiyama, Y., Kominami, E., <u>Tanaka, K.</u> , and Chiba, T.	Impairment of starvation-induced and constitutive autophagy in <i>Atg7</i> -deficient mice.	J. Cell Biol.	169	425-434	2005
Noda, K., Kitami, T., Gai, WP., Chegini, F., Jensen, PH., Fujimura, T., Murayama, K., <u>Tanaka, K.</u> , Mizuno, Y., Hattori, N.	Phosphorylated I κ B α is a component of Lewy body of Parkinson's disease.	Biochem Biophys Res Commun.	331	309-317.	2005

Machida, Y., Chiba, T., Takayanagi, A., Tanaka, Y., Asanuma, M., Ogawa, N., Koyama, A., Iwatsubo, T., Ito, S., Jansen, PH., Shimizu, N., <u>Tanaka, K.</u> , Mizuno, Y., Hattori, N.	Common anti-apoptotic roles of parkin and alpha-synuclein in human dopaminergic cells.	Biochem Biophys Res Commun.	332	233-240	2005
Sahara, N., Murayama, M., Mizoroki, T., Urushitani, M., Imai, Y., Takahashi, R., Murata, S., <u>Tanaka, K.</u> and Takashima, A.	In vivo evidence of CHIP up-regulation attenuating tau aggregation.	J Neurochem.	94	1254-1263	2005
Hirano, Y., Hendil, K.B., Yashiroda, H., Iemura, S., Nagane, R., Hioki, Y., Natsume, T., <u>Tanaka, K.</u> and Murata, S.	A heterodimeric complex that promotes the assembly of mammalian 20S proteasomes,	Nature	437	1381-1385	2005
Sato, S., Chiba, T., Sakata, E., Kato, K., Mizuno, Y., Hattori, N, and <u>Tanaka, K.</u>	14-3-3 η is a novel regulator of parkin ubiquitin-ligase.	EMBO J.	25	211-221	2006
Matsuda, N., Kitami, T., Suzuki, T., Mizuno, Y., Hattori, N., and <u>Keiji Tanaka.</u>	Diverse effects of pathogenic mutations of Parkin that catalyzes multiple mono-ubiquitylation in vitro.	J. Biol. Chem.	281	3204-3209	2006
Kumanomidou, T., Mizushima, T., Komatsu, M., Suzuki, A., Tanida, I., Sou, Y., Ueno, T., Kominami, E., <u>Tanaka, K.</u> , and Yamane, T.	The Crystal Structure of Human Atg4b, a Processing and Deconjugating Enzyme for Autophagosome-forming Modifiers.	J. Mol. Biol.	355	612-618	2006
Iwata, J., Ezaki, J., Komatsu, M., Yokota, S., Ueno, T., Tanida, I., Chiba, T., <u>Tanaka, K.</u> , and Kominami, K.	Excess peroxisomes are degraded by autophagic machinery in mammals	J. Biol. Chem.	281	4035-4041	2006
Kim Y-J., Nakatomi, R., Akagi, T., Hashikawa, T., <u>Takahashi, R.</u>	Unsaturated fatty acids induce Cytotoxic aggregate formation of amyotrophic lateral sclerosis-linked Superoxide dismutase 1 mutants.	Journal of Biological Chemistry	280(22)	21515-21521	2005
Yang Y., Gehrke, S., Haque, ME., Imai, Y., Kosek, J., Yang, L., Beal, MF., Nishimura, I., Wakamatsu, K., Ito, S., <u>Takahashi, R.</u> , Lu, B.	Inactivation of Drosophila DJ-1 leads to impairments of oxidative stress response and phosphatidylinositol 3-kinase/Akt signaling.	Proc Natl Acad Sci U S A.	102(38)	13670-13675	2005
Urushitani, M., Sik, A., Sakurai, T., Nukina, N., <u>Takahashi, R.</u> , Julien, JP.	Chromogranin-mediated secretion of mutant superoxide dismutase proteins linked to amyotrophic lateral sclerosis.	Nat Neurosci	9(1)	108-118	2006
Rezgaoui, M., Susens, U., Ignatov, A., Gelderblom, M., Glassmeier, G., Franke, I., Urny, J., Imai, Y., <u>Takahashi, R.</u>	The neuropeptide head activator is a high-affinity ligand for the orphan G-protein-coupled receptor GPR37.	J Cell Sci.	119(3)	542-549	2006

Shaller, HC.					
Misawa, H., Nakata, K., Matsuura, J., Moriwaki, Y., Kawashima, K., Shimizu, T., Shirasawa, T., <u>Takahashi, R.</u>	Conditional knockout of Mn superoxide dismutase in postnatal motor neurons reveals resistance to mitochondrial generated superoxide radicals	Neurobil Dis			in press
金 然正, <u>高橋良輔</u>	コンフォメーション病のしくみ	BIO Clinica	20(7)	80-84	2005
<u>高橋良輔</u>	パーキンソン病の分子生物学	脳神経外科速報	15(5)	445-452	2005
<u>高橋良輔</u>	ユビキチンプロテアソーム蛋白質分解系と神経変性疾患治療戦略	神経治療学	22(6)	697-702	2005
<u>高橋良輔</u>	アポトーシス研究の現状と今後の展望	呼吸と循環	54(1)	7-11	2006
<u>高橋良輔</u> , 館野美成子	AMPA 受容体と変異 SOD1 タンパク質異常	CLINICAL NEUROSCIENCE	24(2)	226-229	2006
Hagihara, H., Hara, M., Tsunekawa, K., Nakagawa, Y., <u>Sawada, M.</u> and Nakano, K.	Tonic-clonic seizures induce division of neuronal progenitor cells with concomitant changes in expression of neurotrophic factors in the brain of pilocarpine-treated mice	Brain Res Mol Brain Res	139	258-266	2005
Imamura, K., Hishikawa, N., Ono, K., Suzuki, H., <u>Sawada, M.</u> , Nagatsu, T., Yoshida, M. and Hashizume, Y.	Cytokine production of activated microglia and decrease in neurotrophic factors of neurons in the hippocampus of Lewy body disease brains	Acta Neuropathol (Berl)	109	141-150	2005
Ito, S., <u>Sawada, M.</u> , Haneda, M., Fujii, S., Oh-Hashi, K., Kiuchi, K., Takahashi, M. and Isobe, K.	Amyloid-beta peptides induce cell proliferation and macrophage colony-stimulating factor expression via the PI3-kinase/Akt pathway in cultured Ra2 microglial cells	FEBS Lett	579	1995-2000	2005
Kaneko, Y.S., Mori, K., Nakashima, A., <u>Sawada, M.</u> , Nagatsu, I. and Ota, A.	Peripheral injection of lipopolysaccharide enhances expression of inflammatory cytokines in murine locus coeruleus: possible role of increased norepinephrine turnover	J Neurochem	94	393-404	2005
Nagatsu, T. and Sawada, M.	Inflammatory process in Parkinson's disease: role for cytokines	Curr Pharm Des	11	999-1016	2005
Nakamichi, K., Saiki, M., <u>Sawada, M.</u> , Takayama-Ito, M., Yamamuro, Y., Morimoto, K. and Kurane, I.	Rabies Virus-Induced Activation of Mitogen-Activated Protein Kinase and NF- κ B Signaling Pathways Regulates Expression of CXC and CC Chemokine Ligands in Microglia	J Virol	79	11801-11812	2005
Nakamichi, K., Saiki, M., <u>Sawada, M.</u> , Yamamuro, Y., Morimoto, K. and Kurane, I.	Double-stranded RNA stimulates chemokine expression in microglia through vacuolar pH-dependent activation of intracellular signaling pathways	J Neurochem	95	273-283	2005

研究成果の刊行物・別刷り

- Sone, T., Saeki, Y., Toh-e, A., and Yokosawa, H. (2004). Sem1p is a novel subunit of the 26 S proteasome from *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.* **279**, 28807–28816.
- Sudol, M., and Hunter, T. (2000). NeW wrinkles for an old domain. *Cell* **103**, 1001–1004.
- Thrower, J. S., Hoffman, L., Rechsteiner, M., and Pickart, C. M. (2000). Recognition of the polyubiquitin proteolytic signal. *EMBO J.* **19**, 94–102.
- Verma, R., Aravind, L., Oania, R., McDonald, W. H., Yates, J. R., 3rd, Koonin, E. V., and Deshaies, R. J. (2002). Role of Rpn11 metalloprotease in deubiquitination and degradation by the 26S proteasome. *Science* **298**, 611–615.
- Verma, R., Chen, S., Feldman, R., Schieltz, D., Yates, J., Dohmen, J., and Deshaies, R. J. (2000). Proteasomal proteomics: identification of nucleotide-sensitive proteasome-interacting proteins by mass spectrometric analysis of affinity-purified proteasomes. *Mol. Biol. Cell* **11**, 3425–3439.
- Verma, R., McDonald, H., Yates, J. R., 3rd, and Deshaies, R. J. (2001). Selective degradation of ubiquitinated Sic1 by purified 26S proteasome yields active S phase cyclin-Cdk. *Mol. Cell* **8**, 439–448.
- Verma, R., Oania, R., Graumann, J., and Deshaies, R. J. (2004). Multiubiquitin chain receptors define a layer of substrate selectivity in the ubiquitin-proteasome system. *Cell* **118**, 99–110.

[15] Large- and Small-Scale Purification of Mammalian 26S Proteasomes

By YUKO HIRANO, SHIGEO MURATA, and KEIJI TANAKA

Abstract

The 26S proteasome is an ATP-dependent protease known to collaborate with ubiquitin, whose polymerization acts as a marker for regulated and enforced destruction of unnecessary proteins in eukaryotic cells. It is an unusually large multi-subunit protein complex, consisting of a central catalytic machine (called the *20S proteasome* or *CP/core particle*) and two terminal regulatory subcomplexes, termed *PA700* or *RP/regulatory particle*, that are attached to both ends of the central portion in opposite orientations to form an enzymatically active proteasome. To date, proteolysis driven by the ubiquitin-proteasome system has been shown to be involved in a diverse array of biologically important processes, such as the cell cycle, immune response, signaling cascades, and developmental programs; and the field continues to expand rapidly. Whereas the proteasome complex has been highly conserved during evolution because of its fundamental roles in cells, it has also acquired considerable diversity in multicellular organisms, particularly in mammals, such as immunoproteasomes, PA28, S5b, and various alternative splicing forms of S5a (Rpm 10). However, the details of the ultimate pathophysiological roles

of mammalian proteasomes have remained elusive. This article focuses on methods for assay and purification of 26S proteasomes from mammalian cells and tissues.

Introduction

The 26S proteasome is a protein-destroying apparatus capable of degrading a variety of cellular proteins in a rapid and timely fashion. Most, if not all, substrates are modified by ubiquitin before their degradation by the 26S proteasome. The covalent attachment of multiple ubiquitins on target proteins is catalyzed by a multienzyme cascade, consisting of the E1 (Ub-activating), E2 (Ub-conjugating), and E3 (Ub-ligating) enzymes (Hershko and Ciechanover, 1998; Pickart, 2001). The resulting polyubiquitin chain serves as a signal for trapping the target protein, and, consequently, the substrate is destroyed after proteolytic attack by the 26S proteasome (Baumeister *et al.*, 1998; Coux *et al.*, 1996). The 26S proteasome is a dumbbell-shaped particle, consisting of a centrally located, cylindrical 20S proteasome (alias core particle, CP) that functions as a catalytic machine and two large terminal PA700 modules (alias 19S complex, or regulatory particle, RP) attached to the 20S core particle in opposite orientations.

The 20S proteasome/CP is a complex with a sedimentation coefficient of 20S and a molecular mass of approximately 750 kDa (see a model of Fig. 1). It is a barrel-like particle formed by the axial stacking of four rings made up of two outer α -rings and two inner β -rings, which are each made up of seven structurally similar α - and β -subunits, respectively, being associated in the order of $\alpha_{1-7}\beta_{1-7}\beta_{1-7}\alpha_{1-7}$. The overall architectures of the highly ordered structures of yeast (*Saccharomyces cerevisiae*) and mammalian (bovine) 20S proteasomes are indistinguishable, as demonstrated by x-ray crystallography (Groll *et al.*, 1997; Unno *et al.*, 2002). Three of the β -type subunits of each inner ring have catalytically active threonine residues at their N-terminus, all of which show N-terminal nucleophile (Ntn) hydrolase activity, indicating that the proteasome is a novel threonine protease, differing from the known protease families categorized as seryl-, thiol-, carboxyl-, and metalloproteases. The catalytic β_1 , β_2 , and β_5 subunits correspond to caspase-like/PGPH (peptidylglutamyl-peptide hydrolyzing), trypsin-like, and chymotrypsin-like activities, respectively, which are capable of cleaving peptide bonds at the C-terminal side of acidic, basic, and hydrophobic amino acid residues, respectively. Two copies of these three active sites face the interior of the cylinder and reside in a chamber formed by the centers of the abutting β rings.

PA700/RP contains approximately 20 distinct subunits of 25–110 kDa, which can be classified into two subgroups: a subgroup of six ATPases,

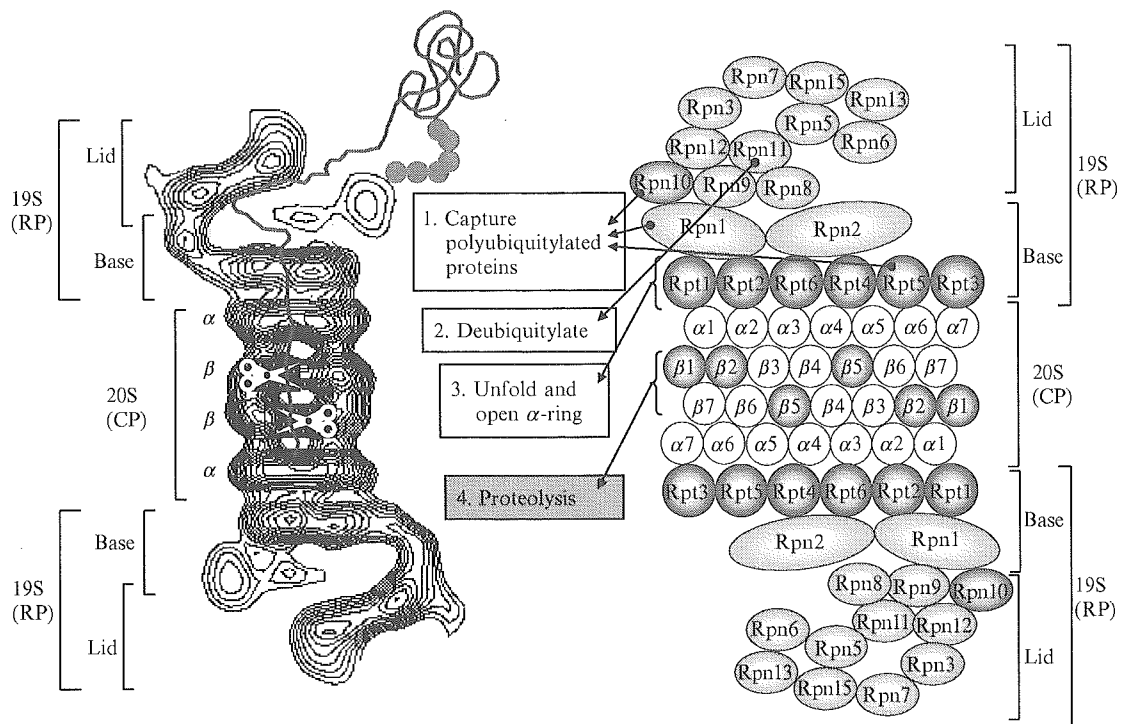


FIG. 1. Molecular organization of 26S proteasomes. (Left panel) Averaged image of the 26S proteasome complex of rat based on electron micrographs. The α and β rings of the 20S proteasome are indicated. Photograph kindly provided by W. Baumeister. (Right panel) Schematic drawing of the subunit structure. CP, core particle (alias 20S proteasome); RP, 19S regulatory particle (alias PA700) consisting of the base and lid subcomplexes; Rpn, RP non-ATPase; Rpt, RP triple-ATPase. Note that relative positions of 19S subunits have not been established. (See color insert.)

numbered from Rpt1 to Rpt6 (i.e., RP triple ATPases 1–6), that are structurally similar and have been highly conserved during evolution, and a subgroup of more than 15 heterogeneous subunits, numbered from Rpn1 to Rpn15 (i.e., RP non-ATPases 1–15), that are structurally unrelated to the members of the ATPase family (Tanaka *et al.*, 2005). The PA700/RP structurally consists of two subcomplexes, known as “base” and “lid,” which, in the 26S proteasome, correspond to the portions of PA700 proximal and distal, respectively, to the 20S proteasome (Glickman *et al.*, 1998). The base is made up of six ATPases (Rpt1–Rpt6) and two large regulatory components Rpn1 and Rpn2, functioning as presumptive receptor(s) of ubiquitin-like proteins, and the lid contains multiple non-ATPase subunits (Rpn3–Rpn15). The base-complex is thought to bind in an ATP-dependent manner to the outer α -ring of the central 20S proteasome. The six ATPases in this base-complex are assembled into one ring complex. The main role of the ATPase ring is to supply energy continuously for the degradation