

的な選択的オートファジーによるクリアランス (mitophagy)

CCCP処理後の経過をみると、24時間後には GFP-パーキンを導入した細胞のミトコンドリアのみが選択的に消失した。しかもこの消失は、オートファジー (Atg7) が欠損したMEFs (mouse embryonic fibroblasts) では、大幅に抑制されたことから、膜電位を失ったミトコンドリアはオートファジーによって選択的に分解されている可能性が示唆された。このオートファジーによる選択的なミトコンドリア分解は、mitophagyと呼ばれている。パーキンはこの膜電位低下 (損傷) に依存したmitophagyに必須な役割を果たしていることが示唆された。

[結果4] PINK1 依存的なパーキンのミトコンドリア移行

ハエ (*Drosophila*) の遺伝学的研究から PINK1 はミトコンドリアの形態維持に必須であること、そしてパーキンと同じ経路に存在することが示唆されていた。さらにこの経路において PINK1 は、パーキンの上流に位置することも報告されていた。その理由は、PINK1 欠失によるミトコンドリアの形態異常はパーキンの過剰発現で抑制されるが、逆にパーキン欠失は PINK1 の過剰発現で相補されないからであった。

そこで損傷ミトコンドリアへのパーキンの移行に PINK1 が関係しているのか否かを調べるために PINK1 欠損 MEFs にレトロウイルスに組み込んだ GFP-パーキンを導入し、CCCP 処理 (30 μ M, 3 時間) を行った。その結果、野生株 MEFs では、パーキンは損傷ミトコンドリアに移行したが、PINK1 欠損 MEFs では、全く移行しなかった。そこで、PINK1 欠損 MEFs にレトロウイルスに PINK1 を組み込んで導入した戻し実験をすると、CCCP によるパーキンのミトコンドリア移行は、完全に回復した。この結果は、PINK1 がパーキンの損傷ミトコンドリアへのリクルート因子であることを示唆している。

[結果5] PINK1 によるパーキンのミトコンドリア移行の誘導には、PINK1 のミトコンドリア局在とキナーゼ活性が必須である

PINK1 は N-末端側に putative なミトコンドリア移行シグナル (典型的な構造ではない) 領域をもち C-末端側半分領域に Ser/Thr タンパク質キナーゼ領域 (serine/threonine-protein kinase) を持っている。そこで、PINK1 欠損^(+/)MEFs にレトロベクターで

野生型 PINK1 と欠損変異体 PINK1 を導入・発現させた戻し実験を行った。その結果、N-末端側ドメインを削除し PINK1 がミトコンドリアに移行できないようにすると、パーキンの損傷ミトコンドリアへのリクルートは、完全に阻害された。この結果、PINK1 のミトコンドリア局在がパーキンの損傷ミトコンドリアへのリクルートに不可欠であることが判明した。

さらに PINK1 のキナーゼ不活性型変異体 (触媒部との Ser/Thr 残基を変異させた kinase dead PINK1) も、同様な戻し実験においてパーキンの損傷ミトコンドリア移行が全く回復しなかった。したがって PINK1 のタンパク質キナーゼ活性がパーキンの損傷ミトコンドリアへのリクルート因子としての機能に必須であることが判明した。

[結果6] PINK1 は膜電位依存的な mitophagy に必須である

最終的に PINK1 がミトコンドリアの膜電位に依存した mitophagy に必須であるか否かを検討した。パーキンをレトロウイルスで導入した野生型 MEFs と PINK1 欠損 MEFs に CCCP 処理して 24 時間後に、ミトコンドリア量を Tom20 の染色度で観察した。野生型 MEFs のミトコンドリア量は、CCCP 処理によって激減したが、PINK1 欠損 MEFs で検討すると、ミトコンドリアの有意な減少は、明確に阻害された。この結果から、PINK1 が膜電位低下とパーキンに依存した mitophagy に必須であることが判明した。

[結果7] 膜電位依存的な PINK1 の選択的限定分解機構：損傷ミトコンドリアの感知機構

次いで PINK1 の動態 (細胞内局在性) を CCCP 処理の有無で比較検討した。通常、(膜電位が高い) 健康なミトコンドリアでは、全長 (60-kDa) PINK1 が短鎖 (50-kDa) PINK1 に限定分解され、その後の急速な分解によって PINK1 が恒常的に分解されているために、PINK1 は検出できないが、(膜電位が低い) 損傷ミトコンドリアでは、この限定分解が阻害され、PINK1 がミトコンドリア外膜上に急激に蓄積することを見出した。この結果は、膜電位依存的に PINK1 を切断する (プロトン H⁺依存性) プロテアーゼが損傷ミトコンドリアの感知機構の鍵を握ることが判明した。

[結果8] 更に本年、本課題に関連したユビキチン・プロテアソームシステムの研究においても多くの研究を行った (9-19)。

D. 考察

本研究により、PINK1 とパーキンによるミトコンドリアの品質管理機構が明確になった。この損傷ミトコンドリアのオートファジーによるクリアランス (浄化) は、分裂・増殖しない神経細胞の恒常性維持に特に重要であると思われる。本研究の今後の解明すべき課題は次の3点である。(I) 脱分極した (電位差を失った) ミトコンドリアを識別する機構の解明。電位差依存的に成熟型 60 kDa PINK1 を短鎖 50 kDa PINK1 に転換する酵素の同定が必須であり、プロトン (H⁺) 依存性プロテアーゼの存在を示唆している。しかし果たしてプロトン (H⁺) 依存性プロテアーゼは存在するか? が最大のテーマである。(II) PINK1 の作用機構の解明。パーキンが PINK1 の標的基質とすれば、合理的であるが、われわれのこれまでに解析では、パーキンは PINK1 の標的ではない知見が集積している。従って PINK1 の基質の同定とそのリン酸化型タンパク質がどのようにしてパーキンを損傷ミトコンドリアに移行させるかが、次に解明すべき大きな課題である。(III) 損傷ミトコンドリアの処理機構 (mitophagy の分子機構) の解明。損傷ミトコンドリアへ移行したパーキンの基質の同定と、その後の mitophagy の分子機構解明が必須である。われわれはオートファジーの選択的基質である p62 は C 末端の UBA (ubiquitin-associated) ドメインを介してユビキチン化タンパク質をオートファジーに誘導することを提唱した (6、7)。最近、p62 が mitophagy を仲介する役割を示唆する論文が発表された (8 : 参考文献)。しかしわれわれは損傷ミトコンドリアに移行したパーキンによる外膜タンパク質のユビキチン化に依存して p62 もミトコンドリア外膜に移行することを確認しているが、p62 の KO MEFs を用いた解析から mitophagy に関係しないデータを得ている。損傷ミトコンドリアは凝集して核近傍に移動するが、このミトコンドリアの動態には p62 が必須である (N 末端の PB1 重合化ドメインが必須) ことを突き止めた (論文投稿中)。今後 p62 による損傷ミトコンドリアの凝集 (clustering) の生理的意義と電位差の低下に依存した mitophagy の機構解明が焦眉の急である。

E. 結論

パーキンソン病は、ミトコンドリアの品質管理の破綻によって発症するミトコンドリア病である。その根拠は下記の通りである。われ

われは様々な細胞の細胞質の大部分のパーキンがミトコンドリアの脱共役剤 ‘uncoupler’ である CCCP (carbonyl cyanide m-chlorophenylhydrazone) 処理によって膜電位が低下したミトコンドリアに移行することを確認した。そしてパーキン移行後に、ミトコンドリアの外膜表面が抗ユビキチン抗体で濃染されることから、パーキンの真の標的分子がミトコンドリア表面膜に存在する可能性を示唆した。その後、ユビキチン化されたミトコンドリアは時間経過と共に消失し、この消失はオートファジー欠損 MEFs (マウス胎児線維芽細胞) では、観察されなかった。この結果は、選択的オートファジーがミトコンドリアの品質管理 (mitophagy) に関与している可能性を強く示唆している。

さらにわれわれは、哺乳動物細胞で PINK1 (PTEN-induced putative kinase 1) がパーキンの上流で機能していることを見出した。この結果から、PINK1-パーキン経路がミトコンドリアの障害状態を感知して、損傷したミトコンドリアをオートファジーでクリアランス (浄化) していることが判明した。またごく最近、われわれは PINK1 の動態解析の結果、PINK1 がミトコンドリアの障害状態を感知する分子機構の解明にも成功した。

F. 健康危険情報

無し

G. 研究発表

1. 論文発表

- (1) Shimura, H., Hattori, N., Kubo, S., Mizuno, Y., Asakawa, S., Minoshima, S., Shimizu, N., Iwai, K., Chiba, T., Tanaka, K., and Suzuki, S. (2000) Familial Parkinson's disease gene product, parkin, is a ubiquitin-protein ligase. *Nature Genet.* 25, 302-305.
- (2) Matsuda, N. and Tanaka, K. (2009) Does impairment of ubiquitin-proteasome system predispose to neurodegenerative disorders? *J Alzheimer's Dis.* 19, 1-9.
- (3) Sato, S., Chiba, T., Nishiyama, S., Kakiuchi, T., Tsukada, H., Hatano, T., Fukuda, T., Yasoshima, Y., Kai, N., Kobayashi, K., Mizuno, Y., Tanaka, K., and Hattori, N. (2006) Decline of striatal dopamine release in parkin-deficient mice revealed by ex vivo autoradiography. *J. Neurosci. Res.* 84, 1350-1357.

- (4) Narendra, D., A. Tanaka, D.F. Suen, and R.J. Youle. 2008. Parkin is recruited selectively to impaired mitochondria and promotes their autophagy. **J Cell Biol.** 183, 795-803.
- (5) Matsuda, N., Sato, S., Shiba, K., Okatsu, K., Saisho, K., Gautier, CA Sou, Y., Saiki, S., Kawajiri, S., Sato, F., Kimura, M., Komatsu, M., Hattori, N., and Tanaka, K. (2010) PINK1 stabilized by depolarization recruits Parkin to damaged mitochondria and activates latent Parkin for mitophagy. **J Cell Biol.** in press.
- (6) Komatsu, M., Waguri, S., Koike, M., Sou, Y., Ueno, T., Hara, T., Mizushima, N., Iwata, J., Ezaki, J., Murata, S., Hamazaki, J., Nishito, Y., Iemura, S., Natsume, N., Yanagawa, T., Uwayama, J., Warabi, E., Yoshida, H., Ishii, T., Kobayashi, A., Yamamoto, M., Yue, Z., Uchiyama, Y., Kominami, E., and Tanaka, K. (2007) Homeostatic levels of p62 control cytoplasmic inclusion body formation in autophagy-deficient mice. **Cell** 131, 1149-1163.
- (7) Ichimura, Y., Kumanomidou, T., Sou, Y.S., Mizushima, T., Ezaki, J., Ueno, T., Kominami, E., Yamane, T., Tanaka, K., and Komatsu, M (2008) Structural basis for sorting mechanism of p62 in selective autophagy. **J. Biol. Chem.** 283, 22847-22857.
- (8) Geisler, S., K.M. Holmstrom, D. Skujat, F.C. Fiesel, O.C. Rothfuss, P.J. Kahle, and W. Springer. 2010. PINK1/Parkin-mediated mitophagy is dependent on VDAC1 and p62/SQSTM1. **Nat Cell Biol.** 12, 119-131.
- (9) Tonoki, A., Kuranaga, E., Tomioka, T., Hamazaki, J., Murata, S., Tanaka, K., and Miura, M. (2009) Genetic evidence linking age-dependent attenuation of the 26S proteasome with aging process. **Mol. Cell Biol.** 29, 1095-1106.
- (10) Saeki, Y., Kudo, T., Sone, T., Kikuchi, Y., Yokosawa, H., Toh-e, A., and Tanaka, K. (2009) Lysine 63-linked polyubiquitin chain may serve as a targeting signal for the 26S proteasome. **EMBO J.** 28, 359 - 371
- (11) Kimura, Y., Yashiroda, H., Kudo, T., Koitabashi, S., Murata, S., Kakizuka, A., and Tanaka, K. (2009) An inhibitor of deubiquitinating enzyme regulates ubiquitin homeostasis. **Cell** 137, 549-559.
- (12) Saeki, Y., Toh-e, A., Kudo, T., Kawamura, H., and Tanaka, K. (2009) Multiple proteasome-interacting proteins assist the assembly of the yeast 19S regulatory particle. **Cell** 137, 900-913.
- (13) Kaneko, T., Hamazaki, J., Iemura, S., Sasaki, K., Furuyama, K., Natsume, T., Tanaka, K., and Murata, S. (2009) Assembly pathway of the mammalian proteasome base subcomplex is mediated by multiple specific chaperones. **Cell** 137, 914-925.
- (14) Komatsu, M., Kurokawa, H., Waguri, S., Taguchi, K., Kobayashi, A., Ichimura, Y., Sou, Y-S., Ueno, I., Sakamoto, A., Tong, K. I., Kim, M., Nishito Y., Iemura, S., Natsume, T., Ueno, T., Kominami, E., Motohashi, H., Tanaka, K., and Yamamoto, M. (2010) The selective autophagy substrate p62 activates the stress responsive transcription factor Nrf2 through inactivation of Keap1. **Nat. Cell Biol.** 12, 213-223.
- (15) Murata, S., Yashiroda, H., and Tanaka, K. (2009) Molecular mechanisms of proteasome assembly. **Nature Rev Mol Cell Biol** 10, 104-115.
- (16) Tanaka, K. (2009) The proteasome: Overview of structure and functions. **Proc. Jpn. Acad. Ser B Phys Biol Sci.** 85, 12-36.
- (17) Yue, Z., Friedman, L., Komatsu, M., and Tanaka, K. (2009) The cellular pathways of neuronal autophagy and their implication in neurodegenerative diseases. **Biochem. Biophys. Acta** 1793, 1496-1507.
- (18) Yoshida, Y. and Tanaka, K. (2010) Lectin-like ERAD players in ER and cytosol. **Biochem. Biophys. Acta** 1800, 172-180.
- (19) Kimura, Y. and Tanaka, K. (2010) Regulatory mechanisms involved in the control of ubiquitin homeostasis. **J. Biochem.** in press.

2. 学会発表

- (1) 田中啓二：細胞内大規模タンパク質分解システムの作動機構と生理機構。日本分子生物学会第9回春期シンポジウム (090511-12) 分子生物学の新たな胎動～宮崎から黎明の曙光～ (平成21年5月11～12日) 宮崎

(2)Keiji Tanaka : Molecular Assembly and Diversity of Proteasomes . Ubiquitin, Ubiquitin-like Proteins and Proteasomes: Functions and Dysfunctions, Inserm Workshop (June 10-12, 2009) Saint-Raphael, France

and the Ubiquitin-Like Systems, In Jerusalem, March 14-18, 2010, Israel

(3)Keiji Tanaka : Molecular Assembly and Diversity of Eukaryotic Proteasomes. Proteolysis Research: Succession and Development, Tokyo Garden Palace (July 5th, 2009) Tokyo, Japan

G. 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

(4)Keiji Tanaka : Molecular Assembly and Diversity of Eukaryotic Proteasomes. EMBO CONFERENCE on “Ubiquitin and Ubiquitin-like Modifiers in Health and Disease” Riva Del Garda, September 22nd to 26th, 2009, Italy

(5)田中啓二 : オートファジーと神経変性疾患. 第1回 ニューロフォーラム東京、京王プラザホテル (2009年10月1日)東京

(6)Keiji Tanaka : Molecular Mechanisms of Chaperone-assisted Proteasome Assembly. The 4th International Congress on Stress Responses in Biology and Medicine. The 4th Annual Meeting of The Biomedical Society for Stress Response, October 6 - 9, Sapporo, Japan

(7) Keiji Tanaka : Overview of My Proteasome Study, focusing on the Structure and Functions. International Conference on Radiation and Cancer Biology at Nagasaki 2010 (January 17th), Japan

(8) Keiji Tanaka : In-depth Analysis of Structure and Functions of Eukaryotic Proteasomes. Global COE “Integrative Life Science” Meeting. Based on the Study of Biosignaling Mechanisms, The University of Tokyo : March 5th 2010, Japan

(9) Keiji Tanaka : The Role of the PINK1/Parkin Pathway on the Autophagic Clearance of Damaged Mitochondria. Cancer Center, Rappaport Research Institute and Faculty of Medicine. Technion -Israel Institute of Technology, The 2010 Rappaport Research Institute Ubiquitin Day, Haifa (March 11, 2010), Israel

(10) Keiji Tanaka : Immunological Roles of the Thymoproteasome. Biology of the Ubiquitin

パーキンソン病におけるパエル受容体の役割に関する研究

研究分担者 高橋良輔 京都大学医学研究科

研究要旨

常染色体劣性若年性パーキンソニズム (AR-JP) の原因遺伝子 *parkin* はユビキチン・プロテアソーム系で重要な役割を果たすユビキチンリガーゼであり、タンパク質分解系の破綻が PD の発症にかかわることを示す強い証拠を提供している。我々は Parkin の基質タンパク質として構造異常を起こした Pael 受容体 (Pael-R) を単離し、*parkin* の変異によって分解されなくなった Pael-R が蓄積すると、これが小胞体ストレスを惹起して神経変性が生じるという仮説を提唱している。このことから小胞体ストレス防御機構の破綻からパーキンソン病発症に至る可能性が考えられる。哺乳類の小胞体ストレス防御機構で最も重要な分子のひとつに ATF6 がある。ATF6 は小胞体膜一回貫通型のタンパク質で、小胞体ストレスを検知すると、小胞体シャペロン転写を活性化するなど、防御機構の発現に不可欠な役割を果たす。我々は ATF6 α 欠損細胞では Pael-R を過剰発現すると細胞死が起こりやすくなることを見出した。さらに ATF6 α 欠損マウスでは黒質線条体経路で小胞体シャペロンが減少していることから、ATF6 α が黒質線条体経路での小胞体ストレス防御に重要であることが示唆された。さらに MPTP 投与による黒質ドーパミン神経細胞死が ATF6 α 欠損マウスでは優位に増強し、封入体形成も見られることから、従来ミトコンドリア障害に基づく酸化ストレスが主因と考えられてきた MPTP の毒性メカニズムにも小胞体ストレスが関与していることが明らかになった。

A. 研究目的

常染色体劣性若年性パーキンソニズム (AR-JP) の原因遺伝子産物 Parkin は、細胞内の主要なタンパク質分解系のひとつであるユビキチン・プロテアソーム系 (UPS) で重要な役割を果たすユビキチンリガーゼ (E3) としての活性をもち、AR-JP 患者で見られる変異体はこの E3 活性が欠失または低下している。このことは、本来 Parkin によって分解されるべき基質の神経細胞への蓄積がその病態の原因であることを示唆している。我々が Parkin の基質として同定した膜タンパク質 Pael 受容体 (Pael-R) は小胞体でのフォールディングが難しく、神経系培養細胞内で過剰発現させると、高度なユビキチン化とともに細胞死が観察される。これは本来そのほとんどが小胞体関連分解 (ERAD) で分解されている、うまくフォールディングされなかった Pael-R が ERAD の処理能力を超えて小胞体および細胞質に蓄積し小胞体ストレスを引き起こすためであると考えられる。

小胞体ストレスはこのように異常タンパク質が小胞

体内腔に蓄積することで細胞機能が著しく損なわれる状態を指す。小胞体ストレスは最終的には細胞死に至るので、これを解除するためのメカニズムとして小胞体ストレス応答という生体反応が惹起される。哺乳類では主として IRE1-XBP1 経路、ATF6 経路、PERK 経路の三種類の小胞体ストレス応答が知られている。このうち ATF6 は最も重要な経路である。ATF6 は小胞体膜一回貫通型の Type II 膜タンパク質であり、小胞体ストレスによって、N 末端が切断され、核に移行して小胞体シャペロンや小胞体関連分解 (ERAD) 関連分子の転写活性化に必須の転写因子として作用する。

本年は ATF6 欠損細胞に Pael-R を過剰発現した場合、Pael-R の毒性が増強されるかどうか、さらに従来実験的パーキンソン病モデル作製に用いられ、ミトコンドリア毒素と考えられてきた MPTP 誘発性のドーパミン神経細胞死に ATF6 α が関わるかどうか検討した。

B. 研究方法

ATF6 ノックアウト(ATF6 α -KO)マウスは京都大学理学研究科・森和俊教授から供与を受けた。このマウスから MEF を作製した。Pael-R をコードするアデノウイルスを作製し、これを MEF に感染させ、Pael-R の蓄積および細胞死誘導作用への影響を解析した。

一方 ATF6 α ノックアウトマウスの脳内各部位で小胞体シャペロンを定量した。MPTP を腹腔内投与し、黒質ドーパミン神経細胞死および形態学的変化への影響を観察した。

C. 研究結果

Pael-R を過剰発現した ATF6 α -KO の MEF では、野生型の MEF に比べて、ミスフォールド型に相当する不溶性 Pael-R の蓄積が著しく認められた。さらに Pael-R を過剰発現した ATF6 α -KO では、野生型に比べて有意に細胞死が増悪していたが、その差は顕著なものではなかった。

ATF6 α のドーパミン神経での役割を探るため、脳内各部位での小胞体シャペロンを測定したところ、代表的な小胞体シャペロンである BiP の発現が脳幹、中脳、線条体において有意に低下していた。他の小胞体シャペロン GRP94、コシャペロン p58IPK、Derlin-3 も中脳において有意に低下しており、ATF6 α が黒質線条体経路において特に重要な役割を果たしていることが示唆された。しかし、黒質ドーパミン神経細胞数は野生型と変わりなく、チロシン水酸化酵素 (TH) およびドパミントランスポーターのレベルにも変化はなかった。MPTP を野生型マウスに投与したところ、中脳で ATF6 α の前駆体と切断された活性化型がともに発現上昇し、その下流に位置する小胞体シャペロンの BiP と GRP94、ERAD 因子である Derlin-3 の発現上昇が見られた。また酸化的ストレスで活性化される p38MAPK もリン酸化され、活性化しているのが認められた。そこで ATF6 α -KO マウスと野生型マウスをともに MPTP で処理したところ、ATF6 α -KO マウスでは線条体で多くのユビキチン陽性の封入体形成が観察された。また線条体の TH レベルおよび HPLC で測定したドーパおよび DOPAC のレベルが低下してり、

ドーパミン作動性神経終末の減少が示唆された。黒質ドーパミン神経細胞数も ATF6 α -KO マウスで有意に減少しており、ATF6 α が MPTP 毒性に対して防御的に働いていることが判明した。

D. 考察

Pael-R の過剰発現による細胞死が ATF6 α 欠損細胞で増強されることから、ATF6 α が小胞体ストレスに対して細胞保護的に作用していることが示された。しかし野生型との差は非常に顕著なものではなかったのは、ATF6 α が単に小胞体ストレスに拮抗するだけでなく、小胞体ストレス誘発性神経細胞死を促進する作用があるからかもしれない。

また、ATF6 α -KO マウスが MPTP 毒性に対して脆弱になっていたことから、MPTP 毒性に対して ATF6 α が防御的に働くことが示された。これまで In vitro では p38MAPK が ATF6 α の活性化型をリン酸化し、転写活性を増強することが示されている。このような機序が MPTP 誘発性パーキンソン病モデルマウスでも働いているかどうか、検討中である。

E. 結論

小胞体ストレスセンサーである Pael-R 過剰発現による神経毒性を緩和する。また、MPTP による実験的パーキンソニズムにおいて小胞体ストレス応答が惹起され、ATF6 α は細胞保護的に働く。

F. 研究発表

村上 学、井上治久、高橋良輔 (2009) : 筋萎縮性側索硬化症 (ALS) の治療戦略、ファルマシア、45 : 1009-1112

高橋良輔 (2009) : パーキンソン病の神経細胞移植治療、日本医事新報、4445 : 79-80

Takahashi R. (2009) Edaravone in ALS. (commentary) *Exp Neurol.* 217:235-6

Takeuchi H, Yanagida T, Inden M, Takata K, Kitamura Y, Yamakawa K, Sawada H, Izumi Y, Yamamoto N, Kihara T, Uemura K, Inoue H, Taniguchi T, Akaike A, Takahashi R, Shimohama S (2009) Nicotinic receptor stimulation protects nigral dopaminergic neurons in rotenone-induced Parkinson's disease models. *J Neurosci Res.* 87:576-85.

Uemura K, Lill CM, Banks M, Asada M, Aoyagi N, Ando K, Kubota M, Kihara T, Nishimoto T, Sugimoto H,

Takahashi R, Hyman BT, Shimohama S, Berezovska O, Kinoshita A.(2009) N-cadherin-based adhesion enhances Abeta release and decreases Abeta42/40 ratio. **J.Neurochem** 108(2): 350-60.

Kondo T, Inoue H, Usui T, Mimori T, Tomimoto H, Vernino S, Takahashi R (2009) Autoimmune autonomic ganglionopathy with Sjögren's syndrome: significance of ganglionic acetylcholine receptor antibody and therapeutic approach. **Auton Neurosci.** 146:33-5.

Sawada H, Oeda T, Yamamoto K, Kitagawa N, Mizuta E, Hosokawa R, Ohba M, Nishio R, Yamakawa K, Takeuchi H, Shimohama S, Takahashi R, Kawamura T (2009) Diagnostic accuracy of cardiac metaiodobenzylguanidine scintigraphy in Parkinson disease. **Eur J Neurol.** 16:174-82.

Ikeda A, Hirasawa K, Kinoshita M, Hitomi T, Matsumoto R, Mitsueda T, Taki JY, Inouch M, Mikuni N, Hori T, Fukuyama H, Hashimoto N, Shibasaki H, Takahashi R (2009) Negative motor seizure arising from the negative motor area: is it ictal apraxia? **Epilepsia** 50:2072-84.

Okamoto Y, Ihara M, Fujita Y, Ito H, Takahashi R, Tomimoto H (2009) Cortical microinfarcts in Alzheimer's disease and subcortical vascular dementia. **Neuroreport** 20:990-6.

Ikeuchi K, Marusawa H, Fujiwara M, Matsumoto Y, Endo Y, Watanabe T, Iwai A, Sakai Y, Takahashi R, Chiba T (2009) Attenuation of proteolysis-mediated cyclin E regulation by alternatively spliced Parkin in human colorectal cancers. **Int J Cancer** 125: 2029-35.

Kitaguchi H, Tomimoto H, Ihara M, Shibata M, Uemura K, Kalaria RN, Kihara T, Asada-Utsugi M, Kinoshita A, Takahashi R.(2009) Chronic cerebral hypoperfusion accelerates amyloid beta deposition in APPSwInd transgenic mice. **Brain Res.** 1294:202-10.

Kobayashi K, Okamoto Y, Inoue H, Usui T, Ihara M, Kawamata J, Miki Y, Mimori T, Tomimoto H, Takahashi R (2009) Leukoencephalopathy with cognitive impairment following tocilizumab for the treatment of rheumatoid arthritis (RA). **Intern Med.** 48:1307-9.

Matsui H, Taniguchi Y, Inoue H, Uemura K, Takeda S, Takahashi R (2009) A chemical neurotoxin, MPTP induces Parkinson's disease like phenotype, movement disorders and persistent loss of dopamine neurons in medaka fish. **Neurosci Res.** 65:263-71.

Kawamata J, Ikeda A, Fujita Y, Usui K, Shimohama S, Takahashi R.(2009)Mutations in LGI1 gene in Japanese families with autosomal dominant lateral temporal lobe epilepsy: The first report from Asian families. **Epilepsia.**

2009 Sep 22. [Epub ahead of print]

Usui K, Ikeda A, Nagamine T, Matsubayashi J, Matsumoto R, Hiraumi H, Kawamata J, Matsuhashi M, Takahashi R, Fukuyama H. (2009) Abnormal auditory cortex with giant N100m signal in patients with autosomal dominant lateral temporal lobe epilepsy. **Clin Neurophysiol.** 120: 1923-6.

Uyama N, Uchihara T, Mochizuki Y, Nakamura A, Takahashi R, Mizutani T.(2009) Selective nuclear shrinkage of oligodendrocytes lacking glial cytoplasmic inclusions in multiple system atrophy: a 3-dimensional volumetric study. **J Neuropathol Exp Neurol.** 68:1084-91.

Yamakawa K, Izumi Y, Takeuchi H, Yamamoto N, Kume T, Akaike A, Takahashi R, Shimohama S, Sawada H. (2009) Dopamine facilitates alpha-synuclein oligomerization in human neuroblastoma SH-SY5Y cells. **Biochem Biophys Res Commun.** 2009 Nov 11. [Epub ahead of print]

Matsui H, Taniguchi Y, Inoue H, Kobayashi Y, Sakaki Y, Toyoda A, Uemura K, Kobayashi D, Takeda S, Takahashi R (2010) Loss of PINK1 in medaka fish (*Oryzias latipes*) causes late-onset decrease in spontaneous movement. **Neurosci Res.** 66:151-61.

Aoyagi N, Uemura K, Kuzuya A, Kihara T, Kawamata J, Shimohama S, Kinoshita A, Takahashi R (2010) PI3K inhibition causes the accumulation of ubiquitinated presenilin 1 without affecting the proteasome activity. **Biochem. Biophys. Res. Commun.** 391:1240-5.

Kawamoto Y, Ito H, Kobayashi, Y., Suzuki, Y., Ihara M, Kawamata J, Akiguchi I, Fujimura H, Sakoda S, Kusaka H, Hirano A, Takahashi R.(2010) HtrA2/Omi-immunoreactive intraneuronal inclusions in the anterior horn from patients with sporadic and SOD1 mutant amyotrophic lateral sclerosis. **Neuropath. Appl. Neurobiol.** in press.

2. 学会発表

高橋良輔：孤発性パーキンソン病の病因：環境要因とリスク遺伝子。第50回日本神経学会総会、仙台（2009. 5. 22）

高橋良輔：パーキンソン病の最新の治療と展望。平成21年度日本内科学会生涯教育講演会、仙台（2009. 9. 6）

高橋良輔：家族性パーキンソン病の分子メカニズム—神経保護治療に向けて—シンポジウム「神経変性疾患の分子標的治療への新たな展開」、第32回日本神経科学学会、名古屋（2009. 9. 18）

G. 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

厚生労働科学研究費補助金（こころの健康科学研究事業）

パーキン蛋白の機能解析と治療法の開発

分担研究報告書

ミクログリアの二相性と脳保護作用に関する研究

分担研究者 澤田 誠 名古屋大学教授

研究要旨

本研究の最終年度として本年度はミクログリアの脳保護作用について検討を行った。ラット脳一次培養からえられる性質の異なるミクログリアのうちタイプ II を IL-4 で活性化すると神経毒性の強い A beta(1-42)オリゴマーの貪食分解が促進された。このとき、スカベンジャー受容体 CD36、ネプリライシン、インシュリン分解酵素が誘導された。CD36 に機能変異をもつラットから分離したタイプ II ミクログリアでは A beta(1-42)オリゴマーの貪食増大が見られなかった。この効果はタイプ I ミクログリアでは見られなかった。この結果から、ミクログリアにはサブタイプが存在し、神経変性疾患発症にそれぞれ異なる役割を果たしている事がわかった。サブタイプの活性化条件はそれぞれ異なる事から、パーキンソン病の段階における各サブタイプの役割を調べる事により発症や病態形成のメカニズムへの関与が明らかになると考えられる。

A. 研究目的

アルツハイマー病やパーキンソン病などの神経変性を伴う疾患だけでなく、脳腫瘍やてんかん、統合失調症に至るほとんどすべての脳疾患においてミクログリアの活性化が見られることが報告されている。脳全体に広汎に存在するいわゆる休止ミクログリアはその検出が難しいが、活性化ミクログリアはマクロファージ様の性質を持つようになるため、マクロファージを認識する種々の抗体で検出でき、

脳疾患の病理像では疾患部位に集積した活性化ミクログリアが多数観察することができる。しかもそれらがあたかも神経変性や炎症などの疾患の原因を引き起こしているようにさえ見える。さらに、単離したミクログリアが細胞傷害性をもつ因子を産生すること、活性化したミクログリアが病理切片においても培養下においても細胞傷害性のマクロファージと区別が付けることが難しいことから、種々の脳疾患において、ミクログリアが病変

を形成する「悪役」として考えられてきた。このような視点から本研究ではミクログリアの毒性転換のメカニズムについて研究を行い、パーキンソン病発症や病態形成との関係について検討を行ってきた。しかし、より多くの抗体や染色法が開発され、それらを用いた疾患脳の検索が行われた結果、ミクログリアの活性化は病変部に限局しているわけではなく、正常な組織像を呈する部分にも出現していることも明らかになりつつある。このようなミクログリアは少なくとも病態形成とは無関係であり、「悪いミクログリア」とは明らかに異なる作用をしていると考えられる。そこで本研究の最終年度として本年度はミクログリアの脳保護作用について検討を行った。

B. 研究方法

タイプ I および II ミクログリアの分離：新生ラット脳より調製した混合グリア培養から既報の方法によりタイプ I および II ミクログリアを分離した。両者は CD86 陽性細胞であるが、CD40 タンパク質の発現の有無（タイプ I は CD40 陽性、タイプ II は陰性）で区別した。

Abeta オリゴマーの調製とミクログリアによる貪食分解実験：¹²⁵I で標識した 5 mM A beta(1-42)ペプチドの DMSO 溶液を HAM F12 培地にて 10 倍希釈し、4 度で 24 時間巡回攪拌してオリゴマーを調製した。TP24 テストプレートもしくは 6cm dish に播種したタイプ I および II ミクログリ

アにオリゴマーを添加し、37 度で 6 時間反応した後、PBS で洗浄しプロテイナーゼ K で 4°C 15 分反応して細胞外の A beta(1-42)オリゴマーを分解除去した後、細胞を回収して総取り込み量や分解について分析した。ミクログリアによる A beta(1-42)オリゴマーの取り込み量の測定は、回収した細胞を 0.1M NaOH にて溶解し細胞内の放射活性を測定して定量した。A beta(1-42)オリゴマーの分解はウエスタンブロッティングにより分析した。

ウエスタンブロッティングによる A beta(1-42)オリゴマー分解の測定：回収したミクログリア (5×10^6 細胞) を 1% SDS, 2% ショ糖、4mM EDTA, 1mM PMSF, 1ug/ml pepstatin A, 1ug/ml leupeptin, 10ug/ml trypsin 阻害剤を含む 10mM Tris-HCl (pH 7.6) で溶解し、その一部に DTT を加えて加熱熱変性した。タンパク質量で 50ug のサンプルを SDS-PAGE で分離し、ニトロセルロースに転写後、抗 A beta(1-17)抗体 (6E10, 1/500 倍希釈) で反応 HRP 標識二次抗体で標識後、ECL にて検出した。

(倫理面への配慮) 特に無し。

C. 研究結果

ミクログリアのサブタイプの分離：新生ラット脳より調製した混合グリア培養から既報の方法によりタイプ I および II ミクログリアを分離した。両者は CD86 陽性細胞であるが、タイプ I は CD40 陽性、タイプ II は陰性であった。一方、IL-4

受容体発現についてはタイプ I ではほとんど発現が見られなかったが、タイプ II では発現が見られた。CD36 スカベンジャー受容体は無刺激では両者ともわずかに検出できる程度であったが、IL-4 で活性化するとタイプ II ミクログリアで発現が増大した。CD36 の発現誘導はミクログリアの活性化を起こす事が知られている LPS, インターフェロン γ , M-CSF などでは見られなかった。一方、スカベンジャー受容体 A は両者とも高発現しており、活性化剤などでの発現誘導は見られなかった。

IL-4 で活性化したタイプ II ミクログリアで A beta オリゴマーの取り込み、分解が促進される : 1 μ g/ml の 125 I 標識 A beta(1-42)オリゴマーを添加して 37°C で 6 時間反応させた場合、タイプ II ミクログリアは mg タンパク質あたり約 70ng の A beta(1-42)オリゴマーを取り込んだ。また 5ng/ml の IL-4 で活性化すると約 70% 取り込み量が増大 (120ng/mg タンパク) した。細胞内の量は 6-12 時間でピークとなるが、その後減少する事から細胞内で分解排除されると考えられる。この分解はネプリライシン阻害剤のチオルファンの前処理やインシュリン分解酵素の基質であるインシュリンにより抑制される事から両酵素が関わっている事が推定できた。また、両酵素は IL-4 による活性化で増大する事から、IL-4 で活性化されたタイプ II ミクログリアは神経毒性の強い A beta(1-42)オリゴマーの排除に特異的に

関わっている可能性が考えられた。

A beta(1-42)オリゴマーの取り込みメカニズム : タイプ II ミクログリアによる A beta(1-42)オリゴマーの取り込みが IL-4 による活性化により CD36 の発現と並行して増大する事、A beta(1-42)オリゴマーが CD36 などのスカベンジャー受容体のリガンドになることなどから、今回検出しているミクログリアによる A beta(1-42)オリゴマーの取り込みには CD36 が関与していると考えられる。その可能性を確認するために以下の実験を行った。まず、スカベンジャー受容体の競合的リガンドであるフコイタンを添加したところ、A beta(1-42)オリゴマーの取り込み量が減少した。次に、CD36 を強制発現した CHO 細胞で A beta(1-42)オリゴマーの取り込みが検出できる事がわかった。さらに、CD36 の機能変異をも SHR/NCrj ラットから調製したタイプ II ミクログリアでは IL-4 依存的な A beta(1-42)オリゴマーの取り込み量増大が見られなかった。これらの結果から、タイプ II ミクログリアによる A beta(1-42)オリゴマーの取り込みは CD36 スカベンジャー受容体を經由して起こる事がわかった。

D. 考察

CD36 は、マクロファージに存在するタイプ B スカベンジャー受容体で、特定の酸化リン脂質や酸化リポタンパク質を認識するスカベンジャー受容体として機能することによりアポトーシス細胞、特定

の細菌病原体や真菌病原体、および修飾低密度リポタンパク質の細胞内移行に関与し、それによって炎症応答などに寄与する。CD36 の下流のシグナル伝達経路には、非受容体型チロシンキナーゼ、特異的なマイトジェン活性化プロテインキナーゼ、および Vav ファミリーのグアニンヌクレオチド交換因子のリガンド依存型リクルートメントと活性化、接着斑の構成要素の調節、および細胞内での活性酸素種の産生が関与する。多くの細胞において、CD36 はコレステロールを豊富に含む特殊な膜マイクロドメインに局在しており、テトラスパニンやインテグリンなどの他の膜受容体と相互作用している可能性もある。今回明らかになった A beta(1-42)オリゴマーの取り込みに関わる CD36 シグナル伝達経路の詳細を明らかにすることができれば、パーキンソン病の病態各段階における各サブタイプの役割を調べる事により発症や病態形成のメカニズムが明らかになるばかりでなく、広く神経変性の治療に有効な薬物開発のための新たな標的がもたらされるとかんがえられる。

ミクログリアは様々な生理的な刺激により、活性化される。しかし、軽度な活性化においては、ミクログリアは神経保護的因子、及び神経栄養因子などを放出し、神経保護的に働くと考えている。その時、さらに神経変性疾患の病因になるような、例えばアルツハイマー病の場合 A beta、PD の場合 α シヌクレイン酸などのような

蛋白、またはウイルス、及び炎症性細胞などにより、2段階に活性化されると、ミクログリアは toxic change している。ミクログリアのサブタイプによって、第2段階の刺激における感受性に相違がある可能性が考えられ、このミクログリアの2段階 toxic change のモデルという考えに基づき、各々の患者におけるミクログリアの活性化の違いや活性化したミクログリアの役割の違いがあることを踏まえた取り組みが必要と思われる。

本研究により、今後様々な中枢神経疾患における治療薬、治療法を開発する上で、ミクログリアの性質を把握する事は不可欠であり、さらにサブタイプによる活性化の相違や、2段階 toxic change という新しい見解を考慮する事が重要であると考える。神経変性疾患において、ミクログリアのさらなる理解が必要であると考える。

E. 結論

神経変性疾患の病態形成においてはミクログリアの毒性転換が重要であるが、発症のメカニズムの解明には毒性転換と脳保護作用の両方を調べる必要がある。そこでミクログリアの脳保護作用について検討を行い、typeII ミクログリアを IL-4 で活性化させると CD36 スカベンジャーレセプターが増大し神経毒性の高い A beta オリゴマーの貪食が増大、並行してネプリライシンやインシュリン分解酵

素 (IDE) が増大してオリゴマーを分解して神経毒性を低下させる事がわかった。サブタイプの活性化条件はそれぞれ異なる事から、パーキンソン病の病態各段階における各サブタイプの役割を調べる事により発症や病態形成のメカニズムへの関与が明らかになると考えられる。

F. 研究発表

1. 論文発表

M Kuno, H Ando, H Morihata, H Sakai, H Mori, M Sawada, S Oiki: Temperature dependence of proton permeation through a voltage-gated proton channel. *The Journal of General Physiology* 134(3): 191-205, 2009

T Chikuma, T Yoshimoto, M Ohba, M Sawada, T Kato, T Sakamoto, Y Hiyama, H Hojo: Interleukin-6 induces prostaglandin E₂ synthesis in mouse astrocytes. *Journal of Molecular Neuroscience* 39(1-2): 175-184, 2009

K Ono, K Fuma, K Tabata, M Sawada: Ferritin reporter used for gene expression imaging by magnetic resonance. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 388(3): 589-594, 2009

H Sawada, H Suzuki, T Nagatsu, M Sawada: Neuroprotective and Neurotoxic Phenotypes of Activated Microglia in Neonatal Mice with Respective MPTP- and Ethanol-Induced Brain Injury. *Neuro-degenerative Diseases* 7(1-3): 64-67, 2010

F Ito, H Toyama, G Kudo, H Suzuki, K Hatano, M Ichise, K Katada, K Ito, M Sawada: Two

activated stages of microglia and PET imaging of peripheral benzodiazepine receptors with [(11)C]PK11195 in rats. *Annals of Nuclear Medicine* 24(3): 163-169, 2010

H Yukawa, Y Kagami, M Watanabe, K Oishi, Y Miyamoto, Y Okamoto, M Tokeshi, N Kaji, H Noguchi, K Ono, M Sawada, Y Baba, N Hamajima, S Hayashi: Quantum dots labeling using octa-arginine peptides for imaging of adipose tissue-derived stem cells. *Biomaterials* 31(14):4094-4103, 2010

K Ono, H Suzuki, M Sawada: Delayed neural damage is induced by iNOS-expressing microglia in a brain injury model. *Neuroscience Letters* 473(2):146-150, 2010

書籍

澤田 誠: 家族性パーキンソン病は弧発性パーキンソン病のモデルになるか? *Frontiers in Parkinson Disease* メディカルレビュー社, 20-23, 2009.

澤田 誠: 炎症。パーキンソン病-基礎・臨床研究のアップデート *日本臨牀* 126-130, 2009.

2. 学会発表

招待講演

澤田 誠: シンクトロン光を用いた細胞制御脳研究への道. 第16回「先端技術と原子力」シンポジウム, 2009. 8. (名古屋)

澤田 誠: ミクログリアの毒性転換の in vivo イメージング. 第7回神経科学研究会, 2009. 9. (東京)

澤田 誠: ミクログリアの毒性転換の in vivo イメージングと脳の標的化 DDS 技術. 第3

- 回アルツハイマー病の早期診断・治療・予防法の開発研究会, 2009.12. (名古屋)
- 一般演題
- K Hatano, H Toyama, T Yamada, G Kudo, H Suzuki, M Ichise, Wilson A.A. M Sawada, K Ito: A practical preparation of [¹⁸F]FEPPA using a protic solvent system. 18th International Symposium on Radiopharmaceutical Sciences, 2009.7. (Edmonton, Canada), *Journal of Labelled Compounds & Radiopharmaceuticals* 52: S273-S273 Supple. 1
- 鈴木陽之、梶村益久、岩間信太郎、鈴木弘美、有馬 寛、澤田 誠、大磯ユタカ: SIADHモデルラットにおいてミノサイクリンは浸透圧性脱髄の発症・進展を防止する。第36回日本神経内分泌学会学術集会, 2009.9. (北九州)
- H Suzuki, Y Sugimura, S Iwama, H Suzuki, H Arima, M Sawada, Y Oiso: Minocycline prevents osmotic demyelination by inhibiting the activation of microglia in rats. 第8回国際下垂体後葉ホルモン学会, 2009.9. (北九州)
- 小野 健治、山本奈穂、鈴木弘美、澤田 誠: Protective roles of brain-migrated immature bone marrow cells against NO-dependent neurotoxicity in a brain injury model. 第32回日本神経科学大会, 2009.9. (名古屋), *Neuroscience Research* 65: S43-S43 Supple.1
- 澤田浩秀、鈴木弘美、永津俊治、澤田 誠: Neuroprotective or neurotoxic phenotypes of activated microglia in neonatal mice in neuronal injuries. 第32回日本神経科学大会, 2009.9. (名古屋), *Neuroscience Research* 65: S118-S118 Supple.1
- 梶村益久、村瀬孝司、竹藤聖子、高木博史、岩間信太郎、鈴木陽之、高岸芳子、有馬 寛、澤田 誠、大磯ユタカ、村田善晴: The differing pathological effects of nitric oxide synthase isoforms in osmotic demyelination syndrome in rats. 第32回日本神経科学大会, 2009.9. (名古屋), *Neuroscience Research* 65: S53-S53 Supple.1
- H Suzuki, Y Sugimura, Iwama, H Suzuki, H Arima, M Sawada, Y Oiso: Protective effects of minocycline on osmotic demyelination syndrome in rats. *Neuroscience* 2009, 2009.10. (Chicago)
- 小野 健治、夫馬和也、田畑香織、澤田 誠: 遺伝子発現変化を核磁気共鳴イメージングで可視化する方法の開発。日本生化学会第82回大会, 2009.10. (神戸)
- 川原浩一、清水英介、鍛冶園誠、澤田 誠、中山 仁: インターロイキン4で活性化したラット初代培養2型ミクログリアによるオリゴマー状アミロイドβペプチド₁₋₄₂の選択的クリアランス。日本生化学会第82回大会, 2009.10. (神戸)
- G. 知的財産権の出願、登録
1. 特許取得
- 出願: 脳移行型融合ポリペプチド (出願日: 平成21年12月4日)
- 特許取得: 株化ミクログリア (取得日: 平成21年10月9日)

2. 実用新案登録：該当なし

3. その他：該当なし

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 (服部信孝)

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
Mellick GD, Siebert GA, Funayama M, Buchanan DD, Li Y, Imamichi Y, Yoshino H, Silburn PA, Hattori N	Screening PARK Genes for Mutations in Early Onset Parkinson's Disease Patients from Queensland, Australia	Parkinsonism & Related Disorders	15	105-109	2009
Momma K, Funayama M, Li Y, Ichinose H, Motoyoshi K, <u>Hattori N</u> , Mizuno Y, Kamakura K	A new mutation in the GCH1 gene presents as early-onset Parkinsonism	Parkinsonism & Related Disorders	15	160-161	2009
Fukae J, Sato S, Shiba K, Sato K, Mori H, Sharp PA, Mizuno Y, & <u>Hattori N</u>	Programmed cell death-2 isoform 1 is ubiquitinated by parkin and increased in the substantia nigra of patients with autosomal recessive Parkinson's disease.	<i>FEBS Lett</i>	383	521-525	2009
Tomiyama H, Li Y, Yoshino H, Mizuno Y, Kubo S, Toda T, & <u>Hattori N</u>	Mutation analysis for DJ-1 in sporadic and familial parkinsonism: Screening strategy in parkinsonism	<i>Neurosci Lett</i>	455	159-161	2009
Sasaki K, Shimura H, Itaya M, Tanaka R, Mori H, Mizuno Y, Kosik KS, Tanaka S, & <u>Hattori N</u>	Excitatory amino acid transporter 2 associates with phosphorylated tau and is localized in neurofibrillary tangles of tauopathic brains	<i>FEBS Lett</i>	583	2194-200	2009
Satake W, Nakabayashi Y, Mizuta I, Hirota Y, Ito C, Kubo M, Kawaguchi T, Tsunoda T, Watanabe M, Takeda A, Tomiyama H, Nakashima K, Hasegawa K, Obata F, Yoshikawa T, Kawakami H, Sakoda S, Yamamoto M, <u>Hattori N</u> , Murata M, Nakamura Y, & Toda T.	Genome-wide association study identifies common variants at four loci as genetic risk factors for Parkinson's disease	<i>Nat Genet</i>	41	1303-1307	2009
Kawajiri S, Saiki S, Sato S, Sato F, Hatano T, Eguchi H, & <u>Hattori N</u>	PINK1 is recruited to mitochondria with parkin and associates with LC3 in mitophagy	<i>FEBS Lett</i>	584	1073-1079	2010

研究成果の刊行に関する一覧表 (田中啓二)

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
Saeki, Y., Kudo, T., Sone, T., Kikuchi, Y., Yokosawa, H., Toh-e, A., and Tanaka, K.	Lysine 63-linked polyubiquitin chain may serve as a targeting signal for the 26S proteasome.	EMBO J.	28	359 - 371	2009
Kimura, Y., Yashiroda, H., Kudo, T., Koitabashi, S., Murata, S., Kakizuka, A., and Tanaka, K.	An inhibitor of deubiquitinating enzyme regulates ubiquitin homeostasis.	Cell	137	549-559	2009
Saeki, Y., Toh-e, A., Kudo, T., Kawamura, H., and Tanaka, K.	Multiple proteasome-interacting proteins assist the assembly of the yeast 19S regulatory particle.	Cell	137	900-913	2009
Kaneko, T., Hamazaki, J., Iemura, S., Sasaki, K., Furuyama, K., Natsume, T., Tanaka, K., and Murata, S.	Assembly pathway of the mammalian proteasome base subcomplex is mediated by multiple specific chaperones.	Cell	137	914-925	2009
Nitta, T., Murata, S., Sasaki, K., Fujii, H., Ripen, A. M., Ishimaru, N., Koyasu, S., Tanaka, K., and Takahama, Y.	Thymoproteasome shapes immunocompetent repertoire of CD8 T cells.	Immunity	32	29-40	2009
Murata, S., Yashiroda, H., and Tanaka, K.	Molecular mechanisms of proteasome assembly.	Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.	10	104-115	2009
Tanaka, K.	The proteasome: Overview of structure and functions.	Proc. Jpn. Acad. Ser. B Phys Biol Sci	85	12-36	2009
Tonoki, A., Kuranaga, E., Tomioka, T., Hamazaki, J., Murata, S., Tanaka, K., and Miura, M.	Genetic evidence linking age-dependent attenuation of the 26S proteasome with aging process.	Mol. Cell. Biol.	29	1095-1106	2009

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Komatsu, M., Kurokawa, H., Waguri, S., Taguchi, K., Kobayashi, A., Ichimura, Y., Sou, Y-S., Ueno, I., Sakamoto, A., Tong, K. I., Kim, M., Nishito Y., Iemura, S., Natsume, T., Ueno, T., Kominami, E., Motohashi, H., Tanaka, K., and Yamamoto, M.	The selective autophagy substrate p62 activates the stress responsive transcription factor Nrf2 through inactivation of Keap1.	Nat. Cell Biol.	12	213-223	2010
Yue, Z., Friedman, L., Komatsu, M., and Tanaka, K.	The cellular pathways of neuronal autophagy and their implication in neurodegenerative diseases.	Biochem. Biophys. Acta	1793	1496-1507	2009
Yoshida, Y. and Tanaka, K.	Lectin-like ERAD players in ER and cytosol.	Biochem. Biophys. Acta	1800	172-180	2010
Kimura, Y. and Tanaka, K.	Regulatory mechanisms involved in the control of ubiquitin homeostasis.	J. Biochem. in press			2010
Matsuda, N., Sato, S., Shiba, K., Okatsu, K., Saisho, K., Gautier, CA Sou, Y., Saiki, S., Kawajiri, S., Sato, F., Kimura, M., Komatsu, M., Hattori, N., and Tanaka, K.	PINK1 stabilized by depolarization recruits Parkin to damaged mitochondria and activates latent Parkin for mitophagy.	J. Cell Biol. in press			2010

研究成果の刊行に関する一覧表（高橋良輔）

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

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
村上 学、井上治久、高橋良輔	萎縮性側索硬化症 (ALS) の治療戦略	ファルマシア	45	1009-1112	2009
高橋良輔	パーキンソン病の神経細胞移植治療	日本医事新報	4445	79-80	2009
<u>Takahashi R</u>	Edaravone in ALS. (commentary)	Exp Neurol.	217	235-6	2009
Takeuchi H, Yanagida T, Inden M, Takata K, Kitamura Y, Yamakawa K, Sawada H, Izumi Y, Yamamoto N, Kihara T, Uemura K, Inoue H, Taniguchi T, Akaike A, <u>Takahashi R</u> , Shimohama S	Nicotinic receptor stimulation protects nigral dopaminergic neurons in rotenone-induced Parkinson's disease models.	J Neurosci Res.	87	576-85	2009
Uemura K, Lill CM, Banks M, Asada M, Aoyagi N, Ando K, Kubota M, Kihara T, Nishimoto T, Sugimoto H, <u>Takahashi R</u> , Hyman BT, Shimohama S, Berezovska O, Kinoshita A	N-cadherin-based adhesion enhances Abeta release and decreases Abeta42/40 ratio.	J. Neurochem.	108	350-60	2009