

神経突起制御因子 PRGs の結合タンパク TRIMEN の同定と機能解析

研究協力者：佐々木秀直（北海道大学大学院医学研究科神経病態学講座神経内科学分野 教授）

共同研究者：矢口裕章¹⁾，加納崇裕¹⁾，奥村文彦²⁾，畠山鎮次²⁾

1) 北海道大学大学院医学研究科神経病態学講座神経内科学分野

2) 北海道大学大学院医学研究科生化学講座医化学分野

研究要旨

（目的）近年神経細胞の突起伸長にかかわる膜タンパク質として plasticity related gene1 (PRG1) が同定され、その機能にはリゾフォスファチジン酸 (LPA) が関与するとされている。それらの神経突起様伸長に関わる機能を ALS の治療に応用することを目標として、LPA・PRG を制御するタンパク質の機能を検討した。（方法）Yeast two-hybrid スクリーニング・HEK293T 細胞での過剰発現による免疫沈降法・パルスチェイスアッセイ・COS7 細胞と Neuro2A 細胞での免疫蛍光染色。（研究結果）①タンパク質の構造からリング型ユビキチンリガーゼとして機能することが考えられる TRIM for elongation of neurites 1 and 2 (TRIMEN1 および TRIMEN2) と PRGs が結合することを明らかにした。②パルスチェイスアッセイにて TRIMEN1/2 が PRGs の分解へ関与していないことを明らかにした。③免疫蛍光染色により PRG・TRIMEN の局在を確認した。④Neuro2A においては、TRIMEN2 を過剰発現することで神経突起様伸長が抑制されることを明らかにした。⑤変異体の作製により TRIMEN2 の PRGs への結合部位を検討した。（結論）生化学的解析により、TRIMEN1/2 が PRGs の機能を制御する可能性が示唆された。

A. 研究目的

ES 細胞や iPS 細胞から運動ニューロンを作製することが可能となり、ALS など神経変性疾患の新たな治療法として再生医療への期待が高まっている。しかし、治療応用のためには再生した神経細胞の軸索伸長・ネットワーク構築が不可欠であり、その促進因子の投与など包括的な治療戦略が必要である。今回我々は、神経突起様伸長の促進因子である plasticity related gene (PRGs) に着目し、その機能制御に関与するタンパクを同定した。PRGs は脳梗塞などでおこるニ

ューロン新生時に発現が亢進し、神経突起の成長抑制因子であるリゾフォスファチジン酸 (LPA) を分解することで神経ネットワークの再生に貢献すると考えられている。我々は PRGs の神経突起様伸長に関わる分子機能を ALS の治療に応用することを目標として、LPA・PRGs を制御するタンパク質の機能を検討した。

B. 研究方法

Yeast two-hybrid スクリーニングにより、PRGs (PRG1 及び PRG2) と結合するタンパク質の同

定を試みた。その後、HEK293T 細胞に PRGs と同定タンパク質を共発現させ、免疫沈降法によりそれらの結合を確認した。さらに、パルスチエイスアッセイを行い、同定タンパク質による PRGs の分解への影響を検討した。また、COS 7 細胞や Neuro2A 細胞に PRGs と同定タンパク質を共発現させ、免疫蛍光染色により、それらのタンパク質の局在や細胞形態への影響を観察した。さらに PRGs との結合に必要な領域を決定するために、さまざまな変異体を作製し、結合ドメインの検索も行った。

(倫理面への配慮)

倫理面には常に配慮している。今回の実験系は *in vitro* なので特に支障ない。

C. 研究結果

Yeast two-hybrid スクリーニングにより、PRGs 結合タンパク質として、TRIM for elongation of neurites 1 and 2 (TRIMEN1 および TRIMEN2) を同定した。TRIMEN はリング型ユビキチンリガーゼと類似の構造を有していた。哺乳類細胞内 (HEK293T) での免疫沈降により PRGs と TRIMEN1/2 の結合を確認した。(図 1)。

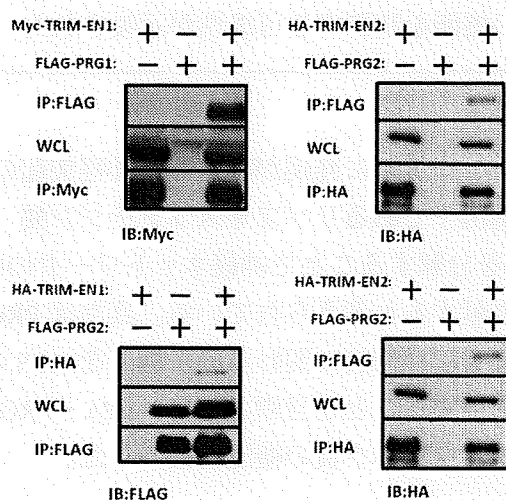


図 1 PRG1/2 と TRIMEN1/2 の結合。PRG 1/2 には FLAG をエピトープタグとして使用し、TRIMEN 1/2 に対しては Myc・HA をエピトープ

タグとして用いた(WCL: whole cell lysis, IP: immunoprecipitation, IB: immunoblot)。

さらに様々な部位の変異体を作製し TRIMEN2 の PRGs への結合部位を検討したところ、TRIMEN2 の中間部に結合部位が存在することが推定された。COS7 細胞に PRG と TRIMEN を一過性過剰発現させ免疫蛍光染色すると、PRGs はアクチンと共局在していた。また TRIMEN1/2 は細胞質に存在していたが、TRIMEN1 は以前の報告同様細胞内小器官に存在し、TRIMEN2 は細胞質全体に存在しており TRIMEN1 と TRIMEN2 の局在は異なっていた。神経細胞である Neuro2A で TRIMEN2 を過剰発現させると、神経突起様伸長の形態変化が抑制された(図 2・3)。TRIMEN1/2 による PRGs 分解亢進は認められなかったが、PRGs の機能を抑制的に制御する可能性が考えられた。

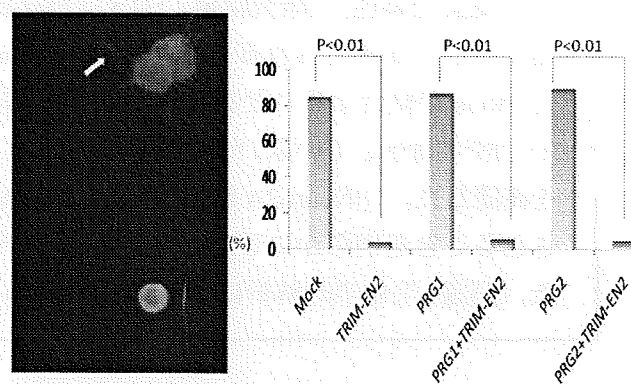


図 2 PRGs (赤) を強制発現させた Neuro2A 細胞では神経突起様伸長が見られる(矢印)。さらに TRIMEN2 (緑) が強制発現した細胞では神経突起様伸長は抑制された。PRG1/2 には FLAG をエピトープタグとして使用し、TRIMEN2 には HA をエピトープタグとして用いた。

図 3 TRIMEN2 が神経突起伸長を抑制することを示す。Neuro2A において神経突起様伸長を示す細胞を、細胞体の 1/2 以上の突起様伸長

が3本以上もつと定義し、神経突起様伸長を示す割合を比較した。二群間比較はフィッシャーの正確検定による(観察回数は2回、n=50)。

D. 考察

RG1 は近年神経突起様伸長を促進する膜タンパク質として同定され注目されている。TRIMEN1/2 は PRGs の機能を抑制的に制御していると考えられ、TRIMEN1/2 が RING-finger 型ユビキチンリガーゼと類似の構造をもつことから、TRIMEN1/2 が PRGs を分解することで制御すると予想した。しかし、PRGs 分解促進は証明されず、両者の結合による PRGs の構造変化やユビキチン化によるシグナル伝達などによる新たな神経突起様伸長抑制機能の獲得が考えられた。

TRIMEN1/2 は構造が類似しているものの、細胞質内局在が異なり、相互にその機能を補完している可能性が考えられた。生化学的解析により、TRIMEN1/2 が PRGs の機能を制御する可能性が示唆されたが、今後は安定発現細胞の作成なども行い、細胞生物学的にいかなる機能に影響を及ぼすかを解析する必要がある。

E. 結論

神経突起様伸長を促進する PRGs の機能を制御する因子の同定を試み、PRGs 結合タンパクである TRIMEN1/2 を同定した。両者の強制発現細胞では突起の進展が抑制されていた。PRGs の制御は分解以外の方法で行われていると考えられた。

F. 健康危険情報

特記すべき事項無し

G. 研究発表

該当無し

H. 知的所有権の所得状況

該当無し

遺伝性 ALS のモデル動物におけるリンパ球の役割

研究協力者：佐古田三郎 大阪大学医学部神経内科 教授

共同研究者：多田 智¹⁾、安居輝人²⁾、奥野龍禎³⁾、中辻裕司¹⁾、菊谷仁²⁾、隅 寿江¹⁾、長野清一¹⁾

1)大阪大学医学部神経内科

2)大阪大学微生物病研究所分子免疫制御分野

3)大阪大学微生物病研究所感染病態分野

研究要旨 筋萎縮性側索硬化症(ALS)におけるリンパ球の役割を明らかにするために、リンパ球を持たない ALS モデル動物である Rag2 遺伝子欠損変異 SOD1 トランスジェニックマウス (mSOD1/RAG2^{-/-}) を作製し、変異 SOD1 トランスジェニックマウス(mSOD1)と表現型を比較した。mSOD1/RAG2^{-/-}の発症は mSOD1 と比べて遅延しており、更に疾患初期においてレクチン陽性ミクログリア及び神経保護作用を持つ Ym1 の mRNA の発現が脊髄に増加していた。mSOD1/RAG2^{-/-}ではリンパ球消失により疾患初期にミクログリアが活性化して Ym1 の分泌が増加し、発症が遅延した可能性が示唆された。

A.研究目的

近年、神経変性疾患の進行にリンパ球が大きな役割を果たしていることが徐々に明らかになってきている。リンパ球の中樞神経系への影響は、中樞神経系の主たる免疫細胞であり、組織マクロファージの一つであるミクログリアを介して行われていることが判明しており、リンパ球はさまざまなサイトカインの分泌を介して、ミクログリアを変化させる。IFN-g と LPS でミクログリアを刺激すると、ミクログリアは NO や TNF- α といった炎症促進性のエフェクター分子を産生し、神経傷害的に働く一方で、IL-4 と IL-13 でミクログリアを刺激すると、Ym1 などの組織修復因子を発現し、神経保護的に働くことが知られている。

このように、リンパ球から分泌されるサイトカインによりミクログリアは神経保護的にも神経傷害的にもなりうるということが明らかになっているが、ALS の中樞神経においてリンパ球がどのようなサイトカインを産生し、ミクログリ

アにいかなる影響を与え、更に病状の進行にどう影響するかは不明であった。

今回我々は、ALS におけるリンパ球-ミクログリア相互作用の役割を明らかにするために、成熟リンパ球が存在しない RAG2 遺伝子欠損マウス (RAG2^{-/-}マウス) と家族性 ALS のモデルである G93A ヒト変異 SOD1 トランスジェニックマウス (mSOD1/RAG2^{+/+}マウス) とを交配させ、ヒト変異 SOD1 トランスジェニック RAG2 遺伝子欠損マウス (mSOD1/RAG2^{-/-}マウス) を作製し、その表現型の解析及び脊髄の標識レクチン染色、定量的 RT-PCR の結果をもとに、ALS におけるリンパ球-ミクログリア相互作用について考察した。

B.研究方法

★マウス

RAG2^{-/-}マウスは Jackson Laboratory より購入し、C57BL/6J のバックグラウンドで交配を続けた。

Glycine93→Alanine 変異を持つ mSOD1 マウスは Jackson Laboratory より購入し、C57BL/6J のバックグラウンドで交配を続けた。mSOD1/RAG2+/+マウスと RAG2-/マウスの交配を行い、mSOD1/RAG2-/マウスを作製し、mSOD1/RAG2+/+マウスと表現型を観察した。

★クリニカルスコア測定、体重測定、paw grip endurance test (PaGE test) 記録測定

雄の mSOD1/Rag+/+マウス (12~15 匹) 及び雄の mSOD1/Rag-/マウス (9 匹) に対して、体重、クリニカルスコア、PaGE test を週 2 回計測し、発症時期と重症度を評価した。クリニカルスコアは、5 段階評価 (0 点~4 点) とし、正常であれば 4 点、尻尾を持ってぶら下げたときに後肢の振戦が明らかになれば 3 点、歩行異常が出現すれば 2 点、少なくとも片足を引きずっていれば 1 点、倒されても 30 秒以内に体を起こせない状態になれば 0 点と評価した。3 点以下のスコアしか認められなくなった時点で発症と定義した。PaGE test は、マウス飼育用のケージ金網にマウスを載せ、金網を反転させて両側後肢が金網から外れるまでの時間を 3 回計測し、最長記録を PaGE test のスコアとして記録した。

★マウス脊髄標識レクチン染色

マウス脊髄内のミクログリアの活性化を評価するために、70 日齢及び 150 日齢のマウスより脊髄標本を作製し、標識レクチン染色を行った。

★マウス脊髄定量的 RT-PCR

マウス脊髄内の遺伝子発現変化を評価するために、70 日齢及び 130 日齢の mSOD1/Rag+/+マウス、及び mSOD1/Rag-/マウス (n=3~4) の脊髄から全 RNA を採取し、定量的 RT-PCR を行った。

★統計

クリニカルスコア、体重変化、PaGE test 記録の 2 群間の差はスチューデントの t 検定で評価した。発症日、死亡日の 2 群間の差は一般化ウィルコクソン検定で評価した。

(倫理面への配慮)

全ての動物実験は大阪大学微生物病研究所動物施設で SPF 環境下に飼育されたマウスを使用し、大阪大学動物実験規定に基づいて適正に行われた。

C. 研究結果

★ 表現型

クリニカルスコアによる症状の評価では、mSOD1/RAG2-/マウス群で疾患発症が有意に遅延していた。PaGE test による評価でも同様に、mSOD1/RAG2-/マウス群では疾患初期のスコア悪化が抑制されていた。さらに臨床的に発症前の 10 週目体重を基準とした相対体重による評価でも、疾患初期において mSOD1/RAG2-/マウス群は、mSOD1/RAG2+/+マウス群と比較して有意に体重減少が抑制されていた。死亡日齢については、両群間で有意差を認めなかった。以上より、mSOD1/RAG2-/マウスは疾患発症が有意に遅延するが死亡日齢には変化がなく、リンパ球の存在は疾患初期には神経傷害的に作用する可能性が示唆された。

★ 脊髄標識レクチン染色

成熟リンパ球の欠損により生じた疾患初期での症状の差が、ミクログリア/マクロファージの変化によるものかどうかを確認するため、両群の脊髄におけるミクログリア/マクロファージの状態をレクチン染色により評価した。70 日齢の疾患初期/発症前の段階では、mSOD1/RAG2-/マウスの脊髄前角において、

レクチン陽性のミクログリア/マクロファージが多数観察されたが、mSOD1/RAG2+/+マウスの脊髄前角ではほとんど観察されなかった。150日齢の疾患末期では、両群のミクログリア/マクロファージはレクチン染色では、数、形態ともに明らかな差異は認められなかった。

★脊髄内遺伝子発現変化

この観察結果を受け、疾患初期の mSOD1/RAG2-/-マウスでは成熟リンパ球の欠損により神経保護的なミクログリア/マクロファージが増加しているとの仮説をたて、神経保護的な作用を持つ Ym1, RELM α , GDNF, GLAST 及び神経毒性を有する iNOS, IFN- γ の mSOD1 マウスの脊髄での遺伝子発現を定量的 RT-PCR で評価した。

脊髄の定量的 RT-PCR では、組織修復作用を有する分泌タンパクである Ym1 の発現が 70 日齢の mSOD1/RAG2-/-マウスで有意に上昇していた。130 日齢でも Ym1 の発現は mSOD1/RAG2-/-マウスで高い傾向にあったが、有意差は消失していた。一方、RELM α , GDNF, GLAST や IFN- γ , iNOS の発現には差はみられなかった。

D. 考察

今回我々は、成熟リンパ球が存在しない RAG2-/-マウスと mSOD1 マウスを交配させ、mSOD1/RAG2-/-マウスを作製することにより、獲得免疫系が神経変性にどのような影響を与えるか検討した。

我々の観察では、mSOD1/RAG2-/-マウスは mSOD1/RAG2+/+マウスと比べ発症時期は有意に遅延したが、死亡日齢には有意差は認められなかった。疾患初期において mSOD1/RAG2-/-マウスの脊髄前角ではレクチン陽性ミクログリア/マクロファージの増加が見られ、また脊髄定量的 RT-PCR では Ym1

の発現が 70 日齢の mSOD1/RAG2-/-マウスで有意に上昇していたが、iNOS をはじめとするその他の遺伝子発現には有意差が認められなかった。

Ym1 は主にマクロファージから分泌される 45kDa の蛋白で、ヘパリン、グルコサミンオリゴマー、ヘパラン硫酸に結合することが報告されており、組織修復に関連した分子である。一般的に Ym1 を分泌するマクロファージは M2 マクロファージ呼ばれ、IL-4 と IL-13 の刺激により分化し組織修復的に働くことが知られている。本研究では、脊髄定量的 RT-PCR で 70 日齢の mSOD1/RAG2+/+マウスと比較して mSOD1/RAG2-/-マウスの脊髄で Ym1 の高発現を認めたため、mSOD1/RAG2-/-マウスの発症が遅延のメカニズムの一つとして Ym1 による組織修復作用が関与している可能性が考えられた。

ALS にて発現に変化があることが報告されている他の遺伝子についても脊髄定量的 RT-PCR で発現を確認したが、組織修復的な作用を持つ RELM α 、神経保護作用を持つ GDNF, GLAST 及び神経毒性を有する iNOS, IFN- γ の発現については両群間で有意差を認めなかった。

mSOD1/RAG2-/-マウスの脊髄において Ym1 の発現上昇は認められたが、実際に Ym1 を分泌している細胞や Ym1 の細胞内での局在は不明であった。Ym1 は活性化マクロファージによって産生され、その発現は、肺、脾臓、骨髄と腹腔マクロファージに限定される(12)との報告があることから、我々は本研究における Ym1 の分泌源は脊髄ミクログリア/マクロファージである可能性が高いと考えた。

今回観察された mSOD1/RAG2-/-マウスの発症遅延の他のメカニズムとして、ミクログリア以外の神経組織内の細胞によって神経保護効果や神経毒性の軽減がもたらされた可能性

は否定できない。T細胞は直接運動ニューロンと相互作用を行う可能性があり、ALSにおいても脊髄内へのリンパ球の浸潤は報告されているので、T細胞が直接的に運動ニューロン傷害作用を持つ可能性はある。

また本研究では、病期を通じてアストロサイトのマーカーである脊髄内 GFAP の発現が mSOD1/RAG2-/-マウスにて上昇していることをウェスタンブロット法にて観察していた (data not shown)。アストロサイトは活性化されて神経保護的に働き得ることが明らかになっているので、アストロサイトによる神経保護作用が mSOD1/RAG2-/-マウスの発症遅延のメカニズムとして存在する可能性も残されている。

Beers らは、Glycine93→Alanine 変異を持つ mSOD1 マウスと RAG2 遺伝子欠損マウスの交配実験を行うことにより、本実験と同様に mSOD1/RAG2-/-マウスと mSOD1/RAG2+/+マウスの表現型を比較し、両群間で発症時期に変化はないが、mSOD1/RAG2-/-マウスで死亡日齢が有意に早まることを報告している。我々の観察では、mSOD1/RAG2-/-マウスで発症時期は遅れるがエンドポイントには差は見られなかった。この乖離の原因としては以下の可能性が考えられた。

ALS モデル動物としての mSOD1 マウスの神経変性の重症度は mSOD1 遺伝子のコピー数に相関することが報告されており、多コピーマウスの方がより早期に発症し経過も急峻である。今回の我々の実験では使用したマウスのコピー数は確認しておらず、Beers らとのグループとの結果の乖離は、使用したマウスのコピー数が異なっていた為に、神経変性の起こるスピードや程度に差が生じた結果である可能性が考えられた。

また我々の実験では、マウスを雄マウスに限定して症状観察や PaGE test を行っており、

Beers らの観察では雌雄マウスが混在していた。既に、性差による ALS の発症や経過の相違、あるいは動物実験における性差による治療反応性の差異が明らかになっており、ALS の発症及び進行において性差が重要な要素と考えられているため、性差が観察結果の乖離の可能性として考えられた。

さらに、結果の乖離の原因としては、SPF 環境の微妙な差異が表現型の差異となって現れている可能性は否定できないと考えられる。Zorzella らの報告では、SPF 環境で飼育したラットと、SPF でない環境で飼育したラットでは、EAE の発症や重症度に差があったと報告している。今回我々が観察した Rag2 遺伝子欠損マウスも、自然免疫の機能には障害がなく、ミクログリアやマクロファージは Toll like receptor や manose receptor などの刺激に反応するので、マウス飼育環境の清潔さの程度の差異によりミクログリアやマクロファージの恒常的な活性化に差が生じる結果、神経変性に与える影響に差が出てくる可能性はあると考えられる。

以上より、今回観察された mSOD1/RAG2-/-マウスの発症遅延のメカニズムの一つとして、RAG2 遺伝子欠損により成熟リンパ球が消失し、この結果骨髄由来マクロファージの中枢神経内への浸潤が適切に行われなくなり、発症早期に中枢神経のミクログリアが活性化して、このミクログリアから組織修復作用を持つ Ym1 の分泌が増加して発症が遅延する可能性が示唆された。

E. 結論

ALS のモデルマウスにおいてリンパ球を欠損させると、疾患早期にミクログリアが活性化され Ym1 の分泌が増加し、神経保護作用を発揮して神経変性が抑制される可能性が示唆された。

F.健康危険情報

G.研究発表

(発表雑誌名巻号・頁・発行年なども記入)

1. 論文発表

Tada S, A role of lymphocytes in an animal model of inherited ALS. Medical Journal of Osaka University: vol 53, 2010

2.学会発表

筋萎縮性側索硬化症の病態におけるリンパ球の役割の解析

第 21 回日本神経免疫学会学術集会 (2009 年 3 月、大阪)、多田 智

筋萎縮性側索硬化症の病態におけるリンパ球の役割の解析 (続報)

第 50 回日本神経学会総会(2009 年 5 月、宮城)、多田 智

H.知的所有権の取得状況 (予定を含む)

1.特許取得

無し

2.実用新案登録

無し

3.その他

無し

『家族性 ALS の凝集体形成機構の解明と治療法への応用』

研究協力者：谷口直之 大阪大学産業科学研究所疾患糖鎖学¹・教授
共同研究者：松本紋子¹、藤原範子²
兵庫医科大学大学生化学²

研究要旨

筋萎縮性側索硬化症(ALS)やポリグルタミン病、アルツハイマー病、パーキンソン病などの神経変性疾患において、異常タンパク質のミスフォールディングや凝集体形成がみられ、病因に関与していると考えられている。Huntingtin、Tau、Amyloid β 、 α -SynucleinなどはTransglutaminase (TG)の基質となり、カルシウム存在下において架橋反応により重合体を形成する。また、TGの阻害剤であるCystamineの投与により、ハンチントン病モデルマウスにおいて延命効果が多数報告されている。私達は家族性ALS(FALS)変異型Cu, Zn-superoxide dismutase (SOD1)やアポ型SOD1がTGの基質になることを確認した。SOD1の凝集体形成機構をTGに着目して検討し、さらに治療法開発へと発展させるため、Cystamineの効果もあわせて検討した。

A. 研究目的

Transglutaminase (TG: protein-glutamine γ -glutamyltransferase, EC 2.3.2.13)はタンパク質中のグルタミン残基の γ -カルボキシアミド基と各種の一級アミン(L-リジンの ϵ -アミノ基等)との間のアシル基転移反応をカルシウム存在下で触媒する酵素である。タンパク質分子間または分子内に ϵ -(γ -Glu)-Lys 架橋が形成されることによりタンパク質の重合等が起こる。Huntingtin、Tau、Amyloid β 4、 α -SynucleinなどはTGの基質となり得ることが確認されており、Tissue TG (TG2) 活性の上昇に伴い、基質となる原因タンパク質の多量体化や、他のタンパク質を含む凝集体の形成が見られることより、ハンチントン病やアルツハイマー病、パーキンソン病などの病態にTGが関与していると考えられている。さらに、TGの阻害剤であるCystamineの投与により、ハンチントン病モデルマウスにおいて延命効果が多数報告されている。

様々な論文に見られる、anti-SOD1 抗体を用

いた還元型 SDS-PAGE/Western blotting によっても単量体にならない、共有結合による可溶性の数〜多量体の形成にTGが関与しているのではないかと推測し、FALSにおけるSOD1の凝集体形成機構を生化学的に解明し、治療法開発へと発展させようと試みた。

B. 研究方法

リコンビナント human SOD1 は、バキュロウイルスを用いて Sf9 細胞に過剰発現させ生成した。Transglutaminase from guinea pig liver はオリエンタル酵母株式会社から購入した。培養細胞は human SOD1 (WT, G37R, G41D, G85R) と human TG2 を共発現させた N2a (mouse neuroblastoma) を用いた。Human TG2 の cDNA (pcDNA3,1-tTG) は Dr. G. V. W. Johnson (University of Alabama Birmingham, USA) から供与していただいた。

C. 研究結果

リコンビナント human SOD1 を精製し、市販の

TG2 と Ca^{2+} 存在下でインキュベートし、SOD1 が TG2 の基質になり得るかどうか還元型 SDS-PAGE/Western blotting にて検討した結果、FALS 変異 SOD1 は TG2 の酵素反応によって、共有結合により数-多量体を形成することが確認された。また野生型 SOD1 もアポ型であれば基質になることが確認された。

次に human SOD と TG2 を共発現させた細胞で検討した。0.5 % NP-40 含有の PBS を用いて可溶性画分を遠心分離にて分取し、還元型 SDS-PAGE/Western blotting にて SOD1 を検出した。N2a 細胞に SOD1 を過剰発現させただけでは可溶性画分に数-多量体は検出されなかったが、TG2 を共発現させカルシウム (A23187) 存在下で検討すると数-多量体が検出された。また、Cystamine 処理により、それらの数-多量体形成が抑制された。

D. 考察

異常タンパク質のミスフォールディングや凝集体形成は ALS おいてもみられるが、TG が関与しているのかどうか報告はない。おそらく TG の基質スクリーニングに野生型 SOD1 も取り上げられたであろうが、基質とならなかったであろう。

TG は様々なアポトーシス関連タンパク質にも作用し、アポトーシスを制御することも多数報告されている。一方、Cystamine はカスパーゼの阻害作用があることも報告されているので、現在、TG の細胞死への関与と Cystamine の効果を検討中である。

TG の阻害剤である Cystamine の投与がハンチントン病モデルマウスにおいて有効であり、臨床応用にむけての研究が進められている。そのため、ALS モデルにおける Cystamine の効果を N2a 細胞にて検討し、治療法へと応用できることを期待している。

E. 結論

FALS 変異型 SOD1 やアポ型 SOD1 は TG2 の基質となり、 Ca^{2+} 依存的に共有結合による SOD1 の数-多量体の形成が認められた。ALS

における凝集体形成機構は不明であったが、FALS 変異型 SOD1 やアポ型 SOD1 が特異的に TG の基質となり、共有結合による数-多量体を形成することが確認できた。また、Cystamine 処理によりそれらの数-多量体形成を阻害することができた。

F. 健康危険情報

なし。

G. 研究発表

1. 論文発表

- (1) Kitazume S, et al. J Biol Chem. In press.
- (2) Takamatsu S, et al. Glycobiology. In press.
- (3) Akasaka-Manyu K, et al. Glycobiology. 2010; 20: 99-106.
- (4) Taniguchi N. J Biol Chem. 2009; 284: 34469-78.
- (5) Shirato K, et al. Pflugers Arch. 2009; 459: 93-103.
- (6) Takahashi M, et al. Carbohydr Res. 2009; 344: 1387-90.
- (7) Osumi D, et al. Cancer Sci. 2009; 100: 888-95.
- (8) 藤原範子ら 実験医学増刊, 監修: 谷口直之 2009; 27: 140-144.

2. 学会発表

- (1) Fujiwara N, Nakano M, Kato S, Yoshihara D, Eguchi H, Sakiyama H, Taniguchi N. and Suzuki K. The 5th Joint Meeting of The Societies For Free Radical Research Australasia and Japan, Sydney, Dec.1-4, 2009.
- (2) 藤原範子、伊原健太郎、若槻壮市、谷口直之、鈴木敬一郎、第 82 回日本生化学会大会、2009.10.21-24、神戸
- (3) 伊原健太郎、藤原範子、富本裕介、若槻壮市、谷口直之、鈴木敬一郎、2009.3.24-25、つくば

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし。

TDP-43 過剰発現による ALS サルモデル動物作製

研究協力者：水澤 英洋 東京医科歯科大学大学院 脳神経病態学

共同研究者：内田 あずさ¹⁾ 笹栗 弘貴¹⁾ 西本 美香¹⁾ 木村 展之²⁾ 内原 俊記³⁾ 横田 隆徳¹⁾

1) 東京医科歯科大学大学院 脳神経病態学

2) 医薬基盤研究所 霊長類医科学センター

3) 東京都神経科学総合研究所 三次元プロジェクト

研究要旨

孤発性 ALS の病態における野生型 TDP-43 の役割は明らかになっていない。そこで、カニクイザルの頸髄前角細胞にアデノ随伴ウイルス (AAV) ベクターで野生型 TDP-43 を過剰発現させ、神経症状および神経病理学的所見を観察し、ALS モデルとなりうるかを検討した。その結果、進行性の前肢運動麻痺と、TDP-43 の細胞質への異常局在と凝集体形成および核の染色性低下という孤発性 ALS 類似の病理変化の再現に成功した。一方、正中神経の電気刺激において、短拇指外転筋の CMAP は導出されなかったが、脊髄前角細胞は比較的保たれており、さらに TDP-43 の局在は約 60-70% の前角細胞で核のみであった。このことから、TDP-43 の過剰発現によって運動神経軸索の障害が起こり、それは前角細胞の核内での過剰発現のみで十分であるという新規の作業仮説が成り立つと思われる。

A. 研究目的

TDP-43 は筋萎縮性側索硬化症 (ALS) や前頭側頭葉変性症 (FTLD-U) の神経細胞内のユビキチン陽性封入体の主要構成蛋白として同定された。ALS 症例の剖検脳において TDP-43 による細胞質内封入体が存在する神経細胞では、核蛋白である TDP-43 の核内染色性が著明に低下していることが報告されている。さらに、孤発性 ALS および家族性 ALS において、TDP-43 遺伝子の点変異が次々と報告され、変異 TDP-43 遺伝子が ALS の原因遺伝子であることが判明しつつある。しかし、孤発性 ALS の病態における野生型 TDP-43 の役割は明らかになっていない。

今回、孤発性 ALS の病態における野生型 TDP-43 の役割を明らかにするため、カニクイザルの頸髄前角細胞にアデノ随伴ウイルス (AAV) ベクターを用いて野生型 TDP-43 を過剰発現させ、神経症状および神経病理学的所見を観察し、ALS

モデルとなりうるかを検討した。

B. 研究方法

(AAV プラスミドベクターの作製)

野生型 TDP-43 は CMV プロモーターを含む human TDP-43 発現ベクタープラスミド (Invitrogen) を用いた。この完全長 human TDP-43 cDNA の N 末端を flag (DYKDDDDK) で標識したものを、AAV2 の ITR を持つプラスミド (pAAV-MCS; Stratagene) に組み込み、野生型 TDP-43 を発現するコンストラクトを作製した (Fig. 1-A)。

アデノウイルスフリー triple transfection 法 (Stratagene) により、上記の TDP-43 発現ベクタープラスミド、packaging plasmid (AAV1) および AAV ヘルパープラスミド (pHelper; Stratagene) を 1:1:1 の割合で混合し、リン酸カルシウム法にて HEK293 細胞にトランスフェクションした。48 時間後に細胞を回収し、ペレットを PBS で再懸濁

して凍結融解し、硫酸塩析とイオデキサノール (Axis-Shield) 密度勾配超遠心法、HPLC による精製を行った。AAV プラスミドベクターのゲノム力価は TaqMan 法の定量的 PCR を用いた。

作製した AAV プラスミドベクターはウェスタンブロッティングにて発現を確認した。HEK293 細胞を 12 well プレートに巻き、24 時間後に AAV 溶液を 1.0×10^{11} vg/ml または 5.0×10^{11} vg/ml/well 添加した。48 時間後に RIPA buffer にて細胞を回収、凍結融解後、遠心し上清中のタンパクを抗 TDP-43 抗体 (Protein Tech) (1:2000)、抗 flag 抗体 (Sigma) (1:500) を用いて検出した (Fig. 1-B)。

すべての DNA 組換え実験は東京医科歯科大学遺伝子組換え倫理委員会の承認 (承認番号 2008-27) を得て行った。

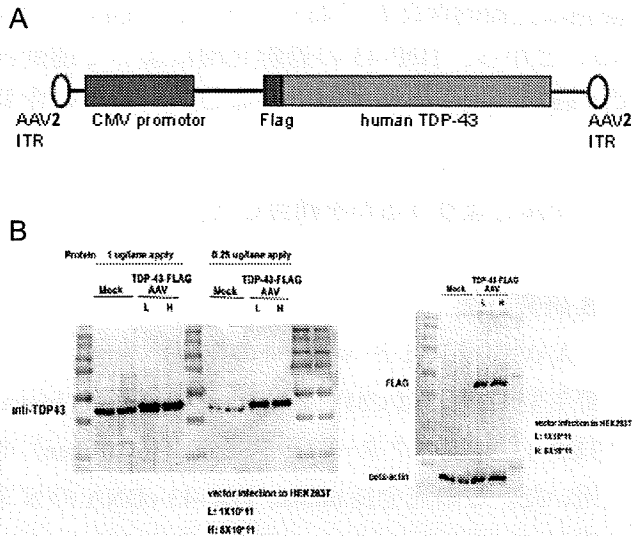


Fig. 1 野生型 TDP-43 発現 AAV プラスミドベクター作製
(A)野生型 TDP-43 発現プラスミドベクターのコンストラクト模式図。(B)ウエスタンブロッティングによる AAV プラスミドベクター発現確認。HEK293 細胞において野生型 TDP-43 が過剰発現している。

(AAV プラスミドベクター注入)

カニクイザル (6-7 歳♂) 4 頭に対して椎弓切除術を行い、第 6 頸髄の利き手側の前角細胞付近にハミルトンシリンジ、30 G 針を用いて直接注入した。AAV プラスミドベクターの量は 5 μ l、濃度は high dose 群で 1×10^{13} vg/ml (n=1)、low dose

群で 3×10^{12} vg/ml (n=2) とした。また、コントロールとして、AAV プラスミドベクターのみを同様の方法で注入した (n=1)。

すべての実験は、独立行政法人医薬基盤研究所・霊長類医学研究センターの動物実験委員会の承認番号 DS21-19 に基づき行った。

(行動評価)

上柵への掴まり行動、アップルテストにて行動を評価した。上柵への掴まり行動は、ビデオ撮影を元に解析を行い、4 段階 (score 3: 上柵ぶら下がり可能、score 2: 上柵への掴まり可能だが、ぶら下がり不可、score 1: 上肢挙上可能だが、上柵への掴まり不可、score 0: 上肢挙上不可) で grading した。また、アップルテストは、ケージの左右の端に設置したトレイ上のリンゴを掴み取る行動に際し、左右いずれの手を使うかを計数した。

(神経生理評価)

末梢神経伝導検査は、両側の正中神経を手関節部及び肘部で電気刺激 (0.2 msec) し、拇指球筋より Belly-tendon 法により、複合筋活動電位を MEB 2000 筋電計 (日本光電) で記録した。

(神経病理評価)

脊髄は、10%中性緩衝ホルマリンで固定後、パラフィン包埋し、抗 TDP-43 抗体 (Protein Tech) (1:1000)、抗 flag 抗体 (Sigma) (1:500) で検出を行った。前根は 10%グルタルで固定後、エポン包埋し、トルイジンブルー染色を行った。骨格筋は液体窒素で冷却したイソペンタンにて凍結し、ATPase 活性 (pH 10.6) を調べた。

C. 研究結果

TDP-43 を過剰発現させた個体 (n=3) では、AAV 注入後約 2 週から注入側前肢に進行性の麻痺を生じ始め、4 週間には上腕は中等度の運動麻痺 (Fig. 2 -A,B)、手指は完全麻痺となった (Fig. 2 -B,C)。上肢機能評価の grading は、TDP-43 high dose 個体 (n=1) の注入側では、手術直後は score 3、術後 1 週より score 2、術後 2 週から 3 週にかけて score 1、術後 4 週には score 0 となった。反対側は、TDP-43

high dose 個体でのみ、注入側より程度は軽いものの明らかな score の低下がみられた。TDP-43 low dose 個体 (n=2) では、注入側は TDP-43 high dose 個体よりも 1 週遅れてほぼ同様の経過を辿ったが、術後 4 週まで近位筋の機能は保たれた。一方、コントロール (n=1) では、注入側、反対側ともに術後 4 週までに score の低下はなかった (Fig. 2-B)。アップルテストによる評価では、TDP-43 high dose 個体では術後 1 週 (データは示していない)、TDP-43 low dose 個体で術後 2 週から 3 週にかけ利き手の交代が見られ始め、最終的に使用する手がほぼ逆転した (Fig. 2-C)。コントロールでは、利き手を使用する頻度に変化はなかった (Fig. 2-D)。

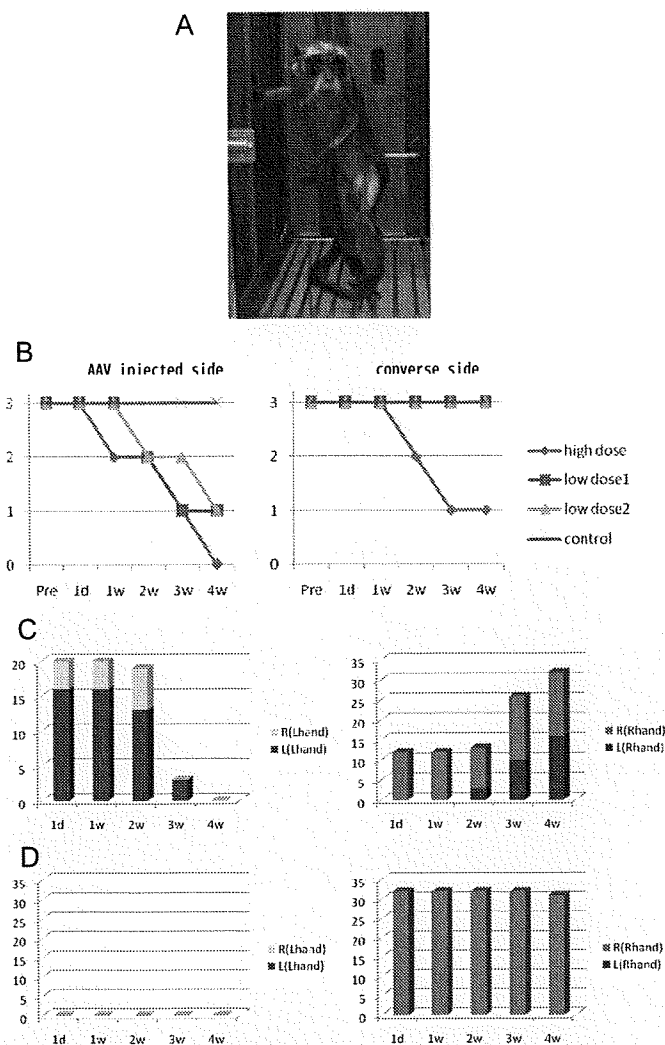


Fig. 2 野生型 TDP-43 過剰発現サルにおける神経症状出現

(A)左側頸髄に野生型 TDP-43 を過剰発現させたカニクイザル(術後 4 週)。左上肢は屈曲位を取り手指は完全麻痺を示した。(B)上肢機能の grading。TDP-43 注入側で進行性に機能低下がみられ(左)、反対側は TDP-43 high dose 個体のみ score 低下した(左)。(C)TDP-43 low dose 個体のアップルテストの推移。左図が利き手側の左手、

右図が右手の使用回数を表している。術後 3 週で使用する手の左から右への逆転が起こっている。(D)コントロールのアップルテストの推移。手術前後を通して利き手の右手のみを使用しており、食餌時の利き手使用頻度の変化はみられない。

生理学的所見は、TDP-43 を過剰発現させた個体では、術後 4 週において AAV 注入側で複合筋活動電位が誘発されなかった。一方、コントロールサルの注入側では、手術前後で複合筋活動電位が誘発された。TDP-43 を過剰発現させた個体、コントロールともに反対側では、手術前後で複合筋活動電位が誘発された (データは示していない)。

TDP-43 を発現する AAV プラスミドベクターを注入したカニクイザルの脊髄において、前角細胞に野生型 human TDP-43 が発現していることを確かめた。抗 flag 抗体により免疫染色を行うと、注入部位付近のほぼ全ての脊髄前角細胞に対し染色性が認められ、野生型 human TDP-43 が過剰発現していた。そのうち 60-70%の前角細胞では、TDP-43 は核に局在していたが、30-40%の前角細胞においては、TDP-43 は細胞質に異常分布していた。また、抗 TDP-43 抗体による免疫染色では、野生型 human TDP-43 が細胞質に過剰発現している前角細胞において、内因性サル TDP-43 の発現低下が観察された。また、それらの細胞の中には、変性突起や TDP-43 の沈着像が認められるものがあった。

D. 考察

本研究において、霊長類であるカニクイザルの頸髄に AAV ベクターで野生型 human TDP-43 を過剰発現させることにより、進行性の前肢運動麻痺と、TDP-43 の細胞質への異常局在、凝集体形成および核の染色性低下という孤発性 ALS 類似の病理変化の再現に成功した。その機序として、細胞質に異常局在した TDP-43 が凝集し、内因性 TDP-43 を取り込むことにより、核の内因性 TDP-43 の低下をきたした可能性が考えられる。

一方、正中神経の電気刺激において短拇指外転筋の CMAP は導出されなかったが、脊髄前角細胞の

数は比較的保たれており、さらに TDP-43 の局在は約 60-70%の前角細胞で核のみであった。このことから、TDP-43 の過剰発現によって運動神経軸索の障害が起こり、それは前角細胞の核内での過剰発現のみで十分であると考えられる。

E.結論

カニクイザルの頸髄前角細胞に AAV ベクターで野生型 TDP-43 を過剰発現させることにより、進行性の前肢運動麻痺と、TDP-43 の細胞質への異常局在と凝集体形成および核の染色性低下という孤発性 ALS 類似の病理変化の再現に成功した。

F.健康危険情報

なし

G.研究発表

1.論文発表

なし

2.学会発表

山本由紀ら：TDP43 タンパクの shRNA 導入における神経細胞死への影響. 第 50 回日本神経学会総会、仙台、2009 年 5 月 20 日

H.知的所有権の取得状況（予定を含む）

1.特許取得

2.実用新案登録

3.その他

なし

IV. 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

祖父江 元 (名古屋大学神経内科)

発表者名	論文タイトル名	発表誌名	巻/号	ページ	出版年
Senda J, Ito M, Watanabe H, Atsuta N, Kawai Y, Katsuno M, Tanaka F, Naganawa S, Fukatsu H, <u>Sobue G</u>	Correlation between pyramidal tract degeneration and widespread white matter involvement in amyotrophic lateral sclerosis: a study with tractography and diffusion-tensor imaging.	Amyotroph Lateral Scler	10	288-294	2009
Palazzolo I, Stack C, Kong L, Musaro A, Adachi H, Katsuno M, <u>Sobue G</u>	Taylor JP, Sumner CJ, Fischbeck KH, Pennuto M: Overexpression of IGF-1 in muscle attenuates disease in a mouse model of spinal and bulbar muscular atrophy.	Neuron.	63	316-328	2009
Sone J, Niwa JI, Kawai K, Ishigaki S, Yamada SI, Adachi H, Katsuno M, Tanaka F, Doyu M, <u>Sobue G</u>	Dorfin ameliorates phenotypes in a transgenic mouse model of amyotrophic lateral sclerosis.	J Neurosci Res	88	123-135	2009
Iguchi Y, Katsuno M, Niwa J, Yamada S, Sone J, Waza M, Adachi H, Tanaka F, Nagata K, Arimura N, Watanabe T, Kaibuchi K, <u>Sobue G</u>	TDP-43 depletion induces neuronal cell damage through dysregulation of Rho family GTPases.	Hum Mol GenetJ Biol Chem.	284	22059-22066	2009
Katsuno M, Adachi H, <u>Sobue G</u>	Getting a handle on Huntington's disease: the case for cholesterol.	Nat Med.	15	253-254	2009
Banno H, Katsuno M, Suzuki K, Takeuchi Y, Kawashima M, Suga N, Takamori M, Ito M, Nakamura T, Matsuo K, Yamada S, Oki Y, Adachi H, Minamiyama M, Waza M, Atsuta N, Watanabe H, Fujimoto Y, Nakashima T, Tanaka F, Doyu M, <u>Sobue G</u>	Phase 2 trial of leuprorelin in patients with spinal and bulbar muscular atrophy.	Ann Neurol.	65	140-150	2009
Tokui K, Adachi H, Waza M, Katsuno M, Minamiyama M, Doi H, Tanaka K, Hamazaki J, Murata S, Tanaka F, <u>Sobue G</u>	17-DMAG ameliorates polyglutamine-mediated motor neuron degeneration through well-preserved proteasome function in an SBMA model mouse.	Hum Mol Genet.	18	898-910	2009
Atsuta N, Watanabe H, Ito M, Tanaka F, Tamakoshi A, Nakano I, Aoki M, Tsuji S, Yuasa T, Takano H, Hayashi H, Kuzuhara S, <u>Sobue G</u>	Research Committee on the Neurodegenerative Diseases of Japan: Age at onset influences on wide-ranged clinical features of sporadic amyotrophic lateral sclerosis.	J Neurol Sci.	276	163-169	2009

発表者名	論文タイトル名	発表誌名	巻/号	ページ	出版年
Sasaki S, Aoki M, Nagai M, Kobayashi M, <u>Itoyama Y.</u>	Mitochondrial alterations in transgenic mice with an H46R mutant Cu/Zn superoxide dismutase gene.	J Neuropathol Exp Neurol.	68	365-373	2009

発表者名	論文タイトル名	発表誌名	巻/号	ページ	出版年
Kanki H, Shimabukuro MK, Miyawaki A, <u>Okano H</u>	Color Timer” mice: visualization of neuronal differentiation with fluorescent proteins.	Mol. Brain	[in press]		2010
Kojima T, Hirota Y, Ema M, Takahashi S, Miyoshi I, <u>Okano H</u> , Sawamoto K	Subventricular zone-derived neural progenitor cells migrate along a blood vessel scaffold toward the post-stroke striatum.	Stem Cells.	[Epub ahead of print]		2010
Tada H, Okano HJ, Takagi H, Shibata S, Matsumoto M, Yao I, Saiga T, Nakayama KI, Kashima H, Takahashi T, Setou M, <u>Okano H</u>	Fbxo45, a novel ubiquitin ligase, regulates synaptic activity.	J. Biol. Chem.	[Epub ahead of print]		2009
Kumagai G, Okada Y, Yamane J, Kitamura K, Nagoshi N, Mukaino M, Tsuji O, Fujiyoshi K, Okada S, Shibata S, Toh S, Toyama Y, Nakamura M, <u>Okano H</u>	Roles of ES Cell-Derived Gliogenic Neural Stem/ Progenitor Cells in Functional Recovery after Spinal Cord Injury	PLOS ONE	4	e7706	2009
Tamase A, Muraguchi T, Naka K, Hoshii T, Ohmura M, Kinoshita M, Tanaka S, Shugo H, Ooshio T, Nakada M, Sawamoto K, Onodera M, Matsumoto K, Oshima M, Asano M, Saya H, <u>Okano H</u> , Suda T, Hamada JI, Hirao A	Identification of tumor-initiating cells in a highly aggressive brain tumor using promoter activity of nucleostemin.	Proc.Natl.Acad. Sci.USA	106	17163-17168	2009
Miura K, Okada Y, Aoi T, Okada A, Takahashi K, Okita K, Nakagawa M, Koyanagi M, Tanabe K, Ohnuki M, Ogawa D, Ikeda E, <u>Okano H</u> , Yamanaka S	Variation in the safety of induced pluripotent stem cell lines	Nature Biotechnology	27	743-745	2009
Hamanoue M, Matsuzaki Y, Sato Ki, Okano HJ, Shibata S, Sato I, Sadafumi Suzuki S, Ogawara M, Takamatsu K, <u>Okano H</u>	Cell surface N-glycans mediated isolation of mouse neural stem cells.	J. Neurochem.	110	1575-1584	2009
Oishi K, Watatani K, Yoshimatsu T, Masuyama N, Nakajima K, <u>Okano H</u> , Guillemot F, Alessi DR, Gotoh Y	Selective induction of neocortical GABAergic neurons by the PDK1-Akt pathway through activation of Mash1	Proc.Natl.Acad. Sci.USA	106	13064-13069	2009
Sasaki E, Suemizu H, Shimada A, Hanazawa K, Oiwa R, Kamioka M, Sotomaru Y, Hirakawa R, Eto T, Shiozawa S, Maeda T, Ito R, Kito C, Yagihashi C, Kawai K, Miyoshi H, Tanioka Y, Tamaoki N, Habu S, <u>Okano H</u> , Nomura T	Generation of transgenic non-human primates with germline transmission.	Nature	459	523-527	2009

Kiso M, Tanaka S, Saba R, Matsuda S, Shimizu A, Ohyama M, James-Okano H, Shiroishi T, <u>Okano H</u> , Saga Y	The disruption of Sox21-mediated hair shaft cuticle differentiation causes cyclic alopecia in mice.	Proc.Natl.Acad. Sci.USA	106	9292-9297	2009
---	---	-------------------------	-----	-----------	------

郭 伸 (東京大学神経内科)

発表者名	論文タイトル名	発表誌名	巻/号	ページ	出版年
Sawada J, Yamashita T, Aizawa H, Aburakawa Y, Hasebe N, <u>Kwak S</u>	Effects of antidepressants on GluR2 Q/R site-RNA editing in a modified HeLa cell line.	Neurosci Res	64	251-258	2009
<u>Kwak S</u> , Hideyama T, Yamashita T, Aizawa H	AMPA receptor-mediated neuronal death in sporadic ALS.	Neuropathology doi: 10.1111/j.1440-1789.2009.01090.x.			
Hideyama T, Yamashita Y, Nishimoto Y, Suzuki T, <u>Kwak S</u>	RNA editing enzyme abnormality in sporadic amyotrophic lateral sclerosis.	J Pharmacol Sci			in press
日出山拓人, 山下雄也, 郭 伸	グルタミン酸受容体と孤発性筋萎縮性側索硬化症.				印刷中
日出山拓人, 郭 伸	ALSにおけるRNA editing異常.	Clinical Neuroscience			印刷中

高橋 良輔 (京都大学神経内科)

発表者名	論文タイトル名	発表誌名	巻/号	ページ	出版年
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
Ikeuchi K, Marusawa H, Fujiwara M, Matsumoto Y, Endo Y, Watanabe T, Iwai A, Sakai Y, <u>Takahashi R</u> , Chiba T	Attenuation of proteolysis-mediated cyclin E regulation by alternatively spliced Parkin in human colorectal cancers.	Int J Cancer	125	2029-35	2009
Kitaguchi H, Tomimoto H, Ihara M, Shibata M, Uemura K, Kalara RN, Kihara T, Asada-Utsugi M, Kinoshita A, <u>Takahashi R</u>	Chronic cerebral hypoperfusion accelerates amyloid beta deposition in APPSwInd transgenic mice.	Brain Res.	1294	202-10	2009

Matsui H, Taniguchi Y, Inoue H, Uemura K, Takeda S, <u>Takahashi R</u>	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	2009
Matsui H, Taniguchi Y, Inoue H, Kobayashi Y, Sakaki Y, Toyoda A, Uemura K, Kobayashi D, Takeda S, <u>Takahashi R</u>	Loss of PINK1 in medaka fish (<i>Oryzias latipes</i>) causes late-onset decrease in spontaneous movement.	Neurosci Res.	Epub ahead of print	Epub ahead of print	2009
Yamakawa K, Izumi Y, Takeuchi H, Yamamoto N, Kume T, Akaike A, <u>Takahashi R</u> , Shimohama S, Sawada H	Dopamine facilitates alpha-synuclein oligomerization in human neuroblastoma SH-SY5Y cells.	Biochem Biophys Res Commun.	Epub ahead of print	Epub ahead of print	2009
<u>Takahashi R</u>	Edaravone in ALS. (commentary)	Exp Neurol.	217	235-6	2009
村上 学、井上治久、高橋良輔	筋萎縮性側索硬化症(ALS)の治療戦略	ファルマシア	45	1009-1112	2009
Inoue H, Kondo T, Lin L, Mi S, Isacson O, <u>Takahashi R</u>	Protein Misfolding and Axonal Protection in Neurodegenerative Diseases	In Protein folding and misfolding: neurodegenerative diseases.	Springer	97-109	2009

田中 啓二 (東京都臨床医学総合研究所)

発表者名	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 <u>Tanaka, K.</u>	Lysine 63-linked polyubiquitin chain may serve as a targeting signal for the 26S proteasome.	EMBO J.	28	359 - 371	2009
Singh, R., Kaushik, S., Wang, Y., Xiang, Y., Novak, I., Komatsu, M., <u>Tanaka, K.</u> , Cuervo, A. M, and Czaja M. J.	Autophagy regulates lipid metabolism.	Nature	458	1131-1135	2009
Kimura, Y., Yashiroda, H., Kudo, T., Koitabashi, S., Murata, S., Kakizuka, A., and <u>Tanaka, K.</u>	An inhibitor of deubiquitinating enzyme regulates ubiquitin homeostasis.	Cell	137	549-559	2009
Saeki, Y., Toh-e, A., Kudo, T., Kawamura, H., and <u>Tanaka, K.</u>	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., <u>Tanaka, K.</u> , 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., <u>Tanaka, K.</u> , and Takahama, Y.	Thymoproteasome shapes immunocompetent repertoire of CD8 T cells.	Immunity in press		in press	2009

Komatsu, M., Kurokawa, H., Waguri, S., Taguchi, K., Kobayashi, A., Ichimura, Y., Sou, Y-S., Ueno, I., Sakamoto, A., Tong, K. I., Kim, M., Iemura, S., Natsume, T., Ueno, T., Kominami, E., Motohashi, H., <u>Tanaka, K.</u> , and Yamamoto, M.	The selective autophagy substrate p62 activates the stress responsive transcription factor Nrf2 through Keap1-inactivation.	Nat. Cell Biol. in press.		in press	2009
Murata, S., Yashiroda, H., and <u>Tanaka, K.</u>	Molecular mechanisms of proteasome assembly.	Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.	10	104-115	2009
<u>Tanaka, K.</u>	The proteasome: Overview of structure and functions.	Proc. Jpn. Acad. Ser. B Phys Biol Sci	85	12-36	2009
Matsuda, N. and <u>Tanaka, K.</u>	Does impairment of the ubiquitin-proteasome system or the autophagy-lysosome pathway predispose individuals to neurodegenerative disorders such as Parkinson's disease?	J Alzheimer's Dis.	19	1-9	2009

中野 今治 (自治医科大学神経内科)

発表者名	論文タイトル名	発表誌名	巻/号	ページ	出版年
Atsuta N, Watanabe H, Ito M, Tanaka F, Tamakoshi A, <u>Nakano I</u> , Aoki M, Tsuji S, Yuasa T, Takano H, Hayashi H, Kuzuhara S, Sobue G, Research Committee on the Neurodegenerative Diseases of Japan	Age at onset influences on wide-ranged clinical features of sporadic amyotrophic lateral sclerosis.	Neurol Sci.	Jan15; 276	163-9	2009
Hara K, Shiga A, Fukutake T, Nozaki H, Miyashita A, Yokoseki A, Kawata H, Koyama A, Arima K, Takahashi T, Ikeda M, Shiota H, Tamura M, Shimoe Y, Hirayama M, Arisato T, Yanagawa S, <u>Tanaka A</u> , <u>Nakano I</u> , Ikeda S, Yoshida Y, Yamamoto T, Ikeuchi T, Kuwano R, Nishizawa M, Tsuji S, Onodera O	Association of HTRA1 Mutations and Familial Ischemic Cerebral Small-Vessel Disease.	N Engl J Med	360	1729-1739	2009
Okuno T, Nakayama T, Konishi N, Michibata H, Wakimoto K, Suzuki Y, Nito S, Inaba T, <u>Nakano I</u> , Muramatsu S, Takano M, Kondo Y, Inoue N	Self-Contained Induction of Neurons from Human Embryonic Stem Cells.	PLoS ONE	4	e6318	2009
Muramatsu S, Okuno T, Suzuki Y, Nakayama T, Kakiuchi T, Takino N, Iida A, Ono F, Terao K, Inoue N, <u>Nakano I</u> , Kondo Y, Tsukada H	Multitracer Assessment of Dopamine Function After Transplantation of Embryonic Stem Cell-Derived Neural Stem Cells in a Primate Model of Parkinson's Disease.	SYNAPSE	63	541-548	2009
中野今治	運動ニューロン疾患 監修：高久史麿、尾形悦郎、黒川清、矢崎義雄	新臨床内科学 第9版 (株) 医学書院		1202-1208	2009
藤原雅代、森田陽子、松坂恵介、中野今治、福田隆浩	著明な自律神経症状を呈した末梢神経障害の59歳男性例.	BRAIN and NERVE	61	1089-1097	2009