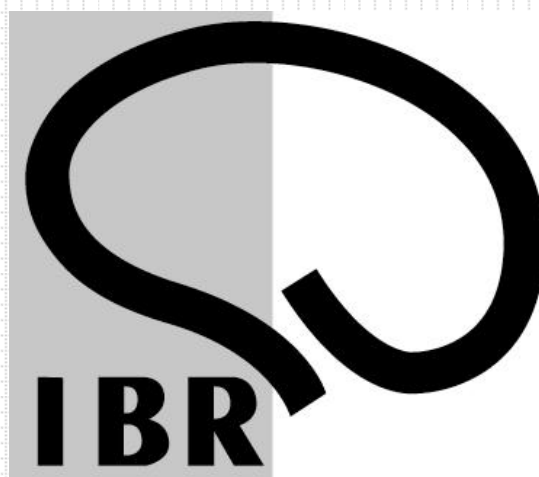


平成 18 年度 成果報告書・発表論文リスト

第五領域「病態脳」



第5領域 (計画班員)			
研究課題名	神経変性における蛋白凝集機構の解析		
研究代表者名	貫名 信行	E-mail	nukina@brain.riken.jp
所属・職名	独立行政法人理化学研究所病因遺伝子研究グループ・グループディレクター		
研究分担者名			
分担者所属			
研究成果報告書 『ショウジョウバエハンチントン病細胞モデルの作成と RNAi による凝集体形成制御の探索』 貫名信行¹、DOUMANIS Joanna¹, MOORE Adrian² 1. 独立行政法人理化学研究所 BSI 構造神経病理研究チーム 2. 独立行政法人理化学研究所 BSI ムーア研究ユニット 目的および背景：CAG リpeat病はその病因遺伝子に CAG のリpeatを含み、リpeatの伸長を認める一群の神経疾患である。CAG リpeatが病因遺伝子の翻訳領域に存在するため CAG リpeatから翻訳されたポリグルタミンが病態に強くかかわっていると想定され、ポリグルタミン病とも呼ばれる。ポリグルタミン病の神経細胞の核にはポリグルタミンからなる封入体が存在することが確認され、これらの封入体と神経細胞変性の関連が注目されている。ハンチントン病の病態の解析を凝集体形成を中心に行うために、凝集体形成を制御する因子の系統的解析を RNAi ライブラリーを用いて行うことを計画した。マウスによる RNAi ライブラリーによるスクリーニングについても試行中であるが、RNAi の導入に安定性がある、ショウジョウバエの系について行った解析について報告する。 方法： 1) ショウジョウバエ中枢神経由来の細胞に N-terminal truncated huntingtin fused to EGFP with an expanded (62Q) polyglutamine repeat を誘導的に発現する系を作成した。この細胞は pQ 蛋白発現により、EGFP 陽性の凝集体を形成した。 2) この細胞に RNAi ライブラリーを用いて RNAi を導入し、凝集体形成を ArrayScan によってスクリーニングする系を確立した。 結果： 7200 遺伝子（ショウジョウバエ遺伝子の約半数で主に既知の遺伝子が含まれている）をスクリーニングし、404 の制御遺伝子（抑制ないし促進）の候補を同定した。これらの多くはほ乳類のオーソログを持つものであった。現在これらの候補遺伝子の絞り込みを in vivo モデルを用いるなどして行っている。			

第 5 領域 （計画班員）	
研究代表者名	貫名 信行
発表論文 英文 （１）原著論文 Liu, C., Fei, E., Jia, N., Wang, H., Tao, R., Iwata, A., <u>Nukina, N.</u>, Zhou, J. & Wang, G. Assembly of lysine 63 linked ubiquitin-conjugates by phosphorylated alpha-synuclein implies Lewy body biogenesis. <i>J Biol Chem.</i> in press. Wang, H., Jia, N., Fei, E., Wang, Z., Liu, C., Zhang, T., Fan, J., Wu, M., Chen, L., <u>Nukina, N.</u>, Zhou, J. & Wang, G. p45, an ATPase subunit of the 19S proteasome, targets the polyglutamine disease protein ataxin-3 to the proteasome. <i>J Neurochem.</i> in press. Goswami, A., Dikshit, P., Mishra, A., <u>Nukina, N.</u> & Jana, N.R. Expression of expanded polyglutamine proteins suppresses the activation of transcription factor NFkappaB. <i>J Biol Chem.</i> 281, 37017-24 (2006). Khan, L.A., Bauer, P.O., Miyazaki, H., Lindenberg, K.S., Landwehrmeyer, B.G. & <u>Nukina, N.</u> Expanded polyglutamines impair synaptic transmission and ubiquitin-proteasome system in <i>Caenorhabditis elegans</i>. <i>J Neurochem.</i> 98, 576-87 (2006). Oyama, F., Miyazaki, H., Sakamoto, N., Becquet, C., Machida, Y., Kaneko, K., Uchikawa, C., Suzuki, T., Kurosawa, M., Ikeda, T., Tamaoka, A., Sakurai, T. & <u>Nukina, N.</u> Sodium channel beta4 subunit: down-regulation and possible involvement in neuritic degeneration in Huntington's disease transgenic mice. <i>J Neurochem.</i> 98, 518-29 (2006). （２）総説 Mitsui, K., Doi, H. & <u>Nukina, N.</u> Proteomics of polyglutamine aggregates. <i>Methods Enzymol</i> 412, 63-76 (2006). （３）著書 和文 （１）原著論文 （２）総説	

(3) 著書

第5領域（計画班員）			
研究課題名	パーキンソン病発症の分子機構		
研究代表者名	岩坪 威	E-mail	iwatsubo@mol.f.u-tokyo.ac.jp
所属・職名	東京大学大学院薬学系研究科・教授		
研究分担者名	伊藤弦太		
分担者所属			

研究成果報告書

優性遺伝性家族性パーキンソン病（FPD）の中で頻度の高い PARK8 の病因遺伝子産物 LRRK2 は、Ras 様低分子 GTP 結合蛋白質（Roc）ドメイン、キナーゼドメインを併せ持つ約 2500 アミノ酸からなる蛋白質である。LRRK2 の Roc ドメインが GTP 結合能を有するかを調べるため、LRRK2 を HEK293 細胞に発現し、[32P]orthophosphate で代謝ラベリング後免疫沈降し、薄層クロマトグラフィーで展開した。Ras などの低分子量 GTP 結合蛋白質からは GDP が主に検出されるのに対し、LRRK2 からは GTP の遊離が観察されたが GDP は見られなかった。in vitro での LRRK2 と[α-32P]GTP との結合は、非標識 GTP、GDP のいずれによっても競合された。これらの結果から、LRRK2 は GTP、GDP いずれに対しても結合能を有するが、細胞内では定常状態において主に GTP 結合型として存在すると考えられた。LRRK2 が細胞内において GTP 結合型で存在したことから、LRRK2 が GTP 加水分解活性を持たないと考えられ、in vitro において LRRK2 は[α-32P]GTP から GDP を産生しなかった。LRRK2 の GTPase 活性の欠損は、Ras などの GTPase 活性に必要である 3 つのアミノ酸残基のうち 2 つが LRRK2 において保存されていないことに起因すると考えられた。LRRK2 の Roc ドメインの保存されていない 2 残基を Ras 型に戻したところ、代謝ラベリングにより GDP 結合型の LRRK2 が検出された。これらの結果から、野生型 LRRK2 は定常状態においては GTPase 活性を持たないと結論された。Roc ドメインとキナーゼドメインの機能的関連を明らかにするため、GTP 結合能を喪失した変異型 LRRK2 を作製した。Ras などの低分子量 G 蛋白質の GTP 結合能を喪失させるアミノ酸置換（T1348N）を Roc ドメインに導入すると、LRRK2 の GTP 結合能は、HEK293 細胞の代謝ラベリングにおいても、in vitro においても消失した。また、T1348N 変異体は、in vitro において自己リン酸化活性を持たず、人工基質 myelin basic protein もリン酸化しなかった。LRRK2 を発現する HEK293 細胞の代謝ラベリングで見られる LRRK2 自身のリン酸化も、T1348N 変異により消失した。これらの結果から、LRRK2 の Roc ドメインへの GTP 結合は、LRRK2 の細胞内におけるリン酸化ならびに LRRK2 のキナーゼ活性に必要と考えられた。LRRK2 を細胞内でリン酸化するキナーゼを同定するため、同時に様々な阻害剤で細胞を処理し、LRRK2 のリン酸化の変化を検討した。PKA 阻害剤 H-89 と KT5720 で LRRK2 のリン酸化が阻害され、LRRK2 は in vitro において PKA によってリン酸化された。これらの結果から、PKA もしくは類似の阻害剤感受性を示すキナーゼが LRRK2 をリン酸化する可能性が示唆された。FPD 変異のうち、G2019S 変異は LRRK2 の自己リン酸化活性を増加させたが、I1371V, R1441C, I2020T 変異では自己リン酸化は不変であった。FPD 変異は Roc ドメインへの GTP 結合量を変化させなかった。以上（1）LRRK2 は GTP 結合能を有するが、GTPase 活性を有さないこと（2）LRRK2 のキナーゼ活性の獲得には、Roc ドメインへの GTP 結合が必要であり、この過程は GTP 結合依存的な他のキナーゼによるリン酸化を伴うことが明らかになった。

第5領域 (計画班員)

研究代表者名 岩坪 威

発表論文

英文

(1) 原著論文

Morohashi, Y., Kan, T., Tominari, Y., Fuwa, H., Okamura, Y., Watanabe, N., Sato, C., Natsugari, H., Fukuyama, T., Iwatsubo, T. & Tomita, T. Carboxyl-terminal fragment of presenilin is the molecular target of a dipeptidic γ -secretase-specific inhibitor DAPT. *J Biol Chem.* **281**, 14670-14676(2006).

Tomita, T., Tanaka, S., Morohashi, Y. & Iwatsubo, T. Presenilin-dependent intramembrane cleavage of ephrin-B1. *Molecular Neurodegeneration* **1**,2 (doi:10.1186/1750-1326-1-2)(2006).

Yamamoto, R., Iseki, E., Murayama, N., Minegishi, M., Marui, W., Togo, T., Katsuse, O., Kato, M., Iwatsubo, T., Kosaka, K. & Arai, H. Investigation of Lewy pathology in the visual pathway of brains of dementia with Lewy bodies. *J Neurol Sci.* **246**,95-101(2006).

Arawaka, S., Wada, M., Goto, S., Karube, H., Sakamoto, M., Ren, C.-H., Koyama, S., Nagasawa, H., Kimura, H., Kawanami, T., Kurita, K., Tajima, K., Daimon, M., Baba, M., Kido, T., Saino, S., Goto, K., Asao, H., Kitanaka, C., Takashita, E., Hongo, S., Nakamura, T., Kayama, T., Suzuki, Y., Kobayashi, K., Katagiri, T., Kurokawa, K., Kurimura, M., Toyoshima, I., Tsuchiya, K., Iwatsubo, T., Muramatsu, M., Matsumine, H. & Kato, T. The role of G protein-coupled receptor kinase 5 in pathogenesis of sporadic Parkinson's disease. *J Neurosci.* **26**,9227-9238(2006).

Kim, E.J., Sung, J.Y., Lee, H.J., Rhim, H., Hasegawa, M., Iwatsubo, T., Min, D.S., Kim, J., Paik, S.R. & Chung, K.C. Dyrk1A phosphorylates α -synuclein and enhances intracellular inclusion formation. *J Biol Chem.* **281**, 33250-33257(2006).

Sato, C., Morohashi, Y., Tomita, T. & Iwatsubo, T. Structure of the catalytic pore of γ -secretase inferred by the accessibility of substituted cysteines. *J Neurosci.* **26**, 12081-12088(2006).

Hsieh, H., Boehm, J., Sato, C., Iwatsubo, T., Tomita, T., Sisodia, S. & Malinow, R. AMPA-R removal underlies A β -induced synaptic depression. *Neuron* **52**,831-843(2006).

Zhu, X., Babar, A., Siedlak, L.S., Yang, Q., Ito, G., Iwatsubo, T., Smith, M.A., Perry, G. & Chen, S.G. LRRK2 in Parkinson's disease and dementia with Lewy bodies. *Molecular Neurodegeneration* **1**,17(2006).

Ito, G., Okai, T., Fujino, G., Takeda, K., Ichijo, H., Katada, T. & Iwatsubo, T.: GTP binding is essential to the protein kinase activity of LRRK2, a causative gene product for familial Parkinson's disease. *Biochemistry* **46**,1380-1388(2007).

Wakamatsu, M., Ishii, A., Iwata, S., Sakagami, J., Ukai, Y., Ono, M., Kanbe, D., Muramatsu, S.-i, Kobayashi, K., Iwatsubo, T. & Yoshimoto, M.: Selective loss of nigral dopamine neurons induced by overexpression of truncated human α -synuclein in mice. *Neurobiol Aging*. (doi:10.1016/j.neurobiolaging)2006.11.017 (2007).

Hori, Y., Hashimoto, T., Wakutani, Y., Urakami, K., Nakashima, K., Condron, M.M., Tsubuki, S., Saido, T.C., Teplow, D.B. & Iwatsubo, T. The Tottori (D7N) and English (H6R) familial Alzheimer's disease mutations accelerate A β fibril formation without increasing protofibril formation. *J Biol Chem*. **282**, 4916-4923(2007).

Fumimura, Y., Ikemura, M., Saito, Y., Sengoku, R., Kanemaru, K., Sawabe, M., Arai, T., Ito, G., Iwatsubo, T., Fukayama, M., Mizusawa, H. & Murayama, S.: Analysis of adrenal gland is useful for evaluating pathology of the peripheral autonomic nervous system in Lewy body disease. *J Neuropathol Exp Neurol*. in press.

Isoo, N., Sato, C., Miyashita, H., Shinohara, M., Takasugi, N., Morohashi, Y., Tsuji, S., Tomita, T. & Iwatsubo, T.: A β 42 overproduction associated with structural changes in the catalytic pore of γ -secretase: common effects of Pen-2 amino-terminal elongation and fenofibrate. *J Biol Chem*. in press.

(2) 総説

Iwatsubo, T.: Tauopathy: an overview. *Neuropathology* **26**, 455-456(2006).

Iwatsubo, T.: Pathological biochemistry of α -synucleinopathy. *Neuropathology* in press.

(3) 著書

Wakabayashi, T., Iwatsubo, T. & De Strooper, B.: The biology of the presenilin complexes. "Alzheimer's Disease", edited by S.S. Sisodia and R.E. Tanzi. VTEX Lithuania, in press.

和文

(1) 原著論文

(2) 総説

桑原知樹、岩坪威：家族性 PD 変異型 α -シヌクレインを発現するトランスジェニック線虫はドパミン神経の異常を生じる. *PD today* **13**,16(2006).

岩坪威：アルツハイマー病のアミロイド仮説を検証する. *Medical Practice* **23**,1155-1157 (2006).

岩坪威： α -synuclein 遺伝子(SNCA)の異常による家族性パーキンソン病(PARK1 および PARK4). *神経内科* **65**,108-113(2006).

岩坪威：アプローチ：アルツハイマー病研究の過去・現在・未来. *最新医学* **61**,2355-2357(2006).

富田泰輔、岩坪威：アルツハイマー病のシステム生物医学. *医学のあゆみ* **219**,714-718(2006).

岩坪威：軽度認知障害に対する薬物介入：今後の方向性. *Modern Physician* **26**,1885-1888(2006).

橋本唯史、岩坪威：認知症動物モデルの現状と問題. *Clinical Neuroscience***25**, 165-168(2007).

山田薫、岩坪威： β アミロイドの脳外排出と末梢分解機構. *医学のあゆみ* **220**, 369-373(2007).

矢吹千織、岩坪威：アルツハイマー病に対する A β 免疫療法. *医学のあゆみ* **220**, 451-455(2007).

(3) 著書

岩坪威：アルツハイマー病、パーキンソン病、Lewy 小体型痴呆症の発症機序. *認知症治療薬開発の最前線* 斎藤洋、阿部和穂（編）シーエムシー出版、109-130(2006).

第5領域（計画班員）			
研究課題名	γセクレターゼの酵素学的性質の解明		
研究代表者名	井原 康夫	E-mail	yihara@m.u-tokyo.ac.jp
所属・職名	東京大学・大学院医学系研究科・脳神経医学専攻・神経病理・教授		
研究分担者名	森島 真帆，舟本 聡		
分担者所属	東京大学 大学院医学系研究科 脳神経医学専攻 神経病理		
研究成果報告書			
アルツハイマー病は、脳内のアミロイドβタンパク質（Aβ）、中でもAβ42の増加が発症の原因になると考えられている。γセクレターゼは、Aβが前駆体であるAPPから切り出される際に、そのC末端側を切断し、産生されるAβ分子種を決定する、アルツハイマー病の発症にとって要となる酵素である。プレセニリン、ニカストリン、APH1、PEN2を構成要素として含む高分子量複合体で、プレセニリンの膜貫通領域にある2つのアスパラギン酸がプロテアーゼとしての活性中心を形成している。基質であるI型膜タンパク質の膜内領域を切断することが、γセクレターゼの大きな特徴であるが、その切断のメカニズムは分かっていない。 われわれは、これまでの研究結果から、γセクレターゼが、APPをその膜・細胞質境界領域のε部位で切断した後に、膜貫通領域のαヘリックスに沿って3アミノ酸残基ずつ切断し、最終的にγ部位で切断してAβを産生するというトリペプチド仮説を立て、これを検証した。 まず、APPがε部位などで切断された後、C末端側から3アミノ酸残基ずつ切断されることを証明した。C99を発現する細胞をγセクレターゼ阻害剤であるDAPTで処理すると、Aβ46が細胞内に溜まる。この細胞から膜画分あるいはラフト画分を調製し、L685,458の存在下でインキュベートすると、C99のε切断は抑制されているにもかかわらず、Aβ43とAβ40が経時的に増加し、それに伴ってAβ46が対応する量だけ減少した。この変化はDAPTにより抑制されたことから、Aβ46は、γセクレターゼにより切断されてAβ43とAβ40を生じることが明らかになった。 次に、γセクレターゼにより産生され、膜から放出されるであろうと予想される、APPのγ部位とε部位の間の領域に由来する3アミノ酸残基のペプチドを、LC/MS/MSを用いて直接的に検出し、同定することを試みた。C99を発現する細胞から膜画分を調製し、インキュベートすると、γセクレターゼ依存的にAβとAICDが産生される。この時の反応液をHPLCで部分精製し、これをさらにLC/MS/MSで解析した結果、予想通りの5種類のトリペプチド、IAT、VIV、ITL、TVI、VITを検出、同定することができた。これらのトリペプチドの産生はL685,458により抑制された。従って、Aβが産生される際には、γ部位とε部位の間のAPP膜内領域が、γセクレターゼにより3アミノ酸残基ずつ切断されて、トリペプチドが放出されと考えられる。現在、トリペプチドの定量的解析を行い、切断の時系列について検討を行っている。			

第5領域 (計画班員)

研究代表者名 井原 康夫

発表論文

英文

(1) 原著論文

Kakuda, N., Funamoto, S., Yagishita, S., Takami, M., Osawa, S., Dohmae, N. & Ihara, Y. Equimolar production of amyloid β -protein and APP intracellular domain from β -carboxyl terminal fragment by γ -secretase. *J. Biol. Chem.* **281**, 14776-86 (2006).

Kuwano, R., Miyashita, A., Arai, H., Asada, T., Imagawa, M., Shoji, M., Higuchi, S., Urakami, K., Kakita, A., Takahashi, H., Tsukie, T., Toyabe, S., Akazawa, K., Kanazawa, I. & Ihara, Y. Dynamin-binding protein gene on chromosome 10q is associated with late-onset Alzheimer's disease. *Hum. Mol. Genet.* **5**, 2170-82 (2006).

Morishima-Kawashima, M., Han, X., Tanimura, Y., Hamanaka, H., Kobayashi, M., Sakurai, T., Yokoyama, M., Wada, K., Nukina, N., Fujita, S. C. & Ihara, Y. Effects of human apolipoprotein E isoforms on the amyloid β -protein concentration and lipid composition in brain low-density membrane domains. *J. Neurochem.* in press.

(2) 総説

Iwatsubo, T., Ihara, Y. & Kanazawa, I. Alzheimer disease research in Japan: public funding. *Nat. Med.* **12**, 778-79 (2006).

(3) 著書

Ihara, Y. Neurofibrillary tangles/paired helical filaments (1981-83). In: Alzheimer's Disease. A Century of scientific and Clinical Research. (ed Perry, G., Avila, J., Kinoshita, J. & Smith, M. A.) *J. Alz. Dis.* **9**, 209-17 (2006).

Ihara, Y. Ubiquitin is a component of paired helical filaments in Alzheimer's disease. In: Alzheimer: 100 Years and Beyond. (ed Jucker, M., Beyreuther, K., Haass, C., Nitsch, R. & Christen, Y.) Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 338-43 (2006).

和文

(1) 原著論文

(2) 総説

森島真帆. γ セクレターゼに注目した治療の可能性. *PROGRESS IN MEDICINE* **26**, 431-36 (2006).

(3) 著書

第5領域 (計画班員)			
研究課題名	パーキンソン病における神経細胞死の機序解明とその防御		
研究代表者名	水野 美邦	E-mail	y_mizuno@med.juntendo.ac.jp
所属・職名	順天堂大学 老人性疾患病態・治療研究センター長		
研究分担者名			
分担者所属			
研究成果報告書 Parkin と PINK1 の共通カスケードの解明：Parkin は PINK1 の安定化に関与 本研究の背景と目的 Parkinson's disease (PD)は、levodopa 治療の導入により生命予後は劇的に改善された。しかしながら長期治療による運動合併症状などの問題点が明らかにされ、ドパミン作動薬が開発されたものの患者は終生薬物療法が必要であり、しかも現在の治療方法でも十分満足いくものとは言い難い。このような背景のもと神経保護作用のある新規薬物の開発が期待されているが、実現化には根本原因の究明が急務である。PD の多くは孤発性であるが一部には家族性に発症する。家族性 PD の存在の重要性は、たった1つの遺伝子異常でドパミン神経脱落とドーパ反応性パーキンソニズムを引き起こすことである。このため原因遺伝子産物が、神経変性において共通機序に関わっていることが推定される。劣性遺伝性 PD の原因遺伝子である parkin (PARK2)と PTEN-induced putative kinase 1: PINK1 (PARK6)は、臨床系も極めて類似しており、遺伝子改変ショウジョウバエモデルの検討でも Parkin が PINK1 の上流として機能していることが報告されている。これら所見は、両分子が協働している可能性を示している。本年度は、両遺伝子産物の相互作用を検討し、共通機構の解明を行った。 方法 結合検討方法として免疫沈降法、pull down 法、及び FRET (fluorescence resonance energy transfer) 法を用いた。ユビキチン化においては、<i>in vivo</i> ユビキチン化法、半減期においてはパルスチェイス法において検討した。内在性 PINK1 発現量の検討においてはウエスタンブロット法で確認した。 結果 Parkin と PINK1 は生細胞内においてミトコンドリア近傍で結合した。また、これらの結合が直接的であることを証明した。野生型及び変異型 Parkin と PINK1 は結合するが、変異型 PINK1 は野生型 Parkin とは結合しなかった。PINK1 は Parkin 基質にはならず、逆に、PINK1 ユビキチン化を著しく阻害し、両因子変異型においてはその機能が低下した。また、PINK1 半減期を検討した結果、野生型 Parkin のみが PINK1 を有意に安定化した。さらに、神経芽細胞腫 SH-SY5Y Parkin 定常発現株における内在性 PINK1 の発現量は増加しているもののベクターのみの定常型発現株では PINK1 そのものを決定出来なかった。これら現象から Parkin が PINK1 の安定性に関与している可能性が考えられた。実際に Parkin 変異を持つ AR-JP 剖検脳の検討では、正常脳と比較し患者脳において PINK1 発現量は低下していた。 結論 Parkin は PINK1 のユビキチン化を阻害することにより、その結果、プロテアソームを介した PINK1 の分解を抑制した。これらの機能が、両遺伝子変異型においても著しく低下すること、Parkin 変異患者脳において PINK1 発現量が減少していたことから、Parkin の PINK1 安定化機構が Park2 の黒質神経細胞死に関与している可能性が考えられた。また、両遺伝子に連鎖する PD 発症機構は一部共通していることが示唆された。さらに、結合局在がミトコンドリア近傍であることから、ミトコンドリア機能に影響する可能性を示唆した。			

第5領域 (計画班員)

研究代表者名 水野 美邦

発表論文

英文

(1) 原著論文

Arai, H., Furuya, T., Mizuno, Y. & Mochizuki, H. Inflammation and infection in Parkinson's disease. *Histol Histopathol* **121**,673-678 (2006).

Naito, S., Mochizuki, H., Yasuda, T., Mizuno, Y., Furusawa, M., Ikeda, S., Adachi, T., Shimizu, H. M., Suzuki, J., Fujiwara, S., Okada, T., Nishikawa, K., Aoki, S. & Wada, K. Characterization of multimeric variants of ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase L1 in water by small-angle neutron scattering. *Biochem Biophys Res Commun* **339**, 717-725 (2006).

Sato, K., Hatano, T., Yamashiro, K., Kagohashi, M., Nishioka, K., Izawa, N., Mochizuki, H., Hattori, N., Mori, H. & Mizuno, Y. The Juntedo Parkinson Study Group. Prognosis of Parkinson's Disease: Time to Stage III, IV, V, and to Motor Fluctuations. *Mov Disord* **21**(9), 1384-1395 (2006).

Mizuno, Y., Kanazawa, I., Kuno, S., Yanagisawa, N., Yamamoto, M. & Kondo, T. Japanese Parkinson-Entacapone Study Group. Placebo-controlled, double-blind dose-finding study of entacapone in fluctuating parkinsonian patients. *MovDisord* **22**, 75-80 (2007).

(2) 総説

Mizuno, Y., Nobutaka, H., Yoshino, H., Hatano, Y., Satoh, K., Tomiyama, H. & Li, Y. Progress in familial Parkinson's disease. *J Neural Transm Suppl.* **70**, 191-204 (2006).

(3) 著書

和文

(1) 原著論文

(2) 総説

(3) 著書

水野美邦 : 8. 錐体街路系疾患. *臨床神経内科学*, 廣瀬源二郎・田代邦雄・葛原茂樹編, 南山堂、東京、324-348 (2006).

水野美邦：序文. 新しい診断と治療の ABC39 パーキンソン病. *最新医学別冊* 水野美邦・編, 最新医学社、東京、(2006).

水野美邦：加速性 Parkinson 病の臨床像と分子遺伝学の整理解説：総論. *神経内科* **65**, 103-107(2006).

水野美邦：パーキンソン病遺伝子. *Clinical Neuroscience 別冊* 中外医学社、東京、(2007).

水野美邦：パーキンソン病遺伝子 Overview. *Clinical Neuroscience* **25**,70-71(2007).

水野美邦：ふるえの診察と検査：問診と身体診察のポイント. *Clinical Neurosci* 2007 **25**,325-329(2007).

第5領域 (計画班員)			
研究課題名	神経難病に関わる各種脳幹部神経細胞の試験管内分化系とその応用		
研究代表者名	笹井 芳樹	E-mail	yoshikisasai@cdb.riken.jp
所属・職名	理化学研究所発生・再生科学総合研究センター・グループディレクター		
研究分担者名			
分担者所属			
研究成果報告書 研究代表者らはフィーダー細胞を用いずに、ES 細胞の細胞塊を無血清下に浮遊培養ですること で、効率よく神経細胞に分化させる系をまず樹立した(SFEB 法)。特に Wnt, Nodal という2つの 内在性の分泌シグナル因子の活性を一時的に阻害することで、ほぼ選択的に神経分化誘導でき ることが判明した。マーカー解析の結果、SFEB 法で ES 細胞から産生された神経細胞はこれまで 産生が困難であった大脳の前駆細胞であることが明らかになり、さらに Shh を作用させること により、この大脳前駆細胞から大脳基底核などの細胞を試験管内で分化誘導することに成功し た。この研究により、従来不可能であった試験管内での大脳神経細胞の大量産生が可能なり、大 脳の変性疾患（ハンチントン病やアルツハイマー病など）の発症機序の解明や大脳疾患の治療法 開発に大きく貢献することが期待される。SFEB 法により ES 細胞からの前脳の分化誘導は確認 されたが、小脳、橋などへの分化効率は低かった。小脳、橋などを含む変性疾患に関連する後脳 吻側部に着目し、細胞外シグナルによる分化誘導系の樹立を目指し、そのために同部に発現する 新規遺伝子 RH-1 をマーカーに、誘導因子のスクリーニング系を構築した。具体的には RH-1 の 遺伝子に LacZ をノックインしたマウス作成し、小脳・橋領域に胎生9日という早期から発現す ることを確認した。さらにノックインしたマウス ES 細胞を用いて、試験管内分化系を確立し、 誘導因子のパイロットスクリーニングを行った。 また、ヒト ES 細胞からドーパミン神経細胞を効率よく分化させる誘導因子として、ヒト羊 膜マトリクスが有効であることを発見した。これによりヒト由来の培養材料によって、ヒト ES 細胞からのパーキンソン病治療のための移植細胞を調整することが可能となり、再生医学的な応 用に貢献する成果となった。			

第5領域 (計画班員)

研究代表者名 笹井 芳樹

発表論文

英文

(1) 原著論文

Onai, T., Matsuo-Takasaki, M. & Sasai, Y. XTsh3 is an essential enhancing factor of canonical Wnt signaling in *Xenopus* axial determination. *EMBO J* .in press.

Arakawa, A., Matsuo-Takasaki, M., Takai, A., Inomata, H., Matsumura, M., Ikeya, M., Takahashi, K., Miyachi, Y., Sasai, N. & Sasai, Y. The secreted EGF-Discoidin factor xDel1 is essential for dorsal development of the *Xenopus* embryo. *Developmental Biology* in press.

Ikeya, M., Kawada, M., Kiyonari, H., Sasai, N., Nakao, K., Furuta, Y. & Sasai, Y. Essential Pro-BMP Roles of Crossveinless 2 in Mouse Organogenesis. *Development* **133**, 4463-4473 (2006).

Ueno, M., Matsumura, M., Watanabe, K., Nakamura, T., Osakada, F., Takahashi, M., Kawasaki, H., Kinoshita, S. & Sasai, Y. Neural Conversion of Embryonic Stem Cells by an Inductive Activity on Human Amniotic Membrane Matrix. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **103**, 9554-9559 (2006).

Brederlau, A., Correia, A.S., Anisimov, S.V., Elmi, M., Paul, G., Roybon, L., Morizane, A., Bergquist, F., Riebe, I., Nannmark, U., Carta, M., Hanse, E., Takahashi, J., Sasai, Y., Funa, K., Brundin, P., Eriksson, P.S. & Li, J.Y. Transplantation of human embryonic stem cell-derived cells to a rat model of Parkinson's disease: effect of in vitro differentiation on graft survival and teratoma formation. *Stem Cells* **24**, 1433-1430 (2006).

Morizane, A., Takahashi, J., Shinoyama, M., Ideguchi, M., Takagi, Y., Fukuda, H., Koyanagi, M., Sasai, Y. & Hashimoto, N. Generation of graftable dopaminergic neuron progenitors from mouse ES cells by a combination of coculture and neurosphere methods. *J Neurosci Res*. **83**, 1015-1027. (2006).

Yamazoe, H., Kobori, M., Murakami, Y., Yano, K., Satoh, M., Mizuseki, K., Sasai, Y. & Iwata, H. One-Step Induction of Neurons From Mouse Embryonic Stem Cells in Serum-Free Media Containing Vitamin B12 and Heparin. *Cell Transplantation* **15**, 135-145 (2006).

(2) 総説

Sasai, Y. A Matter of Some Importins: Nuclear Transport Factors in ES Cell Maintenance and

Differentiation. *Dev Cell* **12**, 172-174 (2007).

(3) 著書

和文

(1) 原著論文

(2) 総説

(3) 著書

第5領域 (計画班員)			
研究課題名	Seed 仮説に基づくアルツハイマー病の病態解明ならびに治療薬開発		
研究代表者名	柳澤 勝彦	E-mail	katuhiko@nils.go.jp
所属・職名	国立長寿医療センター研究所・副所長		
研究分担者名			
分担者所属			
研究成果報告書 背景：Abeta 重合機構の解明はアルツハイマー病（AD）研究の主要課題の一つである。本研究代表者は、脳内において Abeta は GM1 ガングリオシド（GM1）と結合し内因性 seed となることを見出し、脳内の Abeta 重合に神経細胞膜脂質が重要な役割を果たすことを提唱した。 目的：本研究は、GM1 ガングリオシド結合型 Abeta（GAbeta）に焦点をあて、その形成機構の解明を通して AD 発症病態の本質に迫ると同時に、GAbeta を標的とした新規治療法を開発することを目的とする。 方法：(1) 各種ガングリオシドを含有させたリポソーム に可溶性 Abeta（野生型ならびに遺伝的変異型）を反応させ、その結果誘導される Abeta 重合を生化学的ならびに形態学的に評価した。(2) 培養神経細胞に可溶性 Abeta を作用させ、神経細胞表面上で進む GM1 依存性 Abeta 重合の詳細を免疫細胞化学的ならびに細胞生物学的に解析した。(3) GM1 依存性に形成される可溶性 Abeta 重合体の特性を形態学的ならびに細胞生物学的に解析した。(4) 抗 GAbeta 抗体を陽性対照として抗 seed 作用を有する小分子化合物のスクリーニングを開始した。 結果：(1)これまで未解析であった Iowa 型 Abeta は、他のアミロイドアンギオパチー誘導の変異型 Abeta 同様、血管平滑筋が発現する GM3 の存在下で顕著なアミロイド線維形成を示すことを確認した。(2)培養系において Abeta は軸索末端において GM1 依存性に、GAbeta 形成を介して重合することが確認された。また、クロロキン投与によるエンドサイトーシス障害は軸索末端における Abeta 重合を促進することが確認された。(3)GM1 依存性に形成される可溶性 Abeta 重合体には強い神経細胞毒性があり（toxic soluble Abeta assembly; TAbeta と命名）、アミロイド形成とは別経路で形成され、NGF 受容体を介して神経細胞死を誘導することが確認された。 考察：脳領域特異的な遺伝的変異型 Abeta の重合・蓄積に局所のガングリオシド（GM1, GM3, GD3）が深く関わる可能性について、Iowa 型 Abeta の研究結果はさらなる支持を与えた。一方、弧発性 AD において、GM1 が脳実質の Abeta 重合・蓄積をどのように促進するかは不明であったが、本年度の研究により、軸索末端（前シナプス膜）に発現される GM1 が特異なドメインを形成し Abeta 重合を誘導している可能性が示唆された。また、弧発性 AD 脳神経細胞で報告されているエンドサイトーシス障害は同部位における GM1 集積を促進する可能性が示唆された。Abeta 重合を誘導する軸索末端 GM1 ドメインの実体を詳細に解析する必要があると考えられる。さらに、AD 脳に認められる老人斑非依存性神経細胞死は NGF 受容体を有する神経細胞に好発することから、TAbeta の病的意義を追求し、AD 脳で検出された場合には、GAbeta に加え TAbeta をも標的とした小分子化合物のスクリーニングを実施する必要があると考えられる。			

第5領域 (計画班員)

研究代表者名 柳澤 勝彦

発表論文

英文

(1) 原著論文

Yamamoto, N., Van Nostrand, W.E. & Yanagisawa, K. Further evidence of local ganglioside-dependent Abeta assembly in brain. *Neuroreport* **17**, 1735-1737 (2006).

Yuyama, K., Yamamoto, N. & Yanagisawa, K. Chloroquine-induced endocytic pathway abnormalities: cellular model of GM1-ganglioside-induced Abeta fibrillogenesis in Alzheimer's disease. *FEBS Lett.* **580**, 6972-6976 (2006).

Yamamoto, N., Matsubara, E., Maeda, S., Minagawa, H., Takashima, A., Maruyama, W., Michikawa, M. & Yanagisawa, K. A ganglioside-induced toxic soluble Abeta assembly: Its enhanced formation from Abeta bearing the Arctic mutation. *J. Biol. Chem.* **282**, 2646-2656 (2007).

Yamamoto, N., Fukata, Y., Fukata, M. & Yanagisawa, K. GM1-ganglioside-induced Abeta assembly on synaptic membranes of cultured neurons. *Biochim. Biophys. Acta* in press.

(2) 総説

Yanagisawa, K. Role of gangliosides in Alzheimer's disease. *Biochim. Biophys. Acta* in press.

(3) 著書

Yanagisawa, K. Ganglioside and Alzheimer's disease. In: *Sphingolipid Biology*. (edited by Hirabayashi Y, Igarashi Y and Merrill AH; published by Springer, Tokyo, Japan) 309-317(2006).

Yanagisawa, K. Pivotal roles of cholesterol and gangliosides in aggregation of amyloid beta-protein. In: *Research Progress in Alzheimer's Disease* (edited by Miao-Kun Sun; published by Nova Science Publishers, Inc.) in press

Yuki, N. & Yanagisawa, K. Glycoconjugates and neurological diseases. In: *Comprehensive Glycoscience* (edited by Johannis P. Kamerling; published by Elsevier, Oxford, UK). in press

和文

(1) 原著論文

（２）総説

柳澤勝彦：認知症発症危険因子としての高脂血症 アポリポ蛋白 E 遺伝子型などの意義. *Medical Briefs in Brain & Nerve* **15**, 7-8, (2006).

柳澤勝彦：アミロイド beta 蛋白質とアミロイド形成. *最新医学* **61**, 2386-2391(2006).

柳澤勝彦：アルツハイマー病とアミロイド蓄積. *Brain Rescue* **15**, 10-14, (2007).

柳澤勝彦：アルツハイマー病の発症と糖鎖. *実験医学* in press.

（３）著書

第5領域（計画班員）			
研究課題名	アルツハイマー病の免疫機序の解析と新しい治療法の開発		
研究代表者名	田平 武	E-mail	tabira@nils.go.jp
所属・職名	国立長寿医療センター研究所・所長		
研究分担者名	原英夫、高橋慶吉		
分担者所属	国立長寿医療センター血管性認知症研究部		

研究成果報告書 アルツハイマー病のワクチン療法の可能性が示され大きな期待が寄せられているが、副作用として起こった髄膜脳炎をいかに抑えるかがポイントとなっている。本研究者らはアルツハイマー病の経口ワクチンを開発し、アルツハイマー病のモデルマウス（tg2576）及び老齢サルで有効性、安全性を示した。また、tg2576 マウスはワクチン接種により学習機能の改善がみられ、ヒトでの小規模臨床試験を計画している。しかし、高齢者では免疫機能が低下しており、反応が十分でない可能性がある。また、経口ワクチンはより安全であると考えられるが、副作用が全く無いとは断定できない。そこで、より安全かつ効率のよい治療法を開発することを本研究の目的とする。

本研究目的を達成するために次のアプローチを考えた。第一のアプローチは免疫機能が低下している高齢者にも適用可能な受動免疫による方法である。エラン社の Schenk らはすでに Aβ の N 末端ペプチド抗体（ヒト型）を作成し、臨床治験に入っている。しかし、AN-1792 ワクチンで有効性が示された抗体は組織染色で老人斑を染色する抗体（tissue amyloid plaque immuno-ractive=TAPIR 抗体）であった。したがって、真に有効な抗体のエピトープはまだよく分かっていない。また、血管炎や出血がおこる可能性が指摘されている。本研究ではファージ抗体ライブラリーからより効果の高く安全な抗体を分離することを考えた。しかし、Aβ に反応するいくつかの陽性クローンを得たが、目的とする老人斑反応性クローンは得られなかった。そこで、従来法に切り替え、マウスを Aβ で免疫し B 細胞と骨髄腫細胞を融合し、上清を ELISA でスクリーニングした。その結果、8 個のクローンがとれ、7 個は IgM であり、1 個のみ IgG2b であった。現在その IgG2b 抗体のヒト型化を行っている。 第二のアプローチは抗体以外のオプソニンを開発し β アミロイドの貪食を促進させるものである。これには 2 つの方法を考えた。一つは Aβ と結合することが知られている内在性物質の結合部位をもとに遺伝子構築し、抗体の Fc 部分に結合させた人工オプソニンを作成することを試みた。しかし、このキメラ遺伝子を構築し細胞に発現させて蛋白質を回収したが、きわめて難溶性の蛋白質であることがわかり、オプソニン効果をみるにいたっていない。他の方法は、in vitro の系を用いてミクログリアによる β アミロイドの貪食を促進する小分子物質をスクリーニングし、その中からシード物質を得ようとするものである。 その結果、Aβ の N 末抗体や LPS はミクログリアを活性化し Aβ の貪食を促進した。その貪食は Fc 受容体抗体でブロックされた。しかし、Aβ の貪食により TNF-α 等のサイトカインの産生が強くおこり、ミクログリアの細胞死が誘導された。抗体の量や化合物にもよると思われるが、このような方法には限界があるかもしれない。最近、老人斑に集積する細胞はマクロファージなどの骨髄由来細胞であることが示されている。そこで、末梢のマクロファージなど免疫系の細胞を活性化する作用が知られている漢方薬十全大補湯の効果を in vivo でしらべた。十全大補湯を tg2576 マウスに毎日経口投与したところ、脳の老人斑が有意に減少することを見出した。

結論 ワクチン療法に代わる安全な代替法の開発はまだ成功していない。十全大補湯はワクチン療法の補助薬になり得る。

第5領域 (計画班員)

研究代表者名 田平 武

発表論文

英文

(1) 原著論文

Mouri, A., Noda, Y., Hara, H., Mizoguchi, H., Tabira, T. & Nabeshima, T. Oral vaccination with a viral vector containing A{beta} cDNA attenuates age-related A{beta} accumulation and memory deficits without causing inflammation in a mouse Alzheimer model. *FASEB J.* in press.

Kudo, T., Okumura, M., Imaizumi, K., Araki, W., Morihara, T., Tanimukai, H., Kamagata, E., Tabuchi, N., Kimura, R., Kanayama, D., Fukumori, A., Tagami, S., Okochi, M., Kubo, M., Tanii, H., Tohyama, M., Tabira, T. & Takeda, M. Altered localization of amyloid precursor protein under endoplasmic reticulum stress. *Biochem Biophys Res Commun.* **344**(2),525-30(2006).

(2) 総説

Ohya, Y. & Tabira, T. Intracellular Amyloid β -Protein and its associated molecules in the pathogenesis of Alzheimer's disease. *Mini-Reviews in Medicinal Chemistry* **6**, 1075-1080 (2006).

(3) 著書

和文

(1) 原著論文

(2) 総説

原英夫、田平武：アミロイドワクチンによる治療展開. *Medical Practice* **23**, 1188-1194 (2006).

田平武：私たちはなぜ物を覚えられるのか？ 基礎編 記憶のメカニズム. *ソウェルクラブ* **64**, 4-7 (2006).

田平武：同心円硬化症 (Baló). *医学書院 神経研究の進歩* **50**, 563-570 (2006).

田平武：認知症に対する取り組み—予防・治療の展望 *日本医師会雑誌* **135**, 1291-1295 (2006).

田平武：アルツハイマー病治療薬の開発状況. *日本評論社 からだの科学 認知症のすべて* **251**, 98-10 (2006).

田平武：特集 アルツハイマー病研究の最前線 治療戦略-免疫療法を中心として. *最新医学* **61**, 2428-2433 (2006).

田平武：もの忘れ. アンチ・エイジング医学—メジカルレビュー社 *日本抗加齢医学会雑誌* **3**, 70-76 (2007).

田平武：アルツハイマー病のワクチン療法. *中外医学社 Clinical Neuroscience* **25**, 185-187 (2007).

田平武：アルツハイマー病研究の進歩. *日本内科学会雑誌* **96**, 521-528 (2007).

(3) 著書

田平武：老人性認知症. 泉孝英編集主幹. *ガイドライン外来診療 2006 日経メディカル開発* 310-314 (2006).

田平武：ワクチン療法. 監修 齋藤 洋、阿部和穂. *認知症治療薬開発の最前線 シーエムシー出版* 263-269 (2006).

田平武：老化に伴う脳神経疾患 監修 吉川敏一. *アンチエイジング医学 診断と治療社* 80-83 (2006).

田平武：脳神経系の老化 監修 吉川敏一. *アンチエイジング医学 診断と治療社* 213-216 (2006).

第5領域 (計画班員)			
研究課題名	神経変性シグナルの遺伝学的解析による疾患治療ターゲットの解明		
研究代表者名	三浦 正幸	E-mail	miura@mol.f.u-tokyo.ac.jp
所属・職名	東京大学大学院薬学系研究科遺伝学教室・教授		
研究分担者名			
分担者所属			
研究成果報告書 多くの神経変性疾患において、神経細胞における異常タンパク質の凝集・蓄積とそれに伴う神経細胞死が共通する病態として知られており、これら異常タンパク質の主要な分解経路としてユビキチンプロテアソームシステム(UPS)がある。さらに、神経変性疾患の大きな特徴の一つとして加齢に伴って発症リスクが上昇することが挙げられるが、神経変性疾患が晩発性に発症する理由は未だ明らかではない。 我々は、寿命が約 60 日と短く遺伝学的な研究に適したショウジョウバエを用いて、生体内でのプロテアソーム活性と神経変性の発症との関与に着目した。ショウジョウバエ頭部におけるプロテアソーム活性を測定したところ、加齢に伴うプロテアソーム活性の減少と、ユビキチン化タンパク質の蓄積が観察されたことから、加齢によるプロテアソーム活性の低下が神経変性疾患の晩発性発症における危険因子の一つであると考えた。一方、Gal4 転写因子依存的に遺伝子を過剰発現することで、細胞死実行経路に関わる遺伝子を同定するスクリーニング (Gene Search) を行って得られた系統の一つでは、Gal4 依存的にプロテアソーム活性の上昇が認められ、伸長ポリグルタミン発現による複眼の変性が抑制された。このように、神経変性とプロテアソーム活性の変動とは密接な関係があることが示唆された。そこで、加齢に伴うプロテアソーム活性の変化を制御する因子を明らかにするために、ショウジョウバエを用いた機能欠失型の遺伝学的スクリーニングを行った。現在までに数系統のプロテアソーム活性の加齢に伴う低下がおきない系統を得ており、このうち 2 系統がポリグルタミンによる進行性の神経変性様表現型を抑制した。これは、加齢に伴う生体内のプロテアソーム活性の低下が遺伝子レベルで制御されていること、また老化に伴うプロテアソーム活性の変化が神経変性疾患の発症を制御する可能性を示唆するものである。 カスパーゼは細胞死のメディエーターとして機能するシステインプロテアーゼであり、神経細胞死に深く関わっている。我々は、ショウジョウバエ神経系 (複眼) を用いた遺伝学的な手法によりにカスパーゼ依存的な細胞死シグナルに関わる遺伝子の探索を行っている。具体的にはショウジョウバエ細胞死誘導遺伝子 <i>reaper</i> を複眼で特異的発現させることによって複眼縮小を示す系統と、染色体欠損あるいは点突然変異を持つ系統とを交配させ、その F1 で複眼サイズが回復する系統を得る。今年度はこのスクリーニングによって新たに得られたキナーゼ (DmIKK ϵ) が細胞死を誘導しないレベルのカスパーゼ活性を調節することを見いだした。低レベルのカスパーゼ活性の調節と、その神経変性における役割に興味をもたれる。			

第5領域 (計画班員)

研究代表者名 三浦 正幸

発表論文

英文

(1) 原著論文

Ohsawa, S. & Miura, M. Caspase-mediated changes in Sir2alpha during apoptosis. *FEBS Lett.* **580**, 5875-79 (2006).

Kondo, S., Senoo-Matsuda, N., Hiromi, Y. & Miura, M. Dronc coordinates cell death and compensatory proliferation. *Mol. Cell. Biol.* **26**, 7258-68 (2006).

Kuranaga, E., Kanuka, H., Tonoki, A., Takemoto, K., Tomioka, T., Kobayashi, M., Hayashi, S. & Miura, M. *Drosophila* IKK-related kinase regulates nonapoptotic function of caspases via degradation of IAPs. *Cell* **126**, 583-596 (2006).

Oshima, K., Takeda, M., Kuranaga, E., Ueda, R., Aigaki, T., Miura, M. & Hayashi, S. IKKepsilon regulates F actin assembly and interacts with *Drosophila* IAP1 in cellular morphogenesis. *Current Biol.* **16**, 1531-37, (2006).

(2) 総説

Kuranaga, E. & Miura, M. Nonapoptotic functions of caspases: caspases as regulatory molecules for immunity and cell-fate determination. *Trends Cell Biol.* in press.

(3) 著書

和文

(1) 原著論文

(2) 総説

三浦正幸：細胞死の新たな生体機能と調節機構. *バイオニクス* **28**, 28-31 (2007).

倉永英里奈、三浦正幸：細胞を殺さないカスパーゼの新機能. *バイオニクス* **28**, 44-48 (2007).

三浦正幸：モデル生物系を用いた創薬研究. *バイオテクノロジージャーナル* **6**, 655-58 (2006).

三浦正幸. ショウジョウバエモデルを用いた神経変性疾患研究. *実験医学* **24**, 1584-89 (2006).

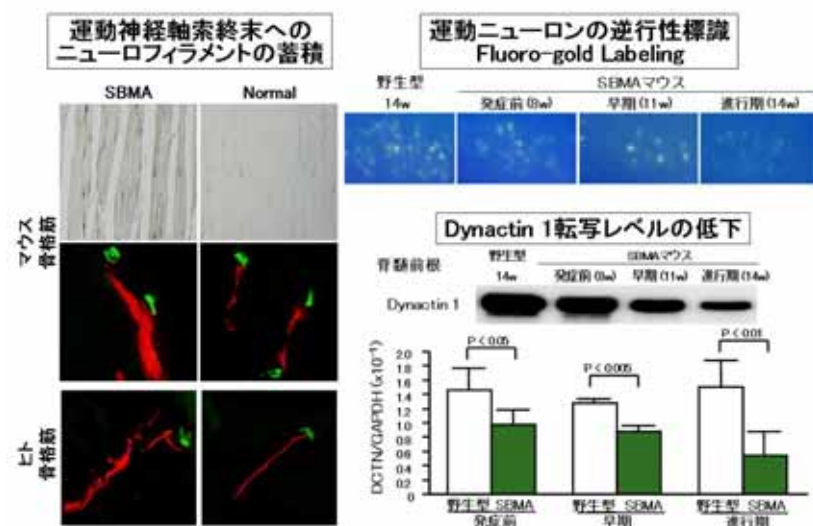
(3) 著書

第5領域（計画班員）			
研究課題名	ポリグルタミン病の病態解明とそれに基づく治療法の開発		
研究代表者名	祖父江 元	E-mail	sobueg@med.nagoya-u.ac.jp
所属・職名	名古屋大学大学院医学系研究科神経内科・教授		
研究分担者名	田中章景、服部直樹		
分担者所属	名古屋大学大学院医学系研究科神経内科		

研究成果報告書

球脊髄性筋萎縮症（SBMA）は成人男性に発症する下位運動ニューロン疾患であり、アンドロゲン受容体遺伝子の CAG 繰り返し配列の異常延長を原因とするポリグルタミン病である。我々はこれまでに、本疾患の病態が男性ホルモン依存性であり、LHRH アナログや選択的 Hsp90 阻害剤などの投与により神経変性が抑止できることを明らかにしてきた。

本年度は SBMA の初期病態における神経細胞機能障害の分子メカニズムおよびその可逆性について検討した。まず、SBMA モデルマウスの骨格筋の免疫組織化学を解析したところ、ニューロフィラメントが終板近傍の運動ニューロン遠位軸索に蓄積していた。この蓄積はマウスの神経症状発症に先行して認められ、症状の進行とともに増強した。同様の集積は患者肋間筋でも観察された。また、シナプス小胞関連蛋白質のうちシナプトフィジンはニューロフィラメントと同様の蓄積を示したが、Rab-3A の蓄積は認められなかった。ニューロフィラメントやシナプトフィジンは軸索内を順行性および逆行性に輸送されるが、Rab-3A は順行性のみ輸送されることに着目し、坐骨神経結紮法によりシナプス小胞関連蛋白質の軸索輸送を調べたところ、野生型マウスに比べて SBMA マウスでは逆行性に輸送されるシナプトフィジンの量が有意に減少していることが明らかとなった。この減少はマウスの神経症状発症前から認められ、進行とともに顕著となった。さらに、フルオロゴールドの腓腹筋内ないし坐骨神経断端投与により脊髄前角の運動ニューロンをラベルしたところ、野生型マウスに比べて SBMA マウスでは発症前からラベルされるニューロン数が減少していることが明らかとなった。次に、軸索輸送を担うモーター蛋白質の発現量を定量したところ、SBMA マウスの脊髄運動ニューロンおよび前根では dynactin 1 蛋白質の発現量が発症前から有意に減少しており、その mRNA レベルも発症前から減少していた。Dynactin 1 は dynein などと複合体を形成し、順行性および逆行性軸索輸送を制御する蛋白質であり、その遺伝子変異により遺伝性運動ニューロン疾患が生じることが報告されている。以上から、ポリグルタミン鎖の延長した変異アンドロゲン受容体の核内集積による dynactin 1 の転写障害が逆行性軸索輸送障害の原因であると考えられた。一方、神経症状発症後早期の SBMA マウスに去勢術を行ったところ、dynactin 1 の発現量およびフルオロゴールドによりラベルされるニューロンの数が増加し、症状は可逆的に改善した。



第5領域 (計画班員)

研究代表者名 祖父江 元

発表論文

英文

(1) 原著論文

Katsuno, M., Adachi, H., Minamiyama, M., Waza, M., Tokui, K., Banno, H., Suzuki, K., Onoda, Y., Tanaka, F., Doyu, M. & Sobue, G. Reversible disruption of dynactin 1-mediated retrograde axonal transport in polyglutamine-induced motor neuron degeneration. *J. Neurosci.* **26**, 12106-17 (2006).

Atsuta, N., Watanabe, H., Ito, M., Banno, H., Suzuki, K., Katsuno, M., Tanaka, F., Tamakoshi, A. & Sobue, G. Natural history of spinal and bulbar muscular atrophy (SBMA): a study of 223 Japanese patients. *Brain* **129**, 1446-1455 (2006).

Sugiura, M., Koike, H., Iijima, M., Mori, K., Hattori, N., Katsuno, M., Tanaka, F. & Sobue, G. Clinicopathologic features of nonsystemic vasculitic neuropathy and microscopic polyangiitis-associated neuropathy: a comparative study. *J. Neurol. Sci.* **241**, 31-37 (2006).

Ishigaki, S., Niwa, J., Yamada, S., Takahashi, M., Ito, T., Sone, J., Doyu, M., Urano, F. & Sobue, G. Dorfin-CHIP chimeric proteins potently ubiquitylate and degrade familial ALS-related mutant SOD1 proteins and reduce their cellular toxicity. *Neurobiol Dis.* **25**, 331-41 (2007).

Yamada, S., Niwa, J., Ishigaki, S., Takahashi, M., Ito, T., Sone, J., Doyu, M. & Sobue, G. Archaeal proteasomes effectively degrade aggregation-prone proteins and reduce cellular toxicities in mammalian cells. *J. Biol Chem.* **281**, 23842-23851 (2006).

Banno, H., Adachi, H., Katsuno, M., Suzuki, K., Atsuta, N., Watanabe, H., Tanaka, F., Doyu, M. & Sobue, G. Mutant androgen receptor accumulation in spinal and bulbar muscular atrophy scrotal skin: A pathogenic marker. *Ann. Neurol.* **59**, 520-526 (2006).

(2) 総説

Adachi, H., Waza, M., Katsuno, M., Tanaka, F., Doyu, M. & Sobue, G. Pathogenesis and molecular targeted therapy of spinal and bulbar muscular atrophy. *Neuropathol. Appl. Neurobiol.* **33**, 135-151 (2007).

Tanaka, F., Niwa, J., Ishigaki, S., Katsuno, M., Waza, M., Yamamoto, M., Doyu, M. & Sobue, G. Gene expression profiling toward understanding of ALS pathogenesis. *Ann. N. Y. Acad Sci.* **1086**, 1-10 (2006).

Waza, M., Adachi, H., Katsuno, M., Minamiyama, M., Tanaka, F. & Sobue, G. Alleviating neurodegeneration by an anticancer agent: an Hsp90 inhibitor (17-AAG). *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **1086**, 21-34 (2006).

Waza, M., Adachi, H., Katsuno, M., Minamiyama, M., Tanaka, F., Doyu, M. & Sobue, G. Modulation of Hsp90 function in neurodegenerative disorders: a molecular-targeted therapy against disease-causing protein. *J. Mol. Med.* **84**, 635-646 (2006).

Katsuno, M., Adachi, H., Waza, M., Banno, H., Suzuki, K., Tanaka, F., Doyu, M. & Sobue, G. Pathogenesis, animal models and therapeutics in Spinal and bulbar muscular atrophy (SBMA). *Exp Neurol.* **200**, 8-18 (2006).

(3) 著書

和文

(1) 原著論文

(2) 総説

和座雅浩、足立弘明、勝野雅央、南山誠、祖父江元. 球脊髄性筋萎縮症に対する分子標的治療薬の開発 既存低分子化合物の臨床応用. *医学のあゆみ* **219**, 263-268(2006).

勝野雅央、坂野晴彦、鈴木啓介、小野田優、祖父江元. 神経変性疾患の臨床試験デザイン. *神経治療* **23**, 615-619(2006).

坂野晴彦、勝野雅央、小野田優、鈴木啓介、徳井啓介、和座雅浩、南山誠、足立弘明、田中章景、道勇学、祖父江元. 神経変性疾患の治療開発—球脊髄性筋萎縮症（SBMA）を中心に—. *現代医学* **54**, 15-23(2006).

足立弘明、和座雅浩、勝野雅央、祖父江元. 臨床医のための神経病理 球脊髄性筋萎縮症. *Clinical Neuroscience* **24**, 974-975(2006).

(3) 著書

第5領域（計画班員）			
研究課題名	統合失調症の分子病態の解明		
研究代表者名	西川 徹	E-mail	tnis.psyc@tmd.ac.jp
所属・職名	東京医科歯科大学大学院医歯学総合研究科・教授		
研究分担者名	1. 山本直樹, 2. 柏 淳, 3. 石井澄和		
分担者所属	1. 東京医科歯科大学医学部附属病院・講師 2. // 医学部附属病院・講師 3. // 大学院医歯学総合研究科・教務職員		

研究成果報告書

統合失調症は、気分障害、不安障害をはじめとする他の精神疾患と同様に、脳に変性、炎症等の明らかな神経病理学的所見を伴わず、患者が集積する家系においてもメンデル遺伝のパターンが見出されないため、分子遺伝学的な病因の解析が難航している。以上の事実は、本症がこれまで知られていない作動原理をもつ分子機構の異常による脳機能障害である可能性を示唆している。そこで本研究では、統合失調症の分子病態に対するアプローチに新たな視点を獲得する目的で、本症の発症の発達神経科学的特徴に着目している。すなわち、統合失調症およびそのモデルと考えられる、NMDA 型グルタミン酸受容体遮断薬、ドーパミン作動薬などの統合失調症様異常発現薬による精神症状や動物の行動異常が、一定の発達期（臨界期）以降に出現することにもとづき、統合失調症で特異的異常を来す情報処理機構を構成する分子の候補として、上記薬物への応答や基礎的発現が、臨界期と密接に関連した発達変化を示す分子を探索している。また、D-セリンが、1)NMDA 受容体のコアゴニストであり、2)統合失調症や統合失調症様異常発現薬による動物の行動変化を改善する作用（抗精神病作用）をもつ、3)哺乳類では例外的な内在性 D アミノ酸であって脳選択的で NMDA 受容体 R2B サブユニットと酷似した分布を示す、4)上述の臨界期以降に成熟動物型の脳内濃度と分布パターンが見られるようになる、などの点から、統合失調症における内在性 D-セリンの代謝・機能に関与する分子機構の障害を検討している。

本年度は、主に 1)ラット大脳新皮質において間接的ドーパミン作動薬の methamphetamine により発達依存的に発現が誘導される mrt1 (methamphetamine(MAP)-responsive transcript 1)、2)ラットまたはマウス大脳新皮質あるいは視床で、NMDA 受容体遮断薬の phencyclidine が成熟期には発現を増加させるのに対して新生仔期には変化させない遺伝子、prt1 (phencyclidine(PCP)-responsive transcript 1)、prt5 および prt6、3) 昨年度までにクローニングした D-セリン関連遺伝子の dsm-1 (D-serine modulator-1) 遺伝子について、統合失調症との関連を検討し、次のような結果を得た。

(1) 統合失調症の発症や再発のモデルといわれる、ドーパミン作動薬に対する感受性亢進現象に mrt1 遺伝子が関係する可能性を検討するため、mrt1 遺伝子の mrt1b mRNA を前脳部選択的に過剰発現するマウスを作製し、統合失調症様異常発現薬 MAP の移所運動量増加作用に対する影響を調べた。

(2)成熟ラットの大脳新皮質における prt1 の発現は、過剰なドーパミン伝達を引き起こす MAP やコカインの投与では変化せず、PCP 投与による増加が D2 ドーパミン受容体遮断薬では抑制されなかったことより、統合失調症の陰性症状に密接に関係すると推測された。また、ヒト prt1 遺伝子の複数の SNPs の対立遺伝子頻度および遺伝子型頻度や、ハプロタイプ解析における複数の組み合わせの出現頻度が、統合失調症患者群と健常対照群の間で差異が認められた。

(3) prt5 は脳において視床の一部に選択的に発現することが in situ ハイブリダイゼーションにより明らかになった。生後 8、13、20、26、32、50 日の各発達段階で PCP 投与の影響を比較したところ、生後 26 日までは有意な変化が生じず、臨界期以降の生後 32 および 50 日に著明な発現増加が見られた。また、成熟期では、他の精神異常惹起性の NMDA 受容体遮断薬 dizocilpine の投与によっても発現が上昇することがわかった。

(4) 視床において、PCP によって発達依存的に発現が誘導される prt6 mRNA は蛋白質をコードせず、少なくとも 2 種の miRNA の前駆体であることが示唆され、他の複数の遺伝子を制御する可能性がある。

(5) dsm-1 がコードする蛋白は、in vitro で D-セリンの細胞内レベルや蓄積を減少させ、細胞外への D-セリン放出を促進することを、昨年度までの研究で明らかにしてきたが、精神疾患では D-セリン-NMDA 受容体シグナルの異常が推測されている。そこで、精神疾患を対象として、ヒト dsm-1 遺伝子の患者—対照研究を行い、SNPs の対立遺伝子頻度および遺伝子型頻度や、ハプロタイプの出現頻度が、統合失調症患者群または双極性障害患者群と健常対照群の間で有意に異なることを見出した。

第5領域 (計画班員)

研究代表者名 西川 徹

発表論文

英文

(1) 原著論文

Kaneko, Y., Kashiwa, A., Ito, T., Ishii, S., Umino, A. & Nishikawa, T. Selective serotonin reuptake inhibitors, fluoxetine and paroxetine, attenuate the expression of the established behavioral sensitization induced by methamphetamine. *Neuropsychopharmacol.* **32**, 658-664 (2007).

Takeuchi, T., Furuta, K., Hirasawa, T., Masaki, H., Yukizane, T., Atsuta, H. & Nishikawa, T. Perospirone in the treatment of patients with delirium. *Psychiatry Clin. Neurosci.* **61**, 67-70 (2007).

Tanaka, Y., Obata, T., Sassa, T., Yoshitome, E., Ikehira, H., Suhara, T., Okubo, Y. & Nishikawa, T. Quantitative magnetic resonance spectroscopy of schizophrenia: relationship between decreased N-acetylaspartate and frontal lobe dysfunction. *Psychiatry Clin. Neurosci.* **60**, 365-372 (2006).

Kuroda, Y., Motohashi, N., Ito, H., Ito, S., Takano, A. & Nishikawa, T. & Suhara, T. Effects of repetitive transcranial magnetic stimulation on [¹¹C] raclopride binding and cognitive function in patients with depression. *J. Affect. Disord.* **95**, 35-42 (2006).

Kanematsu, S., Ishii, S., Umino, A., Fujihira, T., Kashiwa, A., Yamamoto, N., Kurumaji, A. & Nishikawa, T. Evidence for involvement of glial cell activity in the control of extracellular D-serine contents in the rat brain. *J. Neural. Transm.* **113**, 1717-1721 (2006).

(2) 総説

Yui, K., Kajii, Y. & Nishikawa, T. Neurobiological and molecular bases of methamphetamine-induced behavioral sensitization and spontaneous recurrence of methamphetamine psychosis, and its implication in schizophrenia. *Current Psychiatry Reviews* **2**, 381-393 (2006).

(3) 著書

Nishikawa, T. A systematic approach to the brain d-serine system. in *A New Frontier in Amino Acid and Protein Research* (eds. Fujii, N., Homma, H., Bruecker, H., Fisher, G.H. & Konno, R.) Nova Science Publishers, New York, in press.

和文

（１）原著論文

光定博生、正木秀和、大島一成、車地暁生、西川徹：修正型電気けいれん療法（m-ECT）が著効した両心室ペースメーカーを植込まれたうつ病の１症例；特集 電気けいれん療法（ECT）の治療経験-症例を中心に．*臨床精神医学* **35**, 1207-1212 (2006).

横溝美緒、平沢俊行、山名祥子、伊藤将也、清川佑介、杉村舞、大島一成、西川徹、車地暁生：経過中にせん妄を呈した血管性うつ病の１症例．*精神科* **8**, 165-170 (2006).

（２）総説

西川徹：統合失調症の分子機構研究の最前線；疾患解明 Overview. *実験医学* **24**, 2663-2671 (2006).

西川徹：脳の発達障害としての統合失調症．*日本薬理学雑誌* **128**, 13-18 (2006).

日比野英彦、西川徹：アシル化アミノ酸の行動薬理学的評価—脂質による高次脳機能異常改善作用の機序を中心に—．*オレオサイエンス* **6**, 93-105 (2006).

山本直樹、西川徹：違法ドラッグと依存性薬物による精神障害の分子病態．*医学のあゆみ* **217**, 1147-1151 (2006).

熱田英範、西川徹：統合失調症の薬理学的発展；特集「統合失調症解明へのアプローチ」．*精神科* **8**, 257-263 (2006).

正木秀和、西川徹：統合失調症の治療薬開発研究；特集「新しい時代の統合失調症—研究から治療へ」．*臨床精神医学* **36**, 43-51 (2007).

（３）著書

濱村貴史、山本直樹、黒田安計、西川徹：抗精神病薬の作用機序．*統合失調症の薬物治療アルゴリズム* 精神科薬物療法研究会編 医学書院 東京、95-122 (2006).

谷口豪、西川徹：3. グルタミン酸-D-セリンシステムと統合失調症．V. 「グルタミン酸」と「てんかん、統合失調症」．*脳とこころの科学* 鶴紀子編 新興医学出版 東京、114-123 (2006).

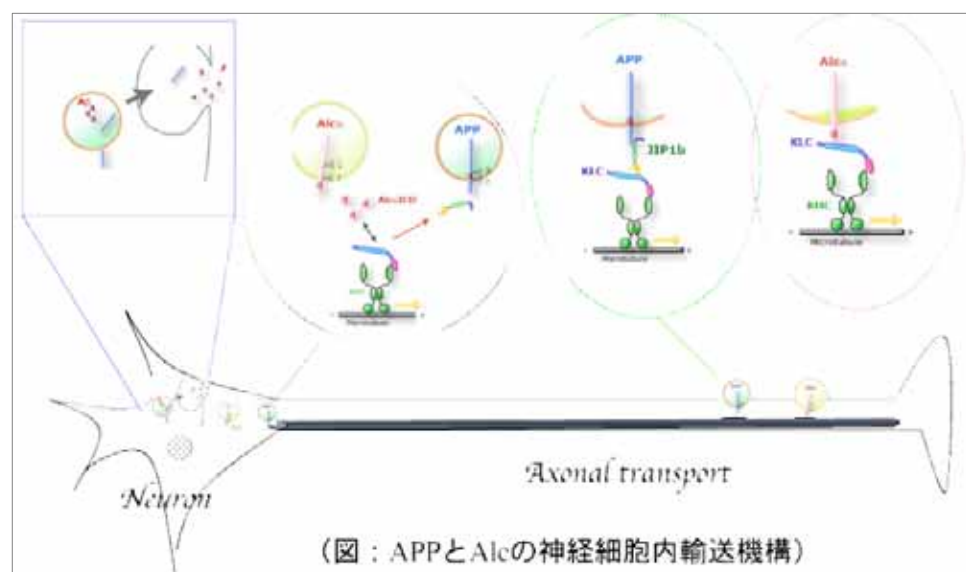
車地暁生、行実知昭、熱田英範、武田充弘、藤田宗久、山本真基子、渋谷治男、西川徹：身体表現性障害を経過中に BipolarII Disorder を呈し、炭酸リチウム投与によって寛解に至った１症例．*Bipolar Disorder 4* Bipolar Disorder 研究会編 アルタ出版 東京、25-30 (2006).

第5領域（公募班員）			
研究課題名	A β 生成制御機構の解明と AD 創薬および診断法への応用		
研究代表者名	鈴木 利治	E-mail	tsuzuki@pharm.hokudai.ac.jp
所属・職名	北海道大学大学院薬学研究院・教授		
研究分担者名			
分担者所属			

研究成果報告書

神経細胞では APP と Alcadin (Alc)は、細胞質 X11L を介した複合体を形成しており、複合体中の APP と Alc は代謝的に安定であり A β の生成は抑制されている。X11L 遺伝子破壊マウスの脳では A β の産生が増加しており、APP 代謝が昂進していた事実は、生体内における X11L の機能を示している。今回、APP と Alc は同じモーター分子キネシン-1 を利用するが独立して軸索輸送を受けることを見いだした。GFP-APP および GFP-Alc を発現した神経細胞における軸索輸送を全反射顕微鏡で観察し、両タンパク質の輸送を解析した。キネシン軽鎖(KLC)をノックダウンした細胞では両タンパク質とも順行輸送が阻害された。軸索輸送中の APP は JIP1b を介しキネシン-1 に接続し、Alc は直接キネシン-1 に高親和性結合を行う。すなわち、輸送中の APP と Alc は、X11L を介した複合体を形成していない。APP カージと Alc カージは、同じモーターを利用することから、一方のカージの過剰は他方のカージをキネシン-1 から解離させる。生体内で、どちらのカージが量的に優勢になることは考えにくい、APP の細胞質断片 AICD が不安定であるのに比較して Alc の細胞質断片 AlcICD は安定であり、神経細胞へ AlcICD を過剰発現させた場合は、APP カージはキネシン-1 から解離し、軸索基部および細胞体で APP カージの滞留を引き起こした。この状態の APP を発現する細胞では、A β の生成が増加した。神経末端まで輸送されることなく解離した APP カージはエンドソーム経路などセクリターゼの豊富な代謝経路に組み込まれ、A β の生成が増加する可能性が考えられた。従って、APP とモーター分子との結合制御機構の変調が A β の生成を促進し、神経変性を加速させ、神経機能の失調がさらなる

APP カ
ーゴ輸
送の停
滞とA β
生成増
を引き
起こす
図式が
考えら
れる。



(図：APPとAlcの神経細胞内輸送機構)

第5領域 (公募班員)

研究代表者名 鈴木 利治

発表論文

英文

(1) 原著論文

Araki, Y., Kawano, T., Taru, H., Saito, Y., Wada, S., Miyamoto, K., Kobayashi, H., Ishikawa, O. H., Ohsugi, Y., Yamamoto, T., Matsuno, K., Kinjyo, M. & Suzuki, T. The novel cargo receptor Alcadin induces vesicle association of kinesin -1 motor components and activates axonal transport. *EMBO. J.* in press.

Hoshino, T., Nakaya, T., Araki, W., Suzuki, K., Suzuki, T. & Mizushima, T. Endoplasmic reticulum chaperones inhibit the production of amyloid-beta peptides. *Biochem. J.* **402**, 581-589 (2007).

Okuda, J., Arikawa, Y., Takeuchi, Y., Mahmoud, M. M., Suzuki, E., Kataoka, K., Suzuki, T., Okinaka, Y. & Nakai, T. Intracellular replication of *Edwardsiella tarda* in murine macrophage is dependent on the type III secretion system and induces an up-regulation of anti-apoptotic NF- κ B target genes protecting the macrophage from staurosporine-induced apoptosis. *Microbial Pathogenesis* **41**, 226-240 (2006).

Sano, Y., Takabatake-Syuzo, A., Nakaya, T., Tomita, S., Itohara, S. & Suzuki, T. Enhanced amyloidogenic metabolism of APP in X11L-deficient mouse brain. *J. Biol. Chem.* **281**, 37853-37860 (2006).

Sano, Y., Nakaya, T., Pedrini, S., Takeda, S., Iijima-Ando, K., Iijima, K., Mathews, P. M., Itohara, S., Gandy, S. & Suzuki, T. Physiological mouse brain A β levels are not related to the phosphorylation state of threonine-668 of Alzheimer's APP. *PLoS One* **1**, e51 (2006).

Nakaya, T. & Suzuki, T. Role of APP phosphorylation in FE65-dependent gene transactivation mediated by AICD. *Genes Cells* **11**, 633-645 (2006).

(2) 総説

Suzuki, T., Araki, Y., Yamamoto, T. & Nakaya, T. Trafficking of Alzheimer's disease-related membrane proteins and its participation in disease pathogenesis (Minireview). *J. Biochem.* **139**, 949-955 (2006).

(3) 著書

和文

(1) 原著論文

(2) 総説

住岡暁夫、山本融、鈴木利治：神経アダプターたんぱく質による細胞内シグナル伝達と細胞応答機構. *生化学* **78**, (10)949-956(2006).

中矢正、鈴木利治：APP の機能と代謝. *医学のあゆみ* 特集「Alzheimer 病 ―基礎・臨床研究の最新動向―」(企画 岩坪威) **220** (5), 349-353(2007).

(3) 著書

第 5 領域 （公募班員）			
研究課題名	パーキンソン病 PARK7 の原因遺伝子 DJ-1 の機能解析		
研究代表者名	有賀 寛芳	E-mail	hiro@pharm.hokudai.ac.jp
所属・職名	北海道大学大学院薬学研究院・教授		
研究分担者名	有賀早苗		
分担者所属	北海道大学大学院農学研究院		
研究成果報告書			
背景と目的			
我々が新規癌遺伝子として単離・同定した DJ-1 は、家族性パーキンソン病 PARK7 の原因遺伝子である。DJ-1 はその機能から、家族性パーキンソン病のみならず、弧発性パーキンソン病発症に関与している可能性が高いが、その詳細は不明である。そこで、DJ-1 の機能解明を行うことでパーキンソン病の発症機構を解明し、同時に、パーキンソン病治療薬への展開を志向する。			
方法			
1) DJ-1 の機能解析 DJ-1 結合タンパク質単離を目的として、SH-SY5Y 細胞抽出液を抗 DJ-1 抗体で免疫沈降させ、共沈殿したタンパク質を TOF-MS 解析で同定した。得られたタンパク質との相互関係を分子生物学、生化学的方法で解析した。 2) DJ-1 と DJ-1 結合化合物によるパーキンソン病治療薬への応用 6-ヒドロキシドパミン(6-OHDA)を中脳黒質に注入したパーキンソン病モデルラットに、DJ-1 タンパク質そのものを同時、あるいは後に注入し、ドパミン作動性ニューロン死と行動異常抑制を検討した。DJ-1 の活性化部位である 106 番目のシステイン(C106)領域に結合する低分子化合物を富士通バイオサーバーで in silico でスクリーニングを行い、得られた化合物の酸化ストレス誘導神経細胞死抑制能を in vitro 培養細胞、6-OHDA 注入パーキンソン病モデルラットで検討した。			
結果			
1. DJ-1 は 106 番目のシステイン(C106)の酸化状態で活性が制御される。還元型は弱い活性で、C106 が SO₂H と酸化されることが活性に必須であるが、SO₃H と過度に酸化されると不活性となる。更にドパミン生合成のキー酵素であるチロシンヒドロキシラーゼ(TH)を転写レベル、及び DJ-1-TH 相互作用を通じて活性上昇させた。 2. パーキンソン病モデルラットに DJ-1 タンパク質を直接注入すると、ドパミン神経細胞死と行動異常が劇的に阻止されることを明らかとした。更に、DJ-1 の活性部位である C106 に結合し、酸化ストレス誘導神経細胞死を抑制する複数の低分子化合物を同定し、これらが DJ-1 タンパク質同様に神経細胞死と行動異常の解除を行うことを in vitro 及びパーキンソン病モデルラットで明らかにした。これらの化合物は、血液脳関門を通過する。 以上より、DJ-1 とその結合化合物は、神経細胞死を抑制することにより、パーキンソン病を始めとする神経変性疾患治療薬の可能性を示した。			
以上より、DJ-1 はパーキンソン病発症の全てのステップに関与し、更に酸化ストレスが関与する他の神経変性疾患発症にも関与することが示唆された。DJ-1 結合化合物は申請細胞死を抑制する根本的な治療薬の可能性が高い。			

第5領域 (公募班員)

研究代表者名 有賀 寛芳

発表論文 (直接関係するもののみ記載)

英文

(1) 原著論文

Shinbo, Y., Niki, T., Taira, T., Ooe, H., Takahashi-Niki, K., Maita, C., Seino, C., Iguchi-Ariga, S.M.M. & Ariga, H. Proper SUMO-1 conjugation is essential to DJ-1 to exert its full activities. *Cell Death Diff.* **13**, 96-108 (2006).

Sekito, A., Koide-Yoshida, S., Niki, T., Taira, T., Iguchi-Ariga, S.M.M. & Ariga, H. DJ-1 interacts with HIPK1 and affects H₂O₂-induced cell death. *Free Radic. Res.* **40**, 155-165 (2006).

Ito, G., Ariga, H., Nakagawa, Y. & Iwatsubo, T. Roles of distinct cysteine residues in S-nitrosylation and dimerization of DJ-1. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **339**, 667-672 (2006).

Inden, M., Taira, T., Kitamura, Y., Yanagida, T., Tsuchiya, D., Takata, K., Yanagisawa, D., Nishimura, K., Taniguchi, T., Kiso, Y., Yoshimoto, Y., Agatsuma, T., Koide-Yoshida, S., Iguchi-Ariga, S.M.M., Shimohama, S. & Ariga, H. PARK7 DJ-1 protects against degeneration of nigral dopaminergic neurons in Parkinson's disease rat model. *Neurobiol. Dis.* **24**, 144-158 (2006).

Ooe, H., Maita, C., Maita, H., Iguchi-Ariga, S.M.M. & Ariga, H. Specific cleavage of DJ-1 under an oxidative condition. *Neuroscience Lett.* **406**, 165-168 (2006).

Li, H.M., Taira, T., Maita, C., Ariga, H. & Iguchi-Ariga, S.M.M. Protection against nonylphenol-induced cell death by DJ-1 in cultured Japanese medaka (*Oryzias latipes*) cells. *Toxicology.* **228**, 229-238 (2006).

Yanagida, T., Takada, K., Inden, M., Kitamura, Y., Taniguchi, T., Yoshimoto, K., Taira, T. & Ariga, H. Distribution of DJ-1, Parkinson's disease-related protein PARK7, and its alteration in 6-hydroxydopamine-treated hemiparkinsonian rat brain. *J. Pharmacol. Sci.* **102**, 243-247 (2006).

Inden, M., Kitamura, Y., Takeuchi, H., Yanagida, T., Takata, K., Kobayashi, Y., Taniguchi, T., Yoshimoto, K., Kaneko, M., Okuma, Y., Taira, T., Ariga, H. & Shimohama, S. Neurodegeneration of mouse nigrostriatal dopaminergic system induced by repeated oral administration of rotenone is prevented by 4-phenylbutyrate, a chemical chaperone. *J. Neurochem.* in press.

Koide-Yoshida, S., Niki, T., Ueda, M., Himeno, S., Taira, T., Iguchi-Ariga, S.M.M., Ando, Y. & Ariga, H.
DJ-1 degrades transthyretin and an inactive form of DJ-1 is secreted in familial amyloidotic
polyneuropathy. *Int. J. Mol. Med.* in press.

(2) 総説

(3) 著書

和文

(1) 原著論文

(2) 総説

有賀寛芳、平敬宏、有賀早苗. Parkinson 病原因遺伝子 PARK7 と DJ-1 遺伝子の機能. *神経内科* **65**,
135-139 (2006).

(3) 著書

第5領域（公募班員）			
研究課題名	アミロイド β 蛋白凝集抑制作用を有するアルツハイマー病予防薬の開発		
研究代表者名	荒井 啓行	E-mail	harai@geriat.med.tohoku.ac.jp
所属・職名	東北大学大学院医学系研究科・教授		
研究分担者名	藤原博典		
分担者所属	東北大学大学院医学系研究科		

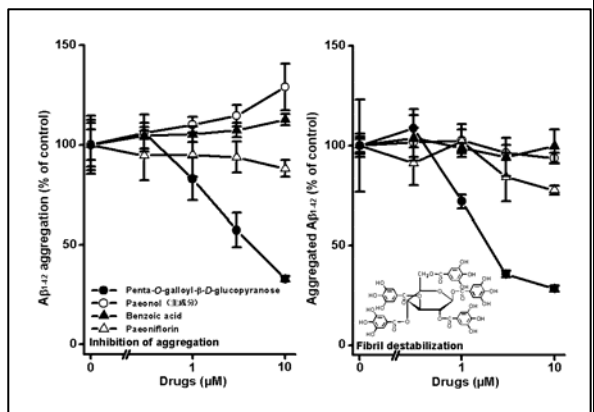
研究成果報告書

【緒言】アルツハイマー病（AD）におけるアミロイド仮説によると、アミロイド（ $A\beta$ ）蛋白が凝集・蓄積することによる老人斑の形成が最初期病変とされる。しかし、現在のAD治療薬は残存神経細胞賦活作用が主要であり、 $A\beta$ 蛋白の除去を目的としたものではない。漢方薬には長く認知症を始めとする中枢神経疾患に使われているものがあり、漢方によるADのdisease-modifying drugの探索的研究を行ない、牡丹皮が $A\beta$ 蛋白の凝集抑制作用および凝集した蛋白の脱重合作用を有する生薬であることを見出した。さらに、牡丹皮のHPLC分析からその有効成分と思われる1,2,3,4,6-Penta-O-galloyl- β -D-glucopyranose (PGG)についても詳細に検討した。

【方法】牡丹皮を水、メタノールおよびエタノールで抽出し、得られたエキスを実験に用いた。 $A\beta_{1-40}$ 蛋白および $A\beta_{1-42}$ 蛋白の凝集抑制作用ならびに凝集蛋白脱重合作用は、Thioflavin-T法によって検討した。In vivoにおいては、APPトランスジェニックマウス（Tg2576）に牡丹皮およびPGGを経口投与し、脳切片を作成した後、Thioflavin-Sで染色して検討した。

【結果】牡丹皮による $A\beta$ 蛋白凝集抑制作用を検討したところ、 $A\beta_{1-40}$ 蛋白および $A\beta_{1-42}$ 蛋白の凝集を用量依存的に抑制していることを確認した。このとき、 $A\beta_{1-40}$ 蛋白においては10 $\mu\text{g/ml}$ で50%、 $A\beta_{1-42}$ 蛋白においては100 $\mu\text{g/ml}$ で40%まで凝集を抑制した。また、牡丹皮は凝集した $A\beta$ 蛋白の用量依存的な脱重合も引き起こし、 $A\beta_{1-40}$ 蛋白、 $A\beta_{1-42}$ 蛋白ともに100 $\mu\text{g/ml}$ で20%まで脱重合し、この結果は原子間力顕微鏡でも確認された。さらに、トランスジェニックマウスを用いた実験においては、用量依存的な $A\beta$ 蛋白凝集老人斑の減少が認められた。

牡丹皮からHPLC分析により同定された有効成分のうち4種について、 $A\beta_{1-42}$ 蛋白の凝集抑制作用ならびに凝集蛋白の脱重合作用を検討したところ、PGGのみに顕著な作用が見出された（右図）。また、Tg2576を用いた実験においては、PGG投与群において有意な $A\beta$ 蛋白凝集斑の減少が認められた。さらに、Tg2576の脳内不溶性 $A\beta$ 蛋白量および血漿中 $A\beta$ 蛋白量をELISAで定量したところ、 $A\beta$ 蛋白の顕著な低下が認められた。



【結論】これらの結果から、牡丹皮には、in vitro および in vivo において $A\beta$ 蛋白の凝集を制御することが確認され、その成分がPGGであることが示唆された。また、この成分は経口投与においても有効であることが示唆された。牡丹皮の作用についてさらに検討することにより、アルツハイマー病の改善、または予防を目的とした新たな漢方処方や、機能性食品などに応用できることが大いに期待される。また、PGGは $A\beta$ 蛋白を指標としたアルツハイマー病disease-modifying drugの創薬研究において重要なリード化合物になりえることが示唆された。

第5領域 (公募班員)

研究代表者名

荒井 啓行

発表論文

英文

(1) 原著論文

Fujiwara, H., Iwasaki, K., Furukawa, K., Seki, T., Mei, H., Maruyama, M., Tomita, N., Kudo, Y., Higuchi, M., Saido, T., Maeda, S., Takashima, A., Hara, M., Ohizumi, Y. & Arai, H. Uncaria rhynchophylla, a Chinese medicinal herb, has potent anti-aggregation effects on Alzheimer's amyloid beta proteins *J. Neurosci. Res.* **84**, 427-433 (2006).

(2) 総説

(3) 著書

和文

(1) 原著論文

(2) 総説

藤原博典、古川勝敏、荒井啓行：アルツハイマー病の薬物治療. *Clinical Neuroscience* **25**,181-184(2007).

荒井啓行：総説 認知症の周辺症状に対する薬物療法. *日本老年医学会雑誌* **43**,549-553(2006).

(3) 著書

第5領域（公募班員）			
研究課題名	酸化ストレスによる BACE1 発現変化とアミロイドβ蛋白との相関に関する研究		
研究代表者名	玉岡 晃	E-mail	atamaoka@md.tsukuba.ac.jp
所属・職名	筑波大学大学院人間総合科学研究科病態制御医学専攻神経病態医学分野・教授		
研究分担者名	原田祐嗣 ¹⁾ 、石井一弘 ¹⁾ 、富所康志 ¹⁾ 、荒木 亘 ²⁾ 、Blas Frangione ³⁾ 、Jorge Ghiso ³⁾		
分担者所属	1) 筑波大学大学院人間総合科学研究科病態制御医学専攻神経病態医学分野、2) 国立精神神経センター神経研究所疾病第六部、3) Department of Pathology, New York University School of Medicine		
研究成果報告書			
[背景と目的] アルツハイマー病 (AD) 脳の病理学的特徴の一つはアミロイドβ蛋白 (Aβ) の広範な沈着であり、AβのN末端を切断する Beta-site APP-cleaving enzyme 1 (BACE1) がAβの産生に関与している。また、BACE1 は in vitro で Aβ 1-40 や Aβ 1-42 から Aβ 1-34 を産生することが報告されている (Fluhrer R, et al. JBC, 2003)。本研究では抗ヒト BACE1 抗体を作成し、その反応性、特異性を調べるとともにヒト脳において BACE1 を解析し、脳内細胞における発現局在を調べ、対照脳及びおよび AD 脳においてその発現量を比較した。また、AD の病態に酸化ストレスが関与していることが推察されているため、培養細胞系に酸化ストレスを加えることにより BACE1 の産生量が変化するか否かを検討した。更に、BACE1 によって生成される Aβ の断片 Aβ 34 の存在様式を AD 脳において検討した。 [方法] ヒト BACE1 の合成ペプチドをウサギに免疫し、ポリクローナル抗体を作成した。ヒト BACE1 を一過性に発現させた Hela 細胞の膜画分をポジティブコントロールとして、抗体の特異性や感度をウェスタンブロット法にて調べた。また、ヒト対照脳およびAD脳を抽出し、抗 BACE1 抗体と抗 MAP2 抗体にて Western blotting を行い、densitometer で濃度を測定し、各蛋白を定量した。抗 BACE1 抗体と抗 MAP2 抗体、抗 GFAP 抗体で免疫二重染色を行ない、ヒト脳内の BACE1 の分布を解析した。また、HTB-148/H4 細胞に 20 μM の H₂O₂ を加え、3 および 6 時間処理したものと未処理のものを溶解バッファーにてホモジェナイズした後、各サンプルの蛋白量を一定にした。作成した抗 BACE1 抗体を用いて Western blotting 後、得られたバンドの蛋白量を densitometer にて測定比較した。ラット初代培養神経細胞を用いて同様な実験を行った。Aβ 34 の存在様式の検討のため、AD 患者の凍結剖検脳をリン酸緩衝液、SDS、ギ酸にて連続的に抽出し、免疫沈降、ウェスタンブロット、質量分析及びアミノ酸シーケンスを組み合わせる各画分に含まれる Aβ 分子種を解析した。 [結果および考察] 抗 BACE1 抗体にてヒト脳に約 70kDa の全長型 BACE1 を同定した。AD 脳の免疫二重染色で BACE1 は神経細胞に発現しており、グリア細胞には認めなかった。対照群と比較して AD 群では BACE1 の発現量の低下が認められたが、AD 脳では神経細胞当たりの BACE1 量を反映する BACE1 / MAP2 値は対照群より有意に上昇していた。HTB-148/H4 細胞での解析では、BACE1 の蛋白量は未処理のものと比較して 3 時間で 1.25 倍、6 時間で 1.37 倍となっており、酸化ストレスにより BACE1 発現の増加傾向がみられた。ラット初代培養神経細胞では、hemeoxygenase-1 の増加が生じる条件でも BACE1 の変化は認められなかった。また、BACE1 が生成する Aβ 34 は PBS 可溶性画分に存在し、不溶性画分には認められなかった。 [結論] ヒト脳において全長型 BACE1 の存在が示された。ヒト脳では BACE1 は神経細胞に発現しており、AD 脳では神経細胞当たりの BACE1 が増加していることが示唆された。また、酸化ストレスと BACE1 発現との関係は今後更に検討する必要がある。BACE1 により生成される Aβ 34 は可溶性を獲得しており、BACE1 が Aβ の重合性や神経毒性の軽減にも作用する可能性が考えられた。BACE1 の Aβ 産生能が Reticulon により抑制されるという報告もあり (Murayama KS, et al. Eur J Neurosci 2006)、今後 BACE1 活性の調節因子や BACE1 発現時の Aβ 40、Aβ 42、Aβ 34 の動態に関して、更に解析する必要がある。			

第5領域 (公募班員)

研究代表者名 玉岡 晃

発表論文

英文

(1) 原著論文

Momo, K., Homma, M., Kohda, Y., Ohkoshi, N., Yoshizawa, T. & Tamaoka, A. Drug interaction of tizanidine and ciprofloxacin: Case report. *Clin Pharmacology & Therapeutics*. **80**, 715-720(2006).

Oyama, F., Miyazaki, H., Sakamoto, N., Becquet, C., Machida, Y., Kaneko, K., Uchikawa, C., Suzuki, T., Kurosawa, M., Ikeda, T., Tamaoka, A., Sakurai, T. & Nukina, N. Sodium channel beta4 subunit: down-regulation and possible involvement in neuritic degeneration in Huntington's disease transgenic mice. *J. Neurochem*. **98**, 518-29(2006).

(2) 総説

(3) 著書

Koide, R. & Tamaoka, A.: Body image deviation in chronic schizophrenia: new research. In *Body Image: New Research*, ed by Marlene V. Kendes, NovaScience Publishers, Inc., N.Y., 145-197(2006).

和文

(1) 原著論文

和泉梢、大越教夫、藤田祐之、玉岡晃、庄司進一：ダンス中の衝突に起因した頸静脈孔症候群（Vernet症候群）の1例. *内科* **97**(3), 568-569(2006).

渡邊雅彦、高田健治、松永恒明、大越教夫、玉岡晃：慢性血液透析患者における restless legs syndrome の調査. *JMDD* **16**, 1-6(2006).

(2) 総説

玉岡晃：スタチンはアルツハイマー病のリスクを減少させるか. *老年精神医学雑誌* **17**, 105-112(2006).

玉岡晃：認知症の分子病態の多様性. *最新医学* **61**, 2379-2385(2006).

辻浩史、玉岡晃：吃逆の発生機序と治療. *日本医事新報* **4302**, 90-92(2006).

玉岡晃：アミロイド・カスケード仮説に基づくアルツハイマー病の治療戦略. *DDL magazine* 2006 Summer, 20-21(2006).

玉岡晃：神経内科教授就任の御挨拶. *桐医会会報* 59,23-24(2006).

玉岡晃：内科疾患からみた認知症の予防—高脂血症・スタチン. *Prog Med* 26(2),401-406(2006).

玉岡晃：認知症の神経徴候の診方. *D & N Trends*. 8,3(2006).

(3) 著書

玉岡晃：認知症に対する治療はどうすべきか. *EBM 神経疾患の治療 2007-2008* (水澤英洋、棚橋紀夫、岡本幸市 編)、228-235(2007).

玉岡晃：アルツハイマー病、*臨床病態学* (北村 聖編)、ヌーヴェルヒロカワ、112-118(2006).

玉岡晃：Kennedy-Alter-Sung 症候群. *整形外科診療実践ガイド* (守屋秀繁・他編)、文光堂、454-455(2006).

第5領域（公募班員）			
研究課題名	膜内配列切断機構の理解による新規アルツハイマー病創薬標的因子の探索		
研究代表者名	富田 泰輔	E-mail	taisuke@mol.f.u-tokyo.ac.jp
所属・職名	東京大学大学院薬学系研究科臨床薬学教室・助教授		
研究分担者名			
分担者所属			
研究成果報告書 <緒言> アミロイド産生にかかわるγセクレターゼは APP をはじめとする様々な膜内配列を基質として認識・加水分解するプロテアーゼである。その酵素活性阻害によるアルツハイマー病治療を考えた際、γセクレターゼの構造活性相関および切断機構の分子レベルでの理解は必須である。しかしγセクレターゼは複数の多回膜貫通型蛋白からなる高分子量膜蛋白複合体であり、通常の構造生物学的アプローチが困難である。そこで分子生物学・生化学に加えてケミカルバイオロジーおよび構造生物学を駆使し、その構造活性相関を明らかにすべく研究を進めた。 <方法・結果> まず既知の低分子量阻害剤を光親和性分子プローブとして用い、ジペプチド型阻害剤が直接活性中心サブユニットである Presenilin に対して作用すること、各化合物の酵素特異性がその骨格に起因することをケミカルバイオロジー的アプローチにより明らかにした。本手法をさらに基質特異性を持つスルホンアミド型阻害剤にも適用しその解析を開始した。さらにオリジナルの化合物中間体ライブラリーよりいくつかの阻害活性を有する化合物を見出した。 バキュロウイルス・Sf9 細胞発現系によるγセクレターゼ再構成および精製に成功し、そのサンプルを用いて電子顕微鏡観察および単粒子解析を行い、非常に巨大な構造をしていることを明らかにした。さらに Substituted cysteine accessibility method により、二つのアスパラギン酸からなる活性中心が親水性領域に面していることがわかった。すなわち、膜内の蛋白分解はγセクレターゼ複体内に存在する、脂質二重膜内の catalytic pore において起こっていると考えられた。これらの研究により、γセクレターゼ複合体は基質として膜貫通領域を認識した後、脂質二重膜である疎水性環境から親水性環境である catalytic pore へと運び、切断を行うというモデルが考えられ、その活性を制御するにあたり様々な作用点の存在が予測された。 <考察> 今後これらの化合物による阻害活性について構造生物学との統合的理解をすすめることにより、膜内配列切断機構を分子レベルで理解することができる可能性が示された。今後さらにγセクレターゼの構造変化を指標とした新たな阻害剤開発を進めていきたいと考えている。			

第 5 領域 (公募班員)

研究代表者名 富田 泰輔

発表論文

英文

原著論文

(1)

Yang, X., Tomita, T., Wines-Samuelson, M., Beglopoulos, V., Tansey, M.G., Kopan, R. & Shen, J. Notch1 signaling influences v2 interneuron and motor neuron development in the spinal cord. *Dev. Neurosci.* **28**, 102-17 (2006).

Tomita, T., Tanaka, S., Morohashi, Y. & Iwatsubo, T. Presenilin-dependent intramembrane cleavage of ephrin-B1. *Mol. Neurodegener.* **1**, 2 (2006).

Keller, P.C., 2nd, Tomita, T., Hayashi, I., Chandu, D., Weber, J.D., Cistola, D.P. & Kopan, R. A faster migrating variant masquerades as NICD when performing in vitro gamma-secretase assays with bacterially expressed Notch substrates. *Biochemistry* **45**, 5351-8 (2006).

Fuwa, H., Hiromoto, K., Takahashi, Y., Yokoshima, S., Kan, T., Fukuyama, T., Iwatsubo, T., Tomita, T. & Natsugari, H. Synthesis of biotinylated photoaffinity probes based on arylsulfonamide gamma-secretase inhibitors. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **16**, 4184-9 (2006).

Hsieh, H., Boehm, J., Sato, C., Iwatsubo, T., Tomita, T., Sisodia, S. & Malinow, R. AMPAR removal underlies Abeta-induced synaptic depression and dendritic spine loss. *Neuron* **52**, 831-43 (2006).

Ozaki, T., Li, Y., Kikuchi, H., Tomita, T., Iwatsubo, T. & Nakagawara, A. The intracellular domain of the amyloid precursor protein (AICD) enhances the p53-mediated apoptosis. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **351**, 57-63 (2006).

Garino, C., Tomita, T., Pietrancosta, N., Laras, Y., Rosas, R., Herbette, G., Maigret, B., Quelever, G., Iwatsubo, T. & Kraus, J.L. Naphthyl and coumarinyl biaryl piperazine derivatives as highly potent human beta-secretase inhibitors. Design, synthesis, and enzymatic BACE-1 and cell assays. *J. Med. Chem.* **49**, 4275-85 (2006).

Takahashi, Y., Fuwa, H., Kaneko, A., Sasaki, M., Yokoshima, S., Koizumi, H., Takebe, T., Kan, T., Iwatsubo, T., Tomita, T., Natsugari, H. & Fukuyama, T. Novel gamma-secretase inhibitors discovered by

library screening of in-house synthetic natural product intermediates. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **16**, 3813-6 (2006).

Ogura, T., Mio, K., Hayashi, I., Miyashita, H., Fukuda, R., Kopan, R., Kodama, T., Hamakubo, T., Iwatsubo, T., Tomita, T. & Sato, C. Three-dimensional structure of the gamma-secretase complex. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **343**, 525-34 (2006).

Morohashi, Y., Kan, T., Tominari, Y., Fuwa, H., Okamura, Y., Watanabe, N., Sato, C., Natsugari, H., Fukuyama, T., Iwatsubo, T. & Tomita, T. C-terminal fragment of presenilin is the molecular target of a dipeptidic gamma-secretase-specific inhibitor DAPT (*N*-[*N*-(3,5-difluorophenacetyl) -L-alanyl] -S-phenylglycine t-butyl ester). *J. Biol. Chem.* **281**, 14670-6 (2006).

Sato, C., Morohashi, Y., Tomita, T. & Iwatsubo, T. Structure of the catalytic pore of gamma-secretase probed by the accessibility of substituted cysteines. *J. Neurosci.* **26**, 12081-8 (2006).

Fuwa, H., Kaneko, A., Sugimoto, Y., Tomita, T., Iwatsubo, T. & Sasaki, M. Concise and short synthesis of functionalized 5,6-Dihydropyridin-2-ones by means of palladium(0)-catalyzed cross-coupling of ketene aminal phosphates. *Heterocycles* **70**, 101-106 (2006).

Isoo, N., Sato, C., Miyashita, H., Shinohara, M., Takasugi, N., Morohashi, Y., Tsuji, S., Tomita, T. & Iwatsubo, T. Abeta42 overproduction associated with structural changes in the catalytic pore of gamma-secretase: common effects of Pen-2 amino-terminal elongation and fenofibrate. *J. Biol. Chem.* in press.

Kan, T., Kita, Y., Morohashi, Y., Tominari, Y., Hosoda, S., Tomita, T., Natsugari, H., Iwatsubo, T. & Fukuyama, T.: Convenient synthesis of photoaffinity probes and evaluation of their cross-linking abilities. *Org. lett.* in press.

(2) 総説

Tomita, T. & Iwatsubo, T. gamma-secretase as a therapeutic target for treatment of Alzheimer's disease. *Cur. Pharm. Des.* **12**, 661-70 (2006).

(3) 著書

和文

(1) 原著論文

(2) 総説

富田泰輔：アルツハイマー病治療における γ セクレターゼ阻害剤とその副作用. *医学のあゆみ* **217**,1101-1105(2006).

富田泰輔：セクレターゼ阻害剤による β アミロイド産生抑制. *Cognition and Dementia* **5**,267-274(2006).

富田泰輔：セクレターゼによる APP プロセッシング. *最新医学* **61**,2392-2397(2006).

富田泰輔：Alzheimer 病——システム生物学によるアプローチ. *医学のあゆみ* **219**,714-718(2006).

富田泰輔、岩坪威：臨床開発が期待されるシグナル分子作用薬. γ セクレターゼインヒビター
バイオテクノロジージャーナル in press.

富田泰輔：Ringberg Symposium on Regulated Intramembrane Proteolysis. *Cognition and Dementia* in press.

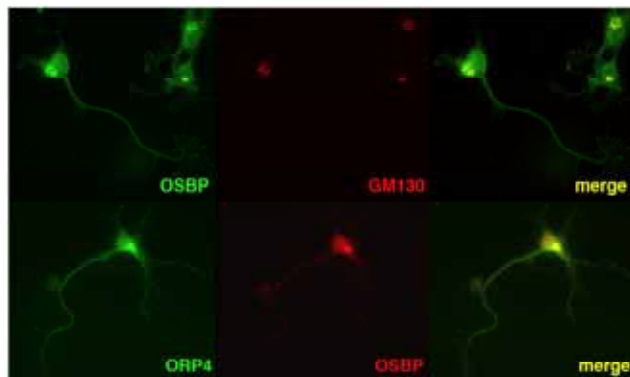
(3) 著書

第5領域（公募班員）			
研究課題名	24-ヒドロキシコレステロール結合蛋白質のアルツハイマー病における意義の解明		
研究代表者名	新井 洋由	E-mail	harai@mol.f.u-tokyo.ac.jp
所属・職名	東京大学薬学系研究科・教授		
研究分担者名	井上貴雄		
分担者所属	東京大学薬学系研究科		

研究成果報告書

本研究の目的は、アルツハイマー病との関連性が示唆されている脳特異的コレステロール代謝産物24-ヒドロキシコレステロール（24-HC：オキシステロールの一種）の作用機構に関して、申請者が独自に見出した24-HC結合蛋白質をターゲットとして、その生理的あるいは病理的機能を明らかにすることである。本年度は、24-HC結合蛋白質ならびに本分子と高い相同性を有するOSBPに関して、以下の点を明らかにした。

- ・24-HC結合蛋白質と相互作用する分子を網羅的に探索するため、免疫沈降により24-HC結合蛋白質と共沈する蛋白質をマスマスペクトロメトリーを用いて解析した。この結果、予想外にも24-HC結合蛋白質がOSBPと結合することを見出した。両者が高発現する脳において発現分布を調べたところ、両分子は共に海馬、大脳皮質、小脳における神経細胞に発現しており、海馬初代培養神経細胞では主に核近傍のゴルジ体において共局在することが分かった（右図）。さらに、両者の結合様式により、24-HC結合蛋白質のオキシステロールに対する反応性が変化することを見出した。



- ・線虫をモデルとしたゲノムワイドな発現抑制系（Feeding RNAi）を用い、オキシステロール結合蛋白質の変異体でみられた胚致死性を増強させるエンハンサー遺伝子のスクリーニングを行った。現在までに全ゲノムの約 1/3 の遺伝子についてスクリーニングを終了し、数十のエンハンサー遺伝子を同定した。これらの遺伝子は機能的に複数のグループに分類され、オキシステロール結合蛋白質の変異体においても、エンハンサー遺伝子と関連する現象に異常が観察された。

第5領域 (公募班員)

研究代表者名 新井 洋由

発表論文

英文

(1) 原著論文

Ban, N., Matsumura, Y., Sakai, H., Takanezawa, Y., Sasaki, M., Arai, H. & Inagaki N. ABCA3 as a lipid transporter in pulmonary surfactant biogenesis. *J. Biol. Chem.* in press.

Shibata, N., Jishage, K., Arita, M., Watanabe, M., Kawase, Y., Nishikawa, K., Natori, Y., Inoue, H., Shimano, H., Yamada, N., Tsujimoto, M. & Arai, H. Regulation of hepatic cholesterol synthesis by a novel protein (SPF) that accelerates cholesterol biosynthesis. *FASEB J.* **20**, 2642-2644 (2006).

Okazaki, H., Tazoe, F., Okazaki, S., Isoo, N., Tsukamoto, K., Sekiya, M., Yahagi, N., Iizuka, Y., Ohashi, K., Kitamine, T., Tozawa, R.I., Inaba, T., Yagyu, H., Okazaki, M., Shimano, H., Shibata, N., Arai, H., Nagai, R.Z., Kadowaki, T., Osuga, J.I. & Ishibashi, S. Increased cholesterol biosynthesis and hypercholesterolemia in mice overexpressing squalene synthase in the liver. *J. Lipid. Res.* **47**, 1950-1958 (2006).

Kobayashi, A., Takanezawa, Y., Hirata, T., Shimizu, Y., Misasa, K., Kioka, N., Arai, H., Ueda, K. & Matsuo, M. Efflux of sphingomyelin, cholesterol and phosphatidylcholine by ABCG1. *J. Lipid Res.* **47**, 1791-1802 (2006).

(2) 総説

(3) 著書

和文

(1) 原著論文

(2) 総説

(3) 著書

第5領域 (公募班員)			
研究課題名	長鎖アミロイドβ生成の調節メカニズム解明とその抑制法開発		
研究代表者名	西村 正樹	E-mail	mnishimu@belle.shiga-med.ac.jp
所属・職名	滋賀医科大学分子神経科学研究センター・助教授		
研究分担者名			
分担者所属			
研究成果報告書 [研究の背景と目的] Alzheimer 病の分子病態における主役はアミロイド beta ペプチド (A beta)、なかでも長鎖 A beta_{42/43} (A beta 42/43) であると考えられている。本研究課題の目的は、長鎖 A beta の脳内生成をコントロールする内因性メカニズムの解明から本症の新たな治療戦略の開発を目指すことにある。gamma セクレターゼ/presenilin 複合体に作用し gamma 活性を制御ないし修飾するタンパク質の検索を進めるが、今回はショウジョウバエの Notch シグナル伝達に対して負のフィードバックに働くとされる Crumbs 分子の gamma セクレターゼに対する機能を解析した。 [方法と結果] Crumbs のヒト相同分子は CRB1, CRB2, CRB3 から成るスーパーファミリーであり、上皮細胞の極性決定や接着帯(zonula adherens)形成に欠かせないスカフォールドタンパク質として知られている。このなかでも脳における発現レベルが高いとされる CRB2 の解析を行った。CRB2 は細胞外領域に複数の EGF 様ドメイン領域とラミン A 球状ドメイン領域をもつ I 型膜貫通タンパク質であり、培養細胞においては分子量約 170kDa の糖タンパク質として発現した。APP-C99 を恒常的に発現する HEK293 細胞に CRB2 を強制発現させると分泌される A beta レベルは有意に減少した。逆に、SH-SY5Y 細胞の内在性 CRB2 発現を siRNA 処理により抑制すると分泌 A beta レベルは増加した。しかし、これらにおいて長鎖 A beta の総 A beta に対する比率には明らかな増減は認められなかった。HEK293 細胞の膜分画を用いて gamma セクレターゼによる APP-CTF の epsilon 切断反応を <i>in vitro</i> アッセイにて評価すると CRB2 発現によって抑制されることが確認され、また CRB2 を恒常的に発現させた HEK293 細胞株では gamma セクレターゼの基質である APP-C82 と APP-C99 の細胞内蓄積がみられた。以上の所見より、CRB2 は gamma セクレターゼ活性を阻害すると考えられた。そこで、gamma セクレターゼ複合体の構成タンパク質と CRB2 との相互作用を免疫共沈にて確認したところ、CRB2 は presenilin, nicastrin, APH-1 と結合する一方、PEN-2 とは結合しないことが判明した。また、部分欠損変異体 CRB2 タンパク質を用いたドメインマッピングから、gamma セクレターゼ阻害には膜貫通領域が必須であることが示された。CRB2 特異抗体による免疫組織化学によってヒト及びラット脳における発現分布をみると、大脳皮質と海馬のニューロンに免疫反応性が認められ、CRB2 が Alzheimer 病の病態に関与し得ることが示唆された。 [考察] 生体内における生理的な条件下での CRB2 の gamma セクレターゼ活性抑制についてはより慎重に検討を重ねる必要があるが、この検討により gamma セクレターゼの内因性制御機構の一側面が明らかにできると期待される。			

第 5 領域 （公募班員）	
研究代表者名	西村 正樹
発表論文 発表論文無し	

第5領域（公募班員）			
研究課題名	パーキンソン病におけるパエル受容体の病態生理的役割の解明		
研究代表者名	高橋 良輔	E-mail	ryosuket@kuhp.kyoto-u.ac.jp
所属・職名	京都大学大学院医学研究科脳病態生理学講座臨床神経学・教授		
研究分担者名	王華芹 ^{1,2} 、井上治久 ^{1,2} 、		
分担者所属	1) 京都大学大学院医学研究科脳病態生理学講座臨床神経学 2) 理化学研究所脳科学総合研究センター病因遺伝子研究グループ		

研究成果報告書

常染色体劣性若年性パーキンソン病（AR-JP）の原因遺伝子産物 Parkin は、タンパク質の分解にかかわるユビキチン・プロテアソーム経路のユビキチンリガーゼ（E3）の活性を持ち、AR-JPに見られる変異体では E3 活性が欠失または低下している。このことは、Parkin の基質の神経細胞への蓄積が AR-JP の原因であることを強く示唆する。我々が Parkin の基質として同定した膜タンパク質 Pael-R は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。この原因は Pael-R が折り畳み効率の低いタンパク質であり、折り畳みに失敗したミスフォールド化 Pael-R は小胞体関連分解（ERAD）で分解されるものの、発現量が ERAD の処理能力を超えると、小胞体及び細胞質に蓄積し小胞体ストレスを引き起こしてアポトーシスを生じさせるからと考えられる。これらの結果を踏まえ、昨年度は AR-JP モデルマウスを作出する目的でニューロン特異的なプロモーター（Prion および PDGF プロモーター）を用いて Pael-R トランスジェニックマウス（Pael-R Tg）を作製した。Pael-R Tg では軽度ながら、12 ヶ月から選択的に黒質ドーパミンニューロンの脱落が認められた。この結果を踏まえ、今年度は Pael-R-Tg に Parkin-KO マウスを掛け合わせた二重変異マウス（Pael-R-Tg/Parkin-KO）を作成した。二重変異マウスでは生後 6 ヶ月から黒質および青斑核に細胞脱落が観察されはじめて徐々に進行し、24 ヶ月ではヘテロ接合型マウスでは 20%、ホモ接合型マウスでは 40% の細胞死が観察された。これらの変化はカテコールアミン作動性ニューロンに特異的であり、海馬のニューロンには細胞死がみられなかった。なお変性部位には Lewy 小体様の構造物は見出せなかった。また、黒質では小胞体シャペロン BiP、転写因子 CHOP、スプライス型の XBP-1、活性化型カスパーゼ 12 の mRNA、蛋白質レベルでの増加が観察され、これらが黒質ではドーパミンニューロンでの変化を主として反映していることが免疫組織学的に確かめられた。さらに 18 ヶ月齢からは、ミトコンドリアの複合体 I の活性が特異的に低下することも見出した。酸化ストレスのマーカーとなるカルボニル化蛋白質の量は脳皮質では増えず、変性の生じる黒質で顕著に認められた。また線条体のドーパミン量は 6 ヶ月齢では増えるが、その後はドーパミン細胞死に相関して減少に転じた。このマウスでは Pael-R の蓄積による小胞体ストレスによりカテコールアミン特異的細胞死が誘発され、その過程でドーパミンやミトコンドリアの活性低下による酸化ストレスによって変性が加速するメカニズムが推測される。以上よりこの二重変異マウス（Pael-R-Tg/Parkin-KO）は AR-JP のはじめてのよいモデルになるものと思われる。

第5領域 (公募班員)

研究代表者名 高橋 良輔

発表論文

英文

(1) 原著論文

Wang, H., Imai, Y., Kataoka, A. & Takahashi, R.: Cell type-specific upregulation of parkin in response to ER stress. *ARS. Forum.* in press.

Murakami, T., Moriwaki, Y., Kawarabayashi, T., Nagai, M., Ohta, Y., Deguchi, K., Kurata, T., Takehisa, Y., Matsubara, E., Ikeda, M., Harigaya, Y., Shoji, M., Takahashi, R. & Abe, K. PINK1, a gene product of PARK6, accumulates in {alpha}-synucleinopathy brains. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry.* in press.

Yamashita, H., Kawamata, J., Okawa, K., Kanki, R., Nakamizo, T., Hatayama, T., Yamanaka, K., Takahashi, R. & Shimohama, S. Heat-shock protein 105 interacts with and suppresses aggregation of mutant Cu/Zn superoxide dismutase; clues to a possible strategy for treating ALS. *J. Neurochem.* in press.

Kawamoto, Y., Akiguchi, I., Shirakashi, Y., Honjo, Y., Tomimoto, H., Takahashi, R. & Budka, H. Expression of S100 protein and protective effect of arundic acid on the rat brain in chronic cerebral hypoperfusion. *Brain Res.* **1136**,219-217 (2007).

Ohtani, R., Tomimoto, H., Wakita, H., Kitaguchi, H., Nakaji, K. & Takahashi, R. Expression of S100 protein and protective effect of arundic acid on the rat brain in chronic cerebral hypoperfusion. *Brain Res.* **1135**,195-200(2007).

Kitao, Y., Imai, Y., Ozawa, K., Kataoka, A., Ikeda, T., Soda, M., Namekawa, K., Kiyama, H., Stern, D.M., Hori, O., Wakamatsu, K., Ito, S., Itohara, S., Takahashi, R. & Ogawa, S. Pael Receptor Induces Death of Dopaminergic Neurons in the Substantia Nigra via Endoplasmic Reticulum Stress and Dopamine Toxicity, which is Enhanced under Condition of Parkin Inactivation. *Hum. Mol. Genet.* **16(1)**,50-60(2007).

Kuzuya, A., Uemura, K., Kitagawa, N., Aoyagi, N., Kihara, T., Ninomiya, H., Ishiura, S., Takahashi, R. & Shimohama, S. Presenilin 1 is involved in the maturation of beta-site amyloid precursor protein-cleaving enzyme 1 (BACE1). *J. Neurosci. Res.* **85(1)**, 153-65(2007).

Kinoshita, M., Ikeda, A., Taki, J., Usui, K., Mikuni, N., Takahashi, J.B., Matsumoto, R., Fukuyama, H., Hashimoto, N. & Takahashi, R. Heterogeneous epileptogenicity and cortical function within malformations

of cortical development: A case report. *J. Neurol. Sci.* **251(1-2)**,129-33(2006).

Omura, T., Kaneko, M., Okuma, Y., Orba, Y., Nagashima, K., Takahashi, R., Fujitani, M., Matsumura, S., Hata, A., Kubota, K., Murahashi, K., Uehara, K. & Nomura, Y. ubiquitin ligase HRD1 promotes the degradation of Pael receptor, a substrate of Parkin., *J. Neurochem.* **99(6)**,1456-69 (2006).

Nakaji, K., Ihara, M., Takahashi, C., Itohara, S., Noda, M., Takahashi, R. & Tomimoto, H. Matrix metalloproteinase-2 plays a critical role in the pathogenesis of white matter lesions after chronic cerebral hypoperfusion in rodents. *Stroke* **37(11)**,2816-23(2006).

Shirakashi, Y., Kawamoto, Y., Tomimoto, H., Takahashi, R. & Ihara, M. alpha-Synuclein is colocalized with 14-3-3 and synphilin-1 in A53T transgenic mice. *Acta Neuropathol (Berl)*. **112(6)**,681-9(2006).

Arai, R., Yoshikawa, S., Murayama, K., Imai, Y., Takahashi, R., Shirouzu, M. & Yokoyama, S. Structure of human ubiquitin-conjugating enzyme E2 G2 (UBE2G2/UBC7). *Acta. Crystallograph. Sect. F. Struct. Biol. Cryst. Commun.* **62(4)**,330-4(2006).

Hitomi, T., Ikeda, A., Matsumoto, R., Kinoshita, M., Taki, J., Usui, K., Mikuni N., Nagamine, T., Hashimoto, N., Shibasaki, H. & Takahashi, R. Generators and temporal succession of giant somatosensory evoked potentials in cortical reflex myoclonus: Epicortical recording from sensorimotor cortex *Clin. Neurophysiol.* **117(7)**,1481-6(2006).

Mitsueda-Ono, T., Ikeda, A., Noguchi, E., Takaya, S., Fukuyama H., Shimohama, S. & Takahashi, R. Epileptic polyopia with right temporal lobe epilepsy as studied by FDG-PET and MRI: A case report. *J. Neurol. Sci.* **247(1)**,109-11(2006).

Misawa, H., Nakata, K., Matuura, J., Moriwaki, Y., Kawashima, K., Shimizu, T., Shirasawa, T. & Takahashi, R. Conditional knockout of Mn superoxide dismutase in postnatal motor neurons reveals resistance to mitochondrial generated superoxide radicals. *Neurobiol. Dis.* **23(1)**,169-77(2006).

Kitajima, K., Takahashi, R. & Yokota, Y. Localization of Id2 mRNA in the adult mouse brain. *Brain Res.* **1073-1074**,93-102(2006).

(2) 総説

Kim, Y.J. & Takahashi, R. Role of polyunsaturated fatty acids for misfolding protein aggregations: implication for neurodegenerative diseases. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **1086**, 11-20(2006).

(3) 著書

和文

(1) 原著論文

竹内啓喜、池田昭夫、大塚快信、斎木英資、下濱俊、高橋良輔：副甲状腺機能低下症による低カルシウム血症を合併した側頭葉てんかんの1例. *臨床神経学* **46**(7), 510-512(2006).

斎木英資、池田昭夫、石倉大輔、下濱俊、高橋良輔：食後に離人症体験、おかしみの情動、失語から始まるeating epilepsyの1例. *てんかん研究* **24**(2), 63-67(2006).

(2) 総説

館野美成子、高橋良輔：AMPA 受容体と変異 SOD1 タンパク質異常. *CLINICAL NEUROSCIENCE* **24**(2), 226-229(2006).

(3) 著書

第5領域 (公募班員)			
研究課題名	プレセニリン機能障害によるシナプス制御機構の破綻		
研究代表者名	木下 彩栄	E-mail	akinoshita@hs.med.kyoto-u.ac.jp
所属・職名	京都大学医学部保健学科・教授		
研究分担者名	植村健吾		
分担者所属	京都大学大学院医学研究科		
研究成果報告書 背景と目的：超高齢化社会を迎える本邦において、認知症は医学的・社会的にも重大な問題である。これまでの家族性アルツハイマー病の研究より、presenilin (PS1)を中心としたgamma-secretase がアルツハイマー病の病態の鍵を握っていると考えられるようになってきている。1999年にPS1がN-cadherin, cateninとともに複合体を形成してシナプス部に存在することが明らかになり、さらに、2004年に、PS1が成体の脳においてシナプスの維持に必須の役割を果たしていることが証明されてから、PS1のシナプス蛋白の制御機構が重要な研究テーマとなりつつある。さらに近年では、Abetaによるシナプス障害作用が明らかにされるに従い、アルツハイマー病の本態であるシナプス病変の機序の解明が注目されている。本課題では、PS1の局在・機能を制御するシナプス蛋白との相互作用について研究を進め、シナプス部におけるPS1の機能が認知症の症状にどのように関わっているかを解明することを目的とする。 方法：我々は海馬の興奮性シナプスに豊富に存在し、記憶の基礎過程を司るとされるLTPに必須なタンパク質であるN-cadherinに注目して研究を進めた。神経系の培養細胞SH-5YSY、あるいは他の培養細胞(HEK293, CHO, PS1 knockout MEF)などを使用し、PS1の局在を免疫組織学、細胞分画による生化学的手法、ビオチン化などで検出。N-cadherinと結合しないPS1のdeletion mutant、およびGSK3betaによるリン酸化 mimic 変異PS1などのコンストラクトを作成し、PS1の細胞内局在とその機能の変化（cell survival pathway, 基質の切断）を調べた。 結果：PS1が、シナプス蛋白であるN-cadherinの切断を介して未知のシグナル伝達系を制御しているということ、Abetaが、N-cadherinの切断を抑制することによって、その経路を抑制すること、さらに、PS1の局在・機能がGSK3betaによるリン酸化によりN-cadherin/cateninとの結合が変わることで変化し、リン酸化により、膜への局在が減少することがわかった。その結果、PS1による基質の切断がdifferentialに影響を受ける(N-cadherinの切断抑制、APPの切断は変化なし)ことなどを明らかにした。 考察：これまで考えられてきた以上に、シナプスタンパク質が核との間で密接に情報を交換し合っており、シナプス接着分子の切断にもRipが重要な役割を果たしていることが推測されている。これらの切断を司るPS1は、gamma-secretaseの活性中心として、シナプスの接着と核における転写を結ぶ情報依存性の分子スイッチとしてさまざまな事象を制御している可能性があり、アルツハイマー病の原因に関係しているのみならず、生物学的な視点からも極めて重要なタンパク質であるといえる。今後は、これまで研究が進んでいなかった「孤発性」アルツハイマー病の原因究明に向けて、環境要因によるPS1の機能制御不全という視点から研究を進めていきたい。			

第5領域 (公募班員)

研究代表者名 木下 彩栄

発表論文

英文

(1) 原著論文

Uemura, K., Kihara, T., Kuzuya, A., Okawa, K., Sugimoto, H., Kinoshita, A*. & Shimohama, S*. Characterization of N-cadherin cleavage by ADAM10 and Presenilin 1. *Neurosci Lett.***402**, 278-13 (2006) (*shared last author)

Uemura, K., Kihara, T., Kuzuya, A., Okawa, K., Bito, H., Ninomiya, H., Sugimoto, H., Kinoshita, A*. & Shimohama, S*. Modulation of beta-catenin nuclear signaling via epsilon-cleavage of N-cadherin. *Biochem Biophys Res Commun* **345**, 951-8 (2006). (*shared last author)

Uemura, K., Kuzuya, A., Aoyagi, N., Ando, K., Shimozone, Y., Ninomiya, H., Shimohama, S*.& Kinoshita, A*. Amyloid beta inhibits ectodomain shedding of N-cadherin via down-regulation of cell-surface NMDA receptor. *Neuroscience* **145**, 5-10 (2007) .(*shared last author)

Uemura, K., Kuzuya, A., Shimozone, Y., Aoyagi., N., Ando, K., Shimohama, S. & Kinoshita, A. GSK3beta activity modifies the localization and function of presenilin1. *J Biol Chem.* in press.

(2) 総説

(3) 著書

和文

(1) 原著論文

(2) 総説

木下彩栄、安藤功一、植村健吾 : プレセニリン/ γ セクレターゼによるシナプス蛋白質転写制御機構. *生化学* **78**, 965-972 (2006).

(3) 著書

第5領域 (公募班員)			
研究課題名	Cdk5 の異常活性化機構の解明と抑制法開発及びアルツハイマー病細胞死への応用		
研究代表者名	久永 真市	E-mail	hisanaga-shinichi@c.metro.u.ac.jp
所属・職名	首都大学東京・理工学研究科・生命科学専攻・教授		
研究分担者名			
分担者所属			
研究成果報告書 Cdk5 は制御サブユニット p35 との結合により活性化される脳特異的なプロテインキナーゼであり、また主要なタウキナーゼの一つである。p35 のカルpain による p25 への限定分解は、Cdk5 の脱制御及び異常活性化を引き起こし、タウなどの高リン酸化を経して、アルツハイマー病、筋萎縮性側索硬化症、ニーマンピック病タイプ C などにおける神経細胞死を誘導する可能性が示唆されている。我々は Cdk5 活性の脱制御と神経細胞死の関連について次の4つの観点から研究を進めている。(1) p35 がカルpain によって p25 へ限定分解される仕組みとその防御方法、(2) Cdk5/p25 が細胞死を実行する機構の解明、(3) Cdk5/p25 の活性抑制方法の開発、そして、(4) FTDP-17 型変異タウの高リン酸化機構である。それぞれの研究についての成果を次に記す。 (1) p35 の限定分解を抑制するリン酸化：リン酸化によって p35 の限定分解が制御されること及び、リン酸化部位は Ser8 と Thr138 であることを既に報告した。Ser8 または Thr138 を Ala に変えた変異体ではカルpain による限定分解が抑えられた。2つのリン酸化部位のうち、Thr138 が脳の発達に伴い減少していた。Thr138 はラットの胎児脳ではリン酸化されていたが、成体脳では脱リン酸化されていた。オカダ酸により、Thr138 のリン酸化状態を増加させると、p35 の限定分解がより抑制されていた。神経細胞内でも同様な制御機構が働いているかを調べた。初代培養神経細胞に非リン酸化型 p35 を発現させたところ、神経細胞内でもリン酸化依存的な限定分解のあることが判明した。(JBC, 2007) (2) Cdk5/p25 による細胞死の実行：p35 の限定分解は小胞体 (ER) ストレスでも起こること、限定分解された p25 は細胞質に留まるのではなく、核に移行して細胞死を実行することは報告した。細胞死の実行に関しては、Cdk5 の阻害剤 (Roscovitine) を用いてこれまでは示してきたが、今年は kinase negative な Cdk5 の神経細胞内導入によっても示すことができ、上記結果が改めて確認された (JNC, in press)。Cdk5 は p35 のミリスチル化を経して、細胞質内で膜に結合しており、p25 への限定分解はミリスチル化部分を切り離すことになる。Cdk5/p25 は膜から遊離して、核内へ移行し、細胞死を実行するものと考えられる。(3) Cdk5 の活性阻害剤の開発：Cdk5 阻害剤としては Roscovitine、Olomousine などがよく用いられているが、それらの特異性は必ずしも高くはない。キナーゼ活性部位に対する阻害試薬の開発が結晶構造解析を基に行なわれている。しかし、この方法によっても特異性の高い阻害剤が開発される可能性は低い。我々は Cdk5 の p35 や p39 による活性化 (結合) を抑える試薬を阻害剤候補として考えている。Cdk5 の活性化を研究している過程で、p35 と p39 は Cdk5 の結合性において大きく異なることを見つけた。p35 は Cdk5 に強く結合して、活性化するのに対して、p39 は容易に解離してしまう不安定な複合体を形成していた (JNC, in press)。両者の立体構造予測から結合の安定性に関わる部位を推定した。結合領域のペプチドを合成し、阻害効果を調べたが、意外にも影響が見られなかった。結合に関わる p35 と p39 のアミノ酸を置換して、活性と結合を調べたところ、Cdk5/p35 の高活性化には Ser270 と Ile275 が関わり、結合には Asp259 の影響が大きいことが示唆された。(4) FTDP-17 変異タウのリン酸化：FTDP-17 型変異タウは in vivo (高リン酸化) と in vitro (低リン酸化) でリン酸化状態が異なる。Cdk5 によるリン酸化を詳細に調べたところ、差の一部はタウの微小管との結合によって説明できることを報告した。残りの差については脱リン酸化が原因ではないかと考えて、Cdk5 でリン酸化した FTDP-17 タウの脱リン酸化を調べた。P301L は脱リン酸化され難く、R406W は脱リン酸化されやすい等、変異によりわずかな違いが見られたが、タウ断片を微小管に結合させた時、いずれのタウの脱リン酸化も大きく減少した。微小管結合領域を除いたタウではこのような脱リン酸化抑制が見られなかった。タウが微小管に結合すると、構造変化を起こし、脱リン酸化され難くなるものと考えられる。			

第 5 領域 （公募班員）

研究代表者名 久永 真市

発表論文

英文

（1）原著論文

Yamada, M., Saito, T., Sato, Y., Kawai, Y., Sekigawa, A., Hamazumi, Y., Asada, A., Wada, M., Doi, H. & Hisanaga, S. Cdk5-p39 is a labile complex with the similar substrate specificity to Cdk5-p35. *J. Neurochem.* in press.

Taniguchi, T., Taoka, M., Itakura, M., Asada, A., Saito, T., Kinoshita, M., Takahashi, M., Isobe, T. & Hisanaga, S. Phosphorylation of adult type sept5 (cdcrel-1) by cyclin-dependent kinase 5 inhibits interaction with syntaxin-1. *J. Biol. Chem.* in press.

Saito, T., Konno, T., Asada, A. & Hisanaga, S. p25/Cdk5 promotes the progression of cell death in nucleus of ER-stressed neurons. *J. Neurochem.* in press.

Hara, F., Yamashiro, K., Nemoto, N., Ohta, Y., Yokobori, S., Yasunaga, T., Hisanaga, S. & Yamagishi, A. An actin homolog of the archaeon *Thermoplasma acidophilum* that retains the ancient characteristics of eukaryotic actin. *J. Bacteriol.* **189**, 2039-45 (2007).

Kamei, H., Saito, T., Ozawa, O., Fujita, Y., Asada, A., Bibb, J. A., Saido, T. C., Sorimachi, S. & Hisanaga, S. Suppression of calpain-dependent cleavage of the cdk5 activator p35 to p25 by site-specific phosphorylation. *J. Biol. Chem.* **282**, 1687-94 (2007).

Horiuchi, Y., Asada, A., Hisanaga, S., Toh-e, A. & Nishizawa, M. Identifying novel substrates for mouse Cdk5 kinase using the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Gene to Cell.* **11**, 1393-404 (2006).

Hosokawa, T., Saito, S., Asada, A., Ohshima, T., Itakura, M., Takahashi, M., Fukunaga, K. & Hisanaga, S. Enhanced activation of Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase II upon downregulation of Cyclin-dependent kinase 5-p35. *J. Neurosci. Res.* **84**, 747-54 (2006).

Nagaki, K., Yamamura, H., Shimada, S., Saito, T., Hisanaga, S., Taoka, M., Isobe, T. & Ichimura, T. 14-3-3 mediates phosphorylation-dependent inhibition of the interaction between the ubiquitin E3 ligase Nedd4-2 and epithelium Na⁺ channels. *Biochemistry.* **45**, 6733-40 (2006).

Masuda, M., Suzuki, N., Taniguchi, S., Oikawa, T., Nonaka, T., Iwatsubo, T., Hisanaga, S., Goedert, M. & Hasegawa, M. Small molecule inhibitors of α -tubulin filament assembly. *Biochemistry*. **45**, 6085-94 (2006).

(2) 総説

(3) 著書

和文

(1) 原著論文

(2) 総説

小谷亨、松島一幸、久永真市：微小管結合蛋白質の構造と機能. *蛋白質、核酸、酵素* **51**,535-42 (2006).

(3) 著書

第5領域 (公募班員)			
研究課題名	NMR 構造生物学による神経変性疾患の発症機構の解析		
研究代表者名	山口 芳樹	E-mail	yyoshiki@phar.nagoya-cu.ac.jp
所属・職名	名古屋市立大学大学院薬学研究科・生命分子構造学分野・講師		
研究分担者名	加藤晃一・栗本英治		
分担者所属	名古屋市立大学大学院薬学研究科・生命分子構造学分野		
研究成果報告書 ユビキチン-プロテアソームシステムの破綻に着目し、家族性パーキンソン症候群遺伝子産物である alpha-synuclein および parkin、マシャド・ジョセフ病原遺伝子産物 ataxin-3、アルツハイマー病関連分子であるアミロイド beta (Abeta) を対象として超高磁場 NMR 装置を用いた解析を行った。 <u>1. 安定同位体標識 Abeta (1-40) と糖脂質との相互作用解析</u> 大腸菌による大量発現を行った Abeta (1-40) を調製して、糖脂質 GM1 との相互作用解析を試みた。GM1 ミセルと Abeta (1-40) の複合体は分子量が大きく、通常の NMR 測定ではシグナルを観測することが困難であるが、Abeta (1-40) の非交換性の水素を重水素に置換すること、また超高磁場 920MHz NMR 装置を用いた TROSY 測定を行うことにより、GM1 ミセルに結合した Abeta (1-40) 由来の NMR シグナルを捉えることに成功した。(国立長寿医療センター 柳澤勝彦 博士のグループとの共同研究)。 <u>2. 超高磁場 NMR 装置を利用したリン酸化 alpha-synuclein の動的構造解析</u> Lewy body に含まれている alpha-synuclein の多くは、リン酸化を受けている。安定同位体標識を施したリン酸化 alpha-synuclein を調製し、超高磁場 NMR 装置を利用した解析を行った。その結果、C 末端近傍に位置する Ser129 のリン酸化に伴い、アミノ酸配列上でその周辺に位置するアミノ酸残基に由来する NMR シグナルのみならず、そこから一次構造上離れた部位 (Lys34, Lys45) に由来するシグナルにも化学シフト変化が観測された。この結果から、Ser129 がリン酸化された alpha-synuclein では、その C 末端近傍が分子中央部と相互作用することが示唆された。(東京都精神医学総合研究所 長谷川 成人 博士、東京大学 岩坪 威 博士のグループとの共同研究)。 <u>3. ataxin-3 と di-ubiquitin との相互作用解析</u> マシャド・ジョセフ病の原因遺伝子産物である ataxin-3 の Josephin ドメインは脱ユビキチン活性を有しており、そのユビキチン-プロテアソームシステムにおける役割が注目されている。その脱ユビキチン活性の発現メカニズムを明らかにするため、Lys48 結合型 di-ubiquitin と Josephin ドメインとの相互作用解析を NMR により行った。その結果、Josephin ドメインは di-ubiquitin のイソペプチド結合を囲む疎水性表面と相互作用することが判明した。また、近位ユビキチンの C 末端部位は Josephin ドメインの触媒残基近傍に位置することが明らかとなった。これらの結果から、Josephin ドメインは endo 型の脱ユビキチン活性を有していると考えられる。			

第5領域 (公募班員)

研究代表者名 山口 芳樹

発表論文

英文

(1) 原著論文

Sasakawa, H., Sakata, E., Yamaguchi, Y., Komatsu, M., Tatsumi, K., Kominami, E., Tanaka, K. & Kato, K. Solution structure and dynamics of Ufm1, a ubiquitin-fold modifier 1. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **343**, 21-26 (2006).

Kitahara, R., Yamaguchi, Y., Sakata, E., Kasuya, T., Tanaka, K., Kato, K., Yokoyama, S. & Akasaka, K. Evolutionally conserved intermediates between ubiquitin and NEDD8. *J. Mol. Biol.* **363**, 395-404 (2006).

(2) 総説

Yamaguchi, Y., Takahashi, N. & Kato, K. Molecular interactions: Antibody structures. *Comprehensive Glycoscience* in press .

(3) 著書

和文

(1) 原著論文

(2) 総説

山口芳樹、加藤晃一：NMR による糖鎖 - タンパク質相互作用の解析. *実験医学* in press .

坂田絵理、加藤晃一：構造生物学から見たユビキチン系. *蛋白質 核酸 酵素* **51**, 1134-1142 (2006).

加藤晃一、内海真穂、住吉晃：神経変性疾患にかかわるタンパク質のかたち. *Bionics* **19**, 30-35 (2006).

神谷由紀子、加藤晃一：新生ポリペプチド鎖が小胞体へ移行する前にプロテアソーム分解に導くしくみ. *実験医学* **24**, 2617-2618 (2006).

(3) 著書

第5領域（公募班員）			
研究課題名	アミロイド分子の PET リガンドに関する基礎医学的研究		
研究代表者名	森 啓	E-mail	mori@med.osaka-cu.ac.jp
所属・職名	大阪市立大学・医学研究科・教授		
研究分担者名	渡邊恭良		
分担者所属	大阪市立大学・医学研究科		
研究成果報告書 フラボン誘導体は、試験管内において、$K_d = 13\text{-}77\text{ nM}$ の高い親和性を持って Abeta 凝集体と結合した。また、アルツハイマー病脳切片においては、老人斑ばかりでなく脳血管アミロイドにも強く結合した。ただし、神経原線維変化にも結合することから、チオフラビンの特異性を残していると考えられる。標識化合物を用いた脳組織への高い脳移行性および排出性は、アミロイドイメージングリガンドとして大変好ましい性質である。リガンドの派生物を網羅的に検討し側鎖の異なる化合物を開発した。ジメチルアミノ基を持つ化合物がインビトロの結合実験ではもっとも結合性が高い結果が得られておりますが、実際の AD 切片を用いた染色実験で、すべて陽性に染色するものの両者の結合能は必ずしも平行しない。そこでインビトロの結果から最終化合物を特定するという予測には限界があることが示唆された。そこで、脳内移行性の観点を含めて総合的に判断した結果、あるフラボン化合物を選択した。 $[^{11}\text{C}]$標識したフラボン誘導体のアミロイド結合性は、実際の Tg2576x 変異型 PS1 のダブルトランスジェニックマウスの5ヶ月齢を用いて確認した。さらに同標識化合物は microPET を用いてこのモデルマウスへのリガンド注入後の画像解析をした結果、老人斑をもつモデルマウスでのイメージングが検出され、従来知られている化合物に劣らない可能性が示唆された。 興味あることに、現在臨床治験で実施されている$[^{11}\text{C}]$標識 PIB はアルツハイマー病患者では前頭葉をはじめとした広範な脳領域に高度の陽性信号を示したにも拘わらず、Tg2576 系マウスでは陽性信号を確認することが出来なかった。このモデルとヒト脳との解離は重要な克服すべき課題として残されている。			

第 5 領域 （公募班員）	
研究代表者名	森 啓
発表論文 英文 （1）原著論文 Boekhoorn, K., Terwe, D., Biemans, B., Borghgraef, P., Wiegert, O., Ramakers, L.G., de Vos, K., Krugers, H., Tomiyama, T., <u>Mori, H.</u>, Joels, M., van Leuven, F. & Lucassen, P.J. Improved Long-Term Potentiation and Memory in Young Tau-P301L Transgenic Mice before Onset of Hyperphosphorylation and Tauopathy. <i>J. Neurosci.</i> 26, 3514-3523 (2006). Ono, M., Kawashima, H., Nonaka, A., Kawai, T., Haratake, M., <u>Mori, H.</u>, Kung, M.P., Kung, H.F., Saji, H. & Nakayama, M. Novel Benzofuran Derivatives for PET Imaging of beta-Amyloid Plaques in Alzheimer's disease Brains. <i>J. Med. Chem.</i> 49, 2725-2730 (2006). Ishibashi, K., Tomiyama, T., Nishitsuji, K., Hara, M. & <u>Mori, H.</u> Absence of synaptophysin near cortical neurons containing oligomer Abeta in Alzheimer's disease brain. <i>J. Neurosci. Res.</i> 84, 632-636 (2006). Arai, T., Hasegawa, M., Akiyama, H., Ikeda, K., Nonaka, T., <u>Mori, H.</u>, Mann, D., Tsuchiya, K., Yoshida, M., Hashizume, Y. & Oda, T. TDP-43 is a component of ubiquitin-positive tau-negative inclusions in frontotemporal lobar degeneration and amyotrophic lateral sclerosis. <i>Biochem. Biophys. Res. Commun.</i> 351, 602-611(2006). Bullmann, T., de Silva, R., Holzer, M., <u>Mori, H.</u> & Arendt, T. The expression of embryonic tau protein isoforms persist during adult neurogenesis in the hippocampus. <i>Hippocampus</i> 17, 98-102 (2006). （2）総説 （3）著書 和文 （1）原著論文 （2）総説 （3）著書	

第5領域 (公募班員)			
研究課題名	線虫をモデルとしたタウオパチーの分子メカニズムの解析		
研究代表者名	三谷 昌平	E-mail	mitani1@research.twmu.ac.jp
所属・職名	東京女子医科大学医学部・助教授		
研究分担者名			
分担者所属			
研究成果報告書 タウ蛋白質は神経原繊維変化に蓄積しており、脳の老化に重要である。FTDP-17型タウ変異蛋白質の発現により、認知症様症状を来すことで知られる。タウオパチーは神経細胞死を起こすことで、認知症などの疾患の原因となっていると考えられる。タウオパチーの分子メカニズムを解明するために、線虫神経系にトランスジェニックとして、FTDP-17型変異体あるいは野生型タウを強制発現し、表現型の再構成を行うことに成功した。このトランスジェニック個体を用いて、gene chip解析を行い、候補遺伝子の絞り込みと機能解析を行っている。 これとは並行して、神経細胞死の原因の1つとして知られる小胞体ストレスの分子メカニズムの解析を行っている。線虫で、gon-1 (ADAMTS メタロプロテアーゼ) 変異体は生殖腺の伸長に異常が見られることが知られていた。Cytochrome b をオルガネラマーカーとして使用することにより、この時に、小胞体の形態に異常が出ることが分かった。そこで、小胞体ストレスのマーカーである hsp-4 (BiP) のトランスジェニックで調べたところ、gon-1 遺伝子のノックダウンにより、誘導を受けることが分かった。Gon-1 表現型は、同時に dpf (dipeptidyl peptidase IV) 遺伝子の機能低下を起こすことで抑圧される。dpf 遺伝子のノックアウト株と、そのトランスジェニック株を用いて、dpf 遺伝子の細胞内発現およびペプチダーゼ活性が重要であることが明らかになり、DPF 蛋白質の細胞内過剰発現により、小胞体ストレスが起こることが分かった。dpf 遺伝子変異体に gon-1 RNAi を施すと同時に、小胞体ストレス信号伝達に関わっている分子群 IRE1、ATF6、PERK などのホモログの RNAi を行ったところ、IRE1 と XBP1 のホモログのみで、dpf ノックアウトによる抑圧が解除された。従って、dpf 遺伝子は、通常は、IRE-1/XBP-1 のパスウェイを介して Gon-1 表現型を抑圧していることが明らかになった。また、線虫の gon-1 以外の metaloprotease に対する RNAi を行ったところ、そのうちの一部で、DTC 以外の組織での小胞体ストレスが誘導されることが見出された。これらの小胞体ストレスに対する線虫での分かった現象をヒト細胞で確認するために、HEK293 細胞に ADAMTS9 の siRNA あるいは、線虫の dpf 遺伝子とトランスフェクトしたところ、同様の小胞体ストレスが起こることが確認された。メタロプロテアーゼおよび dpf などのプロテアーゼが小胞体ストレス現象の中でどのように作用しているか、その詳細な分子メカニズムを解析中である。			

第5領域 (公募班員)

研究代表者名 三谷 昌平

発表論文

英文

(1) 原著論文

Dejima, K., Seko, A., Yamashita, K., Gengyo-Ando, K., Mitani, S., Izumikawa, T., Kitagawa, H., Sugahara, K., Mizuguchi, S. & Nomura, K. Essential roles of 3'-phosphoadenosine 5'-phosphosulfate (PAPS) synthase in embryonic and larval development of the nematode *Caenorhabditis elegans*. *J. Biol. Chem.* **281**, 11431-11440 (2006).

Gengyo-Ando, K., Yoshina, S., Inoue, H. & Mitani, S. An efficient transgenic system by TA cloning vectors and RNAi for *C. elegans*. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **349**, 1345-1350 (2006).

Kuroyanagi, H., Kobayashi, T., Mitani, S. & Hagiwara, M. Transgenic alternative-splicing reporters reveal tissue-specific expression profiles and regulation mechanisms in vivo. *Nature Methods* **3**, 909-915 (2006).

Yigit, E., Batista, P., Pang, K.M., Bei, Y., Chen, C.G., Joshua-Tor, N.L., Mitani, S., Simard, M. & Mello, C.C. Analysis of the *C. elegans* Argonaute family reveals that distinct Argonautes act sequentially during RNAi. *Cell* **127**, 747-757 (2006).

Kawano, T., Nagatomo, R., Kimura, Y., Gengyo-Ando, K. & Mitani, S. Disruption of ins-11, one of the *Caenorhabditis elegans* insulin-like genes and phenotypic analyses of the gene-disrupted animal. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **70**, 3084-3087 (2006).

Gengyo-Ando, K., Kuroyanagi, H., Kobayashi, T., Murate, M., Fujimoto, K., Okabe, S. & Mitani, S. The SM protein VPS-45 is required for RAB-5-dependent endocytic transport in *C. elegans*. *EMBO Reports* **8**, 152-157 (2007).

Kawasaki, I., Hanazawa, M., Gengyo-Ando, K., Mitani, S., Maruyama, I. & Iino, Y. ASB-1, a germline-specific isoform of mitochondrial ATP synthase b subunit, is required to maintain the rate of germline development in *Caenorhabditis elegans* *Mech. Dev.* **124**, 237-251 (2007).

Kitagawa, H., Izumikawa, T., Mizuguchi, S., Egusa, N., Taniguchi, F., Gengyo-Ando, K., Mitani, S., Nomura, K. & Sugahara, K. Expression of rib-1, a *Caenorhabditis elegans* Homolog of the Human Tumor

Suppressor EXT Genes is indispensable for heparan sulfate synthesis and embryonic morphogenesis. *J. Biol. Chem.* **282**, 8533-8544 (2007).

Kobayashi, T., Gengyo-Ando, K., Ishihara, T., Katsura, I. & Mitani, S. IFT-81 and IFT-74 are required for intraflagellar transport in *C. elegans*. *Genes to Cells*. in press.

Wang, X., Wang, J., Gengyo-Ando, K., Gu, L., Sun, C-L., Yang, C., Shi, Y., Kobayashi, T., Shi, Y., Mitani, S., Xie, X-S. & Xue, D. *C. elegans* mitochondrial factor WAH-1 promotes phosphatidylserine externalization in apoptotic cells through phospholipid scramblase SCRM-1. *Nature Cell Biology*. in press.

(2) 総説

(3) 著書

和文

(1) 原著論文

(2) 総説

三谷昌平：スーパーモデル実験動物 *C. elegans*. *細胞工学* **25**, 1316-1318 (2006) .

(3) 著書

第5領域（公募班員）			
研究課題名	ネプリライシンの活性低下による神経病理と活性増強機構の解析		
研究代表者名	岩田 修永	E-mail	iwatan@brain.riken.jp
所属・職名	独立行政法人理化学研究所神経蛋白質制御研究チーム・副チームリーダー		
研究分担者名			
分担者所属			
研究成果報告書 ネプリライシン遺伝子を欠損したアミロイド前駆体蛋白質トランスジェニックマウス(NEP-KO×APP-tg マウス)脳内では、老人斑出現前からシナプス終末部位にオリゴマー型アミロイド beta ペプチド (Abeta) が増加すること、歯状回/貫通線維束および海馬 CA1 領域/Schaffer 側枝の神経可塑性が著しく抑制されること、海馬依存的学习・記憶を試験する複数の行動実験で一貫して認知機能の低下が現れることを明らかにした。さらに、この NEP-KO×APP-tg マウス脳に加齢に伴うアミロイド病理の変化についても解析を行い以下の知見を得た。Abeta のN末端部位認識抗体を用いて免疫組織染色を行うと、N 末端配列が DAE から始まる Abeta の蓄積は APP-tg マウスに比較し NEP-KO×APP-tg マウスでは有意であるがそれ程顕著ではなかった。しかし、3 残基目のグルタミン酸が環化した 3pyroE 型 Abeta の N 末端認識抗体で免疫染色を行うと NEP-KO×APP-tg マウス脳では蓄積が顕著に加速することを見出した。また、ウエスタンブロット法を用いた生化学的解析では、ギ酸によってのみ可溶化される画分に加えて、細胞外可溶性画分においても 3pyroE 型 Abeta の上昇が観察されることから、Abeta1-42 の N 末端 2 アミノ酸残基の切断とピログルタミル化（環化）はアミロイド斑形成前に生じると考えられた。一般に、ヒト老人斑を構成する主要 Abeta 分子種は Abeta 3pyroE-42 であり、蓄積 Abeta 分子種は分泌直後の分子種（Abeta 1-42(40)）とは異なることが知られているが、現行のアルツハイマー病モデルマウスでは Abeta 3pyroE-42 の蓄積はほとんど観察されていなかった。このことは、現行のマウスモデルと AD で観察されるアミロイド病理の大きな相違を示すだけでなく、単に Abeta 1-42 を蓄積させただけでは AD 病理を再現するには不十分である可能性を示唆する。一方、Abeta のペプチド内部の複数のアミノ酸残基を放射性同位体で標識した Abeta 1-42 と Abeta 3pyroE -42 を化学合成してラット海馬に注入し <i>in vivo</i> における分解速度を比較したところ、3pyroE 型 Abeta は Abeta 1-42 に比較して極めて分解され難いことが分かった。3pyroE 型 Abeta は、ネプリライシン活性の低下によって生理的な分解経路が遮断された場合、アミノペプチダーゼ/ジペプチジルペプチダーゼやグルタミルサイクラーゼが関与する副経路を経由して形成するものと考えられる。以上、本研究により、ネプリライシンの活性が低下するとヒトに類似するアミロイド病理が引き起こされることを明らかとなり、3pyroE 型 Abeta の産生に関わるものが予想されるグルタミルサイクラーゼの活性阻害が Abeta 蓄積を抑制する新たな作用点になることが示唆された。			

第5領域 (公募班員)

研究代表者名 岩田 修永

発表論文

英文

(1) 原著論文

Huang, S.M., Mouri, A., Kokubo, H., Nakajima, R., Suemoto, T., Higuchi, M., Staufenbiel, M., Noda, Y., Yamaguchi, H., Nabeshima, T., Saido, T.C. & Iwata, N. Neprilysin-sensitive synapse-associated Abeta oligomers impair neuronal plasticity and cognitive function. *J. Biol. Chem.* **281**, 17941-17951 (2006).

Sato, T., Nyborg, A.C., Iwata, N., Dieh, T.S., Saido, T.C. Golde, T.E. & Wolfe, M.S. Signal peptide peptidase: biochemical properties and modulation by nonsteroidal anti-inflammatory drugs. *Biochemistry.* **45**, 8649-8656 (2006).

Asai, M., Iwata, N., Yoshikawa, A., Aizaki, Y., Ishiura, S., Saido, T.C. & Maruyama, K. Berberine alters processing of Alzheimer's amyloid precursor protein to decrease Abeta levels. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **352**, 498-502 (2007).

Yoshiyama, Y., Higuchi, M., Zhang, B., Huang, S.M., Iwata, N., Saido, T.C., Maeda, J., Suhara, T., Trojanowski, J.Q. & Lee, V.M.Y. Synapse loss and microglial activation are early pathological manifestations of tauopathy in a P301S mutant tau transgenic mouse model. *Neuron* **53**, 337-351 (2007).

(2) 総説

Saido, T.C. & Iwata, N. Metabolism of amyloid beta peptide and pathogenesis of Alzheimer's disease-Towards presymptomatic diagnosis, prevention and therapy- *Neurosci. Res.* **54**, 235-253 (2006).

(3) 著書

Iwata, N., Higuchi, M. & Saido, T.C. Abeta-degrading enzyme, neprilysin, In: *Research Progress in Alzheimer's Disease and Dementia.* (Sun, M.K. ed.) Nova Science Publishers, New York, in press.

和文

(1) 原著論文

(2) 総説

丸山将浩、樋口真人、岩田修永、須原哲也、西道隆臣: アルツハイマー病の画像診断. *BIO Clinica* **21**, 361-365 (2006).

岩田修永、斉藤貴志、末元隆寛、西道隆臣: Alzheimer 病の診断 Update、2. Alzheimer 病におけるアミロイド分子病態. *Mebio* **23**, 22-23 (2006).

樋口真人、岩田修永、西道隆臣、須原哲也: MRI によるアミロイドイメージング. *Medical Practice* **23**, 1185-1187 (2006).

黄樹明、岩田修永、西道隆臣: アミロイド分解機構とアルツハイマー病. *最新医学* **61**, 50-56 (2006).

(3) 著書

岩田修永、西道隆臣: アルツハイマー病の発症機序～ネプリライシン. *認知症治療薬開発の最前線* シーエムシー出版, 東京、131-140 (2006).

第5領域（公募班員）			
研究課題名	神経原線維変化形成機構		
研究代表者名	高島 明彦	E-mail	Kenneth@brain.riken.jp
所属・職名	独立行政法人理化学研究所 アルツハイマー病研究チーム・チームリーダー		
研究分担者名	佐原成彦、木村哲也、福田哲也、吉池裕二		
分担者所属	独立行政法人理化学研究所 アルツハイマー病研究チーム		
研究成果報告書			
神経原線維変化はアルツハイマー病やその他の神経変性疾患における病理学的特徴の一つで、過剰にリン酸化されたタウが繊維化し神経細胞内に沈着した病理像である。神経原線維変化の量と認知症の程度には相関があり、神経原線維変化形成が神経機能低下を引き起こすと考えられてきた。近年のマウスモデルを用いた研究では、タウの過剰発現を神経原線維変化が出来る時期に抑制するとマウスの記憶学習は改善されるが、神経原線維変化は形成され続けた。このことは、神経原線維よりもそれを形成する機構が神経機能低下を引き起こしている事を示唆した。そこで神経原線維変化が形成される前のタウと脳機能の関係を調べるため前脳領域特異的な alpha CaMKII プロモーター下で野生型 4 R2N ヒトタウタンパクを過剰発現する Tg マウスを作製し、行動実験・MRI・免疫組織化学の手法により Tg マウスの加齢に伴う脳機能の変化を調べた。Tg マウスは内在性タウの 3-5 倍の発現を示したが、組織学的な検討から、高齢になっても神経脱落も神経原線維変化も示さないことが確認されている。この Tg マウスは 12 ヶ月令では学習障害を示さなかったが老齢期（25 ヶ月令）において運動機能障害なしに Morris water maze による場所（空間）学習課題における有意な障害が観察された。この実験からヒト野生型タウを発現するマウスでは加齢に伴って神経原線維変化形成なしに記憶学習機能に異常が起きていることが示唆された。行動中のマウス脳活動を可視化するため Mn-enhanced MRI 法を用い空間学習時のマウスの脳活動パターンを測定すると Tg マウスにおいて perirhinal 及び entorhinal cortex の神経活動の低下が観察され、加齢によるこの部位の機能低下と学習能力の低下が有意に相関することが示された。リン酸化タウの免疫組織化学により、不活性化部位のニューロンで特異的に PHF1 サイトがリン酸化されたタウタンパクの蓄積が見いだれた。神経細胞の脱落がこの部位で観察されなかったことから、野生型タウ Tg マウスの加齢に伴う学習障害は perirhinal cortex や entorhinal cortex における神経原線維変化形成や神経脱落ではなくタウ蛋白のリン酸化（PHF 1 サイト）が関与する可能性が示されたのである。このマウスモデルはヒト同様加齢に伴い entorhinal cortex にリン酸化タウが蓄積し entorhinal/hippocampus 機能に障害を示すことから、ヒト脳老化を反映するマウスモデルと考えることが出来る。			

第5領域 (公募班員)

研究代表者名 高島 明彦

発表論文

英文

(1) 原著論文

Sahara, N., Maeda, S., Murayama, M., Suzuki, T., Dohmae, N., Yen, S.H. & Takashima, A. Assembly of two distinct dimers and higher-order oligomers from full-length tau. *EJN* in press

Mizoroki, T., Meshitsuka, S., Maeda, S., Murayama, M., Sahara, N. & Takashima, A.: Aluminum induces tau aggregation in vitro but not in vivo. *J. Alzheimer's disease*. in press.

Maeda, S., Sahara, N., Kim, H., Saito, Y., Akagi, T., Miyasaka, T., Hashikawa, T., Murayama, S., Ikai, A., & Takashima, A. Granular tau oligomers as intermediates of tau filaments. *Biochem. J.* in press.

Shimojo, M., Sahara, N., Murayama, M., Ichinose, H. & Takashima, A. Decrease Aβs secretion in Familial Alzheimer's disease-linked mutant Presenilin 1. *Neurosci. Res.* in press.

Yamamoto, N., Matsubara, E., Maeda, S., Minagawa, H., Takashima, A., Maruyama, W., Michikawa, M. & Yanagisawa, K. A ganglioside-induced toxic soluble Abeta assembly: Its enhanced formation from Abeta bearing the Arctic mutation. *J Biol Chem.* **282(4)**,2646-55(2007). [Epub 2006 Nov 29]

Yamada, M., Tanemura, K., Okada, S., Iwanami, A., Nakamura, M., Mizuno, H., Ozawa, M., Ohyama-Goto, R., Kitamura, N., Kawano, M., Tan-Takeuchi, K., Ohtsuka, C., Miyawaki, A., Takashima, A., Ogawa, M., Toyama, Y., Okano, H. & Kondo, T. Electrical stimulation modulates fate determination of differentiating embryonic stem cells. *Stem Cells*. in press.

Ide, M., Ohnishi, T., Murayama, M., Matsumoto, I., Yamada, K., Iwayama, Y., Dedova, I., Toyota, T., Asada, T., Takashima, A. & Yoshikawa, T. Failure to support a genetic contribution of AKT1 polymorphisms and altered AKT signaling in schizophrenia. *J Neurochem.* **99(1)**,277-87(2006).

Araya, R., Noguchi, T., Yuhki, M., Kitamura, N., Higuchi, M., Saido, T.C., Seki, K., Itohara, S., Kawano, M., Tanemura, K., Takashima, A., Yamada, K., Kondoh, Y., Kanno, I., Wess, J. & Yamada, M. Loss of M5 muscarinic acetylcholine receptors leads to cerebrovascular and neuronal abnormalities and cognitive deficits in mice. *Neurobiol Dis.* **24(2)** 334-44[Epub 2006 Sep 7](2006).

Takashima, A., Shimojo, M. & Wolozin, B. The players on the gamma-secretase team. *Nat Med.* **12(7)**,766-7(2006).

Takashima, A. : GSK-3 is essential in the pathogenesis of Alzheimer's disease. *J Alzheimers Dis.* **9(3)Suppl**,309-17(2006).

Shukkur, E.A., Shimohata, A., Akagi, T., Yu, W., Yamaguchi, M., Murayama, M., Chui, D., Takeuchi, T., Amano, K., Subramhanya, K.H., Hashikawa, T., Sago, H., Epstein, C.J., Takashima, A. & Yamakawa, K. Mitochondrial dysfunction and tau hyperphosphorylation in Ts1Cje, a mouse model for Down syndrome. *Hum Mol Genet.* **15(18)**,2752-62 [Epub 2006 Aug 4](2006).

Fujiwara, H., Iwasaki, K., Furukawa, K., Seki, T., He, M., Maruyama, M., Tomita, N., Kudo, Y., Higuchi, M., Saido, T.C., Maeda, S., Takashima, A., Hara, M., Ohizumi, Y. & Arai, H. Uncaria rhynchophylla, a Chinese medicinal herb, has potent antiaggregation effects on Alzheimer's beta-amyloid proteins. *J Neurosci Res.* **84(2)**,427-33(2006).

Tatebayashi, Y., Planel, E., Chui, D.H., Sato, S., Miyasaka, T., Sahara, N., Murayama, M., Kikuchi, N., Yoshioka, K., Rivka, R. & Takashima, A. c-jun N-terminal kinase hyperphosphorylates R406W tau at the PHF-1 site during mitosis. *FASEB J.* **20(6)** ,762-4(2006).

(2) 総説

(3) 著書

和文

(1) 原著論文

(2) 総説

(3) 著書

第5領域（公募班員）			
研究課題名	アミロイドとミクログリアの生体画像化による抗アミロイド療法の機構解明と評価法確立		
研究代表者名	樋口 真人	E-mail	mhiguchi@nirs.go.jp
所属・職名	独立行政法人放射線医学総合研究所・チームリーダー		
研究分担者名			
分担者所属			
研究成果報告書 本研究ではアルツハイマー病の根本治療法と抗アミロイド療法の治療効果と副作用を画像で評価するシステムを確立することを第一の目的とし、このシステムで評価しうる治療効果に基づいて、抗アミロイド療法の生体脳における分子機構を明らかにすることを第二の目的とした。 平成18年度は、老人斑モデルマウスであるアミロイド前駆体蛋白トランスジェニックマウス（APP23 マウス）の生体脳におけるアミロイド病変を可視化し、加齢や Aβ ワクチン療法をはじめとする抗アミロイド療法に伴うアミロイドの変化を、経時的かつ定量的に評価することをまず試みた。小動物用ポジトロン断層撮影装置（マイクロ PET）とポジトロン標識アミロイドプローブ [^{11}C]6-OH-BTA-1 を用いて、APP23 マウスにおけるアミロイド病変の加齢変化を示しえた。可視化成功の理由として、適切なモデルマウスを選択したことと、ヒトアミロイドよりも存在密度が低いマウスアミロイド内高親和性結合部位を、プローブの比放射能を高めることで検出しえたことが挙げられる。さらに Aβ ワクチン療法の評価では、抗 Aβ 抗体を注入した側の海馬でアミロイドが減少することを [^{11}C]6-OH-BTA-1 により画像化したのみならず、同時に活性化ミクログリアの PET プローブ [^{18}F]fluoroethyl-DAA1106 を用いて、治療後のミクログリア活性化を経時的に追跡しうることを明らかにした。その際に治療前のアミロイド量が多い個体ほど治療後のミクログリア活性化が強いことが判明し、アミロイド蓄積量が多い場合にはワクチン療法でミクログリアの過剰な活性化が起こる恐れが高いことが示された。これら一連の成果は、平成19年3月の国際アルツハイマー・パーキンソン病学会で発表し、さらに現在論文を投稿中である。 抗アミロイド療法でミクログリアが過剰に活性化された場合、神経原線維変化をはじめとするタウ蛋白病理にも影響を及ぼすと考えられたため、変異型タウ蛋白トランスジェニックマウス（P301S マウス）におけるミクログリアの活性と神経変性病理の因果関係を検討した。生体 MRI 検査により、P301S マウスでは生後9ヶ月頃より神経細胞死に伴う脳萎縮が起こることが判明したが、その一方ミクログリアトレーサーDAA1106 による解析で、ミクログリア活性化はそれよりはるか以前の生後3ヶ月で既に始まっていることが分かった。さらに免疫抑制剤 FK506 を用いてミクログリア活性化を抑制したところ、神経変性が顕著に抑えられることが明らかになった。従ってミクログリアはタウ蛋白異常に基づく神経変性に本質的に関わっており、これを過剰に活性化させないように抗アミロイド療法の最適化を図る必要があると考えられた。そのような最適化を行う際の指標として、 [^{18}F]fluoroethyl-DAA1106 による画像検査が有用であることが示唆された。P301S マウスにおけるこれらの成果は雑誌 Neuron に掲載された。			

第5領域 (公募班員)

研究代表者名 樋口 真人

発表論文

英文

(1) 原著論文

Haneda, E., Higuchi, M., Maeda, J., Inaji, M., Okauchi, T., Ando, K., Obayashi, S., Nagai, Y., Narazaki, M., Ikehira, H., Nakao, R., Zhang, M.R., Suzuki, K., Suzuki, H. & Suhara, T. In vivo mapping of substance P receptors in brains of laboratory animals by high-resolution imaging systems. *Synapse* **61**, 205-215 (2007).

Yoshiyama, Y., Higuchi, M., Zhang, B., Huang, S.M., Iwata, N., Saido, T.C., Maeda, J., Suhara, T., Trojanowski, J.Q. & Lee, V.M.Y. Synapse loss and microglial activation precede tangles in a P301S tauopathy mouse model. *Neuron* **53**, 337-351 (2007).

(2) 総説

Higuchi, M., Saido, T.C. & Suhara, T. Animal models of tauopathies. *Neuropathology* **26**, 491-497 (2006).

(3) 著書

和文

(1) 原著論文

(2) 総説

樋口真人：MRI, PET による老人斑の画像化. *Dementia Japan* **19(3)**, 243-255 (2006).

樋口真人、西道隆臣：MRI を用いてマウスの老人斑を見る. *生体の科学* **57(2)**, 145-152 (2006).

樋口真人：脳アミロイドの分子イメージング. *Mebio* **23(6)**, 34-47 (2006).

樋口真人、岩田修永、西道隆臣、須原哲也：MRI によるアミロイドイメージング. *Medical Practice* **23(7)**, 1185-1187 (2006).

樋口真人：Surrogate marker としてのバイオマーカーと画像. *Cognition and Dementia* **5(4)**, 37-46 (2006).

(3) 著書

第5領域 (公募班員)			
研究課題名	高齢者タウオパチーの臨床分子病理学的研究		
研究代表者名	村山 繁雄	E-mail	smurayam@tmig.or.jp
所属・職名	東京都老人総合研究所・高齢者ブレインバンク・研究部長		
研究分担者名	齊藤祐子		
分担者所属	東京都老人医療センター剖検病理科		
研究成果報告書 目的：アミロイド仮説には従わない高齢者タウオパチーの疾患概念確立を目的とする。本年度は、進行性核上性麻痺（PSP）の解剖学的部位別 τ isoform 沈着を検討した。さらに、老人斑（SP）に比し神経原線維変化（NFT）が優位である（NFTC）群を臨床病理学的に検討した。 方法：PSP5 例について、下オリーブ核、橋核、青斑核、黒質、小脳歯状核、海馬・嗅内野、マイネルト基底核、視床下核、淡蒼球、被殻、中心前回を含む中性ホルマリリン 7-14 日固定パラフィン包埋 6μm 厚切片を、H.E.、K.B.、Gallyas-Braak 染色で観察、抗 4 repeat (R) tau (RD4, Upstate)、3R tau (RD3, Upstate)、リン酸化特異抗体（AT8: Ser202/Thr205）を用い、Ventana NX20 で自動免疫染色を行った結果を比較検討した。さらに三抗体による Western blot で検討した。 NFTC について、高齢者ブレインバンクの 1995 年 1 月から 2006 年 3 月までの、DNA 保存 50 歳以上開頭連続剖検 1,590 例に、それ以前の百寿例 38 例を加えた 1628 例を対象とし、Braak らの NFT II 以下/ III 以上および SP A 以下/B 以上で分け、1)軽微変化群（MSC 群）、2)SP 優位型変化群（PSC）3)AD 型変化群（ADC 群）、4)NFT 優位型変化群（NFTC 群）の 4 群に分類、後方視的に CDR を決定、apoE 遺伝子多型を決め、他の老年性変化との関連を比較検討した。 結果：RD3 陽性の NFT は青斑核、マイネルト基底核、嗅内野で認めたが、Braak stage III の症例で強く、Braak stage I の症例ではわずかだった。RD4 陽性所見が AT8 陽性所見を凌駕する所見は、すべての部位で認められたが、下オリーブ核、橋核、黒質、小脳歯状核、視床下核、淡蒼球、被殻、中心前回で顕著であった。これらの所見は blot でも確認された。 NFTC 群は症例数 131 例で、特殊な 2 例を除き NFT ステージは全て IV 以下だった。死亡時年齢とともに頻度が上がり、90 歳代で頭打ちとなる ADC 群とは異なった年齢別分布を示した。平均死亡時年齢 (87.7$\pm$8.4) において他の 3 群より高いが、ADC 群とは有意差がなかった。ApoE 遺伝子多型について、E4 の所有率が 4 群のなかでもっとも低かった（1.9%）が、MSC 群とは有意差がなかった。PSC・ADC 両群よりアミロイドアンギオパチーのステージは有意に低く、嗜銀性顆粒のステージは有意に高かったが、MSC 群とは両病変とも有意差がなかった。astrocytic tangle の出現頻度は他の 3 群より有意に高かった。 考察：PSP における 3R+4R τ 陽性 NFT は、Braak の NFT ステージ分類の分布にほぼ従っており、加齢に伴う変化の合併と判断された。RD4 が AT8 を凌駕する所見は、今回検索した全ての部位で確認され、PSP の疾患特異的变化であることが確認された。 NFTC は、年齢別頻度、他の老年性変化の合併、apoE 遺伝子多型を総合的に評価した時、他の三群とは異なる特徴を有しており、老年性変化の一型とする妥当性が示された。			

第5領域 (公募班員)

研究代表者名 村山 繁雄

発表論文

英文

(1) 原著論文

Harada, H., Tamaoka, A., Ishii, K., Shoji, S., Kametaka, S., Kametani, F., Saito, Y. & Murayama, S.: Beta-site APP cleaving enzyme 1 (BACE1) is increased in remaining neurons in Alzheimer's disease brains. *Neurosci Res.* **54**, 24-29 (2006).

Mitsui, J., Saito, Y., Momose, T., Shimizu, J., Arai, N., Shibahara, J., Ugawa, Y., Kanazawa, I., Tsuji, S. & Murayama, S. Pathology of the sympathetic nervous system corresponding to the decreased cardiac uptake in 123I-metaiodobenzylguanidine (MIBG) scintigraphy in a patient with Parkinson disease. *J Neurol Sci.* **243**, 101-104 (2006).

Maeda, S., Sahara, N., Saito, Y., Murayama, S., Ikai, A. & Takashima, A.: Increased levels of granular tau oligomers: an early sign of brain aging and Alzheimer's disease. *Neurosci Res.* **54**, 179-201 (2006).

Mizuta, I., Satake, W., Nakabayashi, Y., Ito, C., Suzuki, S., Momose, Y., Nagai, Y., Oka, A., Inoko, H., Fukae, J., Saito, Y., Sawabe, M., Murayama, S., Yamamoto, M., Hattori, N., Murata, M. & Toda, T. Multiple candidate gene analysis identifies a-synuclein as a susceptibility gene for sporadic Parkinson's disease. *Hum Mol Gen.* **15**, 1151-8 (2006).

Umemura, K., Yamashita, N., Yu, X., Arima, K., Asada, T., Makifuchi, T., Murayama, S., Saito, Y., Kanamaru, K., Goto, Y., Kohsaka, S., Kanazawa, I. & Kimura, H. Autotaxin expression is enhanced in frontal cortex of Alzheimer-type dementia patients. *Neurosci Lett.* **400**, 97-100 (2006).

Silva, R., Lashely, T., Strand, C., Shiarli, A.M., Shi, J., Tian, J., Bailery, K.L., Davies, P., Higio, E.H., Arima, K., Iseki, E., Murayama, S., Kretschmar, H., Neumann, M., Lippa, C., Halliday, G., Mackenzie, J., Ravid, R., Dickson, D., Wszolek, Z., Iwatsubo, T., Pickering-Brosn, S.M., Hoton, J., Lees, A., Tavesz, T. & Mann, D.M. An immunohistochemical study of cases of sporadic and inherited frontotemporal lobar degeneration using 3R- and 4R-specific tau monoclonal antibodies. *Acta Neuropathologica.* **111**, 329-40 (2006).

Sawabe, M., Arai, T., Kasahara, I., Hamamatsu, A., Esaki, Y., Nakahara, K. I., Harada, K., Chida, K., Yamanouchi, H., Ozawa, T., Takubo, K., Murayama, S. & Tanaka, N. Sustained progression and loss of the

gender-related difference in atherosclerosis in the very old: A pathological study of 1074 consecutive autopsy cases. *Atherosclerosis*. **186**,374-379 (2006).

Shiarli, AM., Jennings, R., Shi, J., Bailey, K., Davidson, Y., Tian, J., Bigio, EH., Ghetti, B., Murrell, JR., Delisle, MB., Mirra, S., Crain, B., Zolo, P., Arima, K., Iseki, E., Murayama, S., Kretschmar, H., Neumann, M., Lippa, C., Halliday, G., Mackenzie, J., Khan, N., Ravid, R., Dickson, D., Wszolek, Z., Iwatsubo, T., Pickering-Brown, S.M. & Mann, D.M. Comparison of extent of tau pathology in patients with frontotemporal dementia with Parkinsonism linked to chromosome 17 (FTDP-17), frontotemporal lobar degeneration with Pick bodies and early onset Alzheimer's disease. *Neuropathol Appl Neurobiol*. **32**, 374-387 (2006).

Ishida, K., Mitoma, H., Wada, Y., Oka, T., Shibahara, J., Saito, Y., Murayama, S. & Mizusawa, H. Selective loss of Purkinje cells in a patient with anti-glutamic acid decarboxylase antibody-associated cerebellar ataxia. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. **78**,190-192 (2007).

Kobayashi, S. Takuma, H., Murayama, S., Sakurai, M. & Kanazawa, I. A Japanese family with early-onset ataxia with motor and sensory neuropathy. *J Neurol Sci*. **254**,44-48 (2007).

Fumimura, Y., Ikemura, M., Saito, Y., Sengoku, R., Kanamaru, K., Sawabe, M., Arai, T., Ito, G., Iwatsubo, T., Fukayama, M., Mizusawa, H. & Murayama, S. Analysis of the adrenal gland is useful for evaluating pathology of the peripheral autonomic nervous system in Lesy body disease. *J Neuropath Exp Neurol*. in press.

Maeda, S., Sahara, N., Saito, Y., Murayama, M., Yuji, Y., Kim, H., Miyasaka, T., Murayama, S., Ikai, A. & Takashima, A. Granular Tau Oligomers as Intermediates of Tau Filaments. *Biochemistry* in press.

Mohri, I., Kadoyama, K., Kanekiyo, T., Sato, Y., Kagitani-Shimono, K., Saito, Y., Suzuki, K., Kudo, T., Takeda, M., Urade, Y., Murayama, S. & Taniike, M: Prostaglandin D₂ receptor, DP₁ is selectively up-regulated in microglia and astrocytes within senile plaques from human patients and a mouse model of Alzheimer's disease. *J Neuropath Exp Neurol*. in press.

Kanekiyo T, Ban T, Aritake K, Huang Z-L, Qu, W-M., Okazaki, I., Mohri, I., Murayama, S., Ozono, K., Taniike, M., Goto, Y. & Urade, Y. Lipocalin-type prostaglandin D synthase/ β -trace is a major amyloid β -chaperone in human cerebrospinal fluid. *PNAS*. in press.

(3) 著書

和文

(1) 原著論文

(2) 総説

初田裕幸、村山繁雄：プリオン病の病理学的診断. *神経内科* **63**,452-458(2006).

村山繁雄：末梢神経・筋疾患の病理のみかた. *病理と臨床* **24**, 1143(2006).

村山繁雄：序論：病理の中での神経・筋の位置づけ. *病理と臨床* **24**, 1144- 1155(2006).

村山繁雄：進行性多巣性白質脳症. *日内会誌* **95**,46- 50(2006).

村山繁雄：認知症の動的神経病理. *臨床検査* **50**, 1083- 1084(2006).

村山繁雄、齊藤祐子：ブレインバンク. *脳と神経* **58**, 1075- 1084(2006).

村山繁雄、齊藤祐子：老化と認知症の臨床・画像・病理連関（動的神経病理）による解明 - ブレインバンクプロジェクト. *臨床検査* **50**,1085- 1089(2006).

齊藤祐子、村山繁雄：病理学的観点からの軽度認知機能障害. *Modern Physician 2006* **26**,1889-1892(2006).

(3) 著書

村山繁雄：アルツハイマー病診断. 真興交易、東京、(2006).

第5領域（公募班員）			
研究課題名	タウ、 α シヌクレイン、アミロイド β 蛋白を介した神経変性の解明と治療に関する研究		
研究代表者名	長谷川 成人	E-mail	masato@prit.go.jp
所属・職名	東京都精神医学総合研究所、分子神経生物学研究チーム・チームリーダー		
研究分担者名			
分担者所属			
研究成果報告書 【背景】多くの神経変性疾患では、細胞内にタンパク質性の凝集体が出現することが明らかとなっている。凝集体の形成、あるいはその形成過程で、機能障害や細胞死が誘導され発症に至ると考えられているが、それらの機構などは明らかになっていない。パーキンソン病などで認められるレビー小体は、リン酸化αシヌクレインを主要構成成分とし、他にユビキチンやプロテアソームサブユニットなどが含まれている。したがって、細胞内タンパク質分解系に異常が生じ凝集体が形成される可能性が考えられる。 【目的】本研究では、細胞内凝集体の形成と神経変性の機構を明らかにすることを目的として、αシヌクレインがプロテアソーム活性に及ぼす影響について検討した。 【方法】Green fluorescence protein（GFP）のC末端側にプロテアソームにより分解されるシグナル配列 CL1（ACKNWFSSLSHFVIHL）を付加したプラスミド（pEGFP-CL1, Science, 292, 1552-, 2001）を構築した。αシヌクレインおよび種々の変異体をコードするプラスミドと共に神経芽細胞 SH-SY5Y に共発現させ共焦点レーザー顕微鏡にて観察した。また同様に処理した細胞を回収し、得られたライセートをイムノブロットで解析した。 【結果】GFP-CL1 を単独で発現させると、GFP 発現の場合に比べて GFP 陽性細胞数は減少した。GFP-CL1 と野生型αシヌクレインを共発現させると、GFP-CL1 単独の場合よりも GFP 陽性細胞数が増大した。これらよりライセートを調製してイムノブロット解析を行うと、GFP-CL1 単独の場合では GFP-CL1 のバンドがほとんど検出できないのに対し、αシヌクレインを共発現させた場合にはこのバンドは顕著に増大した。したがって SH-SY5Y 細胞において、αシヌクレインの過剰発現がプロテアソーム活性を抑制することが示された。また、A53Tαシヌクレイン変異体を共発現させると、野生型の場合より強くプロテアソーム活性を抑制することが判明した。一方、<i>in vitro</i> において線維化しない変異体（73～83 残基を欠損させた変異体）やβシヌクレインを共発現させた場合、プロテアソーム活性は抑制されなかった。さらに、この細胞モデルが、αシヌクレイン発現によるプロテアソーム活性の低下を打ち消し、細胞の状態を改善させる作用を有する低分子化合物のスクリーニングに応用できることを明らかにした。 【考察】本研究によりαシヌクレインがプロテアソーム機能に影響を及ぼすことが明らかとなった。また、本研究で構築した細胞モデルはプロテアソーム機能を活性化する新規薬剤の探索に有用であると考えられる。			

第5領域 (公募班員)

研究代表者名 長谷川 成人

発表論文

英文

(1) 原著論文

Hasegawa, M., Arai, T., Akiyama, H., Nonaka, T., Mori, H., Hashimoto, T., Yamazaki, M. & Oyanagi, K. TDP-43 is deposited in the Guam parkinsonism-dementia complex brains. *Brain* in press.

Arai, T., Hasegawa, M., Akiyama, H., Ikeda, K., Nonaka, T., Mori, H., Mann, D., Tsuchiya, K., Yoshida, M., Hashizume, Y. & Oda, T. TDP-43 is a component of ubiquitin-positive tau-negative inclusions in frontotemporal lobar degeneration and amyotrophic lateral sclerosis. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **351**, 602-611 (2006).

Kim, E.J., Sung, J.Y., Lee, H.J., Rhim, H., Hasegawa, M., Iwatsubo, T., Min, D.S., Kim, J., Paik, S.R., Chung, K.C. Dyrk1A phosphorylates alpha-synuclein and enhances intracellular inclusion formation. *J Biol Chem.* **281**, 33250-33257 (2006).

Masuda, M., Suzuki, N., Taniguchi, S., Oikawa, T., Nonaka, T., Iwatsubo, T., Hisanaga, S.I., Goedert, M. & Hasegawa, M. Small molecule inhibitors of alpha-synuclein filament assembly. *Biochemistry* **45**, 6085-6094 (2006).

Masuda, M., Dohmae, N., Nonaka, T., Oikawa, T., Hisanaga, S., Goedert, M. & Hasegawa, M. Cysteine misincorporation in bacterially expressed human alpha-synuclein. *FEBS Lett.* **580**, 1775-1779 (2006).

Sakai, K., Piao, Y.S., Kikugawa, K., Ohara, S., Hasegawa, M., Takano, H., Fukase, M., Nishizawa, M., Kakita, A. & Takahashi, H. Corticobasal degeneration with focal, massive tau accumulation in the subcortical white matter astrocytes. *Acta Neuropathol. (Berl)* **112**, 341-348 (2006).

Wakabayashi, K., Mori, F., Hasegawa, M., Kusumi, T., Yoshimura, I., Takahashi, H. & Kaneko, S. Co-localization of beta-peptide and phosphorylated tau in astrocytes in a patient with corticobasal degeneration. *Neuropathology* **26**, 66-71 (2006).

(2) 総説

Hasegawa, M. Biochemistry and molecular biology of tauopathies. *Neuropathology* **26**, 484-490 (2006).

(3) 著書

和文

(1) 原著論文

(2) 総説

長谷川成人： α シヌクレイン. *最新医学* **61**, 94-100 (2006).

笈川貴行、長谷川成人：タウとアルツハイマー病. *医学のあゆみ* **220**, 374-378(2006).

増田雅美、長谷川成人：タウ病理の阻害薬. *Pharma Medica* **24**,55-58 (2006).

長谷川成人、新井哲明、野中隆、亀谷富由樹、秋山治彦、池田研二：前頭側頭型認知症の生化学. *Dementia Japan* **20**, 36-45 (2006).

(3) 著書

長谷川成人：タウ:老年期認知症ナビゲーター（平井俊策監修）東京：メディカルレビュー社、218-219 (2006).

長谷川成人：神経原線維変化:老年期認知症ナビゲーター（平井俊策監修）東京：メディカルレビュー社、 214-215(2006).

第5領域 (公募班員)			
研究課題名	脳内コレステロール代謝調節によるアルツハイマー病発症予防・治療に関する研究		
研究代表者名	道川 誠	E-mail	michi@nils.go.jp
所属・職名	国立長寿医療センター研究所 アルツハイマー病研究部・部長		
研究分担者名			
分担者所属			
研究成果報告書 背景：脳内コレステロール代謝に関連する <i>ApoE</i>, <i>ABCA1</i>, <i>CYP46</i> などの遺伝子多型とアルツハイマー病発症との関連が指摘されているが、脳内コレステロール代謝の理解は十分ではない。脳脊髄液中には HDL のみ存在し、それがシナプス可塑性維持や神経修復ならびに Amyloid beta 蛋白(Aβ)除去に働くこと、脳内 HDL 産生には <i>ApoE</i> および <i>ABCA1</i> が関与すること、<i>ApoE</i> による HDL 産生は <i>ApoE</i> のアイソフォーム依存的である(<i>ApoE3</i>><i>ApoE4</i>)こと等が明らかになっている（細胞外 <i>ApoE</i> の作用）。一方、細胞内に取り込まれた <i>ApoE</i> は再利用され <i>ApoE</i>-HDL 粒子として分泌されるが、その効率に <i>ApoE3</i> と <i>ApoE4</i> で大きな違いがある (<i>ApoE3</i>><i>ApoE4</i>)ことが分かっている（細胞内 <i>ApoE</i> の作用）。しかし、その詳細は不明である。 目的：(1) <i>ApoE</i> や <i>ABCA1</i> 等によって担われる脳内コレステロール代謝の主要経路の解明と HDL 産生における <i>ApoE</i> アイソフォーム依存性の分子機構の解明（細胞外 <i>ApoE</i> 作用）。 (2) <i>ApoE</i> あるいは <i>ABCA1</i> の機能制御による脳内コレステロール代謝調節を通してのアルツハイマー病病理発現の抑制法の開発。 (3)細胞内 <i>ApoE</i> 輸送機構ならびに細胞内 <i>ApoE</i> 機能の解明（細胞内 <i>ApoE</i> 作用）。 方法：(1) ラット大脳皮質から調整した神経細胞培養に各種 <i>ApoE</i> 等のアクセプターを投与し培地中へ放出された脂質（コレステロールおよびリン脂質）を定量する。<i>ApoE</i> は、ヒト <i>ApoE3</i>, <i>ApoE4</i>, 変異 <i>ApoE4</i>, 22 kDa-<i>ApoE3</i> ならびに <i>ApoE4</i> 断片、10 kDa の C 末端断片を用いる。 (2)脳内 HDL 産生を増強させる薬剤スクリーニングを確立し、薬剤探索を行う。 (3) FLAG-<i>ApoE</i> リコンビナント蛋白質を用いたアフィニティーカラムを用いた実験から、<i>ApoE</i> に結合しうる蛋白質を同定後、その機能解析を行う。 結果：(1): (i)<i>ApoE</i> によるコレステロール搬出は N 末端断片のみでアイソフォーム依存的である、(ii)その理由は <i>ApoE3</i> N 末端断片が持つシステイン間による disulfide 結合による 2 量体形成（分子間相互作用）にある、(iii)C 末端断片はそれ自体ではコレステロール搬出能が弱い、N 末端断片の作用を相加的に修飾する、(iv)しかし <i>ApoE4</i> では、ドメイン相互作用のため C 末端断片が相加的に働かない（分子内相互作用）ことを明らかにし(論文投稿中)、<i>ApoE</i> アイソフォーム特異的 HDL 産生機構のほぼ全容が明らかにした。 (2) 薬剤スクリーニング系を確立し、複数の薬剤ライブラリーを用いて探索を開始した。 (3) 細胞内で <i>ApoE4</i> に特異的に結合する蛋白質を複数同定することに成功した。 考察：目的(1): 細胞外における <i>ApoE</i> のアイソフォーム依存的機能(HDL 産生)のメカニズムのほぼ全容を解明した。一度分泌された細胞外の <i>ApoE</i> 構造を変えることは比較的困難であると現時点では考え、<i>ApoE4</i> の劣った HDL 産生作用を補強するために細胞側因子である <i>ABCA1</i> の発現増強を標的にしている。そのためのプロジェクトは、目的(2)に示すとおりである。これに関しては現在薬剤スクリーニング系を確立して探索を開始した。来年度以降、候補薬剤を同定し、Aβ 沈着などアルツハイマー病病理に対する影響をモデルマウスで確認する予定である。目的(3)：細胞内における <i>ApoE</i> のアイソフォーム依存的輸送機構に関しては、本年度において <i>ApoE4</i> に特異的に結合する蛋白質を同定した。現在、この蛋白質の機能解析を行っている。			

第5領域 (公募班員)

研究代表者名 道川 誠

発表論文

英文

(1) 原著論文

Yamamoto, N., Matsubara, E., Maeda, S., Minagawa, H., Takashima, A., Maruyama, W., Michikawa, M. & Yanagisawa, K. A ganglioside-induced toxic soluble A β assembly. *J. Biol. Chem.* in press.

Wollmer, MA., Kapaki, E., Hersberger, M., Muntwyler, J., Brunner, F., Tsolaki, M., Akatsu, H., Kosaka, K., Michikawa, M., Molyva, D., Paraskevas, GP., Lutjohann, D., von Eckardstein, A., Hock, C., Nitsh, RM. & Papassotiropoulos, A. Ethnicity-dependent genetic association of ABCA2 with sporadic Alzheimer's disease. *Am. J. Med. Genet. B. Neuropsychiatr. Genet.* **141(5)**, 534-536 (2006).

Byun, K., Kim, J., Cho, S-Y., Hutchinson, B., Yang, S-R., Kang 'K-S., Cho, M., Hwang, K., Michikawa, M., Jeon, Y-W., Paik, Y-K. & Lee, B. Alteration of the glutamate and GABA transporters in the hippocampus of the Niemann-Pick disease, type C mouse using proteomic analysis. *Proteomics.* **6(4)**, 1230-1236 (2006).

Yang, SR., Kim, SJ., Byun, KH., Hutchinson, B., Lee, HH., Michikawa, M., Lee, YS. & Kang, KS. NPC1 gene deficiency leads to lack of neural stem cell self-renewal and abnormal. differentiation through activation of p38 MAP kinase signaling. *Stem Cells.* **24(2)**, 292-298 (2006).

(2) 総説

Michikawa M. Role of cholesterol in amyloid cascade: cholesterol-dependent modulation of tau phosphorylation and mitochondrial function. *Acta Neurol Scand Suppl.* **185**, 21-26(2006).

(3) 著書

和文

(1) 原著論文

(2) 総説

道川誠 :アルツハイマー病とコレステロール代謝. *生化学* **78(9)**, 831-839 (2006).

道川誠 : アルツハイマー病:ベッドサイドからベンチへ. *医療* **60(12)**, 752-759(2006).

道川誠、柳澤勝彦 :コレステロールと Alzheimer 病. *医学のあゆみ* **22(5)**, 39-44(2007).

道川誠 : Alzheimer 病と脂質. *Clinical neuroscience* **25(2)**,162-164 (2007).

(3) 著書

道川誠 : アポリポ蛋白 E. 老年期認知症ナビゲーター, メヂカルレビュー社、226-227(2006).

第5領域（公募班員）			
研究課題名	U-ボックスタンパク質による神経変性疾患関連タンパク質の分解制御		
研究代表者名	畠山 鎮次	E-mail	hatas@med.hokudai.ac.jp
所属・職名	北海道大学大学院医学研究科・教授		
研究分担者名			
分担者所属			
研究成果報告書 神経細胞内封入体が各種の神経変性疾患の組織病理学的所見として多く報告されており、封入体は異常構造をとったタンパク質であることが報告されている。病理組織学的検索によりこれらの封入体を構成するタンパク質の多くがユビキチン化というタンパク質分解のための修飾が起きていることが知られている。申請者は分子シャペロンと相互作用しているユビキチンリガーゼ群として U-ボックスタンパク質を同定している。このユビキチンリガーゼは分子シャペロンを基質認識サブユニットとして働いていることが推測されている。本研究では、封入体構成タンパク質の安定性を調節するメカニズムとして分子シャペロン系とユビキチン-プロテアソーム系がどのような役割を果たしているのかを検討した。特に、封入体構成タンパク質をユビキチン化させる酵素系である U-ボックスタンパク質との関係を生化学的に明らかにすることを目的とした。 また、U-ボックスタンパク質であるマウス Ufd2a は Nmana1 遺伝子と融合タンパク質（Wld^s）を形成することにより、軸索変性を遅延させることが知られている。Wld^s による軸索変性の抑制が Nmnat1 あるいは他の部位によるものであるかは未だ議論の余地がある。そこで我々は Wld^s、Nmnat1 過剰発現 Neuro2A 細胞株を作製した。Neuro2A はレチノイン酸によって神経突起の伸長を含んだ神経分化をする細胞株として知られている。Wld^s の過剰発現によって Neuro2A はビンクリスチンによる神経突起変性が遅延させたが、Nmnat1 の過剰発現では弱く遅延したのみであった。これにより、Nmnat1 の in vitro での毒性傷害からの保護効果は、Wld^s に比べ大幅に弱く、おそらく Wld^s のアミノ末端領域が軸索変性に対する保護に重要であることが示唆された。 我々は以前に Ufd2a が、神経突起伸長に関連するタンパク質、FEZ1 (fasciculation and elongation protein zeta 1) と相互作用し、制御することを報告している。これは、Ufd2a が神経突起伸長において調節分子としての可能性を示している。この場合、Ufd2a の配列のアミノ末端 70 アミノ酸ではなく、カルボキシル末端の U-box ドメインが神経突起生成に必要であることを示している。これらの知見は、Ufd2a が神経突起伸長と神経突起変性からの保護という 2つの機能を有することを示唆している。今後の Wld^s の分子レベルの機能解析が、軸索傷害の抑制のみならず、神経変性疾患の抑制に治療的な利益をもたらす可能性がある。			

第5領域 (公募班員)

研究代表者名 畠山 鎮次

発表論文

英文

(1) 原著論文

Hiramatsu, Y., Kitagawa, K., Suzuki, T., Uchida, C., Hattori, T., Kikuchi, H., Oda, T., Hatakeyama, S., Nakayama, K-i., Yamamoto, T., Konno, H. & Kitagawa, M. Degradation of Tob1 mediated by SCF^{Skp2}-dependent ubiquitination. *Cancer Res.* **66**, 8477-8483 (2006).

Watanabe, M., Tsukiyama, T. & Hatakeyama, S.: Protection of vincristine-induced neuropathy by Wld^S expression and the independence of the activity of Nmnat1. *Neurosci. Lett.* **411**, 228-232 (2007).

Kishi, K., Mawatari, K., Sakai-Wakamatsu, K., Yuasa, T., Wang, M., Ogura-Sawa, M., Nakaya, Y., Hatakeyama, S. & Ebina, Y. APS-mediated Ubiquitination of the Insulin Receptor Enhances its Internalization, but does not Induce its Degradation. *Endocr. J.* in press.

Matsuda, M., Tsukiyama, T., Bohgaki, M., Nonomura, K. & Hatakeyama, S. Establishment of a newly improved detection system for NF-κB activity. *Immunol. Lett.*, in press.

(2) 総説

(3) 著書

和文

(1) 原著論文

(2) 総説

畠山鎮次：またまた新しい T 細胞発見 — 1、2、3、跳んでなぜか 17 —. *実験医学* **24**, 1766-1767 (2006).

畠山鎮次：抗癌剤治療の場への p53 の警告. *実験医学* **24**, 2980-2981 (2006).

(3) 著書

畠山鎮次：II. 神経変性の分子細胞生物学、4. ユビキチン・プロテアソームシステム. (高橋良輔編：The Frontiers in Medical Sciences 「神経変性疾患のサイエンス」、南山堂、東京) in press.

第5領域（公募班員）			
研究課題名	ALS 運動ニューロンにおける GluR2 RNA 編集異常の解析		
研究代表者名	郭 伸	E-mail	kwak-tyk@umin.ac.jp
所属・職名	東京大学大学院 医学系研究科 神経内科学・助教授		
研究分担者名	日出山拓人 ¹ ，山下雄也 ¹ ，伊藤杏子 ¹ ，西本祥仁 ^{1,2} ，辻省次 ¹ ，柿田 明美 ³ ，高橋均 ³ ，高橋良輔 ⁴ ，三澤日出巳 ⁵ ，鈴木岳之 ⁶		
分担者所属	1) 東京大学神経内科学 2) 慶應大学神経内科大学院 3) 新潟大学脳研究所病態神経科学部門病理学分野、4) 京都大学神経内科 5) 共立薬科大学薬理学 6) 共立薬科大学基礎生物学		

研究成果報告書

【背景】我々は、孤発性筋萎縮性側索硬化症（ALS）脊髄運動ニューロンでは、グルタミン酸受容体である AMPA 受容体の GluR2 サブユニット Q/R 部位で RNA 編集が低下していること、これが孤発性 ALS 運動ニューロンに疾患特異的かつ細胞選択的な変化であることを報告した。GluR2 Q/R 部位は RNA 編集酵素 ADAR2（adenosine deaminase acting on RNA type 2）により特異的に編集され、ALS の運動ニューロンでは ADAR2 活性が低下していると考えられる。本報告では、孤発性 ALS 運動ニューロンで ADAR2 活性が低下していることが、GluR2 Q/R 部位の RNA 編集率低下の原因になっているかどうかを検討するために、ALS 組織を用い、複数の ADAR2 基質における RNA 編集率の変化、ADAR2 mRNA の発現レベルを指標とし ADAR2 活性を、間接的に測定した。また、より直接的な知見を得るために、ADAR2 コンディショナルノックアウトマウスを開発した。

【方法】凍結保存した ALS 8～27 例及び正常対照 12～15 例の剖検脊髄前角組織を用い、GluR2 及び ADAR2 mRNA を real-time PCR 法により定量し、ADAR2 の基質である GluR2 Q/R 部位、R/G 部位、GluR6 Q/R 部位、kv1.1 I/V 部位などの mRNA が編集される部位の編集率を RT-PCR 法及び制限酵素処理により測定した。また、laser microdissector を用いて、脊髄運動ニューロンを切り出し、単一ニューロンにおける編集率を測定した。コンディショナルノックアウトマウスは、ヒト ADAR2 遺伝子に相同なマウス adarb1 遺伝子につき Cre-loxP システムを用いて作成した。

【結果と考察】正常ヒト脊髄前角組織における GluR6 Q/R 部位、kv1.1 I/V 部位、GluR2 R/G 部位の RNA 編集率は、大きくばらついていた。ALS 前角組織における GluR6 Q/R 部位、kv1.1 I/V 部位も症例ごとに大きくばらつき、正常対照との間に有意差がみられなかった。正常脊髄全 k なくそしきにおけるこのようなばらつきは、単一ニューロンレベルの検討でも同様で、GluR6 Q/R 部位、kv1.1 I/V 部位とも 0-100% の間で大きくばらついていた。編集率の高低による運動ニューロンの脊髄前角における分布を kv1.1 I/V 部位（正常対照）と GluR2 Q/R 部位（ALS）とで比較すると、正常対照脊髄では、運動ニューロンが前角内で局在する位置に依って kv1.1 の編集率が大きく異なるが、孤発性 ALS 運動ニューロンの GluR2 Q/R 部位 RNA 編集にはこのような運動ニューロンの位置に依存する編集率の違いは見られなかった。また、ADAR2mRNA の発現レベルは個体ごとに異なっていたので、各部位の RNA 編集率との相関性を検討したところ、孤発性 ALS 前角における GluR2 Q/R 部位の編集率との間には相関性が見られた。他方、正常脊髄前角における各 RNA 編集部位との間には有意な相関性は得られなかった。これらの結果からは、孤発性 ALS 運動ニューロンにおける GluR2 Q/R 部位の RNA 編集低下は ADAR2 活性の低下によりもたらされたと考えられ、Cre-loxP システムにより作成した ADAR2 のコンディショナルノックアウトマウスが、GluR2 RNA 編集異常に伴い緩徐進行性の脊髄運動ニューロン死を引き起こしたことからも支持される。また、GluR2 Q/R 部位以外の ADAR2 基質 mRNA では、基質ごとに異なる活性調節機構が存在する可能性が示唆され、ADAR2 活性低下が、各基質 RNA の RNA 編集の変化を通じて神経細胞死とどう関連するのかにつき更に検討を加える必要がある。

第5領域 (公募班員)

研究代表者名 郭 伸

発表論文

英文

(1) 原著論文

Struzik, Z. R., Hayano, J., Soma, R., Kwak, S. & Yamamoto, Y. Aging of complex heart rate dynamics. *IEEE T. Bio-med. Eng.* **53**, 89-94 (2006).

Sun, H., Kawahara, Y., Ito, K., Kanazawa, I. & Kwak, S. Slow and selective death of spinal motor neurons in vivo by intrathecal infusion of kainic acid: implications for AMPA receptor-mediated excitotoxicity in ALS. *J. Neurochem.* **98**, 782-91 (2006).

Hideyama, T., Momose, T., Shimizu, J., Tsuji, S. & Kwak, S. A PET study on the role of nigral lesions in parkinsonism in patients with ALS. *Arch. Neurol.* **63**, 1719-22 (2006).

(2) 総説

Kwak, S. & Weiss, J. H. Calcium permeable AMPA channel in neurodegenerative disease and ischemia. *Curr. Opin. Neurobiol.* **16**, 281-7 (2006).

(3) 著書

和文

(1) 原著論文

(2) 総説

西本祥仁、日出山拓人、河原行郎、郭伸：AMPA 受容体サブユニット GluR2 の RNA 編集と ALS における神経細胞死. *Clin. Neurosci.* **24**, 222-5 (2006).

相馬りか、山本義春、郭伸：経皮的前庭電気ノイズ刺激は有効か？—パーキンソン病、多系統萎縮症に対する検討例の報告—. *難病と在宅ケア* **12**, 49-53 (2006).

郭伸. ALS の運動ニューロン死とグルタミン酸受容体の分子変化. *神経進歩* **50**, 902-11 (2006).

日出山拓人、郭伸：孤発性 ALS の病因. *難病と在宅ケア* in press.

(3) 著書

日出山拓人、郭伸：髄液細胞数・蛋白・糖. 検査値のみかた改訂3版. 編集代表中井利昭. 中外医学社. 790-6 (2006).

山下雄也、郭伸：グルタミン酸受容体と神経細胞死. 神経変性疾患のサイエンス、南山堂、in press.

第5領域（公募班員）			
研究課題名	異常蛋白質蓄積による ASK1 シグナルを介した神経変性細胞死の分子病態の解明		
研究代表者名	西頭 英起	E-mail	nishitoh.osur@tmd.ac.jp
所属・職名	東京医科歯科大学大学院医歯学総合研究科・特任助教授		
研究分担者名	名黒功 野口拓也		
分担者所属	東京大学大学院薬学系研究科		

研究成果報告書

構造異常タンパク質の蓄積は多くの疾患発症原因の一つであり、このような疾患はコンフォメーション病と総称され注目されている。本研究では、細胞内異常タンパク質が細胞死を誘導する分子メカニズムを、筋萎縮性側索硬化症(ALS)モデル実験系を用いて解明することを試みた。

細胞内異常タンパク質の蓄積がタンパク質分解経路の抑制、ならびに小胞体ストレスを誘導することを以前の研究により明らかにしていることから、異常タンパク質蓄積の一例として、家族性 ALS の原因の一つである変異型 SOD1 タンパク質を用いてユビキチンプロテアソームと小胞体ストレスに対する影響を検討し、さらに変異型 SOD1 結合タンパク質のスクリーニングにより、その分子標的・メカニズムを解明した。すなわち、変異型 SOD1 を運動神経細胞に発現させることにより、小胞体ストレスが惹起されることを明らかにした。この変異型 SOD1 誘導性の小胞体ストレスは、小胞体から異常タンパク質が細胞質側へと排出される機構、すなわち小胞体関連分解 (ER associated degradation: ERAD) の抑制が原因であった。そこで、変異型 SOD1 が ERAD を抑制する際の標的分子をスクリーニングするため、ERAD 関連タンパク質との結合を検討したところ、小胞体膜タンパク質で ERAD に必須の分子と変異型 SOD1 が特異的に結合し、その機能を阻害していることが示された。さらに、変異型 SOD1 とこの ERAD 構成分子の結合を阻害するペプチドを見いだし、そのペプチド発現により変異型 SOD1 誘導性の小胞体ストレス誘導、ASK1（小胞体ストレス誘導性アポトーシスに必要な分子）経路の活性化、神経細胞死が抑制されることも明らかとなった。また個体レベルの結果として、ASK1 ノックアウトマウスでは ALS の病態進行が有意に遅延されたことから、変異型 SOD1 による ERAD 構成分子機能阻害が ALS の病態進行に大きく関与していることが示唆された。

本研究では、変異型SOD1が小胞体不良タンパク質の逆輸送（レトロトランスロケーション）に重要な役割を担うERAD構成分子に結合し、その機能を阻害することを明らかにした。その中でERAD構成分子側の結合領域12アミノ酸まで同定しており（特許出願済）、今後はこの12ペプチドを応用した創薬の開発に繋げたい。

第5領域（公募班員）

研究代表者名 西頭 英起

発表論文

英文

（1）原著論文

（2）総説

Nagai, A., Kadowaki, H. & Nishitoh, H. Role of ER quality control and ER stress-induced cell death in neurodegenerative diseases. *J. Oral Biosci.* **49**, 39-46 (2007).

（3）著書

和文

（1）原著論文

（2）総説

西頭英起: ALS における ASK1 を介した運動神経細胞死分子機構の解明. *臨床薬理の進歩* in press.

西頭英起: ALS における変異型 SOD1 による小胞体ストレス誘導性神経細胞死分子機構 *Phama Media* **25**, 145 (2007).

門脇寿枝、西頭英起、一條秀憲.: 異常タンパク質が発信する神経細胞死シグナル伝達. *疾患のサイエンス 実験医学増刊号* **24**, 1553-1560 (2006).

（3）著書

第5領域（公募班員）			
研究課題名	ポリグルタミン病態における核ストレスの解析と治療応用		
研究代表者名	岡澤 均	E-mail	okazawa-tky@umin.ac.jp
所属・職名	東京医科歯科大学・教授		
研究分担者名			
分担者所属			

研究成果報告書

本年度は核ストレスによる細胞機能障害・細胞死の分子機構の解析と、選択的細胞死：すなわち核ストレス細胞死シグナルが全ての神経細胞に起きうるのに特定の神経細胞にのみ影響が強く見られるのは何故か、という問題の2点に対する成果が得られた。成果が得られた順に従い後者から報告する。

1) 選択的細胞死：

神経変性疾患の重要な特徴の一つとして、選択的神経細胞死がある。これは単純にグリア細胞に細胞死が起きないのに神経細胞が変性に陥るということではなく、神経細胞の種類の間でぜい弱性に著しい差異があるとの意味で使われることが多い。例えば、ハンチントン病の場合、線条体と大脳皮質が選択的に変性することが知られている。これは、ハンチントン病が属するポリグルタミン病の多くが小脳系を病変の主座とすることとは対照的といえる。このような選択的細胞死がどのような分子メカニズムに基づくかはこれまで明らかではなかった。

私たちは過去5年あまりに渡り、プロテオーム、トランスクリプトームのオミックス解析を科学技術振興機構戦略的創造研究推進事業の一環をして行ってきた。昨年度には転写抑制性細胞死モデル、あるいはPQBP1トランスジェニックマウスなどで、トランスクリプトーム解析の成果を報告した。このなかで、様々な変性疾患に共通して起こる病態分子を探索するとともに、疾患特異的あるいは神経細胞の種類に特異的な病態分子変化を探してきた。本年度は、トランスクリプトーム解析から選択的神経細胞死に関わる分子を検索し、この成果を公表した。

本研究においては、大脳、小脳、線条体の3種類の初代培養神経細胞に、ハンチンチンとアタキシシン1の正常型／異常型をアデノウィルスベクターにより発現させて、正常型／異常型の間での種々の遺伝子発現量変化をマイクロアレイによって比較した。この結果、小脳神経細胞に異常ハンチンチンを発現した時のみ、hsp70の著明な発現上昇（約30倍）が見られることが明らかになった。Hsp70はシャペロン分子として、ポリグルタミン異常タンパクを構造変換して無毒化することが、これまでの多くの研究報告から示されている。したがって、小脳神経細胞のみが異常型ハンチンチンに抵抗性を示し、大脳、線条体の神経細胞は脆弱であることと良く合致する。

実際、小脳神経細胞でのhsp70発現上昇をRNAiを用いて抑えると抵抗性が失われ、逆に、大脳神経細胞にhsp70を過剰発現するとハンチンチンに対して抵抗性を示すようになる。これらの結果は、異常型ハンチンチン誘導性hsp70発現上昇が小脳神経細胞のハンチントン病理における抵抗性の一つの理由であることを強く示唆している。選択的細胞死のメカニズムとしてはこれまでに、細胞特異的タンパク切断、タンパクリン酸化などが報告されてきた。しかし、これらはいずれも、その細胞が脆弱になる理由を示したものである。これに対して、私たちの結果は抵抗性の違いが選択性に結びつく初めての例といえる。また、転写レベルでの違いが選択性に結びつく可能性を示したのは本論文が初めてである(Tagawa et al., J Neurosci2007)。

2) 核ストレス細胞死シグナル

また、核ストレスシグナルに関与する新しい病態分子をプロテオーム解析から同定した。これについては近日中に報告される予定である(Qi et al., Nature Cell Biology, in press)。

第5領域 (公募班員)

研究代表者名 岡澤 均

発表論文

英文

(1) 原著論文

Yoshimura, N., Horiuchi, D., Shibata, M., Saitoe, M., Qi, M.L. & Okazawa, H. Expression of human PQBP-1 in *Drosophila* impairs long-term memory and induces abnormal courtship. *FEBS Lett.* **580**, 2335-40 (2006).

Marubuchi, S., Okuda, T., Tagawa, K., Enokido, Y., Horiuchi, D., Shimokawa, R., Tamura, T., Qi, M.L., Eishi, Y., Watabe, K., Shibata, M., Nakagawa, M. & Okazawa, H. Hepatoma-derived growth factor, a new trophic factor for motor neurons, is up-regulated in the spinal cord of PQBP-1 transgenic mice before onset of degeneration. *J. Neurochem.* **99**, 70-83 (2006).

Tagawa, K., Marubuchi, S., Qi, M.L., Enokido, Y., Tamura, T., Inagaki, R., Murata, M., Kanazawa, I., Wanker, E.E. & Okazawa, H. The induction levels of hsp70 differentiat the vulnerabilities to mutant huntingtin among neuronal subtypes. *J. Neurosci.* **27**, 868-80 (2007).

(2) 総説

(3) 著書

和文

(1) 原著論文

(2) 総説

岡澤均：転写障害によって生じる新しい神経細胞死. *実験医学* **24**(9),1322-1325.

岡澤均：神経変性はアポトーシスか？ *生化学* **79**(2),157-162.

(3) 著書

第5領域（公募班員）			
研究課題名	劣性遺伝性脊髄小脳変性症の分子病態の解明		
研究代表者名	西澤 正豊	E-mail	nishi@bri.niigata-u.ac.jp
所属・職名	新潟大学脳研究所・教授		
研究分担者名			
分担者所属			
研究成果報告書 研究の背景：「眼球運動失行と低アルブミン血症を伴う早期発症型失調症（EAOH/AOA1）」は、わが国にみられる劣性遺伝性脊髄小脳変性症の約半数を占める重要な疾患であり、幼少期の眼球運動失行と進行期の末梢神経障害、低アルブミン血症を特徴としている。病因蛋白質 aprataxin（APT_X）は核酸の加水分解反応を触媒する histidine triad モチーフを有する核蛋白質であり、一本鎖DNA損傷の修復プロセスに関与していると推定されている。 研究の目的：APT_Xが一本鎖DNA損傷修復における損傷 3'末端のプロセッシングに関与しているか否かをモデル系を用いて明らかにし、さらにAPT_Xのin vivoにおける生理活性を検証する。 研究の方法：組み換えヒト APT_X蛋白質を作製、精製し、3'末端に種々の修飾基を伴う合成DNAを基質として酵素学的検討を行った。またAPT_Xのin vivoにおける生理活性を検証するために、APT_Xノックアウトマウスを作成し、ノックアウトマウスに由来する線維芽細胞の初代培養系を樹立した。一本鎖DNA損傷を定量化できるalkali comet assay法を用いて、酸化ストレスやトポイソメラーシI阻害剤（カンプトテシン）などのDNA損傷ストレスが加えられた場合に、APT_Xを欠損した線維芽細胞は一本鎖DNA損傷ストレスに対して脆弱性を示すか否かを検討した。 結果と考察：全長型APT_XはDNA 3'末端のリン酸基と phosphoglycolate（PG）基の加水分解反応を触媒する活性、すなわち、DNA 3'phosphatase 活性および 3'PG hydrolase 活性を有することを証明した。またDNA polymerase と ligase の共存下で、3'ブロックを伴う一本鎖DNA損傷を修復可能であることも証明した。さらにAPT_Xの疾患関連変異体では、この 3'ブロック除去活性が失われていることを確認した。これらの結果は、APT_Xが 3'ブロックの除去を通じて、一本鎖DNA損傷修復において直接的な役割を果たしていること、また、3'ブロックを伴う一本鎖DNA損傷が修復されずに蓄積することがEAOH/AOA1の病態に深く関与していることを示している。 次に、APT_Xノックアウトマウスの線維芽細胞初代培養系では、過酸化水素などによる酸化ストレスやカンプトテシンに対する脆弱性には、alkali comet assay法を用いる限り、APT_Xの有無によって有意な差は見出せなかった。そこで現在、APT_Xを欠損した小脳顆粒球細胞の初代培養系を用いて、神経細胞では一本鎖DNA損傷ストレスに対する脆弱性が認められるか否かを検討している。 また、わが国にみられる劣性遺伝性脊髄小脳変性症では、EAOH/AOA1に次ぐ頻度で認められるARSACS家系の遺伝子解析から、sacsin遺伝子の新たな変異と新たな臨床病型を見出した。			

第5領域（公募班員）

研究代表者名 西澤 正豊

発表論文

英文

（1）原著論文

Takahashi, T., Tada, M., Igarashi, S., Koyama, A., Date, H., Yokoseki, A., Shiga, A., Yoshida, Y., Tsuji, S., Nishizawa, M. & Onodera, O. Aprataxin, causative gene product for EAOH/AOA1, repairs DNA single-strand breaks with 3'-phosphate and 3'-phosphoglycolate ends. *Nucl. Acids Res.* in press.

Takado, Y., Hara, K., Shimohata, T., Tokiguchi, S., Onodera, O. & Nishizawa, M. New mutation in the non-gigantic exon of SACS in Japanese siblings. *Mov. Disord.* in press.

Hara, K., Shimbo, J., Nozaki, H., Kikkawa, K., Onodera, O. & Nishizawa, M. Sacsin-related ataxia with neither retinal hypermyelination nor spasticity. *Mov. Disord.* in press.

（2）総説

（3）著書

和文

（1）原著論文

（2）総説

（3）著書

第5領域 (公募班員)			
研究課題名	脊髄小脳変性症 10 型の神経変性とインスタビリティ機構		
研究代表者名	松浦 徹	E-mail	tohrum@med.nagoya-u.ac.jp
所属・職名	名古屋大学大学院医学系研究科神経遺伝情報学・助教授		
研究分担者名	鈴木元		
分担者所属	名古屋大学大学院医学系研究科分子腫瘍学		
研究成果報告書			
A. 研究目的			
脊髄小脳変性症 10 型 (SCA10) の原因遺伝子変異は <i>ATXN10</i> 遺伝子イントロン 9 の ATTCT 5 塩基リピートの不安定異常伸長である。優性遺伝性非翻訳リピート病は SCA10 を含め幾つかあるが、研究の進展が著しいポリグルタミン病と異なり、その病態は良く分かっていない。本研究では、ATTCT expansion が、どのような機序で SCA10 を発症させるのか、更にその不安定性メカニズムについて解析する。			
B. 研究方法			
① SCA10 と <i>ATXN10</i> との関係を調べるために、<i>Sca10</i> ノックアウトマウスを作製した。8 か月齢のマウスを用いて、RotaRod テスト・神経組織学的解析を施行した。 ② ATTCT expansion の周辺遺伝子発現への影響を、複数の SCA10 細胞を用いて real-time RT-PCR で調べた。 ③ 複数の SCA10 細胞を用いて、<i>ATXN10</i> 転写産物を定量し (Northern blot 法)、更に異常スプライシングを検討した(RT-PCR)。 ④ AUUCU 核内凝集物の有無を検討するため、SCA10 リンパ芽を用いた FISH を施行した。 ⑤ 不安定性メカニズム解明のため SCA10 expansion 全長を増幅できる long-PCR 法開発を試みた。			
C. 研究結果			
① <i>Sca10</i>-null mice は胎生致死であった。<i>Sca10</i>-null heterozygous は viable であり、SCA10 の病態を考える上で、<i>ATXN10</i> のハプロ不全の関与を検証する良いモデルと考えられた。生後 18 か月まで観察したが、WT と比べ肉眼所見のみならず、異常行動などを認めなかった。8 か月齢での RotaRod テスト、神経組織所見は WT と比べて差がなかった。つまり、SCA10 の病態を考える上で、<i>ATXN10</i> 遺伝子ハプロ不全を支持する結果を得なかった。 ② ATTCT repeat の 200kb centromeric に <i>fibulin1</i>(FBLN1)が、286kb telomeric に peroxisome proliferative activated receptor α (PPARA) が存在する。SCA10 リンパ芽球、fibroblast、myoblast、somatic cell hybrid lines を用いて、対照コントロールと比較したが、両者共に、一貫した増減を認めなかった。 ③ ATTCT expansion 下流域に intronic SNP (C/G 66bp upstream of exon 11)を heterozygous に持つ SCA10 患者由来のリンパ芽球を用いて、RT-PCR を施行したが、この SNP は保たれていた。さらに、SCA10 リンパ芽球 fibroblast、myoblast、somatic cell hybrid lines を用いて、<i>ATXN10</i> 転写産物を定量したが、対照と比べ差はなかった。<i>ATXN10</i> 異常スプライシング転写産物も認められなかった。これらの事実から、SCA10-disease allele では、転写が ATTCT expansion を超えて進行する事、<i>ATXN10</i> RNA プロセッシングも正常であることが明らかになった。 ④ (AGAAT)₁₀ プローブを用いて、AUUCU 核内凝集物を認めた。 ⑤ リピート数が~4500 に及ぶ SCA10 expansion 全長を増幅できる long PCR 法を開発した。			
D. 考察			
SCA10 の病態において、<i>ATXN10</i> や周辺遺伝子の loss-of-function mechanism の寄与は否定的と思われた。ATTCT expansion は AUUCU を含む pre-mRNA に転写されることから、筋強直性ジストロフィー類似の AUUCU gain-of-function 説を考えるのが、妥当のように思われる。SCA10 expansion 全長を増幅できる long PCR 法の開発は、遺伝子診断においてサザン法にとって替わり得るだけでなく、そのインスタビリティやリピート内構造の解析に威力を発揮すると思われる。			

第5領域 (公募班員)

研究代表者名 松浦 徹

発表論文

英文

(1) 原著論文

Matsuura, T., Fang, P., Pearson, C.E., Jayakar, P., Ashizawa, T., Roa, B.B. & Nelson, D.L. Interruptions in the expanded ATTCT repeat of spinocerebellar ataxia type 10. Repeat purity as a disease modifier? *Am. J. Hum. Genet.* **78**, 125-29 (2006).

Wakamiya, M., Matsuura, T., Liu, Y., Shuster, G.C., Gao, R., Xu, W., Sarkar, P., Lin, X. & Ashizawa, T. The role of ataxin 10 in spinocerebellar ataxia type 10 pathogenesis. *Neurology* **67**, 607-13 (2006).

Alonso, I., Jardim, L.B., Artigas, O., Saraiva-Pereira, M.L., Matsuura, T., Ashizawa, T., Sequeiros, J. & Silveira, I. Reduced penetrance of intermediate size alleles in spinocerebellar ataxia type 10. *Neurology* **66**, 1602-4 (2006).

Pavlov, Y. I., Frahm, C., Nick McElhinny, S. A., Niimi, A., Suzuki, M. & Kunkel, T. A. Evidence that errors made by DNA polymerase alpha are corrected by DNA polymerase delta. *Curr. Biol.* **16**, 202-7 (2006).

Sobue, S., Iwasaki, T., Sugisaki, C., Nagata, K., Kikuchi, R., Murakami, M., Takagi, A., Kojima, T., Banno, Y., Akao, Y., Nozawa, Y., Kannagi, R., Suzuki, M., Abe, A., Naoe, T. & Murate, T. Quantitative RT-PCR analysis of sphingolipid metabolic enzymes in acute leukemia and myelodysplastic syndromes. *Leukemia* **20**, 2042-46 (2006).

Kikuchi, R., Murakami, M., Sobue, S., Iwasaki, T., Hagiwara, K., Takagi, A., Kojima, T., Asano, H., Suzuki, M., Banno, Y., Nozawa, Y. & Murate, T. Ewing's sarcoma fusion protein, EWS/Fli-1 and Fli-1 protein induce PLD2 but not PLD1 gene expression by binding to an ETS domain of 5' promoter. *Oncogene* **26**, 1802-10 (2007).

Kikuchi, A., Sobue, S., Murakami, M., Ito, H., Kimura, A., Iwasaki, T., Shibuyama, S., Takagi, A., Kojima, T., Suzuki, M., Banno, Y., Nozawa, K. & Murate, T. The regulatory mechanism of Vitamin D3 induced increase of PLD1 transcription of a human keratinocyte cell line, HaCaT. *FEBS letters* in press.

Matsubara, H., Takeuchi, T., Nishikawa, E., Yanagisawa, K., Hayashita, Y., Ebi, H., Yamada, H., Suzuki, M., Nagino, M., Nimura, Y., Osada, H. & Takahashi, T. Apoptosis induction by antisense oligonucleotides

against miR-17-5p and miR-20a in lung cancers overexpressing miR-17-92. *Oncogene* in press.

(2) 総説

(3) 著書

和文

(1) 原著論文

(2) 総説

松浦徹、大野欽司：非翻訳領域リピート病のRNA病態. *Medical Science Digest* **32**, 25-8 (2006).

松浦徹、大野欽司：SCA10の分子遺伝学. *神経研究の進歩* **50**, 339-45 (2006).

(3) 著書

第5領域 (公募班員)			
研究課題名	異常タンパク質蓄積による神経変性疾患発症の分子機構の解明		
研究代表者名	嘉村 巧	E-mail	z47617a@nucc.cc.nagoya-u.ac.jp
所属・職名	名古屋大学大学院理学研究科・教授		
研究分担者名	松本雅記、中山敬一		
分担者所属	九州大学生体防御医学研究所		
研究成果報告書 ポリグルタミン病と呼ばれる神経変性疾患群は、原因遺伝子上でトリプレット・リピートが異常に伸長することによってタンパク質内に異常ポリグルタミン領域を生じ、この異常タンパク質が神経細胞内封入体に蓄積し、最終的に変性、脱落することによって発症することが知られている。これら封入体成分は高度にユビキチン化されていることより、ユビキチン・プロテアソーム系によるタンパク質分解が、ポリグルタミン病の病態へ関与していることが示唆されている。われわれはポリグルタミン病の一つであるMachado-Joseph病の原因遺伝子産物ataxin-3に対するユビキチン依存性分解酵素E4B (UFD2a) を同定し解析を進めているところである。また酵母two-hybrid法によりE4B結合タンパク質としてfasciculation and elongation protein zeta 1 (FEZ1)を同定し解析を行った。今回はこれらの機能解析を紹介する。 E4B/UFD2aは酵母におけるポリユビキチン鎖伸長因子 (E4) Ufd2の哺乳類ホモログであり、酵母の場合と同様にタンパク質ユビキチン化に関与することが推定されているが、その詳細は明らかではない。われわれはポリグルタミン病の原因遺伝子産物の一つであるataxin-3の分解機構を解析する過程でE4Bがataxin-3のユビキチン化に関与することを見出し、E4Bの過剰発現によって疾患型(異常ポリグルタミン鎖型)のataxin-3の分解が促進されること、さらにドミナントネガティブ型のE4Bを過剰発現させることで異常ポリグルタミン鎖型ataxin-3による封入体形成を促進すること示した。また、ショウジョウバエを用いたモデルシステムにおいて、E4Bの過剰発現がataxin-3によって引き起こされる神経変性を抑制することを示した。これらの結果は、E4Bがataxin-3の分解機構において極めて重要な役割を果たしていることを示唆しており、E4Bの過剰発現によるポリグルタミン病の遺伝子治療の可能性が提唱された。また、E4Bの基質として神経軸索伸長に関わる分子であるFEZ1も同定し、その機能解析を行っている。さらに、E4Bの生物学的機能を探索するために、E4Bノックアウトマウスを作製し解析を行った。E4Bノックアウトマウスは胎生致死であったが、E4B(+/-)マウスは薄束における軸索障害およびPurkinje細胞の変性を認め、運動失調(歩行障害)を示した。以上の結果よりE4Bが脊髄小脳神経を変性から防御するために極めて重要な分子であることが示された。また、E4BコンディショナルノックアウトマウスやE4Bトランスジェニックマウスの作製を行い、現在解析を進めている。 さらにわれわれはE4Bの機能解析を目的とし、yeast two-hybrid法によるスクリーニングを行い、E4B結合タンパク質としてFEZ1を同定した。FEZ1は線虫の運動や神経軸索の束形成に関与していることが報告されているタンパク質UNC-76の哺乳類オルソログと考えられている。マウスにおいてFEZ1は脳に特異的に発現している。またFEZ1はPKCζ結合タンパク質としても報告されており、活性型PKCζを発現させるとFEZ1は細胞膜から細胞内へと局在が変化する。PC12細胞に活性型PKCζとFEZ1を共発現させるとPC12細胞は神経細胞様に分化し神経様突起を伸長する。したがって、PKCζ-FEZ1複合体が神経細胞様突起形成に関与することが推測されている。FEZ1がE4Bのユビキチン化の基質となる可能性を検討した結果、E4Bの過剰発現によりFEZ1のポリユビキチン化の亢進が認められ、それはPKCζによるリン酸化依存的であった。また、E4BのU-ボックス領域に保存されているProをAlaに置換したP1140A変異体はドミナントネガティブとして働き、FEZ1のユビキチン化を阻害した。しかしながら、P1140A変異体を過剰発現させてもFEZ1の安定性に変化はみられなかった。FEZ1上のポリユビキチン鎖を詳細に調べた結果、ユビキチン上のLys48ではなく、Lys27を介してポリユビキチン鎖形成が起きていることが判明した。このポリユビキチン鎖の役割を調べるために、E4B及びE4B(P1140A)変異体の安定発現PC12細胞株を作製したところ、NGF (nerve growth factor) やPKCζ-FEZ1依存的な神経細胞様突起の伸長がE4B(P1140A)発現細胞株において抑制された。shRNAによりE4Bの発現を抑制するとNGFによる神経様突起形成の誘導が阻害されたことから、たしかにE4Bは突起形成に必要であることを見出した。以上より、E4BによるFEZ1のポリユビキチン化はユビキチン-プロテアソーム系による分解のための標識ではなく、神経様突起伸長のための機能修飾である可能性が示唆された。また、FEZ1コンディショナルノックアウトマウスの作製を行い、現在解析を進めている。			

第5領域 (公募班員)

研究代表者名 嘉村 巧

発表論文

英文

(1) 原著論文

Tsunematsu, R., Nishiyama, M., Kotoshiba, S., Saiga, T., Kamura, T. & Nakayama, KI. Fbxw8 is essential for Cul1-Cul7 complex formation and for placental development. *Mol. Cell. Biol.* **26**, 6157-6169 (2006).

Fujii, Y., Yada, M., Nishiyama, M., Kamura, T., Takahashi, H., Tsunematsu, R., Susaki, E., Nakagawa, T., Matsumoto, A. & Nakayama, KI. Fbxw7 contributes to tumor suppression by targeting multiple proteins for ubiquitin-dependent degradation. *Cancer Sci.* **97**, 729-736 (2006).

Takahashi, A., Ohtani, N., Yamakoshi, K., Iida, S., Tahara, H., Nakayama, K., Nakayama, KI., Ide, T., Saya, H. & Hara E. Mitogenic signalling and the p16INK4a/Rb pathway co-operate to enforce irreversible cellular senescence through activating ROS/PKC- δ signalling pathway. *Nature Cell Biol.* **8**, 1291-1297 (2006).

Matsumoto, A., Onoyama, I. & Nakayama, KI. Expression of mouse Fbxw7 isoforms is regulated in a cell cycle- or p53-dependent manner. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **350**, 114-119 (2006).

Shirane, M. & Nakayama, KI. Protrudin induces neurite formation by directional membrane trafficking. *Science*. **314**, 818-21 (2006).

Tu, X., Joeng, K.S., Nakayama, KI., Nakayama, K., Rajagopal, J., Carroll, T.J., McMahon, A.P. & Long, F. Noncanonical Wnt signaling through G protein-linked PKC δ activation promotes bone formation. *Dev. Cell.* **12**, 113-127 (2007).

Nakagawa, T., Shirane, M., Iemura, S., Natsume, T. & Nakayama, KI. Anchoring of the 26S proteasome to the organellar membrane by FKBP38. *Genes Cells.* in press.

(2) 総説

Nakayama, KI. & Nakayama, K. Ubiquitin ligases: cell-cycle control and cancer. *Nature Rev. Cancer.* **6**, 369-381 (2006).

(3) 著書

和文

(1) 原著論文

(2) 総説

嘉村巧：Cullin 型 E3 ファミリー. *蛋白質核酸酵素* (2006 年 8 月号増刊)「ユビキチン-プロテアソーム系とオートファジー」 **51**, 1167-1172 (2006).

(3) 著書

第5領域（公募班員）			
研究課題名	ミトコンドリアストレスを介した神経変性疾患の分子機構解明とその治療		
研究代表者名	清水 重臣	E-mail	Shimizu.pcb@mri.tmd.ac.jp
所属・職名	東京医科歯科大学・難治疾患研究所・教授		
研究分担者名			
分担者所属			
研究成果報告書 Mnd2(motor neuron degeneration2)は遺伝性の神経変性疾患モデルマウスで、アタキシア等の症状により生後 20 日程度で死亡する。神経細胞の脱落変性が疾患の原因である。mnd2 マウスの疾患原因遺伝子はミトコンドリアのセリンプロテアーゼである Omi/HtrA2 である。Omi のミトコンドリアでの機能に関しては、これまで明らかにされていないが、(1)unfold protein の処理を介してミトコンドリアストレスを回避している、(2)permeability transition (PT)を抑制している、等の可能性が報告されている。PT はサイクロフィリン D (CyPD) 蛋白質の活性に依存してミトコンドリア膜の透過性を亢進させ、細胞死を惹起する現象である。実際、mnd2 マウス由来のミトコンドリアは PT が惹起されやすく、CyPD のノックアウトマウスと mnd2 マウスを交配したところ、mnd2 マウスの部分的な症状回復が観察された。回復が完全ではない事より、mnd2 マウスの発症には PT 以外のミトコンドリア機能も関与していると考えられた。 そこで我々は、Omi のミトコンドリアでの役割を明確にするために、Mnd2 マウスの線条体からミトコンドリアを単離し機能解析を行なうとともに、ミトコンドリア蛋白質の二次元電気泳動解析、mnd2 細胞の機能解析を行なった。 その結果、 1、Omi 欠損ミトコンドリアの呼吸能や ATP 産生能は正常ミトコンドリアと変わらなかった。 2、Omi 欠損ミトコンドリアでは、PT が誘導されやすかった。 3、Omi 欠損ミトコンドリアに特徴的な蛋白質を複数同定した。 4、Omi 欠損細胞では、ミトコンドリアストレスに対する応答が強かった。 等の知見を得た。			

第5領域 (公募班員)

研究代表者名 清水 重臣

発表論文

英文

(1) 原著論文

Ito, K., Oji, Y., Tatsumi, N., Shimizu, S., Kanai, Y., Nakazawa, T., Asada, M., Jomgeow, T., Aoyagi, S., Nakano, Y., Tamaki, H., Sakaguchi, N., Shirakata, T., Nishida, S., Kawakami, M., Tsuboi, A., Oka, Y., Tsujimoto, Y. & Sugiyama, H. Antiapoptotic function of 17AA(+)WT1 (Wilms' tumor gene) isoforms on the intrinsic apoptosis pathway. *Oncogene* **25**, 4217-29 (2006).

Simamura, E., Hirai, K., Shimada, H., Koyama, J., Niwa, Y. & Shimizu, S. Furanonaphthoquinones cause apoptosis of cancer cells by inducing the production of reactive oxygen species by the mitochondrial voltage-dependent anion channel. *Cancer Biology & Therapy* **5**, 11523-29 (2006).

(2) 総説

Tsujimoto, Y., & Shimizu, S. Role of the mitochondrial membrane permeability transition in cell death. *Apoptosis*. in press.

Tsujimoto, Y., Nakagawa, T. & Shimizu, S. Mitochondrial membrane permeability transition and cell death. *Biochim Biophys Acta*. **9-10**, 1297-300 (2006).

(3) 著書

和文

(1) 原著論文

(2) 総説

清水重臣：DNA傷害性アポトーシスの分子機構. *生化学* **78**, 891-4(2006).

清水重臣、辻本賀英：サイクロフィリンDと細胞死. *細胞* **39**, 34-37(2006).

清水重臣、辻本賀英： Bcl-2ファミリータンパク質によるプログラム細胞死の制御. *細胞死・アポトーシス 集中マスター* 61-70(2006).

(3) 著書

清水重臣：細胞死「癌のベーシックサイエンス」メデイカルサイエンスインターナショナル.
221-234(2006).

清水重臣：神経変性疾患とミトコンドリア傷害「神経変性疾患のサイエンス」.南山堂 in press.

第5領域（公募班員）			
研究課題名	ポリグルタミン病に対する凝集阻害低分子による治療法開発		
研究代表者名	永井 義隆	E-mail	nagai@clgene.med.osaka-u.ac.jp
所属・職名	大阪大学大学院医学系研究科臨床遺伝学・助手		
研究分担者名			
分担者所属			
研究成果報告書 【背景・目的】 ポリグルタミン（PolyQ）病はハンチントン病、種々の脊髄小脳失調症などの9つの遺伝性神経変性疾患の総称で、原因蛋白質内の異常伸長 PolyQ 鎖がβシートへの異常コンフォメーション変移を獲得して難溶性のアミロイド線維状凝集体を形成し、最終的に神経細胞内に封入体として蓄積して神経変性を引き起こすと考えられている。我々はこれまでに異常伸長 PolyQ 鎖結合ペプチド QBP1 が <i>in vitro</i> で異常伸長 PolyQ 蛋白質のβシート変移・アミロイド線維状凝集体形成を阻害し、QBP1 発現によりショウジョウバエモデルでの神経変性を抑制することを明らかにした。さらに PolyQ 病の薬物治療を目指して、これまでに大規模低分子化合物ライブラリー（約 45,000 個）からのハイスループットスクリーニングを行い、新規 PolyQ 凝集阻害化合物 99 種類を同定した。本研究では1）マウス脳内広範囲での長期間の遺伝子発現が期待できるアデノ随伴ウイルスベクター5型(AAV5)を用いて、PolyQ 病モデルマウスに対する QBP1 の遺伝子治療の効果を明らかにすることと、2）同定した新規 PolyQ 凝集阻害化合物について、PolyQ 病モデルショウジョウバエに対する治療効果を明らかにすることを目的とした。 【方法・結果】 1）<u>PolyQ 病モデルマウスに対する QBP1 による遺伝子治療</u> 生後7日齢のハンチントン病モデルマウス R6/2 の片側線条体に、QBP1 を発現する AAV5-QBP1 ベクターを注射し、3週間後（4週齢）に免疫染色を行った。その結果、注射側線条体でのハンチンチン陽性封入体の形成率は、コントロールの AAV5-GFP 注射群の 31.5%に比べて、AAV5-QBP1 注射群では 9.0%と有意な減少を認めた。現在、経時的な治療効果を含めてさらに詳細な解析を進めると共に、R6/2 マウスの運動障害などの神経症状に対する治療効果を検討している。 2）<u>PolyQ 凝集阻害化合物の PolyQ 病モデルショウジョウバエに対する治療効果の検討</u> スクリーニングにて同定した1次ヒット PolyQ 凝集阻害化合物について、PolyQ 病モデルショウジョウバエ MJDtr-Q78 Fly の複眼変性に対する治療効果を検討した。その結果、複眼変性を有意に抑制する PolyQ 凝集阻害化合物 QAI1、QAI2 を同定した。さらに複眼原基の免疫染色により、PolyQ 封入体形成の有意な抑制を認めた。現在、QAI1、QAI2 の治療効果についてさらに詳細な解析を進めると共に、他の1次ヒット化合物についての検討も進めている。 【考察】 以上の結果から、QBP1 による PolyQ 病の遺伝子治療の可能性が示された。また、新規 PolyQ 凝集阻害化合物 QAI1、QAI2 は PolyQ 病治療薬のリード化合物として期待される。			

第5領域 (公募班員)

研究代表者名 永井 義隆

発表論文

英文

(1) 原著論文

Nagai, Y.*, Inui, T., Popiel, H.A., Fujikake, N., Hasegawa, K., Urade, Y., Goto, Y., Naiki, H. & Toda, T. A. toxic monomeric conformer of the polyglutamine protein. *Nat. Struct. Mol. Biol.* in press.

Popiel, H.A., Nagai, Y.*(Equal contribution), Fujikake, N. & Toda, T. Protein transduction domain-mediated delivery of QBP1 suppresses polyglutamine-induced neurodegeneration *in vivo*. *Mol. Ther.* **15**, 303-309 (2007).

Xiong, H., Kobayashi, K., Tachikawa, M., Many, H., Takeda, S., Chiyonobu, T., Fujikake, N., Wang, F., Nishimoto, A., Morris, G.E., Nagai, Y., Kanagawa, M., Endo, T. & Toda, T. Molecular interaction between fukutin and POMGnT1 in the glycosylation pathway of α -dystroglycan. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **350**, 935-941 (2006).

Mizuta, I., Satake, W., Nakabayashi, Y., Ito, C., Suzuki, S., Momose, Y., Nagai, Y., Oka, A., Inoko, H., Fukae, J., Saito, Y., Sawabe, M., Murayama, S., Yamamoto, M., Hattori, N., Murata, M. & Toda, T. Multiple candidate gene analysis identifies α -synuclein as a susceptibility gene for sporadic Parkinson's disease. *Hum. Mol. Genet.* **15**, 1151-1158 (2006).

(2) 総説

(3) 著書

和文

(1) 原著論文

(2) 総説

永井義隆、ポピエル明子、藤掛伸宏、戸田達史：ポリグルタミン病に対する治療戦略. *BRAIN and NERVE* in press.

永井義隆：ポリグルタミンタンパク質のアミロイド線維形成機構と細胞毒性：露出 β シート仮説の提唱. *細胞工学* **26**, 168-172 (2007).

後藤祐児、桑田一夫、関島良樹、田中元雅、内木宏延、永井義隆、松崎勝巳、樋口京一：アミロイドーシス発症の分子機構解明を目指して：現状と展望、夢. *細胞工学* **26**, 181-185 (2007).

(3) 著書

永井義隆 : χ . 神経変性疾患への臨床応用 18. 神経変性疾患治療戦略としての低分子による蛋白質凝集阻害. *神経変性疾患のサイエンス* (高橋良輔編、南山堂) in press.

第5領域 (公募班員)			
研究課題名	VPS13A 遺伝子が関連する新たな神経細胞死カスケードの解明		
研究代表者名	佐野 輝	E-mail	sano@m3.kufm.kagoshima-u.ac.jp
所属・職名	鹿児島大学大学院 医歯学総合研究科 精神機能病学分野・教授		
研究分担者名	中村雅之		
分担者所属	鹿児島大学医学部歯学部附属病院 神経科精神科		
研究成果報告書 【はじめに】 有棘赤血球舞蹈病 (ChAc) はハンチントン病類似の神経精神症状と有棘赤血球症を呈する遺伝性神経変性疾患である。我々はポジショナルクローニング法を用いて病因遺伝子 <i>VPS13A</i> を同定し、予想遺伝子産物を chorein と命名した。さらに、ヒト疾患と同じ変異をもつ ChAc モデルマウスを作成し、ChAc 類似の症状を持つことを明らかにした。今回、マイクロアレイを用いて ChAc モデルマウスと野生型マウスとの遺伝子発現の差異を検討したところ、<i>gephyrin</i> 遺伝子発現量が ChAc モデルマウスで有意に高かった。ChAc 脳では、90%以上が GABA 作動性中型有棘ニューロンで構成される線状体において選択的神経変性を認める。<i>gephyrin</i> は、GABA_A 受容体のクラスターリング、特に $\gamma 2$ サブユニットをシナプスにクラスターリングさせる機能と密接に関わると考えられている。そこで今回我々は、ChAc モデルマウスと野生型マウス脳において <i>gephyrin</i>, GABA_A 受容体 $\alpha 1$ および $\gamma 2$ サブユニットのタンパク質レベルでの発現量の差異を検討した。 【方法】 1. マウス線条体におけるマイクロアレイ解析を行い、ChAc モデルマウスと野生型マウスでの遺伝子発現の差異を検討した。 2. <i>gephyrin</i>, GABA_A 受容体 $\alpha 1$ および $\gamma 2$ サブユニットのタンパク質レベルの発現の差異をウエスタンブロット法および免疫組織化学法を用いて確認した。 【結果・考察】 マウスの線条体を用いたマイクロアレイ解析において、ChAcモデルマウスでは<i>gephyrin</i>の遺伝子発現が高いことが示唆された。ウエスタンブロットの結果、ChAcモデルマウスの線条体および海馬において<i>gephyrin</i>とGABA_A受容体$\gamma 2$サブユニットの発現量が野生型マウスと比べて有意に高かった。免疫組織化学法では線条体、海馬および淡蒼球において<i>gephyrin</i>, GABA_A受容体$\gamma 2$サブユニットに加え$\alpha 1$サブユニットの発現もChAcモデルマウスで増加していた。 これらは、ChAc 脳における選択的線条体神経変性による GABA 作動性ニューロンの減少に伴い、GABA 投射先組織において <i>gephyrin</i> を介した GABA_A 受容体発現の上方調節が行われていることを示唆する。また、GABA は、虚血、低酸素、外傷などに対して神経保護的な作用を有するとの報告があり、投射元である ChAc モデルマウスの線条体における GABA_A 受容体発現量の増加は、ChAc の神経変性の主座である線条体において、在ニューロンや自己受容体を介した発現の上方調節ならびに神経変性に対する神経保護作用との関連を有する可能性がある。 疾患モデルマウスの線条体・海馬・淡蒼球等にて、<i>gephyrin</i> や GABA_A 受容体の発現が上方調節されていたことは、ChAc の病態を考える上で有用な所見と思われた。			

第5領域 (公募班員)

研究代表者名 佐野 輝

発表論文

英文

(2) 原著論文

Bajestan, S. N., Sabouri, A. H., Nakamura, M., Takashima, H., Keikhaee, M. R., Behdani, F., Fayyazi, M. R., Sargolzaee, M. R., Bajestan, M. N., Sabouri, Z., Khayami, E., Haghighi, S., Hashemi, S. B., Eiraku, N., Tufani, H., Najmabadi, H., Arimura, K., Sano, A. & Osame, M. Association of AKT1 haplotype with the risk of schizophrenia in Iranian population. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet.* **141**, 383-386 (2006).

Iga, J., Ueno, S., Yamauchi, K., Numata, S., Motoki, I., Tayoshi, S., Kinouchi, S., Ohta, K., Song, H., Morita, K., Rokutan, K., Tanabe, H., Sano, A. & Ohmori, T. Gene expression and association analysis of LIM (PDLIM5) in major depression. *Neuroscience letters* **400**, 203-207 (2006).

Kurano, Y., Nakamura, M., Ichiba, M., Matsuda, M., Mizuno, E., Kato, M., Izumo, S. & Sano, A. Chorein deficiency leads to upregulation of gephyrin and GABA(A) receptor. *Biochem Biophys Res Commun.* **351**, 438-442 (2006).

Walker, R. H., Liu, Q., Ichiba, M., Muroya, S., Nakamura, M., Sano, A., Kennedy, C. A. & Sclar, G. Self-mutilation in chorea-acanthocytosis: Manifestation of movement disorder or psychopathology? *Mov Disord.* **21**, 2268-2269 (2006).

Kurano, Y., Nakamura, M., Ichiba, M., Matsuda, M., Mizuno, E., Kato, M., Agemura, A., Izumo, S. & Sano, A. n vivo distribution and localization of chorein. *Biochem Biophys Res Commun.* **353**, 431-435 (2007).

Mizuno, E., Nakamura, M., Agemura, A., Kusumoto, A., Ichiba, M., Kurano, Y., Muroya, S. & Sano, A. Brain-specific transcript variants of 5' and 3' ends of mouse VPS13A and VPS13C. *Biochem Biophys Res Commun.* **353**, 902-907 (2007).

Iga, J. I., Ueno, S. I., Yamauchi, K., Numata, S., Tayoshi-Shibuya, S., Kinouchi, S., Nakataki, M., Song, H., Hokoishi, K., Tanabe, H., Sano, A. & Ohmori, T. Gene expression and association analysis of vascular endothelial growth factor in major depressive disorder. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry.* in press.

Jiang, H. Wu, YC., Nakamura, M., Liang, Y., Tanaka, Y., Holmes, S., Dawson, V.L., Dawson, T.M., Ross, C.A. & Smith, W.W. Parkinson's disease genetic mutations increase cell susceptibility to stress: Mutant alpha-synuclein enhances H₂O₂- and Sin-1-induced cell death. *Neurobiol Aging*. in press.

(2) 総説

Walker, R. H., Jung, H. H., Dobson-Stone, C., Rampoldi, L., Sano, A., Tison, F. & Danek, A. Neurologic phenotypes associated with acanthocytosis. *Neurology* **68**(2), 92-98 (2007).

(3) 著書

和文

(2) 原著論文

(2) 総説

赤崎安昭、佐野輝: D P C / D R G. *臨床精神医学* **35**, 352-354 (2006).

佐野輝: 精神神経疾患の遺伝子的背景. *分子精神医学* **6**, 220-222(2006).

佐野輝 : 精神神経疾患の遺伝子的背景 -多因子をめぐって-. *精神薬療研究年報* **38**, 1-4(2006).

中村雅之、佐野輝: リウマチ熱および小舞蹈病. *精神科治療学* **21**, 120-121(2006).

佐野のぞみ、佐野輝: てんかんの定義と原因. *小児看護* **30**, 138-144(2007).

中村雅之、佐野輝: 良性家族性成人型ミオクローヌス. *てんかん* **25**, 306-307(2007).

(3) 著書

第 5 領域 （公募班員）			
研究課題名	神経変性疾患の病態形成におけるオートファジーの役割		
研究代表者名	水島 昇	E-mail	nmizu.phy2@tmd.ac.jp
所属・職名	東京医科歯科大学・教授		
研究分担者名	原太一		
分担者所属	東京医科歯科大学		
研究成果報告書			
オートファジーはリソソームを分解の場とする非特異的なバルク分解システムである。オートファゴソーム形成に必須なAtg5を全身で欠損するマウスは出生直後に深刻な栄養不良に陥り致死となるが（Kuma et al. 2004 Nature）、このマウスは出生時にすでに肝や一部の神経細胞内にユビキチン陽性封入体が蓄積していることが判明した。これは胎生期のオートファジーによって、細胞内の異常タンパク質の蓄積・凝集が抑制されていたことを示すものであった。そこでより進んだステージの解析の目的に、神経特異的Atg5ノックアウトマウスを作製した。これにはAtg5floxマウスと、Nestinプロモータ制御による神経特異的Cre発現マウスを用いた。このマウスは生直後の栄養飢餓には問題なく耐えることができるが、生後4週目より進行性の運動障害（失調性歩行やfoot clasp reflexなど）を呈するようになった。病理組織学的解析では神経系広範囲にわたる神経細胞内封入体形成、軸索腫大、および大脳皮質錐体細胞や小脳プルキンエ細胞の脱落を認めた。これらの結果は、疾患に関連した変異タンパク質を発現していない状態でも、神経細胞内凝集体形成や神経変性に対してオートファジーが保護的作用をしていることを決定づけるものであった。現在疾患モデルマウスとの交配を進める一方で、オートファジーの活性が部分的に低下するマウスの作製などを試みている。			

第5領域 (公募班員)

研究代表者名 水島 昇

発表論文

英文

(1) 原著論文

Kuma, A., Matsui, M. & Mizushima, N. LC3, an autophagosome marker, can be incorporated into protein aggregates independent of autophagy: Caution in the interpretation of LC3 localization. *Autophagy* in press.

Adhami, F., Liao, G., Morozov, Y. M., Schloemer, A., Schmithorst, V. J., Lorenz, J. N., Dunn, R. S., Vorhees, C. V., Wills-Karp, M., Degen, J. L., Davis, R. J., Mizushima, N., Rakic, P., Dardzinski, B. J., Holland, S. K., Sharp, F. R. & Kuan, C.-Y. Cerebral ischemia-hypoxia induces intravascular coagulation and autophagy. *Am. J. Pathol.* **169**, 566-583 (2006).

Wang, Q.J., Ding, Y., Zhong, Y., Kohtz, S., Mizushima, N., Cristea, I.M., Rout, M.P., Chait, B.T., Heintz, N. & Yue, Z. Induction of autophagy in axonal dystrophy and degeneration. *J. Neurosci* **26**, 8057-8068 (2006).

Szeto, J., Kaniuk, N.A., Canadien, V., Nisman, R., Mizushima, N., Yoshimori, T., Bazett-Jones, D.P. & Brumell, J.H. ALIS are stress-induced protein storage compartments for substrates of the proteasome and autophagy. *Autophagy* **2**, 189-199 (2006).

Hosokawa, N., Hara, Y. & Mizushima, N. Generation of cell lines with tetracycline-regulated autophagy and a role for autophagy in controlling cell size. *FEBS Lett.* **580**, 2623-2629 (2006).

Hara, T., Nakamura, K., Matsui, M., Yamamoto, A., Nakahara, Y., Suzuki-Migishima, R. Yokoyama, M., Mishima, K., Saito, I., Okano, H. & Mizushima, N. Suppression of basal autophagy in neural cells causes neurodegenerative disease in mice. *Nature* **441**, 885-889 (2006).

(2) 総説

Mizushima, N. & Hara, T. Intracellular quality control by autophagy: How does autophagy prevent neurodegeneration? *Autophagy* **2**, 302-304 (2006).

(4) 著書

Mizushima, N. Transgenic models of autophagy. In *Autophagy in Immunity and Infection*, edited by Vojo

Deretic. Wiley-VCH. 55-67 (2006) .

和文

(1) 原著論文

(2) 総説

原太一、水島昇：神経細胞内浄化機構としてのオートファジー. *細胞工学* **25**, 644-645(2006).

水島昇：オートファジー. *炎症と免疫* **121**, 569-571 (2006).

小松雅明、千葉智樹、水島昇：オートファジーによる細胞内品質管理. *蛋白質核酸酵素* **51**, 1515-1518 (2006).

水島昇：オートファジーの生理学：タンパク質代謝システムとしての役割. *医学のあゆみ* **216**, 509-513 (2006).

(3) 著書

原太一、水島昇：神経変性疾患におけるオートファジーの役割. 「神経変性疾患のサイエンス」
高橋良輔編 南山堂 in press.

第 5 領域 （公募班員）			
研究課題名	軽度発達障害の眼球運動と機能画像による病態の研究		
研究代表者名	福島 順子	E-mail	jf002@cme.hokudai.ac.jp
所属・職名	北海道大学医学部保健学科・教授		
研究分担者名	宮本環		
分担者所属	北海道大学医学研究科認知行動分野		
研究成果報告書 研究の背景: 広汎性発達障害の診断基準は、DSM-IV などによる症状からの診断法に頼っており、検査所見などによる診断法は未だ確立されていない。また、その病因について遺伝学的研究が行われているが、それがどのような脳機能の障害として発現するのかについては未だ明らかではない。一方、眼球運動は、他の運動に比べて最も研究の進んでいる領域である。広汎性発達障害の研究にとっての眼球運動の利点は、（１）動物実験や神経疾患患者での所見を利用できる（２）正常発達についてのデータがある（３）認知を調べる検査よりも複雑でなく、被験者が理解しやすい（４）定量的な解析ができることなどである。 目的: 本研究の目的は、高機能自閉症、アスペルガー症候群の小児例、成人例と健常対照群に種々の眼球運動課題を行ってその結果を比較し、特徴的所見を抽出することと、障害の性質とその候補となる脳領域を推定し、次年度からの機能的画像の基礎的データを供給することである。 方法: 小児例では 6-14 歳、成人例では 20-35 歳の知能低下のない (IQ 70 以上) の高機能自閉症者 11 名、アスペルガー症候群 7 名の計 18 名と年齢をマッチさせた健常者 18 名に、以下の眼球運動課題を行った。（１）視覚誘導性サッカード（２）アンチサッカード（３）記憶誘導性サッカード（４）正弦波刺激の smooth pursuit（５）step-ramp 刺激の smooth pursuit で、赤外線吸光度を利用した眼球運動記録装置を用いた。 結果: 広汎性発達障害群(PDD)と健常群(CON)の間で有意差があったのは、アンチサッカードの視標を見てしまうエラー、潜時の延長、垂直 sinusoidal smooth pursuit におけるゲインの低下、step-ramp smooth pursuit の潜時の延長であった。また、アンチサッカード、記憶誘導性サッカードの速度の低下の傾向があった。これらの異常は、saccade 系と pursuit 系ともに見られ、両者の成績に相関が見られた。 考察: アンチサッカードでのエラーが多いことは、反射性サッカードの抑制困難であり、前頭眼野、前頭前野、補足眼野などの機能障害が考えられる。垂直 smooth pursuit(VSP, VSPB)での gain が低下していたことは、小脳片葉から前頭葉眼球運動領域へのフィードバック経路の機能障害の可能性を示す。 最近、MRI や死後脳の研究から、自閉症脳の前頭葉背外側部、及び内側部の容積が異常に大きく細胞の配列が乱れていること、病理組織学的に neuroinflammation を示すグリア細胞の増殖が前頭葉の前述の部位と小脳にみられることが、報告され(Vargas 2004)、また、前頭葉と他の大脳皮質を結ぶ線維の形成不全が指摘されている(Courchesne 2005)。 今回の眼球運動の結果は、これらの領域の機能障害として説明可能であると考えられる。			

第5領域 (公募班員)

研究代表者名 福島 順子

発表論文

英文

(1) 原著論文

Kasahara, S., Akao, T., Fukushima, J., Kurkin, S.&Fukushima, K. Further evidence for selective difficulty of upward eye pursuit in juvenile monkeys: effects of optokinetic stimulation, static roll tilt, and active head movements. *Exp. Brain Res.* **171**,306-321(2006).

Kurkin, S., Akao, T., Fukushima, J.& Fukushima, K. Activity of pursuit neurons in the caudal part of the frontal eye fields during static roll-tilt. *Exp. Brain Res.* **176**,658-664(2007).

Fukushima, J., Kasahara, S., Asaka, T., Saito, H.&Yamanaka, M. Behavioral findings during recovery after experimental stroke in monkeys -Assessment with Modified Hand performance Test-. *J. Phys. Ther. Sci.***19**,33-40(2007).

Saito, H., Asaka, T., Fukushima, J. & Takeda, N. Effects on anticipatory postural adjustments by repetition of the tiptoe movement. *J. Phys. Ther. Sci.*,**19**,83-90(2007).

Takahashi, T., Miyamoto, T., Terao, A.& Yokoyama, A. Cerebral activation related to the control of mastication during changes in food hardness. *Neuroscience* **145**,791-794(2007).

Akao, T., Saito, H., Fukushima, J., Kurkin, S.& Fukushima, K. Latency of vestibular response of pursuit neurons in the caudal frontal eye fields to whole body rotation. *Exp. Brain Res.* in press.

Toyomura, A., Koyama, S., Miyamaoto, T., Terao, A., Omori, T., Murohashi, H. &Kuriki, S. Neural correlates of auditory feedback control in human. *Neuroscience* in press.

(2) 総説

Fukushima, J., Akao, T., Kurkin, S., Kaneko, CRS.&Fukushima, K. The vestibular-related frontal cortex and its role in smooth-pursuit eye movements and vestibular-pursuit interactions. *J. Vest. Res.* **16**,1-22(2006).

(3) 著書

和文

(1) 原著論文

(2) 総説

(3) 著書

福島順子：第16章 感覚系、運動系、統合系. 大野忠雄他編集「トータル人体の構造と機能」、丸善出版 (2007).

福島順子：第15章 運動機能. II. 運動制御のしくみ. 二宮石雄他編集「スタンダード生理学」、文光堂 (2007).

第5領域（公募班員）			
研究課題名	機能性精神疾患の皮質錐体細胞回路障害の two hit model 仮説の構築		
研究代表者名	兼子 直	E-mail	sk@cc.hirosaki-u.ac.jp
所属・職名	弘前大学医学部神経精神医学講座・教授		
研究分担者名	岡田元宏 ¹⁾ 上野伸哉 ²⁾ 福澤雅志 ³⁾ 朱剛 ⁴⁾		
分担者所属	1) 三重大学大学院神経感覚医学講座 2) 弘前大学医学部附属脳血管病態研究施設 3) 弘前大学農学生命科学部		

研究成果報告書

研究の背景

Adaptor protein complex 3B (AP3B)は少なくとも、シナプス小胞膜上の小胞性 GABA トランスポーターの輸送担体であり、AP3B の機能障害は二次的な GABA 伝達系障害呈する。一方、イノシトール3リン酸と GABA 受容体 gamma2 サブユニットの輸送蛋白(PRIP)をコードする遺伝子ノックアウトマウス PRIP-KO は感情障害の標的であるイノシトール3リン酸と不安障害の標的である GABA 受容体 $\gamma 2$ サブユニットの輸送障害を生じている。これら遺伝子改変モデル動物を用い、行動学的解析及び神経科学的解析を行い、各種刺激による神経伝達系機能に与える影響を解析することで、機能性精神疾患の基本病態に接近出来ると考えた。

目的

シナプス小胞形成とシナプス小胞膜タンパクの輸送を司る AP3B を構成する $\mu 3B$ サブユニットをコードする遺伝子ノックアウトマウス(AP3M2-KO)と、PRIP1 遺伝子のノックアウトマウス(PRIP-KO)を用い、これら遺伝子改変モデル動物の、生命予後（寿命・繁殖能力・発達過程）及び光顕レベルの組織学的検索を行った。加えて、行動解析と神経伝達物質の遊離機能の年齢依存性機能変化のスクリーニングを行い、その関連性を解析することで、基本的病態が解明できると考えた。

方法・結果

AP3M2-KO と PRIP-KO は、光顕レベルの組織学的スクリーニングで明らかな変化は認められなかった。寿命・繁殖能力に関しても、C57B/6J へ9回の戻し交配を行った時点では、明らかな変化はなかった。しかし、行動解析では不安に対する耐性の低下が示唆される結果を得た（解析中のため詳細は記載しない）。Microdialysis を用い、神経伝達物質・神経修飾物質の開口分泌制御機構の解析を行い、シナプス前終末の神経伝達物質遊離の変異を確認したが、AP3M2-KO の神経伝達物質遊離の低下が検出されたが、PRIP-KO は逆に神経伝達物質の遊離亢進が検出された。

考察

現在取得している結果だけでは、AP3M2-KO と PRIP-KO の病態を考察するには不十分な結果ではあるが、この両遺伝子改変モデル動物のフェノタイプは類似してはいるが、神経伝達物質遊離機能を指標とした実験結果では、神経科学的な背景は明らかに異なる可能性を示唆する。今後は年齢依存性の遺伝子発現プロファイリングを視野に入れた、網羅的な解析も計画している。

第5領域 (公募班員)

研究代表者名 兼子 直

発表論文

英文

(1) 原著論文

Zhu, G., Okada, M., Yoshida, S., Mori, F., Hirose, S., Wakabayashi, K. & Kaneko, S. Involvement of Ca^{2+} -induced Ca^{2+} releasing system in interleukin-1 β -associated adenosine release. *Eur J Pharmacol.* **532**, 246-252 (2006).

Kojima, T., Mukai, W., Fuma, D., Ueda, Y., Okada, M., Sakaki, Y. & Kaneko, S. Determination of genomic breakpoints in an epileptic patient using genotyping array. *Biochem Bioph Res Co.* **341(3)**, 792-796 (2006).

Yasui-Furukori, N. & Kaneko, S. Digitalis intoxication induced by paroxetine co-administration. *Lancet.* **367**, 788 (2006).

Yasui-Furukori, N., Saito, M., Nakagami, T., Kaneda, A., Tateishi, T. & Kaneko, S. Association between multidrug resistance 1 (MDR1) gene polymorphisms and therapeutic response to bromperidol in schizophrenic patients: A preliminary study. *Prog Neuro-Psychopharmacol Biol Psychiat.* **30**, 286-291 (2006).

Wakabayashi, K., Mori, F., Hasegawa, M., Kusumi, T., Yoshimura, I., Takahashi, H. & Kaneko, S. Co-localization of β -peptide and phosphorylated tau in astrocytes in a patient with corticobasal degeneration. *Neuropathology.* **26**, 66-71 (2006).

Zhu, G., Okada, M., Yoshida, S., Mori, F., Ueno, S., Wakabayashi, K. & Kaneko, S. Effects of interleukin-1 β on hippocampal glutamate and GABA releases associated with Ca^{2+} -induced Ca^{2+} releasing systems. *Epilepsy Res.* **71**, 107-116 (2006).

Niioka, T., Yasui-Furukori, N., Uno, T., Sugawara, K., Kaneko, S. & Tateishi, T. Identification of a shingle time-point for plasma lansoprazole measurement that adequately reflects area under the concentration-time curve. *Ther Drug Monit.* **28(3)**, 321-325 (2006).

(2) 総説

(3) 著書

和文

(1) 原著論文

古郡規雄、岩島久美子、斉藤まなぶ、金田絢子、中神卓、兼子直：統合失調症における長期予後とドーパミン関連遺伝子多型の関係について. *精神薬療基金研究年報* **38**, 76-80 (2006).

(2) 総説

古郡規雄、三浦淳、兼子直：第3章 薬物療法：薬理遺伝. *臨床精神医学* **35**(増刊号), 415-420 (2006).

(3) 著書

兼子直：Heinz N. 改訂版 バルプロ酸の臨床薬理 より良い使い方を求めて. 2006.9.26 改訂版第1刷発行、総頁 183、株ライフ・サイエンス、東京 (2006).

第5領域（公募班員）			
研究課題名	前頭前野皮質に特徴的なモノアミン神経伝達制御の認知機能障害における役割		
研究代表者名	曾良 一郎	E-mail	isora@mail.tains.tohoku.ac.jp
所属・職名	東北大学大学院医学系研究科 精神・神経生物学分野・教授		
研究分担者名	富田博秋		
分担者所属	東北大学大学院医学系研究科 精神・神経生物学分野		
研究成果報告書			
前頭前野皮質に投射するドーパミン神経は大脳基底核への投射と比較して極めて少数であるにもかかわらず認知機能に重要な役割を担っていると考えられている。PPIは統合失調症において観察される認知機能障害の数少ない生理学的指標であり、動物モデルにおいてもヒトと同様な計測手法を用いることが可能である。我々は大脳基底核でのドーパミン神経伝達が過剰なドーパミントランスポーター(DAT)欠損マウスが PPI の障害を示し、選択的ノルエピネフリントランスポーター(NET)阻害剤である nisoxetine の全身投与により、DAT 欠損マウスにおける PPI の改善効果に NET が関与している可能性を見出した。また、脳内微小透析法より DAT 欠損マウスへの nisoxetine 全身投与時に前頭前野皮質において細胞外ドーパミンが顕著に上昇することを明らかにした。以上より同マウスにおける PPI の改善には前頭前野におけるドーパミンの動態が関与している可能性が考えられた。前頭前野皮質はドーパミン神経に加えてノルエピネフリン神経も投射している。また、側坐核はノルエピネフリン神経に比べドーパミン神経がより多く投射している領域であり、モノアミン取り込み阻害剤投与による PPI 障害の最も重要な部位でもある。DAT 欠損マウスにおける NET 阻害による PPI の改善に関与する脳部位および神経回路を明らかにするため、野生型あるいは DAT 欠損マウスに nisoxetine を局所投与し、PPI を測定した。脳位固定装置を用いて内側前頭前野および側座核に局所投与用カニューレを脳の左右両側に挿入し、カニューレ挿入の PPI への影響を調べたところ、野生型あるいは DAT 欠損マウスにおいて前頭前野皮質・側坐核ともにカニューレ挿入の手術前後で PPI に影響は見られなかった。その上で側坐核へ nisoxetine (4, 16 micro g/micro l) を局所投与したところリングル液投与時と比較して DAT 欠損マウスの PPI に変化は見られず、有意差は認められなかった。一方、前頭前野皮質への nisoxetine 局所投与ではリングル液投与時と比べ、4 micro g/micro l の濃度においてプレパルス 3, 6, 12 dB のいずれにおいても PPI は改善傾向を示した。前頭前野皮質では DAT の発現が少なく、より豊富に存在する NET が細胞外ドーパミン濃度を調節していると考えられている。以上の結果は前頭前野皮質では大脳基底核と異なる特徴的なモノアミン神経伝達の制御が認知機能に関与している可能性を示唆した。また、対応するモノアミン以外の他のモノアミントランスポーターによる補完的再取込みのメカニズムを解析するために免疫組織学的手法を用い、現在細胞内ドーパミンの可視化に成功し、その手技を用いて野生型および DAT 欠損マウスの前頭前野皮質における細胞内ドーパミンの局在を明らかにした。			

第5領域 (公募班員)

研究代表者名 曾良 一郎

発表論文

英文

(1) 原著論文

Wu, HE., Sun, HS., Terashivili, M., Schwasinger, E., Sora, I., Scott, F. Hall, Uhl, GR. & Tseng, LF. *dextro-* and *levo*-morphine attenuate opioid delta and kappa receptor agonist produced analgesia in mu-opioid receptor knockout mice. *Eur. J. Pharmacol.* **531**(1-3),103-107 (2006).

Arai, M., Yamada, K., Toyota, T., Obata, N., Haga, S., Yoshida, Y., Nakamura, K., Minabe, Y., Ujike, H., Sora, I., Ikeda, K., Mori, N., Yoshikawa, T. & Itokawa, M. Association Between Polymorphisms in the Promoter Region of the Sialyltransferase 8B (SIAT8B) Gene and Schizophrenia. *Biol. Psychiatry* **59**,652-659 (2006).

Yamada, H., Shimoyama, N., Sora, I., Uhl, R. G., Fukuda, Y., Moriya, H. & Shimoyama, M. Morphine can produce analgesia via spinal kappa opioid receptors in the absence of mu opioid receptors. *Brain Research.* **1083**,61-69 (2006).

Kasai, S., Han, W., Ide, S., Hata, H., Takamatsu, Y., Yamamoto, H., Uhl, GR., Sora, I. & Ikeda, K. Involvement of the 3' non-coding region of the mu opioid receptor gene in morphine-induced analgesia. *Psychiatry Clin Neurosci.* **60**, S11-17 (2006) .

Nomura, A., Ujike, H., Tanaka, Y., Otani, K., Morita, Y., Kishimoto, M., Morio, A., Harano, M., Inada, T., Yamada, M., Komiyama, T., Sekine, Y., Iwata, N., Sora, I., Iyo, M., Ozaki, N. & Kuroda, S. Genetic variant of prodynorphin gene is risk factor for methamphetamine dependence. *Neurosci Lett.* **400**,158-162 (2006).

Han, W., Kasai, S., Hata, H., Takahashi, T., Takamatsu, Y., Yamamoto, H., Uhl, GR., Sora, I. & Ikeda, K. Intracisternal A-Particle Element in the 3' Noncoding Region of the Mu Opioid Receptor Gene in CXBK Mice: A New Genetic Mechanism Underlying Differences in Opioid Sensitivity. *Pharmacogenetics and Genomics.* **16**(6),451-460 (2006).

Kobayashi, H., Hata, H., Ujike, H., Harano, M., Inada, T., Komiyama, T., Yamada, M., Sekine, Y., Iwata, N., Iyo, M., Ozaki, N., Itokawa, M., Naka, M., Ide, S., Ikeda, K., Numachi, Y. & Sora, I. Association analysis of delta-opioid receptor gene polymorphisms in methamphetamine dependence/psychosis. *Am J*

Med Genet. **141B**,482-486 (2006).

Han, W., Hata, H., Imbe, H., Liu, QR., Takamatsu, Y., Koizumi, M., Murphy, NP., Senba, E., Uhl, GR. Sora, I. & Ikeda, K. Increased body weight in mice lacking mu-opioid receptors. *Neuroreport.* **17(9)**,941-944 (2006).

Ide, S., Kobayashi, H., Ujike, H., Ozaki, N., Sekine, Y., Inada, T., Harano, M., Komiyama, T., Yamada, M., Iyo, M., Iwata, N., Tanaka, K., Shen, H., Iwahashi, K., Itokawa, M., Minami, M., Satoh, M., Ikeda, K. & Sora, I. Linkage disequilibrium and association with methamphetamine dependence/psychosis of mu-opioid receptor gene polymorphisms. *Pharmacogenomics J.* **6(3)**,179-188 (2006).

Kobayashi, H., Ujike, H., Hasegawa, J., Yamamoto, M., Kanzaki, A. & Sora, I. Correlation of Tau gene polymorphism with age at onset of Parkinson's disease. *Neurosci Lett.* **405**,202–206 (2006).

Suzuki, A., Nakamura, K., Sekine, Y., Minabe, Y., Takei, N., Suzuki, K., Iwata, Y., Kawai, M., Takebayashi, K., Iyo, M., Ozaki, N., Inada, T., Iwata, N., Harano, M., Komiyama, T., Yamada, M., Sora, I., Ujike, H. & Mori, N. An association study between COMT gene polymorphism and methamphetamine psychotic disorder. *Psychiat Genet.* **16(4)**,133-138. (2006).

Nakamura, K., Chih-Ken, Chen., Sekine, Y., Iwata, Y., Anitha, Pillai., El-Wui, Loh., Takei, N., Kawai, M., Takebayashi, K., Suzuki, K., Minabe, Y., Tsuchiya, K., Yamada, K., Iyo, M., Ozaki, N., Inada, T., Iwata, N., Harano, M., Komiyama, T., Yamada, M., Sora, I., Ujike, H., David, M. Ball, Yoshikawa, T., Shih-Ku, Lin. & Mori, N. Association Analysis of SOD2 Variants with Methamphetamine Psychosis in Japanese and Taiwanese Populations. *Hum Genet.* **120(2)**,243-252 (2006).

Ide, S., Minami, M., Ishihara, K., Uhl, GR., Sora, I. & Ikeda, K. Mu opioid receptor-dependent and independent components in effects of tramadol. *Neuropsychopharmacology.* **51(3)**,651-658 (2006).

Yamamoto, H., Imai, K., Kamegaya, E., Takamatsu, Y., Irigoien, M., Hagino, Y., Kasai, S., Shimada, K., Yamamoto, T., Sora, I., Koga, H. & Ikeda, K. Repeated methamphetamine administration alters expression of the NMDA receptor channel $\epsilon 2$ subunit and kinesins in the mouse brain. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* **1074**, 97–103 (2006).

Yamashita, M., Fukushima, S., Shen, H., Hall, FS., Uhl, GR., Numachi, Y., Kobayashi, H. & Sora, I. Norepinephrine Transporter Blockade Can Normalize the Prepulse Inhibition Deficits Found in Dopamine Transporter Knockout Mice. *Neuropsychopharmacology.* **31(10)**,2132-2139 (2006).

Ujike, H., Sakai, A., Nakata, K., Tanaka, Y., Kodaka, T., Okahisa, Y., Harano, M., Inada, T., Yamada, M., Komiyama, T., Hori, T., Sekine, Y., Iwata, N., Sora, I., Iyo, M., Ozaki, N. & Kuroda, S. Association study of the dihydropyrimidinase-related protein 2 gene and methamphetamine psychosis. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* **1074**, 90–96 (2006).

Nomura, A., Ujike, H., Tanaka, Y., Kishimoto, M., Otani, K., Morita, Y., Morio, A., Harano, M., Inada, T., Yamada, M., Komiyama, T., Hori, T., Sekine, Y., Iwata, N., Sora, I., Iyo, M., Ozaki, N. & Kuroda, S. Association study of the tumor necrosis factor- α gene and its 1A receptor gene with methamphetamine dependence. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* **1074**, 116–124 (2006).

Morio, A., Ujike, H., Nomura, A., Tanaka, Y., Morita, Y., Otani, K., Kishimoto, M., Harano, M., Inada, T., Komiyama, T., Yamada, M., Sekine, Y., Iwata, N., Iyo, M., Sora, I., Ozaki, N. & Kuroda, S. No association between CART (Cocaine- and Amphetamine-Regulated Transcript) gene and methamphetamine dependence. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* **1074**, 411–417 (2006).

Aoyama, N., Takahashi, N., Kitaichi, K., Ishihara, R., Saito, S., Maeno, N., Ji, X., Takagi, K., Sekine, Y., Iyo, M., Harano, M., Komiyama, T., Yamada, Y., Sora, I., Ujike, H., Iwata, N., Inada, T. & Ozaki, N. Association Between Gene Polymorphisms of SLC22A3 and Methamphetamine Use Disorder. *Alcohol Clin Exp Res.* **30(10)**, 1644–1649 (2006).

Kobayashi, H., Ujike, H., Hasegawa, J., Yamamoto, M., Kanzaki, A. & Sora, I. Identification of a risk haplotype of the α -synuclein gene in sporadic Parkinson's disease. *Mov Disord.* **21(12)**, 2157–64 (2006).

Doi, N., Itokawa, M., Hoshi, Y., Arai, M., Furukawa, A., Ujike, H., Sora, I. & Yoshikawa, T. A resistance gene in disguise for schizophrenia? *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet.* **144(2)**, 165–173 (2006).

Ujike, H., Sakai, A., Nakata, K., Tanaka, Y., Kodaka, T., Okahisa, Y., Harano, M., Inada, T., Yamada, M., Komiyama, T., Hori, T., Sekine, Y., Iwata, N., Sora, I., Iyo, M., Ozaki, N. & Kuroda, S. Association Study Between The Dihydropyrimidinase-related Protein 2 Gene And Methamphetamine Psychosis. Submitted to *Ann New York Acad Sci.* **1074**, 90–6 (2006).

Okuyama, K., Ohwada, K., Sakurada, S., Sato, N., Sora, I., Tamura, G., Takayanagi, M. & Ohno, I. The distinctive effects of acute and chronic psychological stress on airway inflammation in a murine model of allergic asthma. *Allergology International.* **56(1)**, 29–35 (2007).

Harburg, GC., Hall, FS., Harrist, AV., Sora, I., Uhl, GR. & Eisch, AJ. Knockout of the mu opioid receptor enhances the survival of adult-generated hippocampal granule cell neurons. *Neuroscience*. **144(1)**,77-87(2007).

(2) 総説

(3) 著書

和文

(1) 原著論文

(2) 総説

曽良一郎、伊藤美紀、沼知陽太郎：違法ドラッグと覚せい剤の精神神経毒性と標的分子への作用機序. *医学のあゆみ* **217(13)**,1152-1154 (2006).

曽良一郎、福島攝：脳の発達障害 ADHD はどこまでわかったか？ *日本薬理学雑誌* **128**,8-12 (2006).

曽良一郎：第3回 Schizophrenia 研究会 講演紹介. *臨床精神薬理* **9(8)**, 1964-1702 (2006).

曽良一郎、有銘預世布：前頭葉のモノアミン神経伝達による行動制御機構. *実験医学* **24(15)**,84-89(2006).

曽良一郎、朴英善：モノアミン神経伝達と「こころの病」. *Bionics* **24(11)**,40-45(2006).

(3) 著書

曽良一郎：こころの病と脳内神経伝達物質. In: *こころの病・脳の病*：9-27 NPO 法人脳の世紀推進会議編、東京、(2006).

第5領域（公募班員）			
研究課題名	統合失調症のジェネティックス・エピジェネティックス解析に基づく疾患パスウェイ解析		
研究代表者名	有波 忠雄	E-mail	tarinami@md.tsukuba.ac.jp
所属・職名	筑波大学大学院人間総合科学研究科・教授		
研究分担者名			
分担者所属			
研究成果報告書 研究の背景と目的 統合失調症の発症は遺伝的な影響を強く受けるが遺伝的な影響のみでは発症には至らず、エピジェネティックな要因も重要な役割を果たしていると推測されている。統合失調症の分子病態を把握するためにはジェネティック、エピジェネティックの両者をともに解析する必要がある。すでに進捗しつつあるジェネティックなデータに加えて、エピジェネティックな遺伝子変化を来す遺伝子を網羅的に同定し、統合失調症の疾患パスウェイを解明することを目的とした。 対象と方法 対象 連鎖 (JSSLG) 236 家系 602 人、TDT (JSSLG) 171 家系、548 人症例・対照各々2,087 人・2,096 人、死後脳は統合失調症 98、24 コントロール (Brodmann area 9)を使用した。ゲノムワイド関連解析は Sentrix® Human-1 Genotyping BeadChip (Illumina)、TaqMan 法、遺伝子発現は Illumina Sentrix® Human-6 Expression BeadChip、TaqMan realtime PCR 法を使った。また The Stanley Medical Research Institute Online Genomics Database も参考にした。対立遺伝子特異的発現解析は SNaPShot 法を使用した。解析ソフトウェアは GeneSpring, Ingenuity Pathways Analysis を使用した。研究は筑波大学および共同研究機関のヒトゲノム・遺伝子解析研究のための倫理委員会の承認を受けて行われた。 結果と考察 ゲノムワイド関連解析により 5 遺伝子が、また、発現解析からは 2 遺伝子が、エピジェネティックな制御による統合失調症と関連する 1 遺伝子が同定された。これらの遺伝子のパスウェイ解析を行ったところ、もっとも遺伝子関連の強い遺伝子のコードしている分子がもっとも多くに関連遺伝子と直接パスウェイを作っており、鍵遺伝子である可能性が示された。この遺伝子は Stanley のデータベースでも遺伝子発現解析の差が見られている遺伝子であった。このパスウェイは特にドーパミンシグナル伝達系に関わっている可能性が示された。また、エピジェネティックな機序にも関わっている可能性がある遺伝子であった。 本研究では統合失調症に関連するジェネティック、エピジェネティックな機構にともに関わる鍵遺伝子を同定した。関連するのはミスセンス多型であるため、その機能解析を行い、統合失調症に関わるパスウェイをより特定する必要がある。			

第5領域 (公募班員)

研究代表者名 有波 忠雄

発表論文

英文

(1) 原著論文

Fukuda, Y., Koga, M., Arai, M., Noguchi, E., Ohtsuki, T., Horiuchi, Y., Ishiguro, H., Niizato, K., Iritani, S., Itokawa, M. & Arinami, T. Monoallelic and unequal allelic expression of the HTR2A gene in human brain and peripheral lymphocytes. *Biol Psychiatry*. **60**, 1331-5 (2006).

Onaivi, E.S., Ishiguro, H., Gong, J.P., Patel, S., Perchuk, A., Meozzi, P.A., Myers, L., Mora, Z., Tagliaferro, P., Gardner, E., Brusco, A., Akinshola, B.E., Liu, Q.R., Hope, B., Iwasaki, S., Arinami, T., Teasensfitz, L. & Uhl, G.R. Discovery of the presence and functional expression of cannabinoid CB2 receptors in brain. *Ann N Y Acad Sc.* **1074**, 514-36 (2006).

Ishiguro, H., Horiuchi, Y., Koga, M., Inada, T., Iwata, N., Ozaki, N., Ujike, H., Muratake, T., Someya, T. & Arinami, T. RGS4 is not a susceptibility gene for schizophrenia in Japanese: association study in a large case-control population. *Schizophr Res.* **89**, 161-4 (2007).

Ishiguro, H., Koga, M., Horiuchi, Y., Inada, T., Iwata, N., Ozaki, N., Ujike, H., Muratake, T., Someya, T. & Arinami, T. PICK1 is not a susceptibility gene for schizophrenia in a Japanese population: Association study in a large case-control population. *Neurosci Res.* in press.

Ishiguro, H., Iwasaki, S., Teasensfitz, L., Higuchi, S., Horiuchi, Y., Saito, T., Arinami, T. & Onaivi, E.S. Involvement of cannabinoid CB2 receptor in alcohol preference in mice and alcoholism in humans. *Pharmacogenomics J.* in press.

Koga, M., Ishiguro, H., Horiuchi, Y., Albalushi, T., Inada, T., Iwata, N., Ozaki, N., Ujike, H., Muratake, T., Someya, T. & Arinami, T. Failure to confirm the association between the FEZ1 gene and schizophrenia in a Japanese population. *Neurosci Lett.* in press.

(2) 総説

Arinami, T. Analyses of the associations between the genes of 22q11 deletion syndrome and schizophrenia. *J Hum Genet.* **51**, 1037-45 (2006).

(3) 著書

和文

(1) 原著論文

(2) 総説

有波忠雄：ドバミン受容体. *分子精神医学* **6**, 429-32 (2006).

有波忠雄：統合失調症の疾患遺伝子探索. *実験医学* **25**, 209-15 (2006).

有波忠雄：分子遺伝学総論・方法論：とくに精神疾患に焦点を当てて. *神経研究の進歩* **50**, 660-72 (2006).

(3) 著書

第5領域 (公募班員)			
研究課題名	DISC1 結合蛋白を標的とした統合失調症の病態研究		
研究代表者名	尾崎 紀夫	E-mail	ozaki-n@med.nagoya-u.ac.jp
所属・職名	名古屋大学 大学院医学系研究科・教授		
研究分担者名	池田匡志 1,2、岩田伸生 2、田谷真一郎 3、貝淵弘三 3		
分担者所属	1 名古屋大学 大学院医学系研究科 精神生物学・精神医学 2 藤田保健衛大学 精神医学 3 名古屋大学 大学院医学系研究科 神経情報薬理学		

研究成果報告書

[はじめに]

DISC1 結合タンパクである 14-3-3 ε 遺伝子(YWHAE)の 5'flanking region に位置する SNP-1(G>C)の頻度が統合失調症では有意に少ないことを遺伝統計学的に確認し、さらに C allele を持つ insert は有意に発現が増加していること、in vivo での mRNA 発現量と蛋白発現量の解析結果でも C allele (C/C or C/G)を有する個体は G/G を有する個体より末梢血において発現が増加していること、を昨年度までに明らかにした。

以上を踏まえ、本年度は、1) 更新された HapMap dat を反映した関連解析を行う、2)関連解析の対象数を増加させる、3) mRNA 発現量と蛋白発現量検討を行う対象数を増加させる。以上三点に留意し、これまでの検証結果をより確かなものとした。

[方法]

- ・ YWHAE の最新 HapMap data(release#21)を反映し、また SNP-1 に関する second-set sample を拡張し（統合失調症=1045, 正常対照者=1376）、関連解析を行った。

- ・ 対象数を 27 に増やし、末梢血から抽出した mRNA 発現量と蛋白発現量検討を RT-PCR 法、Western blotting 法によって genotype 毎に差異があるか否かを検討した。この際、疾患群の試料を用いることは、薬物の影響があると考えられ、正常対照者のサンプルを用いた。

[結果]

- ・ 関連解析の結果：計 11 個の tagging SNPs で、7 個から有意な関連が得られた。SNP-1 についての second-set analysis でも、より強固な結果が得られた。
- ・ mRNA 発現量と蛋白発現量検討：これまでの報告と同様に、SNP-1 の minor allele(C allele)を持つサンプルでは 14-3-3 ε の mRNA 発現量と蛋白発現量が有意に増加する結果が得られた。

[考察]

- ・ 関連解析の方法を更新し、対象数を増やして検討した結果、統合失調症では SNP-1 の C allele が有意に低頻度であることが、遺伝統計学的に再確認された。2) Genotype が mRNA 発現量と蛋白発現量に与える影響に関して対象数を増やして検討した結果、C allele は 14-3-3 ε の mRNA 発現量と蛋白発現量を再確認された。1),2)の結果から、YWHAE の SNP-1 の C allele は、14-3-3 ε の発現を増加させて発症を抑制する、すなわち protective allele である可能性が再確認された。

- ・ 現在、1)14-3-3 ε ノックアウトマウスの行動解析、2) YWHAE の genotype が MRI で撮像したヒト中枢神経系の構造に対する影響の検討、の二点を実行中である。

第5領域 (公募班員)

研究代表者名 尾崎 紀夫

発表論文

英文

(1) 原著論文

Aoyama, N., Takahashi, N., Saito, S., Maeno, N., Ishihara, R., Ji, X., Miura, H., Ikeda, M., Suzuki, T., Kitajima, T., Yamanouchi, Y., Kinoshita, Y., Yoshida, K., Iwata, N., Inada, T. & Ozaki, N. Association study between kynurenine 3-monooxygenase gene and schizophrenia in the Japanese population. *Genes Brain Behav.* **5**, 364-8 (2006).

Aoyama, N., Takahashi, N., Kitaichi, K., Ishihara, R., Saito, S., Maeno, N., Ji, X., Takagi, K., Sekine, Y., Iyo, M., Harano, M., Komiyama, T., Yamada, M., Sora, I., Ujike, H., Iwata, N., Inada, T. & Ozaki, N. Association between gene polymorphisms of SLC22A3 and methamphetamine use disorder. *Alcohol Clin. Exp. Res.* **30**, 1644-9 (2006).

Hakamata, Y., Iwase, M., Iwata, H., Kobayashi, T., Tamaki, T., Nishio, M., Kawahara, K., Matsuda, H., Ozaki, N., Honjo, S. & Inada, T. Regional brain cerebral glucose metabolism and temperament: a positron emission tomography study. *Neurosci. Lett.* **396**, 33-7 (2006).

Chiba, S., Noguchi, H., Suzuki, T., Iwata, N., Ozaki, N., Taguchi, T., Kamiya, A., Kosuga, A., Tatsumi, M., Kamijima, K., Weinberger, D.R., Sawa, A. & Kunugi, H. Impact of the DISC1 Ser704Cys polymorphism on risk for major depression, brain morphology and ERK signaling. *Hum. Mol. Genet.* **15**, 3024-33 (2006).

Ide, S., Kobayashi, H., Ujike, H., Ozaki, N., Sekine, Y., Inada, T., Harano, M., Komiyama, T., Yamada, M., Iyo, M., Iwata, N., Tanaka, K., Shen, H., Iwahashi, K., Itokawa, M., Minami, M., Satoh, M., Ikeda, K. & Sora, I. Linkage disequilibrium and association with methamphetamine dependence/psychosis of mu-opioid receptor gene polymorphisms. *Pharmacogenomics J.* **6**, 179-88 (2006).

Iidaka, T., Matsumoto, A., Ozaki, N., Suzuki, T., Iwata, N., Yamamoto, Y., Okada, T. & Sadato, N. Volume of left amygdala subregion predicted temperamental trait of harm avoidance in female young subjects. A voxel-based morphometry study. *Brain. Res.* **1125**, 85-93 (2006).

Ikeda, M., Iwata, N., Suzuki, T., Kitajima, T., Yamanouchi, Y., Kinoshiya, Y., Sekine, Y., Iyo, M., Harano, M., Komiyama, T., Yamada, M., Sora, I., Ujike, H., Inada, T. & Ozaki, N. Positive association of

AKT1 haplotype to Japanese methamphetamine use disorder. *Int. J. Neuropsychopharmacol.* **9**, 77-81 (2006).

Ikeda, M., Iwata, N., Kitajima, T., Suzuki, T., Yamanouchi, Y., Kinoshita, Y. & Ozaki, N. Positive association of the serotonin 5-HT₇ receptor gene with schizophrenia in a Japanese population. *Neuropsychopharmacology* **31**, 866-71 (2006).

Ikeda, M., Iwata, N., Suzuki, T., Kitajima, T., Yamanouchi, Y., Kinoshita, Y. & Ozaki, N. No association of serotonin transporter gene (SLC6A4) with schizophrenia and bipolar disorder in Japanese patients: association analysis based on linkage disequilibrium. *J. Neural Transm.* **113**, 899-905 (2006).

Kishi, T., Ikeda, M., Suzuki, T., Kitajima, T., Yamanouchi, Y., Kinoshita, Y., Ozaki, N. & Iwata, N. No association of complexin1 and complexin2 genes with schizophrenia in a Japanese population. *Schizophr. Res.* **82**, 185-9 (2006).

Kobayashi, H., Hata, H., Ujike, H., Harano, M., Inada, T., Komiyama, T., Yamada, M., Sekine, Y., Iwata, N., Iyo, M., Ozaki, N., Itokawa, M., Naka, M., Ide, S., Ikeda, K., Numachi, Y. & Sora, I. Association analysis of delta-opioid receptor gene polymorphisms in methamphetamine dependence/psychosis. *Am. J. Med. Genet. B Neuropsychiatr. Genet.* **141**, 482-6 (2006).

Masui, T., Hashimoto, R., Kusumi, I., Suzuki, K., Tanaka, T., Nakagawa, S., Suzuki, T., Iwata, N., Ozaki, N., Kato, T., Kunugi, H. & Koyama, T. Lithium response and Val66Met polymorphism of the brain-derived neurotrophic factor gene in Japanese patients with bipolar disorder. *Psychiatr. Genet.* **16**, 49-50 (2006).

Morio, A., Ujike, H., Nomura, A., Tanaka, Y., Morita, Y., Otani, K., Kishimoto, M., Harano, M., Inada, T., Komiyama, T., Yamada, M., Sekine, Y., Iwata, N., Iyo, M., Sora, I., Ozaki, N. & Kuroda, S. No Association between CART (Cocaine- and Amphetamine-Regulated Transcript) Gene and Methamphetamine Dependence. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **1074**, 411-417 (2006).

Nakamura, K., Chen, C.K., Sekine, Y., Iwata, Y., Anitha, A., Loh el, W., Takei, N., Suzuki, A., Kawai, M., Takebayashi, K., Suzuki, K., Minabe, Y., Tsuchiya, K., Yamada, K., Iyo, M., Ozaki, N., Inada, T., Iwata, N., Harano, M., Komiyama, T., Yamada, M., Sora, I., Ujike, H., Ball, D.M., Yoshikawa, T., Lin, S.K. & Mori, N. Association analysis of SOD2 variants with methamphetamine psychosis in Japanese and Taiwanese populations. *Hum. Genet.* **120**, 243-52 (2006).

Nomura, A., Ujike, H., Tanaka, Y., Kishimoto, M., Otani, K., Morita, Y., Morio, A., Harano, M., Inada, T., Yamada, M., Komiyama, T., Hori, T., Sekine, Y., Iwata, N., Sora, I., Iyo, M., Ozaki, N. & Kuroda, S. Association Study of the Tumor Necrosis Factor- α Gene and Its 1A Receptor Gene with Methamphetamine Dependence. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **1074**, 116-124 (2006).

Nomura, A., Ujike, H., Tanaka, Y., Otani, K., Morita, Y., Kishimoto, M., Morio, A., Harano, M., Inada, T., Yamada, M., Komiyama, T., Sekine, Y., Iwata, N., Sora, I., Iyo, M., Ozaki, N. & Kuroda, S. Genetic variant of prodynorphin gene is risk factor for methamphetamine dependence. *Neurosci. Lett.* **400**, 158-62 (2006).

Shibata, H., Aramaki, T., Sakai, M., Ninomiya, H., Tashiro, N., Iwata, N., Ozaki, N. & Fukumaki, Y. Association study of polymorphisms in the GluR7, KA1 and KA2 kainate receptor genes (GRIK3, GRIK4, GRIK5) with schizophrenia. *Psychiatry Res.* **141**, 39-51 (2006).

Suzuki, A., Nakamura, K., Sekine, Y., Minabe, Y., Takei, N., Suzuki, K., Iwata, Y., Kawai, M., Takebayashi, K., Matsuzaki, H., Iyo, M., Ozaki, N., Inada, T., Iwata, N., Harano, M., Komiyama, T., Yamada, M., Sora, I., Ujike, H. & Mori, N. An association study between catechol-O-methyl transferase gene polymorphism and methamphetamine psychotic disorder. *Psychiatr. Genet.* **16**, 133-8 (2006).

Takahashi, N., Ishihara, R., Saito, S., Maemo, N., Aoyama, N., Ji, X., Miura, H., Ikeda, M., Iwata, N., Suzuki, T., Kitajima, T., Yamanouchi, Y., Kinoshita, Y., Ozaki, N. & Inada, T. Association between chromogranin A gene polymorphism and schizophrenia in the Japanese population. *Schizophr. Res.* **83**, 179-83 (2006).

Ujike, H., Sakai, A., Nakata, K., Tanaka, Y., Kodaka, T., Okahisa, Y., Harano, M., Inada, T., Yamada, M., Komiyama, T., Hori, T., Sekine, Y., Iwata, N., Sora, I., Iyo, M., Ozaki, N. & Kuroda, S. Association Study of the Dihydropyrimidinase-Related Protein 2 Gene and Methamphetamine Psychosis. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **1074**, 90-96 (2006).

Urata, T., Takahashi, N., Hakamata, Y., Iijima, Y., Kuwahara, N., Ozaki, N., Ono, Y., Amano, M. & Inada, T. Gene-gene interaction analysis of personality traits in a Japanese population using an electrochemical DNA array chip analysis. *Neurosci. Lett.* (2006).

Usui, H., Takahashi, N., Saito, S., Ishihara, R., Aoyama, N., Ikeda, M., Suzuki, T., Kitajima, T., Yamanouchi, Y., Kinoshita, Y., Yoshida, K., Iwata, N., Inada, T. & Ozaki, N. The 2',3'-cyclic nucleotide 3'-phosphodiesterase and oligodendrocyte lineage transcription factor 2 genes do not appear to be

associated with schizophrenia in the Japanese population. *Schizophr. Res.* **88**, 245-50 (2006).

(2) 総説

(3) 著書

和文

(1) 原著論文

(2) 総説

尾崎紀夫：統合失調症の病態と治療 再発予防,自立生活支援を見据えた急性期治療と維持治療
治療を受ける患者の視点を加味して統合失調症の再発防止を考える. *臨床精神薬理* **9**, 753-761
(2006).

小石誠二、尾崎紀夫：不安障害の分子遺伝学. *神経研究の進歩* **50**, 719-726 (2006).

山之内芳雄、池田匡志、尾崎紀夫、岩田仲生：Can a SNP on splicing variant of HTR4 predict post
psychotic depression or anxiety? *脳と精神の医学* **17**, 267-272 (2006).

高橋正洋、飯高哲也、尾崎紀夫：恐怖症性障害の生物学的研究. *臨床精神医学* **35**, 783-788 (2006).

(3) 著書

第5領域（公募班員）			
研究課題名	統合失調症のカルシニューリン仮説に基づいた統合失調症発症メカニズムの解明		
研究代表者名	宮川 剛	E-mail	miyakawa@hmro.med.kyoto-u.ac.jp
所属・職名	京都大学医学研究科・助教授		
研究分担者名	高雄啓三、遠山桂子、扇野寛史、大迫清子		
分担者所属	京都大学医学研究科		

研究成果報告書

背景と目的：研究代表者である宮川は、各種遺伝子改変マウスに対して幅広い領域をカバーした行動テストバッテリーを行うことにより、各種遺伝子の新規機能を見出してきた。この戦略により、カルシニューリン(CN)の前脳特異的欠損マウス(CN マウス)では、顕著な作業記憶の障害、注意の障害、社会的行動の障害などを含む統合失調症様の行動異常を示す(Miyakawa et al., 2003)ことと、統合失調症患者の DNA サンプルを用いた相関解析により CN 遺伝子が統合失調症と強く相関している(Gerber et al., 2003)ことを報告した。CN を介したシグナル伝達経路・機能はすでに詳細に知られている。しかしながら、そのうちのどのシグナル伝達経路/神経のメカニズムが統合失調症の発症要因として重要なのかは不明である。本研究の目的は、統合失調症の多様な症状のどれにどの経路・機能が重要な役割を果たしているのかを、遺伝子改変マウスの行動解析を行うことにより明らかにすることである。

方法：CN が関与するシグナル伝達経路/神経のメカニズムで、重要な役割を果たす分子の遺伝子改変マウスに対し、網羅的行動テストバッテリー（作業記憶テスト、注意に関するテスト、24 時間ホームケージ社会的行動テスト、活動量テストなど）を行うことにより、行動異常の有無を調べる。もし、ある特定の CN 関連分子の遺伝子欠損マウスが、CN マウスと同様に統合失調症様の顕著な行動障害を示せば、その経路が重要な役割を果たしていることになる。

結果と考察：本研究で行動解析を行った 6 系統の遺伝子改変マウスのうち、4 系統で活動性の亢進が見られ、2 系統で社会的行動に異常があり、1 系統で作業記憶に顕著な障害が見られた。これらの行動は CN マウスで見られるものと同方向の表現型であった。このことから (1)統合失調症の原因となるシグナル伝達経路は単純に 1 つの経路に特定できるものではないということ、(2)このような手法により遺伝子改変マウスを網羅的に行動解析することで、効率よく多数の精神疾患のモデルマウスを得ることができるということ、がわかった。行動解析した 6 系統のうち、作業記憶に顕著な障害を示した 1 系統については、著しい攻撃性、活動性の亢進、不安様行動の著しい低下があり、このマウスの活動性には 2～3 週間程度のゆっくりとした周期的な大きな波がある（ホームケージでの活動解析）ことが明らかになった。このような「周期的な気分の波」を示すマウスはこれまでに報告がなく、気分障害など何らかの精神疾患のよいモデル動物になると考えられる。さらに、ジーンチップによる遺伝子発現解析や、組織学的、生理学的解析を進めたところ、このマウスでは脳の一部が未成熟であることが分かってきた。

第5領域 (公募班員)

研究代表者名 宮川 剛

発表論文

英文

(1) 原著論文

Ihara, M., Yamasaki, N., Hagiwara, A., Tanigaki, A., Kitano, A., Hikawa, R., Tomimoto H., Noda, M., Takanashi, M., Mori, H., Hattori, N., Miyakawa, T. & Kinoshita, M. Sept4, a Component of Presynaptic Scaffold and Lewy Bodies, Is Required for the Suppression of alpha-Synuclein Neurotoxicity. *Neuron*. **53**, 519-533 (2007)

Hattori, S., Hashimoto, R., Miyakawa, T., Yamanaka, H., Maeno, H., Wada, K. & Kunugi, H. Enriched environments influence depression-related behavior in adult mice and the survival of newborn cells in their hippocampi. *Behav. Brain Res.* in press.

(2) 総説

Powell, C. M. & Miyakawa, T. Schizophrenia-Relevant Behavioral Testing in Rodent Models: A Uniquely Human Disorder? *Biol. Psychiatry*. **59**, 1198-1207 (2006).

Takao, K. & Miyakawa, T. Investigating Gene-to-Behavior Pathways in Psychiatric Disorders: The Use of a Comprehensive Behavioral Test Battery on Genetically Engineered Mice. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **1086**, 144-159 (2006).

Takao, K., Yamasaki, N. & Miyakawa, T. Impact of brain-behavior phenotyping of genetically-engineered mice on research of neuropsychiatric disorders. *Neuroscience Research*. in press.

(3) 著書

和文

(1) 原著論文

(2) 総説

山崎信幸、高雄啓三、宮川剛：遺伝子操作動物と精神障害のモデル。 *月刊精神科* **8 (3)**, 209-213 (2006).

高雄啓三、山崎信幸、宮川剛：「精神疾患のモデルマウス」. *実験医学増刊号* **24(15)**, 2300-2307 (2006).

高雄啓三、山崎信幸、宮川剛:「精神疾患・発達障害のモデルマウス」.*神経研究の進歩* **50(5)**, 673-682 (2006).

高雄啓三、山崎信幸、宮川剛:「遺伝子改変マウスの表現型解析を起点とした精神疾患の研究」.*脳* **21 10 (1)**, 9-17 (2007).

(3) 著書

宮川剛、高雄啓三: 遺伝子と行動.「改訂第2版 脳神経科学イラストレイテッド」、森寿, 真鍋俊也, 渡辺雅彦, 岡野栄之, 宮川剛編. 羊土社、267-274 (2006).

宮川剛:「遺伝子、脳、こころーマウスの研究からわかったこと」2005 世界脳週間の講演より.*子供の脳から大人の脳へ* 107-139 (2007).

第5領域（公募班員）			
研究課題名	脳内ノルアドレナリン神経機能の非侵襲的分子イメージングのための分子プローブの開発		
研究代表者名	清野 泰	E-mail	ykiyono@fmsrsa@fukui-med.ac.jp
所属・職名	福井大学高エネルギー医学研究センター・助教授		
研究分担者名			
分担者所属			
研究成果報告書 機能性精神疾患の病因の1つがノルアドレナリン（NA）神経機能の変化であるとする報告は数多くある。しかし、他の脳神経疾患と比較して、機能性精神疾患の病態解明が遅れている理由の1つに、その病態解明には必須であると考えられる患者のNA神経機能を非侵襲的にイメージングできないことが挙げられる。そこで、機能性精神疾患領域で強く望まれてきたNA神経の分子イメージングを核医学的なアプローチにより達成することを目的とする分子イメージングプローブを開発し、その有効性を評価することを計画した。 分子イメージングプローブのターゲットとしては、NA神経のプレシナプスに存在するノルエピネフリン・トランスポータ（NET）を選択した。このNETをターゲットとする分子イメージングプローブとして放射性ヨウ素-123標識(2S,αS)-[¹²³I]-2-[α-(2-iodophenoxy)benzyl]morpholine ((S,S)-IPBM)を開発し、正常ラットを用いてプローブの評価を行った。その結果、(S,S)-IPBMはNETに対する高い親和性と選択性を持ち、脳内のNETの分布と非常に良く相関した脳内集積を示し、NETイメージングプローブとして非常に優れた性質を有していることを明らかにしてきた。そこで、(S,S)-[¹²³I]-IPBMを臨床応用にむけた候補プローブとして、本年度は動物用SPECT装置を用いて、(S,S)-[¹²³I]-IPBMによる脳内NETの非侵襲的イメージングが可能であるかを検討した。さらに、うつ病モデルラットおよびADHDモデルラットを用いて、脳局所でのNETの発現量の変化を測定し、その変化を(S,S)-IPBMを用いることにより検出可能であるかを検討した。 イメージング実験はコモン・マウスセットを用いて行った。得られたイメージを定量解析した結果、視床で最も集積が高く、線状体で最も低くなりNETの発現量に相関した定量値を得ることができた。また、(S,S)-IPBM投与後にNET結合剤を投与すると、その集積はNETの発現の少ない線状体のレベルまで低下することもイメージング可能であった。以上の結果より、(S,S)-IPBMを用いることにより、非侵襲的にNETの発現をイメージング可能であることが示された。疾患モデル動物を用いた検討としては、代表的な機能性精神疾患であり、ヒト剖検脳においてNETの減少が報告されているうつ病を選択した。うつ病のモデルとしては、汎用性に優れた薬物性モデルであるレセルピン慢性投与モデルを選択した。このモデルにおいて、青斑核や視床前核においてNET発現量が有意に低下していることを見いだした。さらにNET発現量の変化に対応して(S,S)-IPBMの集積が変化することも確認できた。このことより(S,S)-IPBMがうつ病におけるNETの発現変化を鋭敏に検出できることが示唆された。			

第5領域 (公募班員)

研究代表者名

清野 泰

発表論文

英文

(1) 原著論文

Kanegawa, N., Kiyono, Y., Kimura, H., Sugita, T., Kajiyaa, S., Kawashima, H., Ueda, M., Kuge, Y. & Saji, H. Synthesis and evaluation of radioiodinated (S,S)-2-(alpha-(2-iodophenoxy)benzyl)morpholine for imaging brain norepinephrine transporter. *Eur. J. Nucl. Med. Mol. Imaging.* **33** 639-47 (2006).

Koshimizu T., Nasa, Y., Tanoue, A., Oikawa, R., Kawahara, Y., Kiyono Y., Adachi, T., Tanaka T., Kuwaki, T., Mori T., Takeo, S., Okamura, H. & Tsujimoto, G. V1a vasopressin receptors maintain normal blood pressure by regulating circulating blood volume and baroreflex sensitivity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **103** 7807-7812 (2006).

Kiyono, Y., Yamashita, T., Doi, H., Kuge, Y., Katsura, T., Inui, K. & Saji, H. Is MIBG a substrate of P-glycoprotein? *Eur. J. Nucl. Med. Mol. Imaging.* in press.

(2) 総説

(3) 著書

和文

(1) 原著論文

(2) 総説

(3) 著書

第 5 領域 （公募班員）			
研究課題名	DBZ/FEZ1 遺伝子欠損マウスを用いた統合失調症の発症機序の解明		
研究代表者名	谷口 学	E-mail	tmanabu@anat2.med.osaka-u.ac.jp
所属・職名	大阪大学・医学系研究科・教室技術職員		
研究分担者名	松崎伸介		
分担者所属	大阪大学・医学系研究科		
研究成果報告書			
（研究の背景） スコットランドの 1 家系において 1 番染色体と 11 番染色体の転座が起きており、高率に統合失調症、うつ病、躁鬱病といった疾患を発症すること、その転座領域に DISC1 遺伝子がコードされていることが報告された。そこで我々は、DISC1 転座部位を中心に結合する蛋白質が、生理的に重要な役割を持っており、転座が起きた結果、DISC1 との結合が阻害され、神経細胞に必要な生理的機能が障害され、統合失調症等の精神疾患を引き起こすのではないかと仮説を立てた。そこで DISC1 転座部位の配列を用いて yeast-two-hybrid スクリーニングを行った結果、DISC1 結合蛋白質として Fez1、KENDRIN、DBZ の 3 つを同定した。 （研究目的） 本研究では DBZ,Fez1 ノックアウトマウスによる行動変化及びこれら胎生期におけるノックアウトマウスの脳が未成熟であるか否かを確立し、また、胎生期における DBZ,Fez1 のニューロンの発達と成熟に関わる機能を明らかにすることで、これらの遺伝子欠損マウスが統合性失調症のモデル動物になりうるか否かを明らかとし、DBZ,Fez1 が統合失調症の病態発現のキーか否かを確立する。 （研究方法） 平成 18 年度は DBZ,Fez1 ノックアウトマウスの作製を中心に本プロジェクトを進めるとともに、統合性失調症候補遺伝子 DISC1 の転座部位に結合する DBZ に焦点を当て、RI In situ hybridization 法を用いることにより DBZ mRNA のアダルトマウスにおける詳細な脳内局在の検討を行った。また、DBZ と DISC1 及び PAC1R をはじめとするその関連遺伝子の脳内における局在を比較検討した。 （結果と考察） DBZ,Fez1 ノックアウトマウスの作製においては、キメラマウス作製の前段階である ES クローンの取得がほぼ完了した。またアダルトマウスにおける DBZ mRNA の詳細な脳内局在の検討を行った結果、大脳皮質、海馬、線状体、視床、梨状皮質、嗅球、側坐核の神経細胞に強く発現が認められた。下位脳幹部においては三叉神経運動核、舌下神経核、顔面神経核、三叉神経中脳路核、三叉神経脊髄路核、薄束核、楔状束核、蝸牛神経核、下丘、内側膝状体、台形体核、外側毛帯核、下オリーブ核に発現が強く認められた。また、DBZ mRNA と DISC1 mRNA が共発現する領域は大脳皮質、海馬、下丘において認められた。しかしながら、脳幹において DBZ mRNA を強く発現するニューロンは DISC1 mRNA の発現が認められなかった。さらに脳内において DISC1/DBZ 及び、PACAP の受容体である PAC 1 mRNA の三つの因子がともに強く発現する場所は海馬の歯状回に認められた。PACAP もこの領域に存在することが報告されており、perforating system の破壊が統合性失調症の発症メカニズムに関与している可能性が示唆された。			

第5領域（公募班員）

研究代表者名 谷口 学

発表論文

英文

（1）原著論文

Hattori, T., Baba, K., Matsuzaki, S., Honda, A., Miyoshi, K., Inoue, K., Taniguchi, M., Hashimoto, H., Shintani, N., Baba, A., Shimizu, S., Yukioka, F., Kumamoto, N., Yamaguchi, A., Tohyama, M. & Katayama, T. A novel DISC1-interacting partner DBZ (DISC1-Binding Zinc finger protein): implication in the modulation of DISC1-dependent neurite outgrowth. *Mol Psychiatry*. **12**, 398-407 (2007).

（2）総説

（3）著書

和文

（1）原著論文

（2）総説

松崎伸介、遠山正彌：統合失調症発症の分子メカニズム. *脳* **21** **10**(1),31-37(2007).

（3）著書

第 5 領域 （公募班員）			
研究課題名	エピジェネティクスによるうつ病発症・難治化の機序解明		
研究代表者名	森信 繁	E-mail	smoriob@hiroshima-u.ac.jp
所属・職名	広島大学大学院医歯薬学総合研究科・助教授		
研究分担者名	宮本和明		
分担者所属	独立行政法人国立病院機構呉医療センター・室長		
研究成果報告書 研究課題1) BDNF, GDNF遺伝子プロモーター領域のメチル化の解析 <i>BDNF</i>や<i>GDNF</i>の発現低下が、遺伝子プロモーター領域のDNAメチル化異常に伴う転写抑制に起因するか否かを明らかにするために<i>BDNF</i>および<i>GDNF</i>のプロモーター領域においてメチル化状態に特異的なプライマーを作成した。乳癌細胞株8株および乳癌症例13例を対象として、DNA500ngをsodium bisulfiteにより処理した後、メチル化特異的PCR法によりメチル化状態を解析した。<i>BDNF</i>では乳癌細胞株の75%（6/8）および乳癌症例の69%（9/13）に、同様に<i>GDNF</i>では乳癌細胞株の38%（6/8）および乳癌症例の31%（4/13）に遺伝子プロモーター領域のDNAメチル化異常の存在することを明らかにした。 研究課題2) ヒト末梢血白血球由来MeCP2 mRNA発現の解析 末梢血にNycoprep (Axis-Shield)混和遠心後に白血球層をとり、RiboPure-WBC (Ambion)にてtotal RNAを抽出後にQuantiscript Reverse Transcription (Qiagen)を用いてcDNAに逆転写した。MeCP2遺伝子に適切なprimer, TaqMan probeを設計後、real-time PCR法にてmRNA発現を計測した。この方法によって初めて、ヒト白血球由来のMeCP2 mRNA発現の計測が可能となった。Real-time PCR法のamplification curveによるとPCR cycle 25回の時点から増幅反応がみられ、白血球中にも神経細胞のみならず発現の増減を検討しうるだけの発現量のあることがわかった。 研究課題3) ラット海馬および末梢血白血球由来のBDNF mRNA発現の関連の検討 ラット海馬・末梢血白血球由来のBDNF mRNA発現の関連を検討する目的で、急性拘束ストレス負荷ラットでBDNF mRNAを計測した。その結果、未処置群と比較して海馬では30-40%の減少をみたが、白血球由来では30%程度の減少であった。 現在、難治性うつ病患者および健常者由来の血液について解析を行っている。			

第5領域 (公募班員)

研究代表者名

森信 繁

発表論文

英文

(1) 原著論文

(2) 総説

(3) 著書

和文

(1) 原著論文

(2) 総説

土岐茂、森信繁：養育環境と精神発達の生物学. *分子精神医学* **6**, 35-44(2006).

森信繁、高橋輝道、山本茂人：ストレスと動物うつ病モデル. *医学のあゆみ* **219**, 1042-1046(2006).

土岐茂、森信繁：養育の生物学-遺伝子による解明のカギ-. *こころの科学* in press.

(3) 著書

第5領域（公募班員）			
研究課題名	ストレス性精神疾患の可視化とナノメディシン		
研究代表者名	植田 弘師	E-mail	ueda@nagasaki-u.ac.jp
所属・職名	長崎大学 大学院医歯薬学総合研究科 分子薬理学分野・教授		
研究分担者名	井上誠、藤田亮介		
分担者所属	長崎大学 大学院医歯薬学総合研究科 分子薬理学分野		
研究成果報告書 ストレス性精神疾患は歴史的には神経伝達異常という量的な病変疾患として捉えられてきたが、近年ではむしろ質的な神経回路の可塑的病変として注目されはじめており、本研究課題の目的もこの点にある。その独創性は、この動的な可塑的病変を WGA（小麦胚芽レクチン）-EGFP 融合蛋白質のトランスジーン法を培養細胞と個体レベルにおいて導入し、シナプス回路の可塑的変調を可視化解析することにある。前年度に引き続き現在までに得られた成果として以下の項目が挙げられる。 1) ストレス性疾患としてのうつ病とストレス時に産生されるグルココルチコイドの高次脳機能とを関連づけるものとして新しい分子標的 MAP2 を発見した。MAP2 により制御される微小管、アクチン重合の抑制という視点から樹状突起形成抑制との関連を証明し、しかも他の神経ステロイドによる競合的拮抗作用を蛋白質-蛋白質相互作用の観点から明らかにした。こうした相互作用は、それぞれのリコンビナント蛋白質を用いた QCM 装置による蛋白質相互作用、暗視野顕微鏡による cell free 重合や、海馬培養神経細胞における樹状突起伸展や FRAP 解析による蛍光標識微小管重合を解析することにより直接の証明を可能にした。その結果、神経ステロイド、プレグネノロンは重合促進等のアゴニスト活性を示し、コルチコステロンはインバースアゴニスト活性を、プロゲステロンは純粋なアンタゴニスト活性を示すことが明らかになった。ストレスにより放出されるグルココルチコイドがこうした新しい分子標的や樹状突起伸展に対し抑制的に機能することで、うつ病等の抑制性脳機能を担うという仮説の一端が証明された。 2) 機能面からの証明のため、培養細胞において WGA-EGFP 可視化する方法開発に成功し（図1）、個体レベルでのさらなる解析のために WGA-EGFP トランスジェニックマウスの作成を行い、現在、解析中である。 3) WGA-EGFP 遺伝子の in vivo エレクトロポレーション導入法の開発(J Neurosci 2003)により、薬物耐性・依存時に生ずる新規のシナプス回路形成の証明に成功した。また、レーザーマイクロダイセクション法により、可視化標識された神経細胞のみにおける NMDA 受容体を中心とする機能分子群の遺伝子発現変化とエピジェネティクスを介する制御を見出した。 4) 虚血性脳障害は単に運動機能のみならず、学習、精神機能などの高次機能障害と深く関わっている。急性期の治療が高次脳機能障害の軽減に役立つことを念頭に急性期の神経細胞死ネクロシスを抑制する分子プロサイモシン alpha を大脳皮質初代培養から発見した。ネクロシス抑制機構は、虚血性ストレスに伴う神経細胞膜グルコーストランスポーター(GLUT1,4)の内在化を抑制し、低下した細胞内 ATP 量を回復することにあることを証明した。興味あることに、培養実験では遅延してアポトーシスを誘発することを見出し、しかも正常時あるいは虚血時に豊富な神経栄養因子を添加するとこうした細胞死は完全に消失した。プロサイモシン alpha は神経細胞に虚血ストレスを与えたときに豊富に遊離し、周囲のネクロシスを抑制した。以上から、プロサイモシン alpha は虚血性脳障害から脳を守る生体保護分子であることが示唆された。今後、この分子とその下流に働く分子についてストレス性精神疾患との関連性を明らかにすることを計画している。			

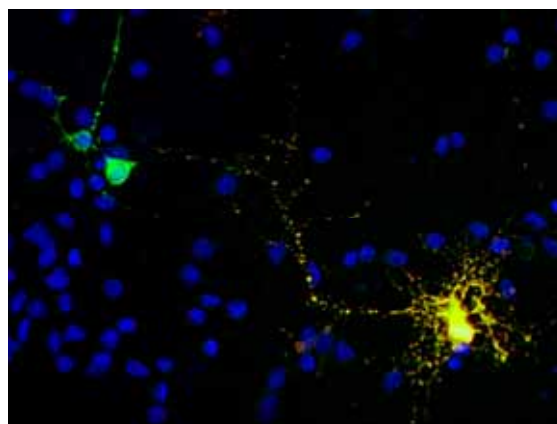


図1 WGA トランスジーン法を用いた神経回路網の可視化。
 単一ベクター内に CMV プロモーター制御の WGA-EGFP 及び Ds-Red2 遺伝子を含むベクターを構築し、初代培養海馬神経細胞に導入後 48 時間の蛍光顕微鏡像。黄色：一次神経、緑：二次神経、青：細胞核

第5領域（公募班員）

研究代表者名 植田 弘師

発表論文

英文

（1）原著論文

Matsunaga, H. & Ueda, H. Voltage-dependent N-type Ca^{2+} channel activity regulates the interaction between FGF-1 and S100A13 for stress-induced non-vesicular release. *Cell Mol Neurobiol.* **26(3)**, 237-246 (2006).

Matsunaga, H. & Ueda, H. Evidence for serum-deprivation-induced co-release of FGF-1 and S100A13 from astrocytes. *Neurochem Int.* **49(3)**, 294-303 (2006).

Mizota, K. & Ueda, H. Endocrine disrupting chemical atrazine causes degranulation through Gq/11 protein-coupled neurosteroid receptor in mast cells. *Toxicol Sci.* **90(2)**, 362-368 (2006).

Nagai, J., Kurokawa, M., Takeshima, H., Kieffer, B. L. & Ueda, H. Circadian-dependent learning and memory enhancement in nociceptin receptor-deficient mice with a novel KUROBOX apparatus using stress-free positive cue task. *J Pharmacol Exp Ther.* **321(1)**, 195-201 (2007).

Ueda, H., Fujita, R., Yoshida, A., Matsunaga, H. & Ueda, M. Identification of prothymosin- α 1, the necrosis-apoptosis switch molecule in cortical neuronal cultures. *J Cell Biol* **176(6)**, 853-862 (2007).

（2）総説

（3）著書

和文

（1）原著論文

（2）総説

（3）著書

第5領域 (公募班員)			
研究課題名	ゲノムブロック異常と精神神経疾患発症素因の解明		
研究代表者名	松本 直通	E-mail	naomat@yokohama-cu.ac.jp
所属・職名	横浜市立大学大学院医学研究科環境分子医科学・教授		
研究分担者名			
分担者所属			
研究成果報告書			
研究の背景 2003年4月版の完了ヒトゲノムシーケンスの約5%は、segmental duplication (seg-dup) によって構成される。この seg-dup が関与した異常な染色体組み替えによって、コピー数の異常（重複や欠失）や逆位などのゲノムブロック異常が生じ、精神神経疾患における素因（原因）となることが明らかとなってきた。例えば 15q24-26 の重複に伴うパニック障害家系例（Cell, 2001）などはその好例である。 目的 機能性精神神経疾患である統合失調症、並びに特発性精神遅滞を対象とし、このゲノムブロック異常に焦点をあて、自身で作成した高精度ゲノムマイクロアレーを用いて網羅的に検出・カタログ化し、精神神経疾患素因・感受性遺伝子の同定と発症機序の解明を行うことを目的とする。 方法： A. <u>対象</u>：精神疾患患者群として統合失調症（50 例／年）を収集・解析する。精神発達遅滞患者群として非症候性精神遅滞（100 例）を既に保有している。それぞれの症例から染色体解析用細胞ペレットおよびゲノム DNA を採取する。 B. <u>4200 マイクロアレーによる疾患群の網羅的解析</u>：新規開発された 4200 マイクロアレーを用いて疾患特異的なゲノム異常を決定する。文献で報告のある染色体検査レベルでの正常多型あるいはその可能性の高い微細欠失・重複も考慮した上で解析を行う。 C. <u>ゲノムブロック異常・多型の詳細な解析</u>：マイクロアレーで検出したブロック異常の FISH 法及び定量 PCR 等による検証と物理地図の作成によりブロック異常のゲノムレベルの全貌を明らかにする。 結果： A. 対象の集積状況：精神発達遅滞患者群として非症候性精神遅滞（100 例）を既に保有している。統合失調症患者群は国立精神神経センター（功刀浩先生・橋本亮太先生）及び東京都精神医学総合研究所（糸川昌成先生）の協力にてこれまでに 60 症例の集積を完了した。全ての検体から株化リンパ芽球が作製されゲノム DNA と染色体解析用細胞ペレットが作製された。 B. <u>4200 マイクロアレーによる疾患群の網羅的解析</u>：4200 アレーによる統合失調症患者 35 例の特異的なゲノム異常の有無を解析中である。文献で報告のある染色体検査レベルでの正常多型あるいはその可能性の高い微細欠失・重複も考慮し解析を行い少なくとも 45,XO/46,XXmos を含む 3 例（8.6%）に明らかに病的な染色体異常を同定し、詳細を検討中である。 C. <u>ゲノムブロック異常・多型の詳細な解析</u>：平成 17 年度に同定した特発性精神遅滞症例の 5 例の染色体微細構造異常のうち 15q11-q12 の非典型サイズの家族性微細欠失をもつ男児症例はアンジェルマン症候群（AS）を呈する。しかし同様の欠失を保有する母は母方祖父から欠失を受け継ぐも正常表現型でプラダーウィリ症候群（PWS）を認めない。これらの事実は本欠失領域に PWS 関連遺伝子が含有されないことを示す。PWS 関連遺伝子は未だ完全に確定されておらず本欠失を詳細にマップすることで PWS 関連候補遺伝子群から同欠失内の遺伝子を除外出来る。定量 PCR にて欠失切断領域の大まかなマッピングを行い、long-PCR で欠失切断端をクローニングし、欠失領域を塩基レベルで決定した。欠失サイズは 1,486,907 bp で <i>HB II-52</i>, <i>HB II-438B</i>, <i>UBE3A</i>, <i>ATP10C</i> および <i>GABRB3</i> が欠失内に存在し PWS 関連遺伝子として除外された。<i>HB II-52</i> はセロトニンレセプター 2C の選択的スプライシングを調節し、母性インプリントを受けるため PWS の発症機序に重要な役割を担っていることが示唆されていたが、今回の研究結果から、<i>HB II-52</i> は PWS 関連遺伝子からは完全に除外された。 考察： 平成 17 年度の特発性精神遅滞の解析を進展させ、PWS 関連遺伝子に関する重要な知見が得られた。統合失調症の 4200 マイクロアレーによる解析が進行し既に病的と考えられる染色体構造異常を 35 例中 3 例で同定している。さらに症例集積とマイクロアレー解析を進め同定された微細構造異常の詳細な解析から統合失調症の発症関連遺伝子の特定を進めてゆく予定である。			

第5領域 (公募班員)

研究代表者名 松本 直通

発表論文

英文

(1) 原著論文

Nakashima, M., Takamura, N., Namba, H., Saenko, V., Meirmanov, S., Matsumoto, N., Hayashi, T., Maeda, S. & Sekine, I. RET oncogene amplification in thyroid cancer: correlations with radiation-associated and high-grade malignancy. *Hum. Pathol.* in press.

Nishimura, A., Sakai, H., Ikegawa, S., Nagai, T., Takada, F., Ohata, T., Tanaka, F., Kamasaki, H., Saitsu, H., Mizuguchi, T. & Matsumoto, N. *FBN2*, *FBN1*, *TGFBR1*, and *TGFBR2* analyses in congenital contractural arachnodactyly. *Am. J. Med. Genet.* in press.

Yamada-Okabe, T. & Matsumoto, N. Decreased serum dependence in the growth of NIH3T3 cells from the overexpression of human NSD1 or fission yeast SET2. *Cell Biochem. Funct.* in press.

Yamasaki-Ishizaki, Y., Kayashima, T., Christophe, M., Soejima, H., Ohta, T., Masuzaki, H., Kinoshita, A., Urano, T., Yoshiura, K., Matsumoto, N., Ishimaru, T., Mukai, T., Niikawa, N. & Kishino, T. Role of DNA methylation and histone H3 Lysine 27 methylation in tissue-specific imprinting of mouse *Grb10*. *Mol. Cell. Biol.* **27**(2),732-742 (2007).

Sato, D., Shimokawa, O., Harada, N., Olsen, OE., Hou, J-W., Muhlbauer, W., Blinkenberg, E., Okamoto, N., Kinoshita, A., Matsumoto, N., Kondo, S., Kishino, T., Miwa, N., Ariga, T., Niikawa, N. & Yoshiura, K. Congenital Arhinia: Molecular-genetic Analysis of Five Patients. *Am. J. Med. Genet.* **143A**(6),546-552 (2007).

Kawara, H., Yamamoto, T., Harada, N., Yoshiura, K., Niikawa, N., Nishimura, A., Mizuguchi, M. & Matsumoto, N. Narrowing Candidate Region for Monosomy 9p Syndrome to a 4.7-Mb Segment at 9p22.2-p23. *Am. J. Med. Genet.* **140A** (4),373-377 (2006).

Ohata, T., Yoshida, K., Sakai, H., Hamanoue, H., Mizuguchi, T., Shimizu, Y., Okano, T., Takada, F., Fukushima, Y., Ikeda, S. & Matsumoto, N. The prevalent -16C>T change at the 5' UTR of the *puratropin-1* gene in autosomal dominant cerebellar ataxia in Nagano. *J. Hum. Genet.* **51**(5), 461-466 (2006).

Miura, S., Miura, K., Masuzaki, H., Miyake, N., Yoshiura, K-i., Sosonkina, N., Harada, N., Shimokawa, O., Nakayama, D., Yoshimura, S., Matsumoto, N., Niikawa, N. & Ishimaru, T. Microarray comparative genomic hybridization (CGH)-based prenatal diagnosis for chromosome abnormalities using cell-free fetal DNA in amniotic fluid. *J. Hum. Genet.* **51**(5), 412-417 (2006).

Hamanoue, H., Umezu, N., Okuda, M., Harada, H., Sakai, H., Mizuguchi, T., Ishikawa, H., Takahashi, T., Miura, K., Hirahara, F. & Matsumoto, N. Complete Hydatidiform Mole and Normal Live Birth after Intracytoplasmic Sperm Injection. *J. Hum. Genet.* **51**(5),477-479 (2006).

Sato, H., Miyamoto, T., Yogev, L., Namiki, M., Koh, E., Hayashi, H., Sasaki, Y., Ishikawa, M., Lamb, DJ., Matsumoto, N., Birk, OS., Niikawa, N. & Sengoku, K. Polymorphic alleles of the human *MEI1* gene are associated with human azoospermia by meiotic arrest. *J. Hum. Genet.* **51**, 533-540 (2006).

Sakai, H., Visser, R., Ikegawa, S., Ito, E., Numabe, H., Watanabe, Y., Mikami, H., Kondoh, T., Kitoh, H., Sugiyama, R., Okamoto, N., Ogata, T., Fodde, R., Mizuno, S., Takamura, K., Egashira, M., Sasaki, N., Watanabe, S., Nishimaki, S., Takada, F., Nagai, T., Okada, Y., Aoka, Y., Yasuda, K., Iwasa, M., Kogaki, S., Harada, N., Mizuguchi, T. & Matsumoto, N. Comprehensive genetic analysis of relevant four genes in 49 patients with Marfan syndrome or Marfan related phenotypes. *Am. J. Med. Genet.* **140A**,1719-1725 (2006).

Shimokawa, O., Harada, N., Miyake, N., Satoh, K., Mizuguchi, M., Niikawa, N. & Matsumoto, N. Array Comparative Genomic hybridization analysis in first-trimester spontaneous abortions with 'normal' karyotypes. *Am. J. Med. Genet.* **140A**, 1931-1935(2006).

Hiraki, Y., Fujita, H., Yamamori, S., Ohashi, H., Eguchi, M., Harada, N., Mizuguchi, T. & Matsumoto, N. Mild craniosynostosis with 1p36.3 trisomy and 1p36.3 deletion syndrome caused by familial translocation t(Y;1). *Am. J. Med. Genet.* **140A**,1773-1777 (2006).

Yamamoto, T., Sameshima, K., Sekido, KI., Aida, N., Matsumoto, N., Naritomi, K. & Kurosawa, K. Trigonocephaly in a boy with paternally inherited deletion 22q11.2 syndrome. *Am. J. Med. Genet.* **140A**(12),1302-1304 (2006).

Miura, S., Miura, K., Yamamoto, T., Yamanaka, M., Saito, K., Hirabuki, T., Kurosawa, K., Harada, N., Ishizaki-Yamasaki, Y., Matsumoto, M., Hirahara, F., Yoshiura, K., Masuzaki, M. & Niikawa, N. Origin and mechanisms of formation of fetus-in-fetu: Two cases with genotype and methylation analyses. *Am. J. Med. Genet.* **140A**,1737-1743 (2006).

Dowa, Y., Yamamoto, T., Abe, Y., Kobayashi, M., Hoshino, R., Tanaka, K., Aida, N., Take, H., Kato, K., Tanaka, Y., Ariyama, J., Harada, N., Matsumoto, N. & Kurosawa, K. Congenital neuroblastoma in a patient with partial trisomy of 2p. *J. Pediatr. Hematol. Oncol.* **28**(6),379-382 (2006).

Sato, K., Iwakoshi, M., Shimokawa, O., Sakai, H., Ohta, T., Saitoh, S., Miyake, N., Niikawa, N., Harada, N., Saitsu, H., Mizuguchi, M. & Matsumoto, N. Angelman syndrome caused by an identical familial 1487-kb deletion. *Am. J. Med. Genet.* **143A**(1),98-101 (2006).

Horikoshi, H., Kato, Z., Masuno, M., Asano, T., Nagase, T., Yamagishi, Y., Kozawa, R., Arai, T., Aoki, M., Teramoto, T., Omoya, K., & Matsumoto, N., Kurotaki, N., Shimokawa, O., Kurosawa, K. & Kondo, N. Neuroradiologic findings in sotos syndrome. *J. Child. Neurol.* **21**(7),614-618 (2006).

(2) 総説

Mizuguch, T. & Matsumoto, N. Recent advance in genetics of Marfan syndrome and Marfan-associated disorders. *J. Hum. Genet.* 52(1), 1-12 (2007).

(3) 著書

Kurotaki, N. & Matsumoto, N. Sotos syndrome. Genomic disorders: The genomic basis of disease: Edited by Lupski JR and Stankiewicz PT. The Humana Press Inc, Totowa, NJ, USA, 237-246(2006).

和文

(1) 原著論文

(2) 総説

大畑尚子、松本直通：ゲノム病と知的発達障害の分子遺伝学. *神経研究の進歩* **50**(5) 760-769 (2006).

(3) 著書

第5領域（公募班員）			
研究課題名	神経幹細胞に対する気分安定薬の薬理作用と作用機序の解析		
研究代表者名	等 誠司	E-mail	shitoshi@nips.ac.jp
所属・職名	生理学研究所・分子生理研究系・助教授		
研究分担者名			
分担者所属			
研究成果報告書 双極性気分障害の治療に用いられる気分安定薬（リチウム、バルプロ酸、カルバマゼピンなど）の共通薬理作用については、様々なモデルが提唱されているものの明確な結論は得られていない。リチウムには成体脳の海馬における神経細胞新生を促進する作用があると報告されていることから、我々は気分安定薬が成体脳の神経幹細胞を活性化させるという仮説を立て、検証を行ってきた。これまでに得た結果として、気分安定薬を投与したマウスの脳では、脳室下層に存在する神経幹細胞の数が増加していることがわかった。また、神経幹細胞を検出する培養法である neurosphere assay に気分安定薬を添加すると、神経幹細胞の自己複製能が亢進することが観察された。この効果は、気分安定薬の髄液中治療域濃度で見られたという点で、これまでに報告されていない知見である。そこで neurosphere 法を用い、気分安定薬添加による神経幹細胞内でのシグナル活性の変動を検討し、気分安定薬の共通薬理作用の同定を試みた。これまで気分安定薬の共通薬理作用として、GSK-3beta 活性の抑制やイノシトール枯渇が広く知られているが、neurosphere においては髄液中治療域濃度の気分安定薬にはそのような効果は認められなかった。一方、神経幹細胞の自己複製能の亢進に重要と考えられている Notch シグナルについて検討を行ったところ、髄液中治療域濃度の気分安定薬存在下で培養した neurosphere では、Notch シグナルが活性化していることがわかった。さらに、Notch シグナルの活性化は、リチウムを投与したマウスの脳室下層においても観察された。これらの結果を踏まえ、今年度は ① 気分安定薬が Notch シグナルを活性化させる際の分子標的の解明、② 神経幹細胞の活性化やそれに引き続く新生神経細胞の増加が気分の安定に結びつく細胞基盤の解析を進めた。① については、薬剤処理した neurosphere 内で発現が増減する遺伝子の同定を、マイクロアレイを用いて行った。リチウムやバルプロ酸添加によって共通して発現が増加・減少する遺伝子を各々10 および 15 遺伝子同定し、解析を進めている。② については、気分安定薬の長期投与によって増加している神経幹細胞から、産生される新生細胞の分布や細胞種の解析を行っている。これらの研究から得られる結果は、気分安定薬の共通の薬理作用を解明して新たな治療法開発に結びつくだけでなく、双極性気分障害の病態理解にも役立つと考えられる。			

第5領域（公募班員）

研究代表者名

等 誠司

発表論文

英文

（1）原著論文

Ishii, A., Ikeda, T., Hitoshi, S., Fujimoto, I., Torii, T., Sakuma, K., Nakakita, S., Hase, S. & Ikenaka, K. Developmental changes in the expression of glycogenes and the content of N-glycans in the mouse cerebral cortex. *Glycobiology* **17**, 261-276 (2007).

Hasegawa, A., Naruse, M., Hitoshi, S., Iwasaki, Y., Takebayashi, H. & Ikenaka, K. Regulation of glial development by cystatin C. *J. Neurochem.* **100**, 12-22 (2007).

Naruse, M., Nakahira, E., Miyata, T., Hitoshi, S., Ikenaka, K. & Bansal, R. Induction of oligodendrocyte progenitors in dorsal forebrain by intraventricular microinjection of FGF-2. *Dev. Biol.* **297**, 262-273 (2006).

Wada, T., Haigh, J.J., Ema, M., Hitoshi, S., Chaddah, R., Rossant, J., Nagy, A. & van der Kooy, D. Vascular endothelial growth factor directly inhibits primitive neural stem cell survival but promotes definitive neural stem cell survival. *J. Neurosci.* **26**, 6803-6812 (2006).

（2）総説

（3）著書

和文

（1）原著論文

（2）総説

（3）著書

第5領域（公募班員）			
研究課題名	ゲノム工学を用いて作製した自閉症マウスの解析による精神機能の分子基盤研究		
研究代表者名	内匠 透	E-mail	takumi@obi.or.jp
所属・職名	（財）大阪バイオサイエンス研究所・神経科学部門・研究室長		
研究分担者名	1. 高野敦子 2. 中谷仁		
分担者所属	1.2 （財）大阪バイオサイエンス研究所・神経科学部門		
研究成果報告書 精神疾患の分子アプローチの困難さは的確なアッセイ系の欠如にある。本研究は、昨今のゲノム情報、最新の発生工学的手法を用いて、臨床の生物学的異常に基づくヒト染色体異常をマウスシンテニー染色体に導入することにより、ヒト精神疾患モデルマウスを確立・解析しようとするものである。具体的には、精神疾患の中でもより遺伝的寄与の高いと考えられる小児精神疾患である自閉症を標的としている。自閉症患者にみられるヒト染色体として 15q11-13 の重複がもっともよく知られているが、研究代表者らは、ヒト 15q11-13 に相当するマウス 7C の相当領域の両側にマウス ES 細胞でダブルターゲティングすることにより loxP 配列を挿入し、Cre レコンビナーゼにより重複をおこしたマウスを作製することに成功した。 行動学的解析（3-chamber social test, Barnes maze task, Rotarod test, Ultrasonic vocalization, Contextual and cued fear conditioning, Elevated plus maze test, Porsolt forced swim test）の結果、父性重複マウスでは、社会性の障害、常同運動、固執傾向、超音波啼鳴の発達の遅れ、不安度の上昇等の行動異常が発見された。一方、母性重複マウスでは、野生型に比べて著明な変化を示さなかった。 父性重複マウスにおける行動異常のメカニズムを明らかにするために、その一つの候補として重複領域に存在する non-coding RNA、特に MBII52 に注目した。父性重複マウスの MBII52 mRNA 量は、野生型に比べて約 2 倍の発現を示し、またセロトニン 5-HT2c 受容体の RNA editing 比が上昇していた。初代培養神経系において、Fura2 を用いて、セロトニン 5-HT2c 受容体特異的なアゴニスト WAY161503 による細胞内 Ca 濃度を測定したところ、父性重複マウス由来のニューロンでは、アゴニスト低濃度（100nM）で細胞内 Ca 濃度が優位に上昇した。これらの結果は、父性重複マウスにおいて、セロトニンシグナルの異常があることを示している。 以上のことから、本モデルマウスは、ヒト自閉症様行動を示し、その原因の一つとして、snoRNA(MBII52)がセロトニン 5-HT2c 受容体の RNA editing を変化させることによりセロトニンシグナルに変化をきたす可能性を明らかにした。			

第5領域 (公募班員)

研究代表者名 内匠 透

発表論文

英文

(1) 原著論文

Yoshimura, A., Fujii, R., Watanabe, Y., Okabe, S., Fukui, K. & Takumi, T. Myosin-Va facilitates the accumulation of mRNA/Protein (mRNP) complex in dendritic spines. *Curr. Biol.* **16**, 2345-2351 (2006).

Nakahata, Y., Akashi, M., Trcka, D., Yasuda, A. & Takumi, T. The in vitro real-time oscillation monitoring system identifies potential entrainment factors for circadian clocks. *BMC Mol. Biol.* **7**, 5(1-11) (2006).

Akashi, M., Ichise, T., Mamme, T. & Takumi, T. Molecular mechanism of cell-autonomous circadian gene expression of Period2, a crucial regulator of the mammalian circadian clock. *Mol. Biol. Cell* **17**, 555-565 (2006).

(2) 総説

(3) 著書

和文

(1) 原著論文

(2) 総説

内匠透：分子時計のからくり. *細胞工学* **25**, 174-178(2006).

内匠透：概日リズム転写制御の分子機構. *生化学* **78**, 425-429(2006).

内匠透：精神疾患はスパインの病気？ *蛋白・核酸・酵素*(Cover Photo) **51**, 2328-2333 (2006).

(3) 著書

第5領域（公募班員）			
研究課題名	双極性障害における小胞体ストレスおよびミトコンドリア機能障害の意義についての研究		
研究代表者名	加藤 忠史	E-mail	kato@brain.riken.jp
所属・職名	老化・精神疾患研究グループ・グループディレクター		
研究分担者名			
分担者所属	老化・精神疾患研究グループ		
研究成果報告書 我々は以前、一卵性双生児双極性障害不一致例のリンパ芽球における遺伝子発現解析により、XBP1 が患者で低下していることを見出し、XBP1 の神経系細胞における標的遺伝子を探索したところ、精神疾患関連遺伝子として注目されていた WFS1 が見出された。WFS1 は小胞体ストレスに関連する蛋白質であることが知られており、WFS1 変異による疾患であるウォルフラム病の患者の脳内では、ミトコンドリア DNA 欠失が蓄積していることが報告されている。そこで、本研究では、XBP1-WFS1 系が脳内で果たす役割を検討するため、WFS1 ノックアウトマウスの解析を行った。WFS1 ノックアウトマウスを C57BL6 マウスと 8 世代以上掛け合わせ、若年および高齢の WFS1 ノックアウトマウスおよび野生型マウスの海馬を摘出し、RNA を抽出し、逆転写を行って cDNA を作成し、蛍光ラベルした cRNA を、GeneChip(マウス 430 2.0 アレイ)実験に供し、遺伝子発現解析を行った。得られたデータを GeneSpring ソフトウェアを用いて解析し、WFS1 ノックアウトマウスにおいて発現量が変化している遺伝子を探索した。その結果、加齢マウスの方が遺伝子発現差異が大きく、WFS1 を欠くことによる脳内遺伝子発現差異への影響は、加齢の影響を受けると考えられた。また、WFS1 ノックアウトマウスおよび野生型マウスの脳を還流固定し、切片を作成後、ヘマトキシリンエオジン染色により形態観察を行った。視察的に明らかな変化は見られなかったが、海馬の細胞構築が異なる傾向が見られたため、対象数を増やして検討を進めている。また、WFS1 抗体を作成し、野生型マウスにおいて、その分布を検討した。その結果、WFS1 蛋白質の分布は、ラットで報告されている分布とよく一致し、いわゆる大脳辺縁系に多く発現していることが明らかとなった。			

第5領域 (公募班員)

研究代表者名

加藤 忠史

発表論文

英文

(1) 原著論文

Kubota, M., Kasahara, T., Nakamura, T., Ishiwata, M., Miyauchi, T. & Kato, T. Abnormal Ca²⁺ dynamics in transgenic mice with neuron-specific mitochondrial DNA defects. *J Neurosci.* **26(47)**, 1231-24 (2006).

Kasahara, T., Kubota, M., Miyauchi, T., Noda, Y., Mouri, A., Nabeshima, T. & Kato, T. Mice with neuron-specific accumulation of mitochondrial DNA mutations show mood disorder-like phenotypes. *Mol Psychiatry*. **11**, 577-593 (2006).

Kakiuchi, C., Ishiwata, M., Hayashi, A. & Kato, T. XBP1 induces WFS1 through an endoplasmic reticulum stress response element-like motif in SH-SY5Y cells. *J Neurochem.* **97(2)**, 545-555 (2006).

Kato, T. Mitochondrial dysfunction as the molecular basis of bipolar disorder : therapeutic implications. *CNS Drugs*. **21(1)**, 1-11 (2007).

(2) 総説

(3) 著書

和文

(1) 原著論文

(2) 総説

(3) 著書

第5領域（公募班員）

研究課題名	グリア関連分子を候補遺伝子とした統合失調症の病態に関する分子生物学的研究		
研究代表者名	糸川 昌成	E-mail	mitokawa@prit.go.jp
所属・職名	東京都精神医学総合研究所統合失調症プロジェクト・プロジェクトリーダー（副参事）		
研究分担者名	吉川武男		
分担者所属	理化学研究所脳科学総合研究センター 分子精神科学研究チーム		

研究成果報告書

Antioxidant-binding catalytic protein（ABCP）は、アストログリアなどで発現している。加齢や変性疾患で ABCP の減少が報告され、DNA のダメージや細胞死との関連も示唆されている。ABCP は、統合失調症と連鎖が繰り返し報告される 6p21 にコードされている。また、統合失調症の2つの多発家系で ABCP のアイソエンザイムの連鎖も報告された。そこで、ABCP 遺伝子のプロモーター領域と exon/intron junction を含む全 exon について、多発家系の

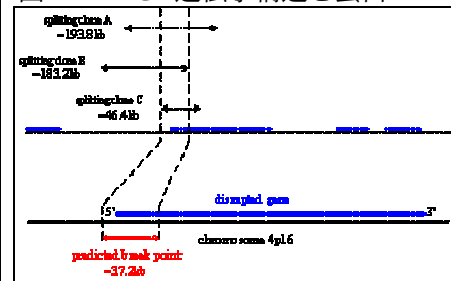
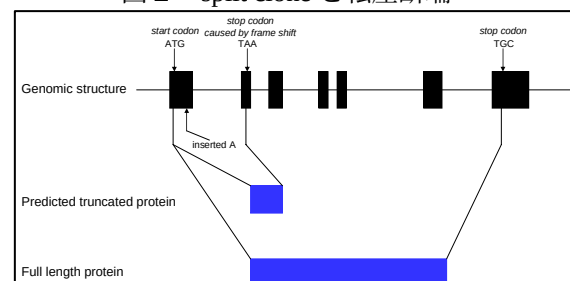


図2 split clone と転座断端



発症者 50 例を用いて変異・多型解析を行った。一卵性双生児の一致例において、exon 1 に adenine の insertion を同定した。これにより frame shift が生じるため症例では異常な 15 アミノ酸をコードしたのち stop codon が生じていた（図1）。この一卵性双生児の家族は、同胞1名と叔父が2名が発症した多発家系だった。さらに、症例のリンパ球を用いた定量的 RTPCR と Western blot の結果、mRNA、タンパクとも対照の約 50 % の発現だった。本症例以外の統合失調症においても ABCP 遺伝子がリスクファクターとなるか確認するため症例・対照研究を行ったところ、missense 多型を含む4つの SNP からなる haplotype で有意な関連が認められた。

我々は、4 番染色体短腕および 13 番染色体長腕の *de novo* 均衡転座を伴う統合失調症孤発例を同定した。それぞれの染色体の転座断端近傍にはグリア関連遺伝子がコードされており、この症例においては転座により当該遺伝子が切断されている可能性が考えられた。そこで、蛍光 *in situ* ハイブリダイゼーション法を用いて転座切断点の解析をおこなった。4p16 で 3 つの split clone を同定した（図2）。それぞれが重なりあう 37.2kb の領域から転座によって断裂されている遺伝子を同定した。13q21 からも split clone が同定され断裂部位を約 150kb まで絞り込んだが、この領域に遺伝子は存在しなかった。そこで、4p16 にコードされた遺伝子が、本症例において病態に関与することが示唆された。本症例以外の統合失調症においても当該遺伝子がリスクファクターとなるか確認するため症例・対照研究を行った結果、5'側の3つの SNP からなる haplotype で有意な関連が認められた。

第5領域 (公募班員)

研究代表者名 糸川 昌成

発表論文

英文

(1) 原著論文

Inoue, S., Imamura, A., Okazaki, Y., Yokota, H., Arai, M., Hayashi, N., Furukawa, A., Itokawa, M. & Oishi, M. Synaptotagmin XI as a candidate gene for susceptibility to schizophrenia. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr. Genet.* in press.

Kakiuchi, C., Ishiwata, M., Nanko, S., Kunugi, H., Minabe, Y., Nakamura, K., Mori, N., Fujii, K., Yamada, K., Yoshikawa, T. & Kato, T. Association analysis of ATF4 and ATF5, genes for interacting-proteins of DISC1, in bipolar disorder. *Neurosci Lett.* in press.

Ohnishi, T., Yamada, K., Ohba, H., Iwayama, Y., Toyota, T., Hattori, E., Inada, T., Kunugi, H., Tatsumi, M., Ozaki, N., Iwata, N., Sakamoto, K., Iijima, Y., Iwata, Y., Tsuchiya, K.J., Sugihara, G., Nanko, S., Osumi, N., Detera-Wadleigh, S.D., Kato, T. & Yoshikawa, T. A Promoter Haplotype of the Inositol Monophosphatase 2 Gene (IMPA2) at 18p11.2 Confers a Possible Risk for Bipolar Disorder by Enhancing Transcription. *Neuropsychopharmacology.* in press.

Itokawa, M., Iwata, K., Takahashi, M., Sugihara, G., Sakai, T., Abe, Y., Uno, M., Hobo, M., Jitoku D., Inoue, K., Arai, M., Yasuda, I. & Shintani, M. Acute confusional state after designer tryptamine abuse *Psychiat. Clinic. Neurosci.* **61**,196-199 (2007).

Yamada, K., Gerber, J., Iwayama, Y., Ohnishi, T., Ohba, H., Toyota, T., Aruga, J., Minabe, Y., Tonegawa, S. & Yoshikawa, T. Genetic analysis of the calcineurin pathway identifies members of the EGR gene family, specifically EGR3, as potential susceptibility candidates in schizophrenia. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **104**, 2815-2820 (2007).

Nishimura, K., Nakamura, K., Anitha, A., Yamada, K., Tsujii, M., Iwayama, Y., Hattori, E., Toyota, T., Takei, N., Miyachi, T., Iwata, Y., Suzuki, K., Matsuzaki, H., Kawai, M., Sekine, Y., Tsuchiya, K., Sugihara, G., Suda, S., Ouchi, Y., Sugiyama, T., Yoshikawa, T. & Mori, N. Genetic analyses of the brain-derived neurotrophic factor (BDNF) gene in autism. *Biochem Biophys Res Commun.* **356**, 200-206 (2007).

Iwata, Y., Nakajima, M., Yamada, K., Nakamura, K., Sekine, Y., Tsuchiya, K.J., Sugihara, G., Matsuzaki, H., Suda, S., Suzuki, K., Takei, N., Mori, N., Iwayama, Y., Takao, H., Yoshikawa, T., Riley, B., Makoff, A.,

Sham, P., Chen, R. & Collier, D. Linkage disequilibrium analysis of the CHRNA7 gene and its partially duplicated region in schizophrenia. *Neurosci Res.* **57**, 194-202 (2007).

Nakajima, M., Hattori, E., Yamada, K., Iwayama, Y., Toyota, T., Iwata, Y., Tsuchiya, K.J., Sugihara, G., Hashimoto, K., Watanabe, H., Iyo, M., Hoshika, A. & Yoshikawa, T. Association and synergistic interaction between promoter variants of the DRD4 gene in Japanese schizophrenics. *J Hum Genet.* **52**, 86-91 (2007).

Fukuda, Y., Koga, M., Arai, M., Noguchi, E., Ohtsuki, T., Horiuchi, Y., Ishiguro, H., Niizato, K., Iritani, S., Itokawa, M. & Arinami, T. Monoallelic and Unequal Allelic Expression of the HTR2A Gene in Human Brain and Peripheral Lymphocytes. *Biol. Psychiatry.* **60**, 1331-1335 (2006).

Doi, N., Itokawa, M., Hoshi, Y., Arai, M., Furukawa, A., Ujike, H., Sora, I. & Yoshikawa, T. A resistance gene in disguise for schizophrenia? *Am. J. Med. Genet. Part B.* **144B**, 165-173 (2006).

Yoshitsugu, K., Yamada, K., Toyota, T., Aoki-Suzuki, M., Minabe, Y., Nakamura, K., Sekine, Y., Suzuki, K., Takei, N., Itokawa, M., Mori, M. & Yoshikawa, T. Novel scale including strabismus and 'cuspidal ear' for distinguishing schizophrenia patients from controls using minor physical anomalies. *Psychiatry Research* **145**, 249-258 (2006).

Kobayashi, H., Hata, H., Ujike, H., Harano, M., Inada, T., Komiyama, T., Yamada, M., Sekine, Y., Iwata, N., Iyo, M., Ozaki, N., Itokawa, M., Naka, M., Ide, S., Ikeda, K., Numachi, Y. & Sora, I. Association analysis of ^μopioid receptor gene polymorphisms in methamphetamine dependence/psychosis. *Am. J. Med. Genet. B Neuropsychiatr. Genet.* **141**, 482-486 (2006).

Ide, S., Kobayashi, H., Ujike, H., Ozaki, N., Sekine, Y., Inada, T., Harano, M., Komiyama, T., Yamada, M., Iyo, M., Iwata, N., Tanaka, K., Shen, H., Iwahashi, K., Itokawa, M., Minami, M., Satoh, M., Ikeda, K. & Sora, I. Linkage disequilibrium and association with methamphetamine dependence/psychosis of mu-opioid receptor gene polymorphisms. *Pharmacogenomics J.* **6**, 179-188 (2006).

Arai, M., Yamada, K., Toyota, T., Obata, N., Haga, S., Yoshida, Y., Nakamura, K., Minabe, Y., Ujike, H., Sora, I., Ikeda, K., Mori, N., Yoshikawa, T. & Itokawa, M. Association between polymorphisms in the promoter region of the sialyltransferase 8B (SIAT8B) gene and schizophrenia. *Biol. Psychiatry.* **59**, 652-659 (2006).

Ide, M., Ohnishi, T., Murayama, M., Matsumoto, I., Yamada, K., Iwayama, Y., Dedova, I., Toyota, T.,

Asada, T., Takashima, A. & Yoshikawa, T. Failure to support a genetic contribution of AKT1 polymorphisms and altered AKT signaling in schizophrenia. *J. Neurochem.* **99**, 277-287 (2006) .

Nakamura, K., Chen, C.K., Sekine, Y., Iwata, Y., Anitha, A., Loh, el-W., Takei, N., Suzuki, A., Kawai, M., Takebayashi, K., Suzuki, K., Minabe, Y., Tsuchiya, K., Yamada, K., Iyo, M., Ozaki, N., Inada, T., Iwata, N., Harano, M., Komiyama, T., Yamada, M., Sora, I., Ujike, H., Ball, D.M., Yoshikawa, T., Lin, S.K. & Mori, N. Association analysis of SOD2 variants with methamphetamine psychosis in Japanese and Taiwanese populations. *Hum Genet.* **120**, 243-252 (2006).

Iwamoto, K., Bundo, M., Yamada, K., Takao, H., Iwayama, Y., Yoshikawa, T. & Kato, T. A family-based and case-control association study of SOX10 in schizophrenia. *Am. J. Med. Gene. B. Neuropsychiatr. Genet.* **141**, 477-481 (2006).

Shimizu, H., Iwayama, Y., Yamada, K., Toyota, T., Minabe, Y., Nakamura, K., Nakajima, M., Hattori, E., Mori, N., Osumi, N. & Yoshikawa, T. Genetic and expression analyses of the STOP (MAP6) gene in schizophrenia. *Schizophr Res.* **84**, 244-252 (2006).

Nakamura, K., Yamada, K., Iwayama, Y., Toyota, T., Furukawa, A., Takimoto, T., Terayama, H., Iwahashi, K., Takei, N., Minabe, Y., Sekine, Y., Suzuki, K., Iwata, Y., Pillai, A., Nakamoto, Y., Ikeda, K., Yoshii, M., Fukunishi, I., Yoshikawa, T. & Mori, N. Evidence that variation in the peripheral benzodiazepine receptor (PBR) gene influences susceptibility to panic disorder. *Am. J. Med. Genet. B Neuropsychiatr. Genet.* **141**, 222-226 (2006).

Yamada, K., Hattori, E., Iwayama, Y., Ohnishi, T., Ohba, H., Toyota, T., Takao, H., Minabe, Y., Nakatani, N., Higuchi, T., Detera-Wadleigh, S.D.& Yoshikawa, T. Distinguishable haplotype blocks in the HTR3A and HTR3B region in the Japanese reveal evidence of association of HTR3B with female major depression. *Biol. Psychiatry.* **60**, 192-201 (2006).

(2) 総説

(3) 著書

和文

(1) 原著論文

藤田俊之、高橋美佐子、新井誠、安田一郎、林直樹、糸川昌成 :5-MeO-DIPT により急性再燃をきたした覚醒剤精神病の1例. *精神医学* **49**, 59-61 (2007).

（２）総説

糸川昌成、吉川武男：うつ病. 分子生物学 *日本臨床* in press.

糸川昌成、新井誠：統合失調症の遺伝子研究（１）：DISC1. *Clinical Neuroscience* in press.

糸川昌成、小幡菜々子、新井誠：統合失調症の遺伝子研究（１）：DISC1. *Clinical Neuroscience* in press.

糸川昌成：遺伝子多型 BDNF(Val66Met)は不安関連行動に影響する. *分子精神医学* **7**, 57-59 (2007).

糸川昌成、吉川武男：うつ病のすべて 遺伝子研究の到達点・現状. *医学のあゆみ* **219**, 1025-1030 (2006).

糸川昌成、吉川武男：ストレスと疾患 統合失調症 *抗ストレス食品の開発と展望*（横越英彦監修 東京：シーエムシー出版）30-37 (2006).

糸川昌成、吉川武男：話題になった遺伝子多型のその後: DISC1. *分子精神医学* **6**, 77-83 (2006).

（３）著書

第5領域（公募班員）			
研究課題名	統合失調症脆弱性遺伝子ディスバインジンの遺伝子改変動物による分子病態解析		
研究代表者名	橋本 亮太	E-mail	hashimor@psy.med.osaka-u.ac.jp
所属・職名	大阪大学大学院医学系研究科附属子どものこころの分子統御機構研究センター・特任助手		
研究分担者名			
分担者所属			
研究成果報告書 ディスバインジン(Dysbindin:DTNBP1: dystrobrevin-binding protein 1)は、世界中の多数の民族において統合失調症との関連が確認されているもっとも有力な統合失調症脆弱性遺伝子の一つである。統合失調症の死後脳研究において、前頭前皮質のディスバインジン mRNA 発現と海馬のディスバインジントタンパク発現の減少が報告されている。どちらの死後脳研究においてもディスバインジンの発現レベルは抗精神病薬の服用量との相関が認められていないことと、我々が報告した抗精神病薬を長期投与したマウス脳においてディスバインジン mRNA 発現の変化が認められないことから、統合失調症脳におけるディスバインジンの発現レベルの低下は抗精神病薬投与による影響を受けているのではなく、統合失調症の病態に関連していると考えられる。 この結果から、ディスバインジンのノックアウトマウスが統合失調症のモデルマウスとして有用である可能性が示唆される。よってこのマウスを用いて、行動解析を行った。オープンフィールド試験においては、ノックアウトマウスは前半の15分間において行動量が低下しているが、後半の15分においては行動量の変化は認められなかったため、新奇環境における探索意欲が減退していると考えられた。またフィールドの真ん中での滞在時間がノックアウトマウスで減少しており、不安が増強している傾向があると考えられた。次に、高架式十字迷路においては、オープンアームにいく回数が前半の10分では変わらないが、後半の10分で少なくなっており、これも不安を反映していると考えられた。社会的行動測定テストにおいては、別のケージで飼育した2匹のマウスをオープンフィールドにおき、相互のコンタクトの回数や時間を測定した。その結果、ノックアウトマウスではコンタクト回数が減少していた。これらの結果は、ディスバインジンのノックアウトマウスでは、不安の増強に加え、意欲や社会行動の障害が認められることを示唆する。統合失調症においては、これらの症状が認められるが、その動物モデルにおいて、意欲の減退が認められるものはまだ見出されていない。そのような観点からこのマウスは新たな統合失調症のモデル動物として興味深いと考えられる。 またディスバインジンは血中にも発現していることから、その発現レベルが統合失調症のマーカーとなる可能性について検討したところ、未服薬の統合失調症患者において mRNA 発現レベルの増加が認められた。このことは、ディスバインジンの統合失調症における発現が脳だけではなく末梢においても異常が認められることを示唆している。 また、我々はディスバインジンの過剰発現マウスの作成を行っており、2つのラインの作成に成功している。このマウスとノックアウトマウスの前頭葉、海馬、線条体の組織から RNA を抽出し、マイクロアレイ解析により網羅的に発現の変化の認められる遺伝子群を検討している。まだプレリミナリーな結果ではあるが、いくつかの遺伝子が複数の部位で発現の変化を認めていた。さらに、発現変化のある遺伝子のうちの一つは、ディスバインジンと結合するという大変興味深いデータも得られており、今後さらなる解析を進めていく予定である。			

第5領域 (公募班員)

研究代表者名 橋本 亮太

発表論文

英文

(1) 原著論文

Mori, T., Ohnishi, T., Hashimoto, R., Nemoto, K., Moriguchi, Y., Noguchi, H., Nakabayashi, T., Hori, H., Harada, S., Saitoh, O., Matsuda, H. & Kunugi, H. Progressive changes of white matter integrity in schizophrenia revealed by diffusion tensor imaging. *Psychiatry Res.* **154**, 133-145 (2007).

Hong, K.W., Sugawara, Y., Hasegawa, H., Hayasaka, I., Hashimoto, R., Ito, S. & Inoue-Murayama, M. A new gain-of-function allele in chimpanzee tryptophan hydroxylase 2 and the comparison of its enzyme activity with that in humans and rats. *Neurosci Lett.* **412**, 195-200 (2007).

Numata, S., Ueno, S.I., Iga, J.I., Yamauchi, K., Hongwei, S., Hashimoto, R., Takeda, M., Kunugi, H., Itakura, M. & Ohmori, T. Gene expression in the peripheral leukocytes and association analysis of PDLIM5 gene in schizophrenia. *Neurosci Lett.*(2007).

Kimura, R., Kamino, K., Yamamoto, M., Nuripa, A., Kida, T., Kazui, H., Hashimoto, R., Tanaka, T., Kudo, T., Yamagata, H., Tabara, Y., Miki, T., Akatsu, H., Kosaka, K., Funakoshi, E., Nishitomi, K., Sakaguchi, G., Kato, A., Hattori, H., Uema, T. & Takeda, M. The DYRK1A gene, encoded in chromosome 21 Down syndrome critical region, bridges between beta-amyloid production and tau phosphorylation in Alzheimer disease. *Hum Mol Genet.* **16**, 15-23 (2007).

Nemoto, K., Ohnishi, T., Mori, T., Moriguchi, Y., Hashimoto, R., Asada, T. & Kunugi, H. The Val66Met polymorphism of the brain-derived neurotrophic factor gene affects age-related brain morphology. *Neurosci Lett* **397**, 25-29 (2006).

Tanaka, K., Shintani, N., Hashimoto, H., Kawagishi, N., Ago, Y., Matsuda, T., Hashimoto, R., Kunugi, H., Yamamoto, A., Kawaguchi, C., Shimada, T. & Baba, A. Psychostimulant-induced attenuation of hyperactivity and prepulse inhibition deficits in Adcyap1-deficient mice. *J Neurosci* **26**, 5091-5097 (2006).

Kunugi, H., Hashimoto, R., Okada, T., Hori, H., Nakabayashi, T., Baba, A., Kudo, K., Omori, M., Takahashi, S., Tsukue, R., Anami, K., Hirabayashi, N., Kosuga, A., Tatsumi, M., Kamijima, K., Asada, T., Harada, S., Arima, K. & Saitoh, O. Possible association between nonsynonymous polymorphisms of the anaplastic lymphoma kinase (ALK) gene and schizophrenia in a Japanese population. *J Neural Transm*

113, 1569-1573 (2006).

Law, A.J., Lipska, B.K., Weickert, C.S., Hyde, T.M., Straub, R.E., Hashimoto, R., Harrison, P.J., Kleinman, J.E. & Weinberger, D.R. Neuregulin 1 transcripts are differentially expressed in schizophrenia and regulated by 5' SNPs associated with the disease. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **103**, 6747-6752 (2006).

Masui, T., Hashimoto, R., Kusumi, I., Suzuki, K., Tanaka, T., Nakagawa, S., Suzuki, T., Iwata, N., Ozaki, N., Kato, T., Kunugi, H. & Koyama, T. Lithium response and Val66Met polymorphism of the brain-derived neurotrophic factor gene in Japanese patients with bipolar disorder. *Psychiatr Genet*. **16**, 49-50 (2006).

Hashimoto, R., Numakawa, T., Ohnishi, T., Kumamaru, E., Yagasaki, Y., Ishimoto, T., Mori, T., Nemoto, K., Adachi, N., Izumi, A., Chiba, S., Noguchi, H., Suzuki, T., Iwata, N., Ozaki, N., Taguchi, T., Kamiya, A., Kosuga, A., Tatsumi, M., Kamijima, K., Weinberger, D.R., Sawa, A. & Kunugi, H. Impact of the DISC1 Ser704Cys polymorphism on risk for major depression, brain morphology and ERK signaling. *Hum Mol Genet*. **15**, 3024-3033 (2006).

Kumamoto, N., Matsuzaki, S., Inoue, K., Hattori, T., Shimizu, S., Hashimoto, R., Yamatodani, A., Katayama, T. & Tohyama, M. Hyperactivation of midbrain dopaminergic system in schizophrenia could be attributed to the down-regulation of dysbindin. *Biochem Biophys Res Commun*. **345**, 904-909 (2006).

Chiba, S., Hashimoto, R., Hattori, S., Yohda, M., Lipska, B., Weinberger, D.R. & Kunugi, H. Effect of antipsychotic drugs on DISC1 and dysbindin expression in mouse frontal cortex and hippocampus. *J Neural Transm*. **113**, 1337-46 (2006).

Nakahachi, T., Iwase, M., Takahashi, H., Honaga, E., Sekiyama, R., Ukai, S., Ishii, R., Ishigami, W., Kajimoto, O., Yamashita, K., Hashimoto, R., Tanii, H., Shimizu, A. & Takeda, M. Discrepancy of performance among working memory-related tasks in autism spectrum disorders was caused by task characteristics, apart from working memory, which could interfere with task execution. *Psychiatry Clin Neurosci*. **60**, 312-318 (2006).

Okada, T., Hashimoto, R., Numakawa, T., Iijima, Y., Kosuga, A., Tatsumi, M., Kamijima, K., Kato, T. & Kunugi, H. A complex polymorphic region in the brain-derived neurotrophic factor (BDNF) gene confers susceptibility to bipolar disorder and affects transcriptional activity. *Mol Psychiatry*. **11**, 695-703 (2006).

(2) 総説

Hashimoto, R., Hattori, S., Chiba, S., Yagasaki, Y., Okada, T., Kumamaru, E., Mori, T., Nemoto, K., Tanii,

H., Hori, H., Noguchi, H., Numakawa, T., Ohnishi, T. & Kunugi, H. Susceptibility genes for schizophrenia. *Psychiatry Clin Neurosci.***60** Suppl 1, S4-S10 (2006).

(3) 著書

和文

(1) 原著論文

野口広子、堀弘明、橋本亮太、中林哲夫、津久江亮太郎、穴見公孝、斉藤治、功刀浩：統合失調症における知的機能の縦断的变化について：予備的検討. *Progress in Medicine* **26**(7), 185-187(2006).

(2) 総説

橋本亮太、安田由華、大井一高、武田雅俊：気分安定薬の作用メカニズム. *こころの科学* **131**,47-52 (2007).

橋本亮太、大井一高、安田由華、武田雅俊：内科医のための脳疾患講座、統合失調症その1. *Brain Medical* **18**(4),382-387(2006).

橋本亮太、武田雅俊：統合失調症は神経変性疾患か？ *脳* **21** **9**(4),390-393(2006).

橋本亮太、武田雅俊：統合失調症は神経変性疾患か？ 神経生化学的観点から. *脳* **21** **9**(4),409-412(2006).

橋本亮太、武田雅俊：日本統合失調症学会 創立記念第1回大会. *Schizophrenia Frontier* **7**(2),140-141(2006).

(3) 著書

武田雅俊、田中稔久、橋本亮太：精神と未病. 未病医学入門臨床、金芳堂、98-102(2006).