

厚生労働科学研究費補助金（難治性疾患克服研究事業）

総合分担研究報告書

ALD・ペオキシソーム病の病態解析と治療薬の開発ならびに
新規ビタミン B₁₂ 欠乏症（ライソゾーム蓄積症）の分子病態解析

分担研究者：今中 常雄（富山大学大学院医学薬学研究部 教授）

研究要旨

副腎白質ジストロフィー（ALD）は、ペルオキシソーム膜 ABC タンパク質 ABCD1 の変異を原因とする神経変性疾患で、極長鎖脂肪酸の蓄積を特徴とする。本研究では、ALD 治療薬の開発を目指して、ABCD1 の極長鎖脂肪酸 CoA 輸送機構、ミスセンス変異 ABCD1 の安定化を指標とした有用化合物のスクリーニング、遺伝子治療のための予備実験を行った。ペルオキシソーム病に関しては、ペルオキシソーム膜形成に焦点を当てた。ペルオキシソーム膜形成に関わる Pex3p と Pex19p の相互作用の分子機構を解析し、ペルオキシソームを欠損する Zellweger 病における変異 Pex3p と Pex19p の相互作用の異常を明らかにした。ABCD4 と LMBRD1 遺伝子異常による新規ビタミン B₁₂ 欠乏症（ライソゾームへのビタミン B₁₂ 蓄積症）に関しては、原因遺伝子産物である LMBD1 が輸送体 ABCD4 と複合体を形成し、ABCD4 を小胞体からライソゾームへ輸送するキャリアタンパク質として機能することを見出した。ABCD4 もしくは LMBD1 の変異により共通したフェノタイプが起こる原因が示唆された。

研究協力者氏名

守田雅志（富山大学大学院医学薬学研究部・
准教授）

川口甲介（富山大学大学院医学薬学研究部・
助教）

加藤博章（京都大学大学院薬学研究科教授）

た治療薬は開発されていない。そこで本研究で ALD 治療薬の開発を目指し、ABCD1 の極長鎖脂肪酸 CoA 輸送機構の解明、ABCD1 欠損アストロサイトでの代謝異常と遺伝子発現解析、ミスセンス変異 ABCD1 を安定化する化合物のスクリーニング、遺伝子治療の基礎的検討を目的とした解析を行った。

A．研究目的

ALD に関する研究

副腎白質ジストロフィー（ALD）は X 連鎖劣性の遺伝子疾患で、ペルオキシソーム膜 ABC タンパク質 ABCD1 をコードする ABCD1 遺伝子の変異により発症する。ALD は、極長鎖脂肪酸の異常蓄積を生化学的特徴とし、大脳における脱ミエリン化や副腎不全を主症状とするが、その発病メカニズムは不明である。ま

ペルオキシソーム病に関する研究

Zellweger 病をはじめとするペルオキシソーム形成因子（Pex）の欠損によるペルオキシソーム病は重篤な疾患であるが、近年、ミスセンス変異による軽症例が報告され治療の対象になってきている。本研究ではペルオキシソーム膜形成に焦点を当てた。Pex3p はペルオキシソーム膜に局在し、遊離型ポリソームで生合成さ

れたペルオキシソーム膜タンパク質(PMP)と複合体を形成する Pex19p と相互作用し、PMP のペルオキシソーム膜への局在化に關与する。今回、Pex3p と Pex19p 複合体の X 線構造解析により、Pex3p、Pex19p の相互作用のメカニズムを解析し、Pex3p と Pex19p の変異による相互作用の破綻を明らかにすることを目的とした。

新規ビタミン B₁₂ 欠乏症(ライソゾーム蓄積症)に関する研究

ビタミン B₁₂ はエンドサイトーシスによってライソゾームに取り込まれた後、細胞質中へと排出され、補酵素型に変換され機能している。最近、ABCトランスポーターABCD4 とライソゾーム膜タンパク質 LMBD1 をコードする遺伝子変異により、ライソゾームから細胞質へのビタミン B₁₂ 輸送が障害されることが報告された。本研究では、ライソゾームからのビタミン B₁₂ 輸送異常の分子機構を理解するため、ABCD4 と LMBD1 の協調的な役割を明らかにすることを目的とした。

B . 研究方法

ALD に関する研究

1 . ABCD1 の機能解析

メタノール資化性酵母 *Pichia pastoris* にヒト ABCD1 を発現させ、ペルオキシソーム分画ならびに精製酵素を調製した。ABCD1 の ATPase 活性はリン酸モリブデン法を用い、acyl-CoA thioesterase 活性はエルマン法を用いて測定した。

2 . ALD の分子病態解析

生後 1 ~ 2 日の Abcd1 欠損マウス脳より調製した混合グリア細胞から、初代培養アストロサイトを分離培養した。脂肪酸の酸化活性は、[1-¹⁴C]C24:0 を基質として測定した。極長鎖脂肪酸は、抽出した脂質を加水分解し、遊離

した脂肪酸をメチルエステル化した後、ガスクロマトグラフィーで定量化した。遺伝子の発現解析は、抽出した mRNA を逆転写酵素で cDNA にした後、DNA マイクロアレイ法及びリアルタイム PCR により行った。

3 . ALD 治療薬の開発

ALD 患者で報告されているミスセンス変異 ABCD1 の C 末端に GFP を融合した変異 ABCD1-GFP を安定発現する CHO 細胞を作製した。この細胞を 96 well プレートで培養し、既存薬を含めた種々の化合物を最終濃度 20 μM で添加し、2 日後、細胞の蛍光強度を測定した。変異 ABCD1-GFP の発現及び細胞内局在性は、イムノプロット法及び蛍光抗体法により確認した。骨髄移植に関しては、野生型マウスの頸骨から骨髄細胞を採取し、放射線照射で骨髄破壊したレシピエントの ABCD1 欠損マウスの眼窩静脈叢に注入した。5 ヶ月飼育後、脳での ABCD1 タンパク質の発現を解析した。さらに、造血幹細胞(lineage 陰性、c-kit 陽性)は、ABCD1 遺伝子を組み込んだレンチウイルスベクターを感染させた後、放射線照射処置を施したマウスの眼窩静脈叢に注入することにより移植した。

ペルオキシソーム病に関する研究

ヒト Pex3p の細胞質ドメイン GST-Pex3p (aa. 49-373)、ヒト GST-Pex19p(aa. 1-44)を大腸菌に発現させ精製した。Pex3p と Pex19p を 1:2 で混合し、ポリエチレングルコールを沈殿化剤として結晶化させ、複合体の結晶構造を決定した。また、GST-Pex19p と His-Pex3p との相互作用は、pull down 法により解析した。Pex19p によるペルオキシソーム形成能は、*pex19* Zellweger syndrome 患者線維芽細胞に野性型もしくは変異型 Pex19p を導入し、ペルオキシソームの形成を蛍光抗体法で解析した。

新規ビタミン B₁₂ 欠乏症(ライソゾーム蓄積症)に関する研究

ABCD4-HA 発現ベクターをヒト肝癌細胞 HuH7 に導入し、ABCD4-HA の安定発現細胞を取得した。発現した ABCD4-HA、LMBD1-GFP の細胞内局在性は免疫染色法で解析した。さらに LMBD1-GFP ならびに ABCD4-HA の各種変異体発現ベクターを作製した。LMBD1 の ABCD4 の局在化への影響は、野生型 ABCD4 と変異型 LMBD1 を共発現することにより解析した。ABCD4 と LMBD1 の相互作用は pull down 法で解析した。

(倫理面での配慮)

ALD 患者線維芽細胞は、提供者が子供のため、両親の同意を得て採取したものを使用した。

C . 研究結果

ALD に関する研究

1 . ABCD1 の機能解析

P. pastoris に発現させた His-ABCD1 は、ペルオキシソームに局在化していた。His-ABCD1 は ATPase 活性を保持し、脂肪酸ならびに脂肪酸 CoA 添加により活性が促進され、炭素数の増加により効果が増大した。さらに、ABCD1 が acyl-CoA thioesterase 活性を有することが明らかになった。149 番目の Ser を Ala に置換した変異型 ABCD1 は活性を失うことから、¹⁴⁹Ser が活性中心であることが示唆された。Acyl-CoA thioesterase 活性は、高濃度の ATP で阻害された。また変異型 His-ABCD1(S149A)の ATPase 活性は、脂肪酸では活性化されたが、脂肪酸 CoA では活性化されなかった。

2 . ALD の分子病態解析

Abcd1 欠損アストロサイトの極長鎖脂肪酸含量は、野生型に比べて約 2 倍増加していた。また極長鎖脂肪酸 (C24:0) の酸化活性は野生型に比べ 40% 減少していた。一方、

[1-¹⁴C]C24:0 由来の放射活性の C26:0 画分への取り込みは、Abcd1 欠損アストロサイトにおいて顕著に増加していた。このことからアストロサイトにおいても ALD の生化学的特徴が認められた。

野生型及び Abcd1 欠損アストロサイトでは、極長鎖脂肪酸代謝に関わる遺伝子及び発病に関わると予想される酸化ストレス関連 (*Cat*, *MnSOD*, *Homx1* 等)や炎症性サイトカイン遺伝子 (*Tnfa*, *Il-1b*, *Cxcl1* 等)、小胞体ストレス関連の遺伝子 (*Chop*, *Bip*, *Oasis* 等)の発現量に有意な違いは認められなかった。一方、Abcd1 欠損アストロサイトではケモカインレセプターの一つである *Darc* 遺伝子、細胞接着分子 *Cadm3* 遺伝子の増加、及び *Egr2* 遺伝子の発現低下が認められた。

3 . ALD 治療薬の開発

変異 ABCD1-GFP を発現した CHO 細胞を用いてスクリーニングを行った結果、ABCD1-GFP の蛍光を回復させる 22 種類の化合物を見出した。この内、既存薬ではアントラサイクリン系抗生物質とボルテゾミブを含む 5 種類の化合物で、天然化合物では 3 種類の化合物で変異 ABCD1-GFP の回復とペルオキシソームへの局在化が確認された。さらに同じ変異をもつ患者由来線維芽細胞で内因性の変異 ABCD1 タンパク質の回復を解析した結果、既存薬で 2 種類 (ボルテゾミブを含む)、天然化合物で 2 種類の有効化合物を見出した。

造血幹細胞移植実験では、5 ヶ月間飼育した移植マウスの脳及び脊髄から調製したペルオキシソーム画分において、造血幹細胞由来の ABCD1 タンパク質が発現していることが確認された。ヒト ABCD1 遺伝子組替え造血幹細胞を移植した ABCD1 欠損マウスは、経過を観察している。

ペルオキシソーム病に関する研究

Pex3p は、6本のヘリックスから構成される回転楕円状の新規な構造をしていることが判明した。最も長い2が中心に位置し、他の5つのヘリックスが2に巻き付く構造をとっていた。Pex19pペプチドはヘリックス構造をとり、Pex3pの最先端部に結合していた。

X線結晶解析によりPex3pとPex19pとの相互作用に重要であるアミノ酸が示唆された。これらアミノ酸をAlaに置換すると、Pex3pとPex19pとの結合が起こらなかつた。さらに、*pex19* Zellweger syndrome患者線維芽細胞に野性型もしくは変異型Pex19pを発現させ、ペルオキシソームの回復能を解析すると、野性型Pex19pではペルオキシソームが検出されたが、Pex3pとの結合能を有しなかつたPex19pではペルオキシソームが検出されなかつた。一方、*pex3* Zellweger syndrome患者線維芽細胞に変異型Pex3p(W104A)を発現させても、ペルオキシソームは検出されなかつた。

ビタミンB₁₂欠乏症(ライソゾーム蓄積症)に関する研究

一過性に発現させたABCD4-HAは小胞体に、LMBD1-GFPはリソゾームに局在していた。一方、ABCD4-HAを安定過剰発現させたHuH7細胞にLMBD1-GFPを共発現させたところ、ABCD4-HAの局在は小胞体からライソゾームへと変化し、LMBD1-GFPと共局在していた。また、両タンパク質が複合体を形成していた。

ABCD4の6個の膜貫通領域のうち、N末端側の2個の膜貫通領域を欠損した変異型ABCD4-HAは、LMBD1-GFPと共発現させてもライソゾームには移行しなかつた。一方、LMBD1の11個の膜貫通領域のうちの6番目以降を欠損した変異型LMBD1-GFPをABCD4と共発現させると、ABCD4と変異型LMBD1-GFPは共局在していたが、ライソゾーム上には局在しなかつた。

D. 考察

ALDに関する研究

1. ABCD1の機能解析

*P. pastoris*にABCD1を活性型酵素として発現することに成功した。ABCD1のATPase活性は脂肪酸添加により促進され、炭素数の増加により効果が増大したことから、より長鎖の脂肪酸に高い親和性を持つことが示唆された。さらに、同じ炭素数でもCoA体を添加した際にATPase活性はより増大したことから、CoA体への親和性の方が高いことが示唆された。ABCD1のもつacyl-CoA thioesterase活性は、149番目のSerをAlaにさせることにより失活した。ALD患者においても同様の変異が報告されているので、ABCD1のacyl-CoA thioesterase活性は、基質輸送に必須と考えられる。ABCD1は極長鎖脂肪酸を認識し、CoAを加水分解により分離し、極長鎖脂肪酸を輸送している可能性が高い。またacyl-CoA thioesterase活性とATP加水分解が協調して脂肪酸を輸送していると推測される。

2. ALDの分子病態解析

Abcd1欠損アストロサイトにおいても極長鎖脂肪酸蓄積が認められた。しかし、アストロサイトは、極長鎖脂肪酸を蓄積しても発病に関わると推定されるサイトカインなどを産生していない可能性が示唆された。一方、*Darc*、*Cadm3*などのmRNAが増加していたことより、Abcd1欠損アストロサイトではサイトカインに対する反応性や他の細胞との相互作用などに異常がある可能性が推察された。

3. ALD治療薬の開発

ハイスループットアッセイ系により見いだした既存薬のボルテゾミブは、多発性骨髄腫の治療薬として認可されているプロテアソーム阻害薬である。もう一つの既存薬は細胞毒性が低く、脳代謝改善薬として用いられていた薬物であり、血液脳関門を通過することが知られて

いる。これらの既存薬については、ALD の候補治療薬になる可能性が考えられる。一方、天然化合物で効果のあった 2 種類は類似構造をもっており、治療薬のシーズ化合物になると考えられる。今後さらに多くの天然化合物をスクリーニングすることにより、リード化合物を見出す予定である。

骨髄移植により骨髄由来の細胞が脳や脊髄に生着していることが確認された。また、組換えレンチウイルスベクターにより造血幹細胞にヒト ABCD1 を発現することが確認され、ABCD1 欠損マウスに移植することができた。現在、順調に飼育されている。今後、移植 5~6 ヶ月後の組織を調製し、生着細胞とその分布について組織化学染色により検討する予定である。本疾患に対する造血幹細胞移植の神経症状抑制のメカニズム解明は、発症機構及び治療戦略を考える上で重要である。

ペルオキシソーム病に関する研究

我々はこれまでに、生合成された PMP70 の Pex19p との相互作用に必要な領域を明らかにするとともに、Pex19p の N 末端側の領域が Pex3p との相互作用に重要であることを報告してきた。今回、Pex3p と Pex19p 複合体の X 線結晶解析により、両者の相互作用における分子基盤が明らかになった。すなわち、Pex3p の細胞質側の先端に位置し、Trp-104 で隔てられた 2 つの cavity に Pex19p の疎水性アミノ酸 Leu-18、Leu-21、Leu-22 と Phe-29 が結合することが示された。またその相互作用はペルオキシソーム形成に必須であることが、各種変異体を用いた Pex3p と Pex19p との結合実験と Zellweger syndrome 患者線維芽細胞でのペルオキシソーム形成回復実験から示された。また Pex19p の Pex3p 結合領域は、単独ではランダムコイルを示し、Pex3p とのみ特異的に結合する可能性が示唆された。

新規ビタミン B₁₂ 欠乏症(ライソゾーム蓄積症)に関する研究

ABCD4 は単独で過剰発現させると、その細胞内局在は小胞体であったが、LMBD1 と共発現させると、ライソゾームへと変化した。一方、LMBD1 は単独でもライソゾームに局在することから、LMBD1 は ABCD4 をライソゾームへと移行させるキャリアタンパク質として機能していることが示唆された。両タンパク質が複合体を形成することも確認した。変異体を用いた解析から、両者の複合体形成には、ABCD4 の N 末端側の 2 個の膜貫通領域、LMBD1 の N 末端側の 5 個の膜貫通領域に重要な部位が存在することが示唆された。また、LMBD1 の 6 番目の膜貫通領域以降にライソゾームへの移行シグナルが存在することも示唆された。ABCD4 と LMBD1 単独の変異により同様のフェノタイプが現れる原因が理解できた。今後、重篤なビタミン B₁₂ 欠乏症患者から、患者を同定し治療法を確立する必要がある。

E . 結論

ALD に関する研究

ヒト ABCD1 が ATPase 活性とともに acyl-CoA thioesterase 活性を有していることを明らかにした。また、その thioesterase 活性には 149 番目のセリンが重要であることも明らかにした。今後は、ABCD1 の基質輸送における thioesterase 活性の意義を明らかにするとともに、基質輸送メカニズムを解明することが期待できる。

アストロサイトの極長鎖脂肪酸蓄積は、直接 ALD 発病と関連していないが、他のグリア細胞との相互作用に違いがある可能性が考えられた。今後、サイトカイン等の刺激に対する反応性の違いについて検討し、発病におけるアストロサイトの役割について検討したい。

ミスセンス変異 ABCD1 の安定化に関して、

有効な既存薬 2 種類及び天然化合物 2 種類を見いだした。既存薬については今後、治療薬としての有効性を検証する。天然化合物については、さらに多くの化合物をスクリーニングし、治療薬のリード化合物を見出す。一方、ヒト ABCD1 を発現した造血幹細胞を ABCD1 欠損マウスに移植した。今後、脳や脊髄での ABCD1 タンパク質の分布や脂肪酸含量への効果について検討する予定である。

ペルオキシソーム病に関する研究

ペルオキシソーム膜形成における Pex3p と Pex19p との相互作用の分子構造基盤が明らかになった。今後、Pex19p が担う PMP のペルオキシソーム膜への挿入過程を解析するとともに、ペルオキシソーム膜形成過程の分子メカニズムに基づいたペルオキシソーム病治療薬開発のためのアッセイ系を確立したい。

新規ビタミン B₁₂ 欠乏症(ライソゾーム蓄積症)に関する研究

ABCD4 および LMBD1 をコードする遺伝子の変異によって、ライソゾームにビタミン B₁₂ が蓄積する。ABCD4 は単独ではライソゾームへと局在しないことから、ABCD4 がビタミン B₁₂ の輸送体として機能し、LMBD1 が ABCD4 のライソゾームへの移行を補助するキャリアタンパク質として機能していることが示唆された。我々は、メタノール資化性酵母を用いたヒト ABCD4 の発現と精製に成功しているため、今後、リポソームに精製 ABCD4 を組み込んだプロテオリポソームを構築することにより、ABCD4 のビタミン B₁₂ 輸送機能を明らかにしたい。

F . 研究発表

1 . 論文発表

1) Sato Y, Shibata H, Nakatsu T, *et al.*: Structural

basis for docking of peroxisomal membrane protein carrier Pex19p onto its receptor Pex3p. *EMBO J* 29: 4083-4093, 2010

- 2) Kashiwayama Y, Tomohiro T, Narita K, *et al.*: Identification of a substrate-binding site in a peroxisomal α -oxidation enzyme by photoaffinity labeling with a novel palmitoyl derivative. *J Biol Chem* 285: 26315-26325, 2010
- 3) Woudenberg J, Rembacz KP, Hoekstra M, *et al.*: Lipid rafts are essential for peroxisome biogenesis in HepG2 cells. *Hepatology* 52: 623-633, 2010
- 4) Iwashita S, Tsuchida M, Tsukuda M, *et al.*: Multiple organelle-targeting signals in the N-terminal portion of peroxisomal membrane protein PMP70. *J Biochem* 147: 581-590, 2010
- 5) Kouno T, Watanabe N, Sakai N, *et al.*: The structure of *Physarum polycephalum* hemagglutinin I suggests a minimal carbohydrate recognition domain of legume lectin fold. *J Mol Biol* 405: 560-569, 2011
- 6) Morita M, Shimozawa N, Kashiwayama Y, *et al.*: ABC subfamily D proteins and very long chain fatty acid metabolism as novel targets in adrenoleukodystrophy. *Curr Drug Targets* 12: 694-706, 2011
- 7) Morita M., Shinbo S., Asahi A, *et al.*: Very long chain fatty acid β -oxidation in astrocytes: Contribution of the ABCD1-dependent and -independent pathways. *Biol Pharm Bull* 35: 1972-1979, 2012
- 8) Morita M, and Imanaka T: Peroxisomal ABC transporters: Structure, function and role in disease. *Biochim Biophys Acta* 1822: 1387-1396, 2012
- 9) 川口甲介, 今中常雄: ペルオキシソームの多様性と動態から見た微生物の生存戦略 .

生化学 84: 840-844, 2012

- 10) Morita M, Kobayashi J, Yamazaki K, et al.: A novel double in the *ABCD1* gene in a patient with X-linked adrenoleukodystrophy: Analysis of the stability and function of the mutant ABCD1 protein. *J Inher Metab Dis Rep*. 10: 95-102, 2013
- 11) Hama K, Nagai T, Nishizawa C, et al.: Molecular species of phospholipids with very long chain fatty acids in skin fibroblasts of Zellweger syndrome. *Lipids* 48: 1253-1267, 2013

2. 学会発表

- 1) 横山和明, 西澤千穂, 池田和貴, 永井徹, 守田雅志, 原田史子, 佐藤典子, 唐沢健, 今中常雄, 下澤伸行, 田口良. ペルオキシソーム病の繊維芽細胞に蓄積する極長鎖脂肪酸含有脂質. 第 52 回日本脂質生化学会. 渋川, 2010. 6
- 2) 志村裕介, 川道美里, 谷口範壮, 新保沙織, 渡辺志朗, 守田雅志, 今中常雄. 野生型および ABCD1 欠損マウス脳における極長鎖脂肪酸延長反応と関連タンパク質 ELOVL1 の発現. 日本薬学会北陸支部第 122 回例会. 金沢, 2010. 11
- 3) 柏山恭範, 今中常雄. ABC タンパク質サブファミリーD 群のオルガネラ選択的局在化機構. 第 32 回生体膜と薬物の相互作用シンポジウム. 富山, 2010.11
- 4) 五十嵐喜子, 柏山恭範, 平裕幸, 今中常雄. ペルオキシソーム膜形成因子 Pex16p のペルオキシソーム局在化シグナルの解析. 第 32 回生体膜と薬物の相互作用シンポジウム. 富山, 2010.11
- 5) 新保沙織, 志村祐介, 守田雅志, 渡辺志朗, 今中常雄. ABCD1 欠損マウス由来アストロサイトを用いた ALD 分子病態の検討. 第 83 回日本生化学会大会・第 33 回日本分子生物学会年会合同大会. 神戸, 2010.12
- 6) 柏山恭範, 今中常雄. ペルオキシソーム膜上に存在する raft 様構造体の解析. 第 83 回日本生化学会大会・第 33 回日本分子生物学会年会合同大会. 神戸, 2010.12
- 7) 李朝香, 朝日彰子, 赤池 宗輔, 柏山恭範, 守田雅志, 安川洋生, 今中常雄. ABC タンパク質サブファミリーDの細胞内局在化とN末端アミノ酸配列. 第 83 回日本生化学会大会・第 33 回日本分子生物学会年会合同大会. 神戸, 2010.12
- 8) 中野雄太, 森達哉, 楠本梨賀, 柏山恭範, 今中常雄. ペルオキシソーム形成因子 Pex3p の存在状態と Pex19p との相互作用に伴う高次構造変化. 第 83 回日本生化学会大会・第 33 回日本分子生物学会年会合同大会. 神戸, 2010.12
- 9) 土屋裕貴, 柏山恭範, 今中常雄: ペルオキシソーム膜 raft 様構造体の機能解析. 第 83 回日本生化学会大会・第 33 回日本分子生物学会年会合同大会. 神戸, 2010.12
- 10) 東野和直, 上杉泰介, 柏山恭範, 今中常雄. 小胞体膜上に存在する ABC タンパク質 P70R(ABCD4)の存在状態と機能の解析. 第 83 回日本生化学会大会・第 33 回日本分子生物学会年会合同大会. 神戸, 2010.12
- 11) 西澤千穂, 永井徹, 池田和貴, 守田雅志, 唐沢健, 原田史子, 佐藤典子, 中西広樹, 田口良, 下澤伸行, 今中常雄, 井上圭三, 横山和明. ペルオキシソーム病の繊維芽細胞にみられる極長鎖脂肪酸含有脂質の分子構造決定. 第 83 回日本生化学会大会・第 33 回日本分子生物学会年会合同大会. 神戸, 2010.12
- 12) Tomohiro T, Kashiwayama Y, Imanaka T, Hatanaka Y. Identification of a substrate-binding site in a peroxisomal

- β -oxidation enzyme by diazirine-based photoaffinity labeling. 8th AFMC International Medicinal Chemistry Symposium: Frontier of Medicinal Science. Tokyo, Sept. 2011
- 13) 李朝香, 朝日彰子, 赤池宗輔, 柏山恭範, 守田雅志, 安川洋生, 今中常雄. ABC タンパク質サブファミリーD の細胞内局在化における N 末端疎水性アミノ酸配列の役割. 日本生化学会北陸支部第 29 回大会. 金沢, 2011. 5
 - 14) 守田雅志. 極長鎖脂肪酸代謝異常と副腎白質ジストロフィー. 第 12 回 Pharmaco-Hematology シンポジウム. 富山, 2011. 6
 - 15) 谷口範壮, 新保沙織, 守田雅志, 今中常雄. ABCD1 欠損マウス脳由来初代培養アストロサイトの極長鎖脂肪酸代謝と遺伝子発現解析. 第 12 回 Pharmaco-Hematology シンポジウム. 富山, 2011. 6
 - 16) 守田雅志, 新保沙織, 今中常雄. ペルオキシソーム膜 ABC タンパク質 ABCD1 欠損アストロサイトの遺伝子発現解析. 第 84 回日本生化学会大会. 京都, 2011. 9
 - 17) 上杉泰介, 柏山恭範, 今中常雄. 小胞体膜上に存在する ABC タンパク質 P70R(ABCD4)の存在状態の解析. 第 84 回日本生化学会大会. 京都, 2011. 9
 - 18) 李朝香, 朝日彰子, 赤池宗輔, 柏山恭範, 守田雅志, 安川洋生, 今中常雄. ABC タンパク質サブファミリーD の細胞内局在化機構-ヒト, 線虫及び粘菌での共通性-. 第 84 回日本生化学会大会. 京都, 2011. 9
 - 19) 李朝香, 朝日彰子, 阪口雅郎, 柏山恭範, 今中常雄. ABC タンパク質サブファミリーD のオルガネラ膜への選別輸送機構:N 末端マルチオルガネラ移行シグナルの解析. 第 10 回次世代を担う若手ファーマ・バイオフォーラム. 仙台, 2011. 10
 - 20) 上杉泰介, 赤池宗輔, 柏山恭範, 守田雅志, 加藤博章, 今中常雄. 小胞体膜上に局在する ABCD4 (P70R)の存在様式と機能. 第 33 回生体膜と薬物の相互作用シンポジウム. 岡山, 2011. 11
 - 21) 上杉泰介, 柏山恭範, 今中常雄. 小胞体膜上に存在する ABC タンパク質 P70R (ABCD4)の存在状態の解析. 日本薬学会北陸支部平成 23 年度第 1 回総会及び第 123 回例会. 金沢, 2011. 11
 - 22) 守田雅志, 新保沙織, 浜田知世, 今中常雄. 副腎白質ジストロフィーモデルマウス由来初代培養アストロサイトの極長鎖脂肪酸代謝と遺伝子発現解析. 第 53 回日本先天代謝異常学会総会・第 10 回アジア先天代謝異常症シンポジウム. 千葉, 2011. 1
 - 23) Uesugi T, Kashiwayama Y, Imanaka T. Complex formation of ABC protein, P70R/ABCD4 on endoplasmic reticulum membranes. 第 34 回日本分子生物学会年会. 横浜, 2011. 12
 - 24) Morita M, Shinbo S, Asahi A, Imanaka T. Very long chain fatty acid -oxidation in astrocytic cells; contribution of ABCD1-dependent and -independent pathways. 第 34 回日本分子生物学会年会. 横浜, 2011. 12
 - 25) Kostsin, DG, Lee A, Yamazaki K, Kawaguchi K, Morita M, Imanaka T. Establishment of screening system to discover candidates of chemical Chaperone that stabilize mutant ABCD1 responsible for adrenoleukodystrophy. The 4th EMBO Meeting. Nice, Sept. 2012
 - 26) 守田雅志, 山崎こず枝, 小出玲爾, 下澤伸行, 今中常雄. 副腎白質ジストロフィー患者で見出された二カ所にミスセンス変異をもつ新規変異 ABCD1 タンパク質の発現

- 解析．日本薬学会第 132 年会．札幌，2012.3
- 27) 池島俊季，赤池宗輔，川口甲介，守田雅志，今中常雄．メタノール資化性酵母 *Pichia pastoris* 発現系を用いたペルオキシソーム膜 ABC タンパク質 ABCD1 の機能解析．日本生化学会北陸支部第 30 回大会．金沢，2012.5
- 28) 山崎こず枝，守田雅志，小出玲爾，下澤伸行，今中常雄．副腎白質ジストロフィー患者の新規 ABCD1 遺伝子変異 -ニカ所にミスセンス変異をもつ ABCD1 タンパク質の発現解析- 第 13 回 Pharmaco-Hematology シンポジウム．東京，2012.6
- 29) 池島俊季，川口甲介，赤池宗輔，守田雅志，今中常雄．メタノール資化性酵母 *Pichia pastoris* 発現系を用いた ABC タンパク質サブファミリー D の発現系の構築．第 11 回次世代を担う若手ファーマ・パイオフォーラム．福岡，2012.9
- 30) 池島俊季，川口甲介，守田雅志，今中常雄．ペルオキシソーム膜 ABC タンパク質 ABCD1D の構造と機能．第 34 回生体膜と薬物の相互作用シンポジウム．京都，2012.11
- 31) Morita M, Kostsin DG, Yamazaki K, Arimura K, Shimozawa N, Imanaka T. A screening system to discover chemical compounds that stabilize missense mutant ABCD1 protein. 第 54 回日本先天代謝異常学会総会・第 11 回アジア先天代謝異常症シンポジウム．岐阜，2012.11
- 32) 李朝香，朝日彰子，川口甲介，守田雅志，今中常雄．ABC タンパク質サブファミリー D の細胞内局在性-ヒトと線虫での共通性-．日本薬学会北陸支部第 124 回例会．富山，2012.11
- 33) 野村芽衣子，友廣岳則，池島俊季，今中常雄，畑中保丸：光反応性脂肪酸プローブによる脂肪酸結合タンパク質のラベル化．日本薬学会北陸支部第 124 回例会．富山，2012.11
- 34) Morita M, Yamazaki K, Kawaguchi K, Shimozawa N, Koide R, Imanaka T. A novel double mutation in *ABCD1* gene in a patient with X-linked adrenoleukodystrophy: Analysis of the stability and function of the mutant ABCD1 protein. 第 35 回日本分子生物学会年会．福岡，2012.12
- 35) Morita M., Kostsin DG, Yamazaki K, Shimozawa N, Imanaka T. A Screening system to discover chemical compounds that stabilize ABCD1 protein with missense mutation. 第 35 回日本分子生物学会年会．福岡，2012.12
- 36) 池島俊季，川口甲介，赤池宗輔，守田雅志，今中常雄．メタノール資化性酵母 *Pichia pastoris* ペルオキシソーム膜 ABC タンパク質 ABCD1 の発現系構築．第 85 回日本生化学会大会．福岡，2012.12
- 37) 守田雅志，小林晃，松本隼，渡辺志朗，下澤伸行，今中常雄：ABCD1 欠損マウスの分子病態の解析とロレンツ油の効果．日本薬学会第 133 年会．横浜，2013.3
- 38) 池島俊季，川口甲介，守田雅志，今中常雄．メタノール資化性酵母を用いたペルオキシソーム膜 ABC タンパク質の発現と機能解析．日本薬学会第 133 年会．横浜，2013.3
- 39) 李朝香，朝日彰子，川口甲介，守田雅志，今中常雄：ABCD タンパク質のオルガネラ局在化における N 末端疎水性モチーフの役割．種を超えた共通性．日本薬学会第 133 年会．横浜，2013.3
- 40) 西澤千穂，濱弘太郎，永井徹，池田和貴，守田雅志，唐澤健，原田史子，谷川和也，佐藤典子，田口良．下澤伸行．今中常雄，

- 井上圭三, 横山和明. 極長鎖脂肪酸含有脂質の定量解析による2つのペルオキシソーム病の比較. 日本薬学会第133年会. 横浜, 2013. 3
- 41) 有村洸平, 守田雅志, Kostsin DG, 山崎こず枝, 下澤伸行, 今中常雄: 副腎白質ジストロフィーの治療薬開発. ABCD1 タンパク質の安定化を指標としたスクリーニング系の構築. 第14回 Pharmaco-Hematology シンポジウム. 東京, 2013. 6
- 42) 池島俊季, 川口甲介, 守田雅志, 今中常雄. ペルオキシソーム膜 ABC タンパク質 ABCD1 の機能解析. 第86回日本生化学会大会. 横浜, 2013. 9
- 43) Kostsin DG, Morita M, Yamazaki K, Arimura K, Shimozawa N, Imanaka T. Establishment and application of fluorescence-based assay for screening of chemical compounds that stabilize mutant ABCD1 protein responsible for adrenoleukodystrophy. 第86回日本生化学会大会. 横浜, 2013. 9
- 44) 池島俊季, 川口甲介, 守田雅志, 今中常雄: メタノール資化性酵母を用いたペルオキシソーム膜 ABC タンパク質 ABCD1 の発現と機能解析. 第12回次世代を担う若手ファーマ・バイオフィォーラム. 東京, 2013. 9
- 45) 岡元拓海, 川口甲介, 金林峰, 守田雅志, 今中常雄. ABC トランスポーター ABCD4 のリソソームへの局在化機構の解析. 日本薬学会北陸支部第125回例会. 金沢, 2013. 11
- 46) 松本隼, 守田雅志, 渡邊康春, 長井良憲, 小林博司, 高津聖志, 今中常雄: 副腎白質ジストロフィー. レンチウイルスベクターを用いた ABCD1 遺伝子発現と骨髄移植. 日本薬学会北陸支部第125回例会. 金沢, 2013. 11
- 47) 高崎満喜子, 渡邊雄一, 深澤力也, 川口甲介, 守田雅志, 大熊芳明, 今中常雄. ペルオキシソーム膜形成因子 Pex3p と相互作用するタンパク質の検索. 日本薬学会北陸支部第125回例会. 金沢, 2013. 11
- 48) 兵藤沙織, 川口甲介, 守田雅志, 今中常雄. リソソーム膜タンパク質 LMBD1 の異種発現系の構築. 日本薬学会北陸支部第125回例会. 金沢, 2013. 11
- 49) 岡元拓海, 川口甲介, 金林峰, 守田雅志, 今中常雄. ABC トランスポーター ABCD4 のリソソームへの局在化における LMBD1 の役割. 第35回生体膜と薬物の相互作用シンポジウム. 東京, 2013. 11
- 50) Morita M., Kostsin DG, Yamazaki K, Arimura K, Shimozawa N, Imanaka T. Screening of chemical Compounds that stabilize ABCD1 protein with missense mutation. The 3rd Asian Congress for Inherited Metabolic Diseases. The 3rd Asian Congress for Inherited Metabolic Diseases. Tokyo, Nov. 2013
- 51) Yokoyama K, Hama K, Nagai T, Nishizawa C, Ikeda K, Morita M, Nakanishi, H, Imanaka, T, Shimozawa N, Taguchi R, and Inoue K, Inoue K. Molecular species of phospholipids with very long chain fatty acids in skin fibroblasts of Zellweger syndrome. The 3rd Asian Congress for Inherited Metabolic Diseases. Tokyo, Nov. 2013
- 52) Okamoto T, Kawaguchi K, Morita M, Imanaka T: Subcellular localization of ABC transporter ABCD4 is regulated by LMBD1. 第36回日本分子生物学会年会. 神戸, 2013, 12
- G. 知的財産権の出願・登録状況
1. 特許登録
- 特許第 5049329 号. 発明名称: ペルオキ

シソーム脂肪酸 酸化系活性化物質の検
出方法. 特許権者：今中常雄, 株式会社ツ
ムラ. 発明者：今中常雄, 林 利光, 守田雅
志. 登録日：平成 24 年 7 月 27 日

2 . 実用新案登録

3 . その他

なし