

合（平均値：15.6，SD：1.8），平均値よりさらに2SD以上の低値を示していた。

以上から，BADSはPDの遂行機能障害の評価に有用であり，また，検査課題が日常生活場面に近いため，今後，PDの遂行機能障害のリハビリテーションにも応用できる可能性があると考えられた。FABについてはBADSのように得点の標準化がなされておらず，年齢で補正された評価も困難であるが，簡便性を生かし，スクリーニング検査として有用である可能性があると考えた。

本研究の一部は，文部科学省私立大学学術研究高度化推進事業，日本大学・学術フロンティア推進事業「認知・記憶・行動の脳内メカニズム」の助成を受けた。

まとめ

1. 明らかな痴呆を認めない Yahr II・III 度の PD 患者では BADS による評価で 10 例中 3 例（30%）に明らかな遂行機能障害を認めた。罹病期間，初発年齢，検査時年齢，MMSE は障害群と非障害群との間に差を認めなかった。
2. BADS 得点と FAB 得点の間に有意な相関を認めた。

文献

- 1) Dubois B, et al.: J Neurol 244: 2-8, 1997
- 2) 金澤 章：パーキンソン病，認知と精神医学的側面。（山本光利：編）．中外医学社，pp.182-196，2003
- 3) 坂爪一幸，ほか：高次脳機能障害のリハビリテーション Ver.2．臨床リハ別冊：260-264，2004
- 4) 鹿島晴雄，ほか：BADS 遂行機能障害症候群の行動評価日本版，新興医学出版社，pp.1-30，2003
- 5) Dubois B, et al.: Neurology, 55:1621-1626, 2000
- 6) 高木理恵子，ほか：脳神経 54:897-902，2002
- 7) 原 元彦，ほか：リハ医学 42：S149，2005
- 8) 田淵 肇，ほか：高次脳機能障害のリハビリテーション Ver.2．臨床リハ別冊：176-181，2004
- 9) Lezak MD, et al.: Neuropsychological Assessment, 4th ed. Oxford University Press, pp. 35-37, 2004
- 10) 金澤 章，ほか：臨床神経 41：167-172, 2001
- 11) Taylor AE, et al.: Brain 109:845-883, 1986
- 12) Lewis SJG, et al.: J Neurosci 23:6351-6356, 2003
- 13) Foltynie T, et al.: Brain 127: 550-560, 2004

パーキンソン病および加齢により髄液中 α -synuclein 濃度は減少する

徳田隆彦¹⁾、水野敏樹¹⁾、Omar MA El-Agnaf²⁾、Sultan Salem³⁾、David Allsop³⁾、中川正法¹⁾

¹⁾京都府立医科大学大学院医学研究科神経病態制御学、²⁾Dept. of Biochemistry, United Arab Emirates University、³⁾Dept. of Biological Science, Lancaster University

研究趣旨

α -synuclein の異常凝集および蓄積がパーキンソン病の発症機序においてきわめて重要な病的過程であることが明らかになっている。今回我々はヒト髄液中の α -synuclein を高感度に測定できる ELISA 系を開発し、特発性パーキンソン病患者群と対照患者群とで髄液中 α -synuclein を定量して比較検討した。対照患者群では、髄液中 α -synuclein 濃度は加齢とともに減少した。一方、特発性パーキンソン病患者と対照患者群との比較では、髄液中 α -synuclein 濃度はパーキンソン病患者群で有意に減少していた。今回、少数例での検討ながら、パーキンソン病患者群で髄液中 α -synuclein 濃度が有意に減少していたことは、髄液中 α -synuclein はパーキンソン病の臨床診断マーカーとして利用できる可能性があることを示している。

はじめに

近年の生化学的及び分子遺伝学的研究によって、 α -synuclein が Lewy 小体の主たる構成成分であること(1)、および α -synuclein 遺伝子の点突然変異は家族性パーキンソン病の原因になることが明らかにされている(2-4)。これらの事実は、 α -synuclein がパーキンソン病の発症機序において重要な分子であることを示している。また最近、 α -synuclein 遺伝子の triplication の家系では早期発症で重症のパーキンソン症状を呈すること(5)、一方 α -synuclein 遺伝子の duplication の家系は高齢発症で特発性パーキンソン病に類似した臨床症状を呈すること(6,7)が明らかにされている。このことは、正常の α -synuclein でも過剰に発現するとパーキンソン病の原因になり、また α -synuclein の発現量

が遺伝性パーキンソン病家系の患者における臨床的な重症度を決定することを示唆している。以上のようなこれまでの知見からは、非遺伝性の特発性パーキンソン病患者においても、その生体試料（髄液および血清）中の α -synuclein 蛋白量が正常者とどのように異なっているのかということは興味のある検討課題である。

α -synuclein は小胞体へ targeting されるシグナル配列を欠如しているために、従来は細胞内のみが存在する蛋白質であると考えられてきた。そのために、これまでにヒトの髄液および血清中の α -synuclein 量を定量した報告は多くはない。最近の報告では、正常者およびパーキンソン病患者の髄液・血漿中には可溶性の α -synuclein が存在することが、免疫沈降法と immunoblotting 法を組み合わせ

せた方法により示されている(8-10)。この様な従来の報告では、髄液・血清中の α -synuclein 濃度はパーキンソン病患者と対照者で有意差はないとする報告が多い(9,10)。しかしこれまでの報告は少数例の検討であり、また α -synuclein の定量法が immunoblotting によって得られた α -synuclein と考えられる immunoreactive band を densitometry によって定量する方法を用いており正確さに欠けている。今回我々はヒト髄液中の α -synuclein を高感度に測定できる enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)系を開発し、ヒトの生体試料中で α -synuclein を正確に定量することを可能にした。この我々が新規に開発した ELISA 系を用いて、パーキンソン病患者と対照患者とで髄液中 α -synuclein の定量を行い、髄液中 α -synuclein の定量がパーキンソン病の臨床診断に有用であるか否かを検討した。

対象および方法

孤発性の特発性パーキンソン病患者 33 名および著明な脳病変を有さない対照患者 38 名を対象とした。パーキンソン病患者群は、年齢が 43-79 歳(63.4 \pm 11.1 歳)、男性 11 名、女性 22 名で、重症度別には Hoehn & Yahr 分類の I 度が 5 名、II 度が 9 名、III 度が 15 名、IV 度が 4 名であった。対照患者群は、年齢が 15-82 歳(47.4 \pm 17.9 歳)、男性 22 名、女性 16 名で、疾患の内訳は筋疾患が 4 名、末梢神経疾患が 8 名、脳神経障害が 4 名、脊髄疾患が 2 名、軽度認知機能障害が 5 名、心因反応が 3 名、変性疾患が 3 名(motor neuron disease:1, spinocerebellar degeneration:2)、髄膜炎等を疑われて髄液検査を施行されたが正常で神経学的異常のない患者が 9 名であった。対象とした患者全員

からは京都府立医科大学倫理委員会で承認された方法により informed consent を得た上で、髄液を今回の研究に使用した。

今回我々が新たに開発した ELISA 系を用いて対象者の髄液中 α -synuclein を定量して解析した。我々が用いた ELISA 系は、ヒト α -synuclein の 121-125 残基を抗原とする抗ヒト α -synuclein モノクローナル抗体 (C211, Santa Cruz Biotech.) を capture antibody に、全長のヒト α -synuclein を抗原とする抗ヒト α -synuclein ポリクローナル抗体 (FL140, Santa Cruz Biotech.) を reporter antibody に用いている。まず試料に protease inhibitor (Calbiochem)を加えた後に、減圧遠心濃縮により試料を 5 倍に濃縮して、この ELISA 系により髄液中 α -synuclein を定量した。

結果および考察

38 名の対照患者群での検討では、髄液中 α -synuclein 濃度は加齢とともに減少した(図 1、 $r = -0.429$, $p = 0.0073$)。パーキンソン病患者群では、今回の検討では対照患者群で認められたような加齢による髄液中 α -synuclein 濃度の低下は認められなかった。一方、特発性パーキンソン病患者 33 名と、対照患者群のうちパーキンソン病患者群と age-matched させた 26 名との比較では、パーキンソン病患者群において髄液中 α -synuclein 濃度が有意に減少していた(図 2、パーキンソン病患者群 18.2 \pm 9.6 ng/ml vs. 対照群 38.7 \pm 19.0 ng/ml, $p < 0.0001$)。またパーキンソン病患者群においては、重症度が Hoehn & Yahr 分類の III 度あるいは IV 度の患者では、I 度あるいは II 度の患者と比べて髄液中 α -synuclein 濃度が低い傾向があった(図 3)。今回、少数例での検討ながら、パーキンソン病患者

群で髄液中 α -synuclein 濃度が有意に減少していたことは、髄液中 α -synuclein はパーキンソン病の臨床診断マーカーとして利用できる可能性があることを示している。さらに、今回の検討では、より重症度の高い患者で髄液中 α -synuclein 濃度が低下する傾向が認められたことは、髄液中 α -synuclein 濃度は患者の重症度マーカーにも成りうるということが考えられる。また、パーキンソン病と同様に原因蛋白質が脳内で異常な凝集を生じて沈着する疾患であるアルツハイマー病では、細胞内に沈着する tau 蛋白と主として細胞外に沈着する A β 蛋白という二つの主要な原因蛋白質があるが、これまでの検討から、アルツハイマー病患者髄液中では tau 蛋白は増加するのに対して A β 42 は減少することが明らかにされている(11)。今回の我々の結果からは、パーキンソン病の病態発現過程において α -synuclein は、アルツハイマー病における tau 蛋白の動態とは異なり、A β 蛋白と同様の動態をとることが考えられる。このような観点からの研究はパーキンソン病の病態発現機序を分子レベルで解明する手がかりとなることが期待される。今後はパーキンソン病およびその関連疾患(多系統萎縮症、その他のパーキンソニズムをきたす疾患など)において、多数例あるいは重症度別での髄液中 α -synuclein 濃度の検討が必要である。

まとめ

少数例の検討ではあるが、パーキンソン病患者及び対照患者の髄液中 α -synuclein 濃度に関して以下の知見が得られた。

- 1) ヒト髄液中の α -synuclein 濃度は加齢により減少する傾向が認められた。
- 2) パーキンソン病患者群では、対照患者群と比較

して、髄液中 α -synuclein 濃度が有意に減少していた。

3) パーキンソン病患者群においては、臨床的な重症度が高い患者では、重症度の低い患者と比較して、髄液中 α -synuclein 濃度が低下している傾向が認められた。

今後の検討として、多施設の共同研究によってより大規模な症例数でのヒト生体試料中の α -synuclein 濃度の検討が必要である。

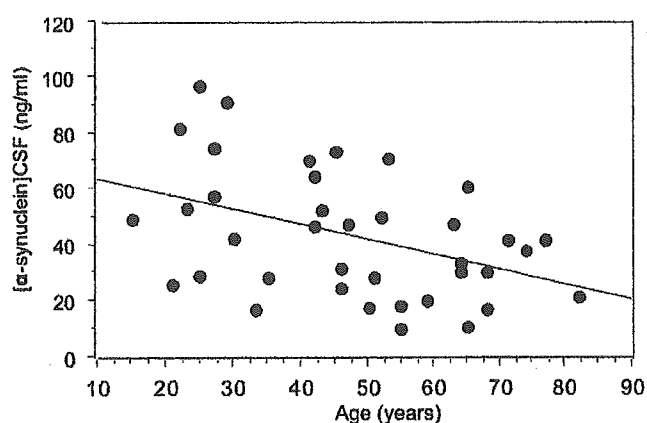


図1.対照患者群における髄液中 α -synuclein 濃度と年齢の関係.

年齢が高い対照患者では髄液中の α -synuclein 濃度が低い傾向があった (n = 38, r = -0.429, p = 0.0073)

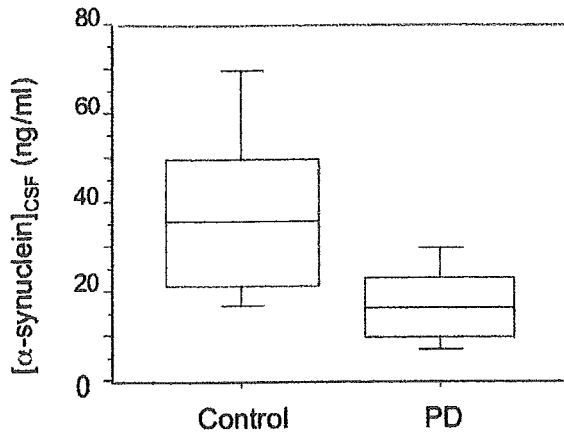


図2. パーキンソン病患者群と対照群 (age-matched)の髄液中 α -synuclein 濃度の比較。髄液中 α -synuclein 濃度はパーキンソン病患者群 (18.2 ± 9.6 ng/ml, $n = 33$)では対照群(38.7 ± 19.0 ng/ml, $n = 26$)と比較して有意に減少していた ($p < 0.0001$, Mann-Whitney U test)。

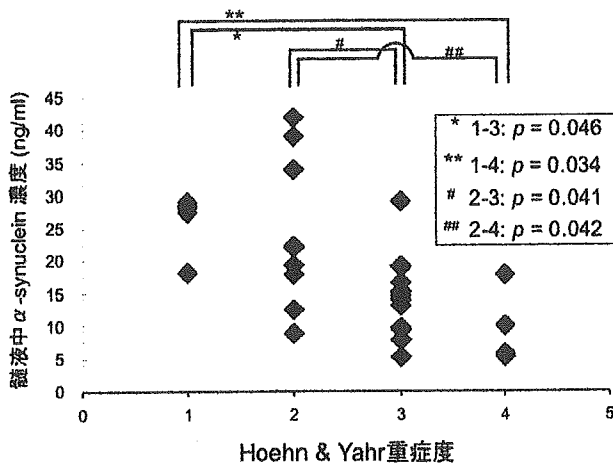


図3. パーキンソン病患者の Hoehn & Yahr 重症度別の髄液中 α -synuclein 濃度 (ng/ml)。重症度が高い患者では重症度の低い患者と比較して髄液中 α -synuclein 濃度が低い傾向があった。

文献

1. M.G. Spillantini, et al. Nature 388: 839-840, 1997.
2. M.H. Polymeropoulos, et al. Science 276: 2045-2047, 1997.
3. R. Kruger, et al. Nat. Genet. 18: 106-108, 1998.
4. J.J. Zarranz, et al. Ann. Neurol. 55: 164-173, 2004.
5. A.B. Singleton, et al. Science 302: 841, 2003.
6. M.C. Chartier-Harlin, et al. Lancet 364: 1167-1169, 2004.
7. P. Ibanez, et al. Lancet 364: 1169-1171, 2004.
8. Jakowec, et al. Neurosci. Lett. 253: 13-16, 1998.
9. R. Borghi, et al. Neurosci. Lett. 287: 65-67, 2000.
10. O.M. El-Agnaf, et al. FASEB J, 17: 1945-1947, 2003.M.W.
11. M. Kanai, et al. Ann Neurol., 44: 17-26, 1998.

ヒト血漿、脳脊髄液における α -synuclein の定量

（分担）研究者氏名：池田修一¹⁾

研究協力者氏名：兼子一真¹⁾ ²⁾ Sultan Salem²⁾, Omar El-Agnaf²⁾, David Allsop²⁾

1) 信州大学医学部神経内科、リウマチ・膠原病内科

2) Department of Biological Sciences, Lancaster University

研究趣旨

Parkinson 病 (PD) の原因蛋白である α -synuclein のヒト生体内での動態を明らかにし、病態に關与する機序を解明するため、sandwich-ELISA 法を用いて PD 患者血漿、脳脊髄液 (CSF) 中の同蛋白を定量した。中枢神経病変の無い対照群は血漿、CSF 共に年齢に反比例して α -synuclein 濃度は減少していたが、PD 患者群では年齢との相関関係が無かった。血漿中 α -synuclein 濃度は、PD 群 $0.0468 \pm 0.121 \mu\text{g/ml}$ 、対照群 $0.0244 \pm 0.0935 \mu\text{g/ml}$ ($p=0.0087$) 髄液中濃度は各々、 $0.00344 \pm 0.000236 \mu\text{g/ml}$ 、 $0.00365 \pm 0.000266 \mu\text{g/ml}$ ($p=0.0186$) であった。PD 患者では血漿、髄液ともに、対照に対し α -synuclein 濃度に有意差を認め、 α -synuclein が通常と異なる代謝を受けている可能性が示唆された。

はじめに

家族性パーキンソン病 (PD) の原因として α -synuclein 遺伝子の異常が発見され¹⁾²⁾、Lewy 小体の主要な構成蛋白であることが確認されて以来³⁾、特発性 PD に於いても、その発症に α -synuclein が關与することが示唆されている。

近年発見された α -synuclein 遺伝子 3 重複の家系⁴⁾で、罹患者末梢血で本蛋白量の増加が認められることが明らかになり⁵⁾、PD 発症と α -synuclein 蛋白量が相関する可能性があるものとして注目されている。

我々は、先にヒト血漿、脳脊髄液に本蛋白が分泌されていることを証明したが⁶⁾、これらの濃度は sandwich-ELISA 法による定量可能であることも明らかになった。そこで、今回特発性 PD 患者の生体における α -synuclein 動態を解明すべく、患者およ

び対照者血漿、脳脊髄液中の α -synuclein 濃度を定量した。

（対象および）方法

1) 対象

患者群として 2003 年から 2005 年にかけて信州大学病院神経内科で、2002 年から 2004 年にかけて Hope Hospital (Manchester, UK) で専門医により PD と診断された患者の血漿、髄液を用いた。対照群として中枢神経病変の無い患者検体を用いた。すべての対象者からインフォームドコンセントを得た上で、検体を採取し使用した。対象数、年齢構成は以下に示す通りであった。

PD 群

血漿 : n = 56、平均年齢 \pm SD : 65.5 \pm 9.5 歳

CSF : n = 15、平均年齢 \pm SD : 64.7 \pm 10.8 歳

対照群

血漿: n = 85、平均年齢±SD: 68.2±8.7歳

CSF : n = 15、平均年齢±SD: 60.3±10.8歳

2) 測定方法

α -synuclein 測定方法として sandwich-ELISA 法を用いた。血漿はリン酸緩衝食塩水(PBS)で2倍に希釈し、CSF は吸引遠心により5倍に濃縮した。また、標準曲線作成のため recombinant α -synuclein を使用した。capture 抗体としてマウス抗ヒト α -synuclein 抗体(C-211, 200倍希釈)(Santa Cruz)、detector 抗体としてウサギ抗ヒト $\alpha/\beta/\gamma$ -synuclein 抗体(FL-140, 1000倍希釈)(Santa Cruz)を使用し、2次抗体としてHRP 付着ヤギ抗ウサギ IgG 抗体(10000倍希釈)(DAKO)を用いた。各反応後、発色基質(Sure Blue Substrate, KPL)による450nm 域の発色を spectrophotometer で測定した。

3) 統計解析法

患者群-対照群有意差解析:

Mann-Whitney U test

年齢-髄液濃度相関解析:

Pearson product-moment correlation test

年齢-血漿、血漿-髄液相関解析:

Spearman's Rank correlation test

危険度 (p) < 0.05 を有意とした。

結果

各々の集団で以下の測定結果を得た。

血漿: 対照群 0.0244±0.0935 μ g/ml

PD群 0.0468±0.1212 μ g/ml

($p = 0.0087$)

髄液: 対照群 0.00365±0.000266 μ g/ml

PD群 0.00344 ± 0.000236 μ g/ml

($p = 0.0186$)

PD群の α -synuclein濃度は、血漿中では対照群より有意に高く、髄液中では有意に低い結果が示された(図1)。

個々の被検者において血漿と髄液中の α -synuclein濃度は一定の関係がなかった(図2)。対

照群では血漿、髄液共に α -synuclein 濃度が年齢に反比例して低下傾向を示した(図3, 4)が、PD群では年齢との相関は認めなかった。

図 1

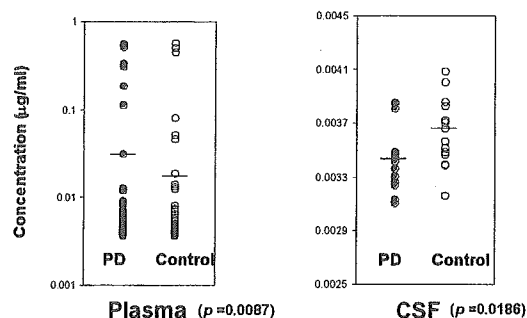


図 2

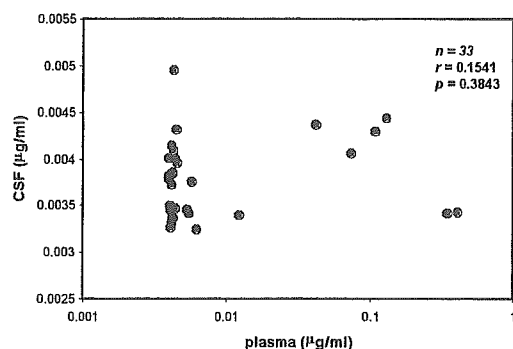


図 3

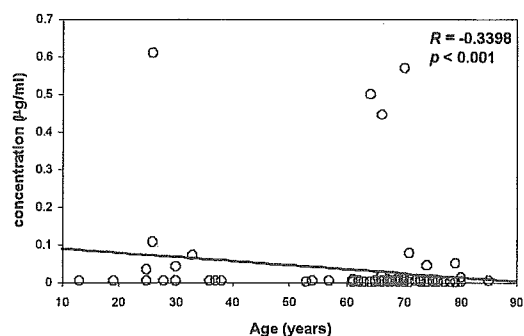
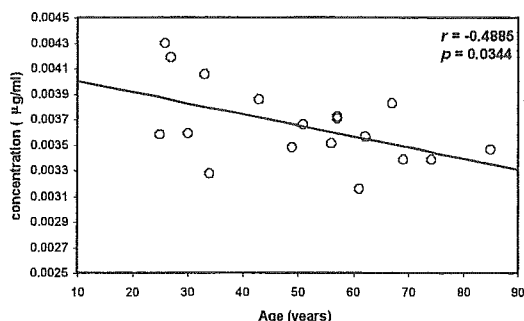


図 4



考察

末梢血、剖検脳実質での α -synuclein定量解析は過去に報告されているが、今回初めて血液、髄液中濃度を比較し得た。本研究では次の事実が明らかになった。

(1) 血漿及び髄液中 α -synuclein濃度は無関係

(2) 対照群では血漿、髄液共に年齢に反比例して α -synuclein濃度が低下する

(3) PD患者群では、 α -synuclein濃度は年齢に無関係

(Plasma: $r = -0.049$, $p = 0.7187$,

CSF: $r = -0.0750$, $p = 0.7907$)

(4) PD患者群の α -synuclein濃度は、血漿中では対照群より有意に高く、髄液中では有意に低い

末梢血では全体に濃度が高く、変動が大きいことから主に血小板由来の α -synucleinを反映している可能性がある一方、髄液中濃度は中枢神経由来の α -synucleinを反映すると考えられた。

PD患者群では年齢による変化が認められなかったことから、通常とは異なる代謝の存在を示唆した。髄液においてPD患者の濃度が有意に低下したことを考慮すると、加齢による生理的な分泌低下以外に、凝集、沈着などによる可溶性成分の減少が疑われた。

従って、罹患期間、重症度等による検討で、更に有意な変化が存在すると予想され、これらの解析が今後の課題と考えている。

まとめ

PD患者群では血漿、髄液中の α -synuclein濃度において年齢による変化が認められなかったことから、通常とは異なる代謝の存在が示唆された。

血漿、髄液中の α -synuclein濃度がPDの病態を反映する指標であると確定するためには、今後これらの濃度とPDの罹患期間、重症度等との関連を検索する必要がある。

文献

- 1) Polymeropoulos MH. et al. Science 2045-2047, 1997
- 2) Kruger R. et al. Nat Genet 106-108, 1998

- 3) Spillantini MG. et al. Nature 839-840, 1997
- 4) Singleton AB. et al. Science 841, 2003
- 5) Miller DW. et al. Neurology 1835-1838, 2004
- 6) El-Agnaf OMA. et al. FASEB J 1945-1947, 2003

パーキンソン病剖検例の黒質メラニン含有細胞における

Golgi 装置の形態的变化

藤田 行雄¹⁾，岡本 幸市¹⁾，大浜 栄作²⁾，高玉 真光³⁾

1) 群馬大学大学院医学系研究科脳神経内科学

2) 鳥取大学脳幹性疾患研究施設脳神経病理部門

3) 老年病研究所附属病院

はじめに

Golgi 装置の fragmentation（微細化）とアポトーシスや神経細胞変性との関係は現在まではっきりした結論は得られていないが、筋萎縮性側索硬化症、アルツハイマー病、多系統萎縮症などの神経変性疾患において Golgi 装置の微細化が報告されている^{1),2),3)}。

一方、これまでヒトパーキンソン病剖検例における Golgi 装置の変化についての検討はなく、今回、パーキンソン病黒質メラニン含有細胞の Golgi 装置の形態的異常の有無、さらに Lewy 小体形成過程における Golgi 装置の形態の違いについて検討した。

対象および方法

神経症候・経過と剖検所見により確定診断されたパーキンソン病（死亡時年齢：57 歳から 86 歳，経過 3 年から 40 年）18 例と対照剖検例 7 例の黒質を含む中脳 5 μ 厚パラフィン包埋切片を用いた。脱パラフィン後 human trans-Golgi network (TGN) の 15-38 アミノ酸残基に対するポリクロナール抗体（以下抗 TGN46 抗体）と Pennsylvania 大学 Gonatas 教授より供与された Golgi 装置の medial cisternae を認識する抗 MG160 抗体を用いて

免疫染色を施行した。パーキンソン病例に対しては HE 染色で pale body, Lewy 小体を確認後に脱色し、抗 α -synuclein 抗体と抗 TGN46 抗体もしくは抗 MG160 抗体で 2 重免疫染色を施行した。発色は抗 α -synuclein 抗体は DAB 法、抗 TGN46 抗体と抗 MG160 抗体は VIP 法を用いた。また、パーキンソン病例については抗 α -synuclein 抗体による染色性の違いによって a) α -synuclein 陰性の黒質メラニン含有細胞、b) Pale body を有する黒質メラニン含有細胞、c) Lewy 小体を有する黒質メラニン含有細胞の 3 種類に分け Golgi 装置の形態的变化を観察した。

結 果

HE染色では、対照例黒質には変性所見は認められなかった。一方、パーキンソン病例では黒質神経細胞の減少、フリーメラニンの増加が認められ、また、Lewy小体やpale bodyが多数認められた。

抗 α -synuclein抗体による免疫染色では、パーキンソン病黒質に様々な染色性を示す神経細胞が認められた。すなわち、 α -synuclein 陰性の細胞から細胞質全体が淡く染色されるもの、pale body, Lewy小体を有する細胞が

認められ、pale bodyとLewy小体が連続してみられる所見も認められた。抗TGN46抗体を用いた染色では、対照例の神経細胞のGolgi装置はひも状に連続して染色され正常形態を示した(図1)。抗MG160抗体による染色も光顕レベルでは抗TGN46抗体と同様の染色性を示した。対照例ではGolgi装置の形態異常は認められなかった。一方、パーキンソン病例ではGolgi装置の微細化した細胞が少数認められた。抗 α -synuclein抗体と抗TGN46抗体との2重免疫染色では、 α -synuclein陰性の黒質神経細胞ではGolgi装置の微細化した細胞がわずかに認められたが、大半の細胞では正常形態を呈していた。Golgi装置の微細化の頻度は1,242個の黒質メラニン含有細胞中35個、約3%であった。pale bodyを有する黒質神経細胞のGolgi装置の微細化の頻度は75個中14個、約19%だった(図2)。Lewy小体を有する細胞のGolgi装置の微細化の頻度は、pale bodyを有する細胞のGolgi装置の微細化の頻度に比べ低く、55個中3個、約5%であった(図3)。Lewy小体を有する細胞の中に正常形態のGolgi装置と微細化したGolgi装置が認められる細胞も稀に認められた。

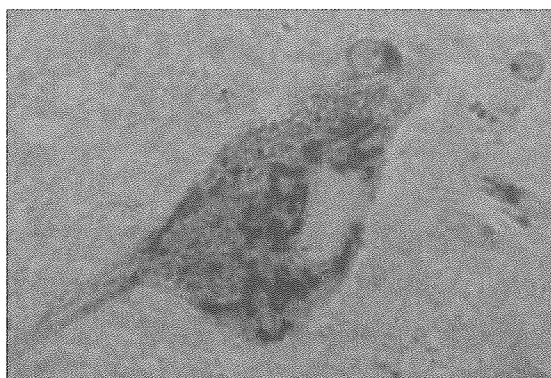


図1：対照例における黒質メラニン含有細胞の抗TGN46抗体染色。Golgi装置はひも状に連続して染色され正常形態を呈している。

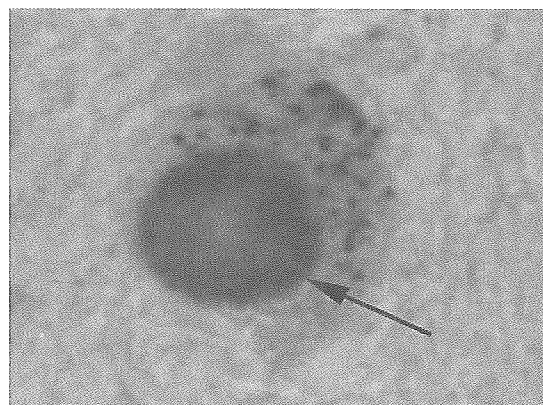


図2：パーキンソン病黒質メラニン含有細胞の抗 α -synuclein抗体と抗TGN46抗体による2重免疫染色。pale body(矢印)を有する細胞においてGolgi装置の微細化が認められる。

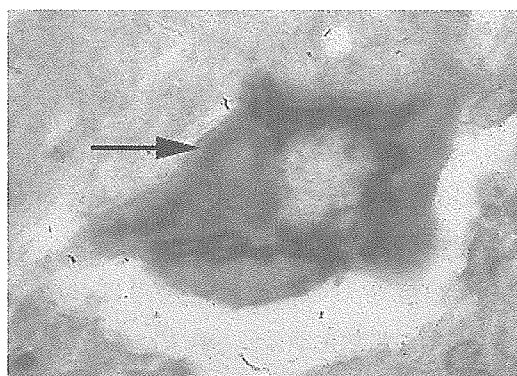


図3：パーキンソン病黒質メラニン含有細胞の抗 α -synuclein抗体と抗MG160抗体による2重免疫染色。Lewy小体(矢印)有する細胞のGolgi装置はひも状に連続して染色され正常形態を呈している。

考 察

Golgi装置の形態異常の報告はALSを始めとする神経変性疾患や各モデル動物、またmitosisやapoptosisにおいても報告がある。パーキンソン病に関連したものでは、GosaviraらはCOS-7細胞を用いた系で、 α -synucleinがprefibrillarな状態、すなわち線維性凝集体を形成するよりも前の段階でGolgi装置のfragmentationが認められることを報告している⁴⁾。今回の検討でもヒトパーキンソン病黒質メラニン含有細胞においてもGolgi装置

の微細化が認められ、さらに、pale bodyを有する細胞ではLewy小体を有する細胞に比べGolgi装置の微細化の頻度は高かった。pale bodyはLewy小体の前段階の封入体と考えられており、Lewy小体形成過程で α -synucleinの毒性は軽減してきている可能性が考えられた。

また、アポトーシスとの関連では、ロテノン処理で誘発されたアポトーシスにおいてその初期段階でGolgi装置の形態変化が生じると報告されている⁵⁾。さらにGolgi装置や核に局在するcaspase 2がstaurosporineによるアポトーシス誘導時に活性化されるとの報告や、メカニズムは不明であるがGolgi装置に集積するFasがp53の作用によって細胞膜に運ばれてアポトーシスが誘導されるとの報告もあり、Golgi装置に関連したユニークなアポトーシスシグナルの存在も示唆されている。一方で、変異tauトランスジェニックマウスの神経細胞ではtau蛋白によるGolgi装置の微細化はアポトーシスに伴うものではないとの報告もある⁶⁾。今後、我々はパーキンソン病を始めとする神経変性疾患において、Golgi装置の微細化の意味をさらに検討していく必要があると考えている。

まとめ

- 1) 黒質に変性のない対照例ではGolgi装置の微細化はほとんどみられなかった。
- 2) パーキンソン病剖検例では α -synuclein陽性構造物のない黒質メラニン含有細胞ではGolgi装置の微細化は約3%にのみ認められたのに対し、pale bodyを有する細胞ではGolgi装置の微細化を約19%の細胞に認めた。またLewy小体を有する細胞ではGolgi装置の微細化の頻度は5%と減少していた。
- 3) 以上の結果から、 α -synucleinの蓄積早期にはGolgi装置に形態異常（機能異常？）を来すが、Lewy小体の形成に伴い α -synuclein蓄積のGolgi装置に対する影響は軽減する可

能性が考えられた。

文 献

- 1) Gonatas NK. Et al. *Histchem Cell Biol* 109: 591-600, 1998
- 2) Fujita Y et al. *J Neurol Sci* 163: 81-85, 1999
- 3) Sakurai A et al. *Acta Neuropathol* 103: 550-554, 2002
- 4) Gosavi N. et al. *J Biol Chem*, 277: 48984-48992, 2002
- 5) Diaz-Corrales FJ et al. *Neurosci Lett* 354: 59-63, 2004
- 6) Liazoghli D, et al. *Am J Pathol* 166: 1499-1514, 2005

パーキンソン病及びその関連疾患の末梢自律神経病理評価に、副腎は有用である

(分担)研究者氏名 村山繁雄¹⁾

研究協力者氏名 池村雅子¹⁾、文村優一¹⁾、斉藤祐子²⁾

¹⁾ 東京都老人総合研究所老年病ゲノム・高齢者ブレインバンク

²⁾ 東京都老人医療センター剖検病理科

研究趣旨

パーキンソン病及びその関連疾患の統合概念としての、レヴィー小体病の自律神経病理評価に、神経病理専門医がいないと採取されない交感神経節の代わりに、一般病理科が常に検索する、系統発生的には相同である副腎が有用であるか否かを、抗リン酸化 α シヌクレイン抗体免疫染色を用いて検討した。副腎の陽性所見は、中枢の陽性所見と平行し、パーキンソン病ないしパーキンソン症状を伴うレヴィー小体型痴呆では全て陽性、アルツハイマー病やタウオパチーに伴い扁桃核に強調されるシヌクレインパチーを呈する症例においては全て陰性であった。以上より、レヴィー小体型痴呆の自律神経病理の評価には、副腎の有用性が確認され、これまで蓄積されたパーキンソン病剖検例全例に応用可能であるという知見が得られた。

はじめに

パーキンソン病(PD)、レヴィー小体型痴呆(DLB)、レヴィー小体型進行性自律神経不全症を併せた概念としての、レヴィー小体病(LBD)の末梢自律神経系病理評価に、これまで交感神経節が代表とされてきた。しかし、一般病院において、LBDの剖検時の評価に、交感神経節を採取することは、必ずしも容易でない。一方、剖検で必ず採取される副腎は、その髄質が交感神経節相同臓器とされている。これまで、副腎にはレヴィー小体の出現が低頻度に認められるとの報告があるが、抗リン酸化 α シヌクレイン(PSYN)抗体免疫染色という、高感度・高特異度の検出法を用いることで、LBDの末梢自律神経系評価に有用であることが分かれば、これまで蓄積された、全身剖検が行われたLBD全例の、末梢自律神経評価が可能になる。また、今後蓄積される症例についても、神経病理専門医がいなくても、評価が可能となる。以上のことを目的に、副腎のLBDにおける有用性の検討を、高齢者ブレインバンク

を用いて行った。

対象及び方法

既報告の中枢神経系LBD抗リン酸化 α -synuclein(PSYN)抗体免疫染色ステージ分類(Saito Y et al 2004a)に基づき、2005年3月1日より遡った連続剖検例、ステージ0 149例、ステージ0.5以上 152例の副腎を、PSYN抗体免疫染色で評価した。Stage分類を簡単に述べると、Stage 0 レヴィー小体関連 α シヌクレインパチー(Lewy body related alpha-synucleinopathy: LBAS)なし; 0.5: LBASとしてPSYN抗体免疫染色陽性細胞突起のみ出現; 1: 黒質変性なくレヴィー小体が少量出現(偶発的LBD); 2: 黒質変性ありレヴィー小体が相当量出現するも、臨床記載なし(発症前レヴィー小体病); 痴呆のないLBD(PD); 痴呆のあるレヴィー小体病(痴呆を伴うPD: PDDとDLB)、レヴィースコア移行型; 痴呆のあるレヴィー小体病、レヴィースコア新皮質型である。

10%中性緩衝ホルマリンに固定された副腎を

パラフィン包埋し、4mm 厚切片を脱パラ後、高リン酸化アルファシヌクレイン単クローン抗体 (psyn#64) でスクリーニングし、ポリクローン抗体 (Psyn129) で確認した。免疫染色には、Ventana N×20 自動免疫染色を使用した。

結果

副腎の陽性所見は、Lewy 小体のかたちをとるもの (Fig 1 A, B)、突起状に認めるもの (Fig 1 C)、軸索内に陽性所見をみるもの (Fig 1D) に分類された。

副腎の陽性所見は Stage 0.5 以下ではなく、Stage 1: 14/71 例 (19.7%)、Stage 2: 14/ 25 (56%)、Stage 3: 3/3 例 (100%)、Stage 4: 21/23 (91.3%)、Stage 5: 14/17 (82.4%) に認められた (Table 1)。

Stage2 以下で、アルツハイマー病 (AD) ないし他の高齢者タウオパチーとして、嗜銀顆粒性痴呆 (DG) ないし、進行性核上性麻痺 (PSP) を合併し、扁桃核中心に陽性所見を認め、脳幹には少数のレヴィー小体病変をみるが、胸髄中間外側核には陽性所見を認めない、いわゆる扁桃核亜型は、副腎の LBAS は全て陰性であった (Table 2, 3)。

認知症の有無にかかわらず、PD は全て陽性であった。また陰性例は全て、DLB でパーキンソン症状を伴わない例だった。これらの症例は、脊髄中間外側核には LBAS を認めたものの、副腎には陰性であり、末梢自律神経系への広がりにおいて、差が認められた (Table 3)。

考察

副腎は全身剖検で必ず検索される臓器であり、レヴィー小体病中、PD の場合に全例で陽性所見が得られたことは、PD においては、末梢自律神経系が常に LBAS で侵されることを示唆する結果と考えられた。一方、DLB の場合、痴呆で初発する症例の中に、陰性例が存在したことは、もうひとつの α シヌクレイノパチーである、多系統萎縮症と同様、レヴィー小体病の場合にも、新皮質・辺縁系、線条体・黒質系・末梢自律神経系が、ある程度の比重を持って障害されることを示唆す

る所見と考えられた (Fig. 2)。

いわゆる扁桃核亜型については、PD とは異なる病態機序を持つ沈着プロセスである可能性が、再確認された。

副腎の検索により、レヴィー小体病の自律神経病変の評価が可能だけでなく、レヴィー小体の広がりに関しても重要な情報が得られる可能性が示されたことは、今後の研究の広がりへの重要な基礎を提供するものと考えた。

まとめ

レヴィー小体病末梢自律神経系の評価に、副腎が有用であることが確認された。

Table 1. Incidence of Lewy body-related- α -synucleinopathy in the adrenal gland.

LB stage	Diagnosis	Number	Adrenal LB-pathology
			Positive (ratio, %)
I	Incidental LBD	64	11 (17.2)
II	presymptomatic LBD	25	16 (64)
III	PD	3	3 (100)
IV	PDDT	9	9 (100)
	DLBT	14	12 (85.7)
V	PDDN	3	3 (100)
	DLBN	14	11 (78.6)

Abbreviations: LB stage, Lewy body stage (Saito, 2003; Saito, 2004a; PDDT, Parkinson disease with dementia, whose Lewy body score corresponds to the value for transitional form; DLBT, dementia with Lewy bodies, whose Lewy body score corresponds to the value for transitional form; PDDN, Parkinson disease with dementia, whose Lewy body score corresponds to the value for neocortical form; and DLBN, dementia with Lewy bodies, whose Lewy body score corresponds to the value for neocortical form.

Table 2. Adrenal Lewy body (LB)-pathology in incidental and presymptomatic Lewy body disease.

LB Stage	Type of Distribution	#	LBAS Positive (ratio, %)
I	Brain-stem	29	3 (10.3)
	Transitional	30	8 (26.7)
	Neocortical	0	N/A
	Amygdala-variant	5	0
	Total	64	11 (17.2)
II	Brain-stem	3	2 (66.7)
	Transitional	17	12 (70.6)
	Neocortical	2	2 (100)
	Amygdala-variant	3	0
	Total	25	16 (64)

LBAS: Lewy body-related alpha-synucleinopathy,

N/A: not applicable

Table 3. Neuropathological details of the amygdala-variant of Lewy body (LB) disease and dementia with Lewy bodies (DLB) without LB-pathology in the adrenal gland

Case	Age/ Sex	LB stage	PMI	BW (g)
1	84M	IA	1:57	1055
2	73M	IA	23:50	1150
3	81M	IA	17:25	1160
4	78M	IA	29:36	1444
5	78M	IA	3:46	1330
6	90F	IIA	64:00	1140
7	88F	IIA	5:25	1003
8	70M	IIA	35:42	1400
9	93F	IV	33:25	1235
10	88F	IV	11:07	1150
11	88M	V	2:00	1360
12	81M	V	37:00	1325
13	91M	V	1:39	1260

NFT	Other senile changes			PA
	SP	CAA*	Grain	
VI	C	0	0	-
IV	C	1	0	-
VI	C	2	0	-
V	C	1	1	-
I	A	1	2**	-
V	C	1	0	-
VI	C	3	0	-
V	C	1	0	-
II	A	2	3	-
III	C	1	0	-
IV	C	2	1	-
I	A	0	0.5	-
IV	C	1	2	-

Abbreviations: LB stage, Lewy body stage; PMI, postmortem interval (hr: min); BW, brain weight; NFT, Braak's stage (Braak, 1991) of neurofibrillary tangles; SP, Braak's stage (Braak, 1991) of senile plaques; CAA, cerebral amyloid angiopathy; Grain, Our staging (Saito, 2004b) of argyrophilic grains; and PA, parkinsonism.

*The grading of CAA is as follows: 0, none; 1, deposition in the wall of small arteries; 2: splitting or degeneration of smooth muscles associated with amyloid angiopathy; and 3: accompanying hemorrhage and/ or infarction.

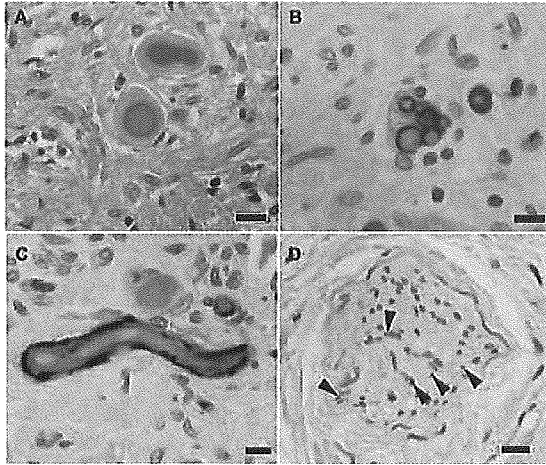
**The pathology of amygdala was severe in cases with argyrophilic grain disease in Stage II, as previously reported (Saito, 2004b).

Fig 1 Lewy body-related alpha-synucleinopathy involving the adrenal gland.

A. Lewy bodies (hematoxylin & eosin

staining) (Bar = 50µm).

B. Lewy bodies demonstrated with phosphorylated α-synuclein (psyn) - immunohistochemistry (Bar = 50µm).



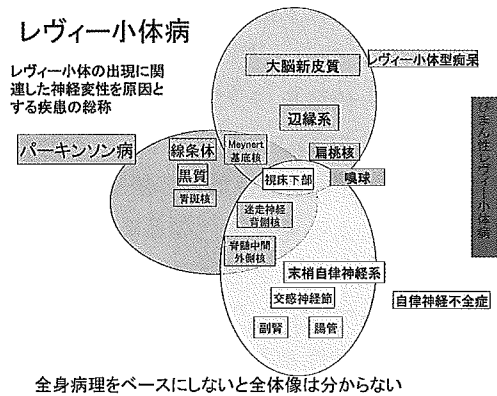
C. Psyn-immunoreactive neurite (Bar = 10µm).

D. Psyn-immunoreactive nerve fibers (arrowheads) in the nerve fascicle of the peripheral nerve in the adrenal gland. (Bar = 50µm)

Saito Y et al: Lewy body-related alpha-synucleinopathy in aging. J Neuropath Exp Neurol 2004a; 63: 742-749

Saito Y et al: Staging of argyrophilic grains, an age-associated tauopathy. J Neuropath Exp Neurol 2004b; 63: 911-918

Fig2. 全身疾患としてのレヴィー小体病



文献

Braak H et al.: Neuropathological staging of Alzheimer-related changes. Acta Neuropathol (Berl) 1991;82:239-259

Saito Y et al: Accumulation of phosphorylated α-synuclein in aging human brain. J Neuropath Exp Neurol 2003; 62: 644-654.

変異タウトランスジェニックマウスの作成と解析

[班 員] 阿部康二

[共同研究者] 村上哲郎、永野功、永井真貴子、瓦林毅、太田康之、奈良井恒、東海林幹夫

[所 属] 岡山大学医学部神経内科

[研究要旨] 第 17 番染色体に連鎖しパーキンソニズムを伴う前頭側頭型痴呆 (FTDP-17) から見出されたタウ遺伝子変異 (P301L) を発現するトランスジェニックマウス (TgTau^{P301L}) を作成した。TgTau^{P301L} は加齢に伴って大脳皮質、海馬、扁桃体などのニューロンおよびグリア細胞内に変異タウの蓄積を来し、neurofibrillary tangle (NFT) の出現や神経細胞死を伴っていた。また、蓄積したタウタンパクはリン酸化され、コンフォメーション変化を来し、不溶化していた。我々の作成したトランスジェニックマウスは皮質基底核変性症や進行性核上性麻痺、ひいてはアルツハイマー病などのタウオパチーの研究や治療法開発に有用なモデルであると考えられた。

はじめに

アルツハイマー病では神経細胞死に加えてβアミロイドから構成される老人斑 (senile plaque) とタウタンパクから構成される神経原線維変化 (neurofibrillary tangle, NFT) を主な病理学的特徴とする。一方、皮質基底核変性症 (CBD)、進行性核上性麻痺 (PSP) および第 17 番染色体に連鎖しパーキンソニズムを伴う前頭側頭型痴呆 (FTDP-17) では老人斑の出現は基本的に認めないものの、神経細胞死に加えて NFT および グリア細胞にも glial fibrillary tangle (GFT) の出現を特徴とする。さらにタウ遺伝子は FTDP-17 の原因遺伝子そのものでもある¹⁾。これらの CBD、PSP、および FTDP-17 などの神経変性疾患は現在 primary tauopathy と総称され、タウタンパクの異常な蓄積から神経細胞死に至る共通のメカニズムの存在が示唆されている²⁾。本研究では FTDP-17 から見いだされた変異タウ遺伝子をマウスに発現させることによって、tauopathy を病理学および生化学的に再現するトランスジェニックマウスを作成し、

tauopathy の機序を明らかにすることを目的に計画された。

方法

ヒト FTDP-17 家系から見出された変異タウ遺伝子 P301L³⁾ をハムスターのプリオンプロモーターの下に発現するトランスジェニックマウス (TgTau^{P301L}) を作成し、得られたマウスの片側脳をパラフィン封埋にて固定し、他側脳を-80℃にて凍結した。これらの標本を用いて Gallyas 染色などの銀染色や、各種抗タウ抗体による免疫染色などにより病理学的変化を検討した。さらに、凍結した TgTau^{P301L} 脳を用いて TgTau^{P301L} の脳内へのタウの蓄積の分布やタウタンパクの修飾について検討した。さらに、このマウスにおける脳各部位における神経細胞数を検討した。

結果

TgTau^{P301L} では加齢に伴って大脳皮質、海馬、扁桃体などのニューロンおよびグリア細胞内に変異タウの蓄積が認められ、NFT や GFT が出現した。蓄積したタウタンパクはリン酸

化タウや、構造変化を起こしたタウタンパク、およびユビキチンに対する抗体でも染色され、蓄積したタウはこれらの変化を受けていると考えられた。また、これらの部位では TgTau^{P301L} では non-Tg マウスと比較して明らかな神経細胞の減少が認められ、神経細胞死を来していると考えられた。ウエスタンブロットでは脳内に蓄積したタウは前述の各種抗体で検出され、生化学的にも同様の変化を受けていることが分かった。さらに、蓄積したタウはサルコシルに対して不溶性を示していた。

考察

TgTau^{P301L} で認められた病理学および生化学的变化は CBD、PSP、および FTDP-17 で認められる変化ときわめて類似しており、異常なタウタンパクの発現がタウタンパクの蓄積とそれに続く神経細胞死を惹起すると考えられた。

まとめ

我々の作成したトランスジェニックマウス (TgTau^{P301L}) は CBD、PSP、および FTDP-17 の病理学の変化をよく再現しており、これらの primary tauopathy のみならず、ひいてはアルツハイマー病などの tauopathy の原因の解明と治療法開発に非常に有用であると考えられた。

- 文献： 1) Hutton M, et al. Nature. 393:702-705, 1998.
2) Feany MB, et al. J Neuropathol Exp Neurol. 55:53-67, 1996.
3) Spillantini MG, et al. Am J Pathol. 153:1359-1363,

プロテアソームとドーパミンニューロン死：*in vivo* モデルでの解析

下濱 俊¹⁾、山川健太郎¹⁾、竹内啓喜¹⁾、青柳信寿¹⁾、
位田雅俊²⁾、北村佳久²⁾、谷口隆之²⁾、澤田秀幸³⁾

1) 京都大学大学院医学研究科臨床神経学、2) 京都薬科大学病態生理学、
3) 国立病院機構宇多野病院臨床研究部

研究趣旨 パーキンソン病の基本的な神経病理は、中脳黒質のドーパミンニューロンの脱落とレビー小体の出現である。家族性パーキンソン病における遺伝子解析でこれまで見つかった原因遺伝子の多くが直接的あるいは間接的にユビキチン・プロテアソーム系と関連することが指摘されている。このことは、ユビキチン・プロテアソーム系をターゲットとした新規のパーキンソン病治療薬の開発の可能性を示唆している。これまで *in vitro* のパーキンソン病モデルでドーパミンニューロン死がプロテアソーム阻害薬で拮抗されることを示した。本年度は、6-hydroxydopamine (6-OHDA) ラットモデルを用いてプロテアソーム阻害薬の黒質ドーパミンニューロン死に与える影響について解析した。プロテアソーム阻害薬同時投与群では、6-OHDA によるドーパミンニューロン死が抑制され、運動異常も抑制された。さらに黒質緻密部に α -synuclein および ubiquitin 陽性の凝集体が観察された。この凝集体は 6-OHDA 単独投与群では観察されなかった。以上の結果は、プロテアソーム阻害薬が *in vivo* において 6-OHDA によるドーパミンニューロン死を抑制し、さらにレビー小体様凝集体形成に関与していることを示唆している。凝集体形成は細胞死誘導よりも、むしろ保護的に働いている可能性がある。

はじめに

パーキンソン病 (PD) の基本的な神経病理は、黒質のドーパミン神経の脱落とレビー小体の出現である。また PD は孤発性と家族性に大別することができ、家族性 PD における遺伝子レベルの解析から PD の発症機序についての研究が進み、発症機序に基づいた新規の治療薬の開発が行われようとしている。これまでに見つかった原因遺伝子はすべて直接的または間接的にユビキチン・プロテアソーム系との関連性が指摘されている¹⁾。ユビキチン・プロテアソーム系をターゲットとした新規の PD 治療薬の開発の可能性が示唆される。

そこで 6-hydroxydopamine (6-OHDA) 投与ラットモデル^{2, 3)}を用いて、プロテアソーム阻害薬 (lactacystin, MG-132) の黒質ドーパミン神経細胞死に与える影響を *in vivo* で解析した⁴⁾。

方法

1. PD ラットモデルの作製および薬物投与
Wistar 雄性ラットをネプタール (50 mg/kg i.p.) 深麻酔下で脳定位装置に固定した。Dimethyl sulfoxide (DMSO) 1%およびアスコルビン酸 0.02%を含む滅菌生理食塩水を対照群とし、6-OHDA (8 μ g)、lactacystin (0.12

μg)、MG-132 (0.19 μg) 単独もしくは 6-OHDA と lactacystin および MG-132 混合液をラット脳地図に従い黒質 (冠矢交差から尾側へ 4.8 mm、外側へ 1.8 mm、硬膜下 7.8mm) にマイクロシリンジを用いて直接投与を行った。投与後 5 分間静置しその後ゆっくりシリンジを引き上げた。

2. 薬物誘発旋回運動の測定

薬物誘発旋回運動はアポモルヒネ (0.6 mg/kg i.p.) を用いて 60 分間計測した。薬物誘発旋回運動の測定は薬物投与 1 週から 4 週後まで各週で行った。

3. 免疫組織化学染色

免疫組織化学には、抗 tyrosine hydroxylase (TH) 抗体 (10,000 倍)、抗 α -synuclein 抗体 (1,000 倍) と抗 ubiquitin 抗体 (500 倍) をそれぞれ 4 日間 4°C で反応させた。二次抗体はビオチン標識ウマ抗マウス IgG 抗体と反応させ、ビオチン標識抗体はアビジン-ビオジン標識酵素複合体法 (ABC 法) により検出した。

4. 組織化学的定量解析

黒質ドーパミン神経細胞死の定量解析は免疫組織化学染色を行った後、黒質緻密部 (SNpc) における TH 陽性細胞数をカウントすることにより行った。データは平均値 ± 標準誤差で示し、統計学的解析には一元配置分散分析を用い、後検定には Bonferroni Dunn's multiple test を行った。危険率 5% 未満を有意な差があるとした。

結果

黒質におけるドーパミン神経細胞死は TH 陽性細胞数を指標した。6-OHDA 単独投与により投与後 12 時間から約 20% の TH 陽性細胞死が引き起こされ、その後経時的に有意に増加した。4 週後に至っては約 90% 以上の細胞

死が引き起こされた。6-OHDA と同時に lactacystin または MG-132 を投与した群では投与後 12 時間の細胞死は 6-OHDA 単独投与群とならば変化はなかった。しかし、投与後 24 時間では 6-OHDA 単独投与群と比較してその細胞死は抑制され、その後の細胞死も有意に抑制されていた。lactacystin または MG-132 単独投与では細胞死が起こらなかった。また、線条体における TH 発現に関する免疫組織化学的解析でも 6-OHDA 単独投与群ではほぼ完全に消失していたのに対し、プロテアソーム阻害薬同時投与群ではその減少が抑えられていた。

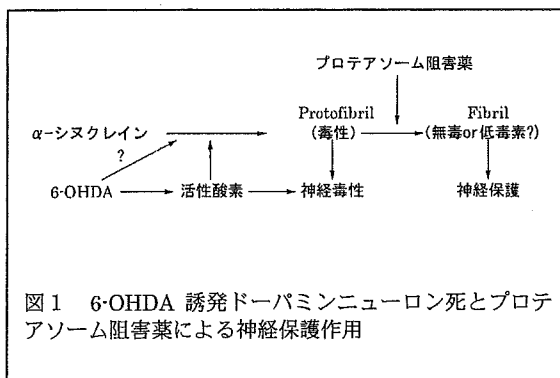
アポモルヒネによる薬物誘発旋回運動を比較すると、6-OHDA 単独投与群では 4 週目の回転数は 365 ± 21 turns/60 min であるのに対し、lactacystin または MG-132 同時投与では 65 ± 17 turns/60 min および 27 ± 7 turns/60 min と有意に減少していた。lactacystin または MG-132 単独投与では、回転運動は起きなかった。以上の結果より、*in vivo* モデルにおいてプロテアソーム阻害薬が 6-OHDA の神経毒性を抑制することが示された。

さらに、免疫組織化学的解析を行った結果、プロテアソーム阻害薬を同時に投与した群において α -synuclein および ubiquitin 陽性の凝集体が黒質において観察された。しかし、6-OHDA 単独投与では α -synuclein および ubiquitin 陽性の凝集体は観察されなかった。また、プロテアソーム阻害薬を単独で用いたモデル動物において凝集体が観察されているが⁶⁾、今回の実験においては lactacystin および MG-132 単独投与において凝集体は観察できなかった。

考察

近年、PD の根治治療を目指してその発症機序に基づく治療法の開発が行われている。その一つにユビキチン・プロテアソーム系から

のアプローチがある。これまでの PD 研究では、凝集体の形成は細胞死を誘導すると推定されてきたが、詳しいメカニズムの解明は今後の課題であるが、凝集体を形成することで 6-OHDA の神経毒性から回避された可能性がある (図 1)。凝集体形成はむしろ保護的に働いている可能性がある^{3,6)}。今回の研究結果は、プロテアソームを阻害することで凝集体の形成と細胞死が対極的に位置していることになるが、まだ不明な点が多く、さらなる検討が必要である。しかし、これらの知見は PD の発症機序に基づいた新規治療薬の開発の基盤となり得る可能性がある。



まとめ

in vivo パーキンソン病ラットモデルでプロテアソーム阻害薬は、6-OHDA の神経毒性を抑制した。

文献

- 1) Giasson BI., et al., *Neuron*. 31, 885-888. (2001)
- 2) Shimohama S., et al., *Trends. Mol. Med.*, 9, 360-365 (2003)
- 3) Inden M., et al., *Biogenic. Amines*. 17, 281-291 (2003)
- 4) Inden M., et al., *J. Pharmacol. Sci.*, 97 203-11 (2005)
- 5) McNaught KStP., et al., *Ann. Neurol.*, 56 149-162 (2004)
- 6) Sawada H., et al., *J. Biol. Chem.*, 279,