

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 25 年 6 月 7 日現在

機関番号：82609

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009 ～ 2012

課題番号：21500396

研究課題名（和文） ノックアウトマウスを用いた神経細胞死抑制遺伝子 *alivin* ファミリーの機能の解析研究課題名（英文） Generation of knockout mice and transgenic mice of the *Alivin* family

研究代表者

小野 富男（ONO TOMIO）

公益財団法人東京都医学総合研究所・基盤技術研究センター・基盤技術研究職員

研究者番号：60231239

研究成果の概要（和文）：

*Alivin1*は神経細胞において神経活動により強く発現誘導されかつ神経細胞死を抑制する活性を持つ遺伝子である。*Alivin1*とそのファミリーメンバーである*Alivin2, 3*の機能を探る目的で、*Alivin1*を高発現するトランスジェニックマウス、および、*Alivin1, 2, 3*のノックアウトマウスを作製した。*Alivin1*ノックアウトマウスから調製した胎児繊維芽細胞の遊走性は野生型のそれと比較して低下していた。また*Alivin1*を高発現するトランスジェニックマウスでは新奇な場所に対する慣れが生じにくく、不安がやや高い可能性が示唆された。

研究成果の概要（英文）：

In order to study biological functions of the *Alivin* family, we have generated mutant strains of mice harboring *Alivin1* knockout (KO) allele, *Alivin2* KO allele, *Alivin3* KO allele, and an *Alivin1* over-expressing transgene. Results of open-field tests suggest that the transgenic mice over-expressing ALIVIN1 have enhanced anxiety. The fibroblast prepared from embryos of the *Alivin1* KO mice showed reduced migratory activity compared with that of wild type.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	900,000	270,000	1,170,000
2010年度	800,000	240,000	1,040,000
2011年度	800,000	240,000	1,040,000
2012年度	800,000	240,000	1,040,000
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：実験動物学・実験動物学

キーワード：ノックアウトマウス、アポトーシス、神経細胞死、ロイシンリッチリピート、免疫グロブリン、神経活動

1. 研究開始当初の背景

神経活動は記憶学習、神経新生、神経分化、

生存、アポトーシスなどの神経細胞の発達と機能の制御に中心的な役割を演じており、こ

これらの制御機構の破綻が鬱病、自閉症などの精神神経疾患や、認知症などの神経変性疾患の原因であるとされている。我々は、神経活動に依存して生存が促進される初代培養小脳顆粒神経細胞を用い、神経活動に依存して発現が強く誘導され、かつアポトーシス抑制活性を持つ遺伝子である *Alivin1* を見出した

(Ono, T. *et al* J. Neurosci. 23, 5887-96, 2003.)。 *Alivin1* の機能はよくわかっていないが、この遺伝子は7回の繰り返し構造をもつロイシン・リッチ・リピート (LRR) と1個の免疫グロブリンドメインを持つ膜タンパク質をコードしており、神経栄養因子の受容体である *Trk* ファミリー、ミエリン化の阻害に関与する *Lingo-1* や、ショウジョウバエの背腹軸の決定に関与する *Kek1* とホモロジーがあることから *Alivin1* も重要な細胞機能を担っていることが予想される。さらに、 *Alivin1* には他に2種類のパラログ (*Alivin2*, *3*) が存在し、ファミリーを形成している。

2. 研究の目的

本研究では、 *Alivin1* とそのパラログである *Alivin2*, *Alivin3* のノックアウト (KO) マウス、および *Alivin1* 遺伝子を過剰発現するトランスジェニックマウスを作出して、これらの遺伝子の機能を細胞レベル、個体レベルで解析することにより、 *Alivin* ファミリーの機能と神経活動により制御される神経機能や疾患の基礎課程との関連性を探ることを目的とした。

3. 研究の方法

(1) *Alivin1* KO マウスの胎児より調製した MEF (mouse embryonic fibroblast) を用い、8 μ m membrane insert を用いて migration assay を行った。

(2) *Alivin* ファミリー遺伝子の組織分布測定には real-time RT-PCR を用いて相対的な mRNA 発現量を定量した。

(3) ALIVIN1 を高発現するトランスジェニックマウスを開発し、行動解析を行った。

(4) *Alivin2* と *Alivin3* に対するターゲティングベクターを作製し、マウス ES 細胞に導入して正しく相同組換えがおこなわれているクローンを PCR と Southern blotting を用いてスクリーニングした。

4. 研究成果

(1) *Alivin1* KO マウスの表現型の解析 *Alivin1* KO マウス、および野生型マウスの胎児より MEF を調製して細胞遊走能を測定した。その結果 *Alivin1* KO マウスでは野生型に比べ有意に MEF の遊走能が低下していた。このことから *Alivin1* は細胞移動の制御に関与していることが示唆された。

(2) *Alivin1* 高発現マウスの作製と表現型

の解析

CAG promoter 下に *Alivin1* cDNA を繋いだコンストラクトを作製し、マウス受精卵にマイクロインジェクションして *Alivin1* を過剰発現する2ラインのトランスジェニックマウスを作製した。これらのラインについて *Alivin1* が高発現していることを mRNA レベル、タンパク質レベルで確認した。これらのラインを用いて行動学的解析を行った結果、Open field test において *Alivin1* 高発現トランスジェニックマウスは新奇な場所に対する慣れが生じにくく、不安がやや高い可能性が示唆された。その他の行動学的テストでは野生型との差は認められなかった。

(3) *Alivin2* KO マウスの作製

C57BL6/N 由来の ES 細胞 RENKA 株を用いて *Alivin2* のターゲティングを行い、相同組換え ES 細胞を得た。アグリゲーション法を用いてキメラを作製し、1ラインの ES 株が生殖系列に移行したことを確認した。

(4) *Alivin3* KO マウスの作製

C57BL6/N 由来の ES 細胞 RENKA 株を用いて *Alivin3* のターゲティングを行い、相同組換え ES 細胞を得た。アグリゲーション法を用いてキメラを作製し、2ラインの ES 株が生殖系列に移行したことを確認した。

(5) *Alivin1* KO マウスの C57BL6/N background および BALB/c background へのコンジェニック化と *Alivin1*, *2*, *3* のトリプル KO マウスの作出を行った。

(6) *Alivin* 遺伝子産物の発現パターンの解析
① Real time RT-PCR による *Alivin* ファミリー遺伝子の組織発現パターンの解析。

マウスの各組織より RNA を抽出し、cDNA に変換した後に real-time PCR を用い各組織の *Alivin1*, *2*, *3* mRNA の発現量を相対定量した。*Alivin1* は脳、肺、脾臓、精巣で高発現していた。*Alivin2* mRNA は脳で発現が最も高く、その他の組織では低発現であった。*Alivin3* は脾臓で発現が最も高く、その他の組織では低発現であった。これらの結果から *Alivin* ファミリー各遺伝子の機能と臓器機能との関連性が示唆された。

② 抗 ALIVIN1 抗体の作製の試み

ALIVIN1 の個体内の局在を評価するために特異抗体の作製を試みた。これまでに3種類の合成ペプチドを用いてウサギに免疫し、抗 ALIVIN1 ペプチド抗体の作製を行ったが、特異性の高い抗体が得ることができなかった。そこで、本研究では *Alivin1* KO マウスを用いて抗 ALIVIN1 抗体の作製を試みた。細菌で発現させたマウス ALIVIN1 の細胞外ドメインタンパク質を、BALB/c

background の *Alivin1* KO マウスに免疫して抗体を得た。得られた抗体はバクテリアで発現させた ALIVIN1 タンパク質と特異的に強く反応したが、マウス個体の ALIVIN1 タンパク質とは反応しなかった。この原因として翻訳後の修飾がエピトープの認識に強く関与している可能性が考えられた。

③ALIVIN1 発現パターン可視化の試み

Alivin ファミリー遺伝子産物と蛍光タンパク質との融合タンパク質を各々のプロモーター下に発現するトランスジェニックマウスを開発し、遺伝子産物の発現パターンを可視化することを試みた。それぞれの遺伝子を含む BAC クローンの *Alivin* ORF の 3' 末端に蛍光タンパク質 cDNA を BAC recombineering により組み込むことにより、それぞれの遺伝子のプロモーター制御下で ALIVIN1-AcGFP, ALIVIN2-mCherry, ALIVIN3-KeimaRed をコードする BAC コンストラクトを BAC recombineering 法を用いて作製した。これらの BAC ベクターの内、本研究では先ず ALIVIN1-AcGFP を発現する BAC コンストラクトをマウス受精卵にインジェクションして、5 ラインのファウンダーマウスを得た。これらの内、1 ラインについてのみ GFP mRNA の発現が確認されたが、抗 GFP 抗体による Western blotting では GFP タンパク質の発現が確認されなかった。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 3 件)

①Yamaguchi J, Nishiyama S, Shimanuki M, Ono T, Sato A, Nakada K, Hayashi J, Yonekawa H, Shitara H Comprehensive application of an mtDsRed2-Tg mouse strain for mitochondrial imaging. Transgenic Res 21, 2012, 439-47 (査読あり)

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21792696>

②Nishiyama S, Shitara H, Nakada K, Ono T, Sato A, Suzuki H, Ogawa T, Masaki H, Hayashi J, Yonekawa H. Over-expression of Tfam improves the mitochondrial disease phenotypes in a mouse model system. Biochem Biophys Res Commun. 401 (1), 2010, 26-31 (査読あり)

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20816751>

③Ono T., Akamatsu N., Shitara H., Ishii R., Taya C., Yamada I, Shibukawa Y., Kushida T., Furuse T., Watabe K., Wakana S., and Yonekawa H. Mice deficient in *alivin1/amigo2* show enhanced locomotor

activity Neurosci Res 65, 2009, S228-S228 (査読無)

[学会発表] (計 8 件)

①芦野洋美, 小野富男, 入江敦, 島村眞里子 血管新生における CK2 と ポリアミン の関与 第 85 回日本生化学会大会 2012 年 12 月 14 日 ~ 2012 年 12 月 16 日 福岡

②Tomio Ono, Toyoyuki Takada, Kazuhiko Watabe, Hiroshi Shitara, Rie Ishii, Toshihiko Shiroishi, Choji Taya, and Hiromichi Yonekawa A new spontaneous mouse mutant of the kyphoscoliosis peptidase gene, a muscular dystrophy gene. 第 3 4 回日本分子生物学会年会 2011/12/14 横浜

③芦野洋美, 小野富男, 入江敦, 島村眞里子 CK2 阻害物質は血管新生を抑制する 第 84 回日本生化学会大会 2011/9/22 京都

④芦野洋美, 小野富男, 入江敦, 山本行男, 島村眞里子 IkB キナーゼ阻害剤による in vivo 血管新生の抑制 第 33 回日本分子生物学会年会・第 83 回日本生化学会大会合同大会 2010.12.7-10 神戸

⑤Ono T., Akamatsu N., Shitara H., Ishii R., Taya C., Yamada I, Shibukawa Y., Kushida T., Furuse T., Watabe K., Wakana S., and Yonekawa H. Enhanced locomotor activity in *alivin1/amigo2* deficient mice. 第 32 回日本分子生物学会年会 2009.12.9-12 横浜

⑥Ashino, H., Ono, T., Yamamoto, Y., Shimamura, M Inhibitory effect of N-acetyl-L-cysteine on angiogenesis in vivo. 第 82 回日本生化学会大会 2009.10.21-24 神戸

⑦Ono T., Akamatsu N., Shitara H., Ishii R., Taya C., Yamada I, Shibukawa Y., Kushida T., Furuse T., Watabe K., Wakana S., and Yonekawa, H. Deficiency of *alivin1/amigo2* in mice enhances locomotor activity. 第 82 回日本生化学会大会 2009.10.21-24 神戸

⑧Ono T., Akamatsu N., Shitara H., Ishii R., Taya C., Yamada I, Shibukawa Y., Kushida T., Furuse T., Watabe K., Wakana S., and Yonekawa H. Mice deficient in *alivin1/amigo2* show enhanced locomotor activity. 第 32 回日本神経科学大会 2009.9.16-18 名古屋

6. 研究組織

(1) 研究代表者

小野 富男 (ONO TOMIO)
公益財団法人東京都医学総合研究所・基盤
技術研究センター・基盤技術研究職員
研究者番号：60231239

(2) 研究分担者

設楽 浩志 (SHITARA HIROSHI)
公益財団法人東京都医学総合研究所・基盤
技術研究センター・基盤技術研究職員
研究者番号：90321885

(3) 研究分担者

松岡 邦枝 (MATSUOKA KUNIE)
公益財団法人東京都医学総合研究所・ゲノ
ム医科学研究分野・主席研究員
研究者番号：40291158

(4) 研究分担者

多屋 長治 (TAYA CHOJI)
公益財団法人東京都医学総合研究所・基盤
技術研究センター・室長
研究者番号：90175456

(3) 連携研究者

なし