

平成22年5月24日現在

研究種目：基盤研究（C）
 研究期間：2007～2009
 課題番号：19500330
 研究課題名（和文）ALS2 活性化因子同定による ALS2 の生理的機能と運動ニューロン変性機構の解明
 研究課題名（英文）Elucidation of the physiological function of ALS2 and mechanism for motor neuron degeneration through the identification of ALS2 activators
 研究代表者
 秦野 伸二（HADANO SHINJI）
 東海大学・医学部・准教授
 研究者番号：60281375

研究成果の概要（和文）：筋萎縮性側索硬化症（ALS）は、運動ニューロンの選択的変性を特徴とする神経難病である。本研究では、ALS 原因遺伝子産物の1つである ALS2 に焦点を当て、その機能的調節因子を同定するとともに、ALS2 が制御する生理的機能を解明することを目指した。その結果、ALS2 の上流活性化因子（Rac1）、ならびに ALS2 の細胞内での生理的役割（細胞内膜小胞融合調節）を特定することに世界ではじめて成功した。

研究成果の概要（英文）：Amyotrophic lateral sclerosis (ALS) is a heterogeneous group of progressive neurodegenerative disorders characterized by a selective loss of motor neurons in the cerebral cortex, brainstem, and spinal cord. Currently, the mechanism for the selective degeneration of motor neurons is unclear. We focus on the newly-identified ALS causative gene product, called ALS2, and investigate the molecular function of ALS2 and its activators. We here identified Rac1 as a novel ALS2 activator, and revealed that ALS2 plays a role in macropinocytosis and endosome fusion in cells. Our study will contribute to define the molecular mechanisms underlying the neuronal dysfunction and degeneration in ALS.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2008 年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2009 年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：神経化学・神経薬理学

キーワード：分子・細胞・神経生物学

1. 研究開始当初の背景

筋萎縮性側索硬化症（ALS）は、上位及び下位運動ニューロンの選択的変性を特徴と

する進行性の神経難病である。しかしながら ALS の本質的な病因は不明であり、それ故にその有効な治療法は開発されていない。本研

究は、当研究グループにより 2001 年に同定された新規の家族性劣性 ALS 原因遺伝子「ALS2」(Nature Genet 29, 166-173, 2001) に焦点を当て、ALS2 遺伝子の機能喪失変異が何故運動ニューロン疾患を引き起こすかについて、ALS2 遺伝子産物 (ALS2 タンパク質: ALS2) の正常機能解明を通して明らかにすることを旨とする。本疾患は劣性遺伝形式を示すので、優性遺伝する神経変性疾患とは異なり、ALS2 の生理的機能喪失による運動ニューロン維持機構の破綻が運動ニューロンの選択的変性をもたらすと考えられる。従って、ALS2 の正常機能の解明は運動ニューロンの維持機構を理解する上で非常に重要である。既に我々は、ALS2 が低分子量 G タンパク質 Rab5 の特異的活性化因子、すなわち GEF (Guanine nucleotide exchange factor)

(Rab5GEF)であることを示している (Hum Mol Genet, 12, 1671-1687, 2003)。さらに ALS2 の Rab5GEF 活性には ALS2 の多量体形成が不可欠であることを示した (J Biol Chem 279, 38626-38635)。このように ALS2 は Rab5 の活性化を介してその機能を発揮すると考えられる。Rab5 シグナルは、エンドサイトーシス (細胞膜、細胞膜に結合する因子、細胞外の因子などを細胞膜と共に細胞内に取り込む過程で、数種類の異なるメカニズムが知られている) の過程自体、その結果生じる細胞内の小胞であるエンドソーム膜の輸送、融合の過程などにそれぞれ不可欠であることが知られている。このように Rab5 は膜輸送過程において多様な役割を有するので、ALS2 の具体的な機能については現在のところ不明な点が多い。

我々は、非神経細胞では ALS2 の一部が初期エンドソームに局在しエンドソームの肥大化を誘導するが、大部分の ALS2 分子は細胞質に局在すること、神経細胞では比較的エンドソームに局在する ALS2 分子が多いことを示している。さらにアミノ末端の領域を欠く変異 ALS2 は、神経系、非神経系細胞に関わらず完全にエンドソームに局在し、異常に巨大化したエンドソームを誘導することを示した (Hum Mol Genet 12, 1671-1687; J Biol Chem 279, 38626-38635)。これらのことは、大部分の ALS2 はアミノ末端領域を介した機構により細胞質に不活化状態で保持され、その一部が何らかの機構により細胞内膜構造に移動し、最終的にエンドソーム膜 (種類は不明) に達し、その融合を促進していることを示唆している。このように ALS2 は少なくともエンドソーム膜の融合を促進する因子であることから、細胞質に局在する ALS2 は細胞内の膜構造 (細胞膜や種々のエンドソーム膜等) に局在を変化させてその機能を発揮する必要がある。従って、細胞質に局在する不活化 ALS2 が、どのようなシグナル下で

のような時にどのような膜構造に局在を変え、最終的にエンドソームの融合を促進するかを明らかにすることは、ALS2 の膜輸送過程における機能を解明することに繋がる。

ALS2 活性化因子が働く環境 (特定のシグナル伝達系等) は、ALS2 自体の機能する生理的環境を示唆する。さらに、活性化された ALS2 が局在するようになる細胞内の膜の種類 (細胞膜や種類の異なるエンドソーム等) は、ALS2 の関わる具体的なエンドサイトーシスの種類と過程を示唆することから、活性化因子の同定は、ALS2 の生理的機能解明に大変重要である。現在、我々以外の国外の研究グループも ALS2 の膜輸送過程における役割を研究しているが、これらの研究グループは、ALS2 分子が通常、不活化されていることを発見していない。従って、不活化された ALS2 の発現する細胞でその機能を解析しており、我々の ALS2 活性化分子シグナル系の同定により ALS2 が制御する膜輸送の種類や過程を明らかにする研究戦略とは根本的に異なる。我々は、Rab5 という細胞特異性のない一般的な G タンパク質の活性化因子である ALS2 の機能は、ALS2 上流因子が活性化時期や場所を決定することにより特異的になり得ると考えている。

2. 研究の目的

本研究では、上記の研究背景に基づき、現在のところ同定されていない ALS2 の上流の活性化因子を同定し、ALS2 の制御するエンドサイトーシスの種類と過程を明らかにすることで、ALS2 の膜輸送過程における機能さらには生理的機能を明らかにし、運動ニューロンの維持機構の実体を解明することを目的とする。当該研究の遂行により、ALS2 の機能的欠損により破綻する神経細胞維持機構が解明され、ALS に対する新たな治療法確立に寄与することができるものと期待される。

3. 研究の方法

(1) ALS2 活性化因子の検索

本項目では、ALS2 の膜輸送過程における具体的な機能を解明する目的で、ALS2 の局在を細胞質から膜構造へ変化させる上流因子の同定を行う。上流因子検索には、取り扱いが簡便で鋭敏な感度を持つと考えられる HeLa 細胞の系を用いる。具体的には、完全長の ALS2 分子と抗体認識部位タグを付加した ALS2 活性化因子の候補 (タンパク質の場合) を HeLa 細胞にリポフェクション法で導入し発現させた後、常法にて固定し、抗 ALS2 抗体 (数種類作製済み) ならびに抗タグ抗体で染色する。共焦点顕微鏡を用いて観察し、ALS2 の局在を細胞質から細胞内の膜構造に変化させた候補因子を ALS2 活性化因子とする。ALS2 活性化因子の候補としては、現在

までにエンドサイトーシス誘導、膜輸送に関わることが知られている分子群や我々が予備実験により ALS2 との結合を確認している分子等を考えている。例えば、RhoA, Cdc42, Rac1, RhoG, RhoD, Trio, PI3K, Src 等（構成的活性化型を含む）であるが、多くはすでに発現プラズミドを作製済みである。またクラスリン依存性エンドサイトーシスやマクロピノサイトーシスを誘導する EGF、PDGF のような増殖因子の場合は、ALS2 のみ導入した細胞の培地に添加し作用させて、同様に ALS2 の局在変化を観察する。既知のシグナル伝達系に属す上流因子を同定した場合には、ALS2 上流因子のさらに上流因子を刺激し内在性の ALS2 上流因子による ALS2 の局在変化も調べる。

(2) 活性化 ALS2 が局在する細胞内膜構造の解析

本項目では、同定された活性化因子の各種エンドソームマーカールとの共存確認、または特定のエンドサイトーシスの阻害剤や特定のエンドサイトーシスを阻害する変異タンパク質等を用いて ALS2 が活性化されて局在する膜の性質を明らかにする。エンドサイトーシスには、クラスリン依存性エンドサイトーシス、マクロピノサイトーシス、カベオリン依存性エンドサイトーシス等が知られているが、それぞれの機構で特徴的にエンドサイトーシスされるマーカー分子が細胞内で局在する膜構造と活性化された ALS2 分子との共局在等も調べる。さらにマウス初代神経細胞において、ALS2 とマーカー分子との共存を確認し、活性化された ALS2 が関与するエンドサイトーシスの種類と過程を決定する。

(3) ALS2 と活性化因子の結合の解析

ALS2 活性化因子が ALS2 を直接活性化するか否かを解析する目的で、*in vitro* で両因子の結合実験を GST プルダウン法にて行う。ALS2 と活性化因子双方の一部を GST 融合タンパク質として発現させて両因子が相互作用するのに必要な領域（ドメイン）を決定する。さらに、細胞内での相互作用を解析するために、タグを付加した両因子を COS-7 細胞に発現させて、その細胞抽出液を用いた免疫沈降も行う。

(4) 活性化因子と ALS2 変異体を用いた活性化の解析

活性化因子の情報、ALS2 と活性化因子の相互作用部位等）をもとに作製する ALS2 の各種変異体（例えば活性化因子との相互作用部位に機能喪失変異を有する ALS2 等）を上流因子と共に HeLa 細胞に発現させて、ALS2 の局在変化を観察されるか否かを解析する。最近、ALS2 アミノ末端領域の 1 アミノ酸置換変

異がヒト運動ニューロン疾患の患者で発見され、さらにこの変異 ALS2 は初期エンドソームに局在し難くなっているとの報告がなされた。ここでは、この変異 ALS2 が上流因子によって活性化されてエンドソームに局在するか否かを解析することで、本変異 ALS2 が機能を喪失した機構を解析する。我々は、Rab5GEF 活性を欠失した ALS2 変異体（1 アミノ酸変異）をすでに発表しているが、この変異体と上流因子を HeLa 細胞に発現させて、ALS2 活性化に ALS2 の Rab5GEF 活性が必須であるか否かも調べる。

(5) 種々の初代培養細胞を用いた ALS2 存在意義の細胞特異性の解析

我々は、すでに *Als2* 遺伝子欠損 (*Als2*-KO) マウスの作出を終えており、当該マウス由来の種々の初代培養細胞を得られる環境にある。よって、ALS2 欠損または野生型 ALS2 を発現する種々の初代培養細胞（神経細胞を含む）を用いた比較実験が可能で、ALS2 が制御すると予想される膜輸送過程が、ALS2 非存在下で実際に影響を受けているのか否かを、細胞種別に解析することが可能である。我々は ALS2 とその他の Rab5GEF との重複した機能を想定しているため、ALS2 非存在下であっても、ALS2 の関与する膜輸送過程は、多くの細胞種で完全には崩壊せず、効率のみが減少する可能性が高いと考えられる。このため、ALS2 非存在下で生じる差異を解析するためには、細胞生物学的な解析法以外に生化学的な解析（例えばエンドサイトーシスマーカーの取り込みの生化学的定量等）も必要と考える。ALS2 と重複する機能を有する Rab5GEF（存在は仮定の段階）の候補を、ALS2 と同時または別々に RNA 干渉 (RNAi) 法で減少させることにより、ALS2 機能の重複を実証する。

4. 研究成果

(1) ALS2 活性化因子の検索

ALS2 活性化因子の候補としては、現在までにエンドサイトーシス誘導、膜輸送に関わることが知られている分子群や我々が予備実験により ALS2 との結合を確認している分子等、例えば、RhoA, Cdc42, Rac1, RhoG, RhoD, Trio, PI3K, Src 等（構成的活性化型を含む）が想定される。HeLa 細胞を用いた ALS2 活性化測定を行った結果、Rac1 及び RhoG が特異的に ALS2 を活性化することが判明した。また、増殖因子である EGF を培地に添加した場合にも、ALS2 の活性化が観察された。従って、ALS2 は、EGF>RhoG>Rac1 シグナル伝達系により活性化されることが示唆された。

(2) 活性化 ALS2 が局在する細胞内膜構造の解析

ALS2 が活性化される過程で、ALS2 は経時

的に細胞内での膜局在を変化させることが判明している。そこで、ALS2 活性化シグナルの上昇に伴って変化する ALS2 局在を様々な分子マーカーを用いて解析した。その結果、ALS2 は活性化に伴い細胞表面のラッフル膜に結合した後、Rac1 依存性マクロピノサイトーシスの活性化により細胞内に膜小胞として取り込まれ、その結果形成されるマクロピノソームに局在化することが明らかとなった。初期の段階では、ALS2 はアクチン陽性のマクロピノソーム上に局在したが、経時的にマクロピノソームの成熟が起こり、その結果 EEA1 陽性のエンドソームに局在を変化させることも判明した。注目すべき点として、様々な変異 ALS2 分子を用いた実験により、ALS2 の有する Rab5GEF 活性がマクロピノソームと初期エンドソームの融合の重要な調節因子として機能していることが明らかになったことである。

(3) ALS2 と活性化因子の結合の解析

GST プルダウン及び免疫沈降実験により、各種の ALS2 活性化因子 (Rac1 など) と ALS2 の直接結合について解析した。その結果、ALS2 は Rac1 と直接結合すること、さらにはその結合は Rac1 が活性化された際により顕著であることが判明した。上記の(1)及び(2)の結果を考慮すると、ALS2 の活性化過程は以下のように考えられる。すなわち、細胞外から増殖因子 (EGF) 等のシグナルが入ると EGF 受容体が活性化され、その結果 RhoG さらにはその下流分子である Rac1 が活性化される。そして、活性化 Rac1 は細胞内不活性型 ALS2 と結合することにより ALS2 を活性化 (ラッフル膜への局在化) し、さらに活性化された Rac1 の作用により引き起こされるマクロピノサイトーシスの活性化に伴ってマクロピノソームに局在化し、最終的に ALS2 分子は自体が有する Rab5GEF 活性により低分子量 G タンパク質 Rab5 を活性化し、エンドソームとマクロピノソームの融合を促進すると想定される。

(4) 活性化因子と ALS2 変異体を用いた活性化の解析

近年患者において見いだされた ALS2 のアミノ末端 Rcc1-like domain (RLD) 領域における 1 アミノ酸置換変異を有する 2 種類の変異 ALS2 分子 (ALS2^{C157Y}、ALS2^{G540E}) を用い、生化学的解析ならびに細胞生物学的解析を行った。その結果、これらの ALS2 変異体は、野生型と同様に ALS2 の上流活性化分子である Rac1 に結合するとともに、Rab5 活性化能を有することが判明した。一方、細胞内での Rac1 刺激反応性について解析した結果、ALS2 変異体は Rac1 への反応性ならびにマクロピノソーム・エンドソーム上への局在能が消失

していることが判明した。従って、細胞内において ALS2 分子が機能するためには、そのアミノ末端 RLD 配列が必須であることが明らかとなった。次に、ALS2 が選択的に特定の細胞膜画分に局在するメカニズムを解明するため、ALS2 と種々のイノシトールリン脂質との相互作用について解析した。マクロピノソーム及びエンドソーム上に存在するイノシトールリン脂質と ALS2 の相互作用について PIP Strip Overlay アッセイを用いて解析した結果、ALS2 は PI(3)P、PI(4)P、PI(5)P、PI(3,5)P2 に結合することが明らかとなった。それに対し、マクロピノソームに局在できない疾患変異を有する変異体 (ALS2^{C157Y}、ALS2^{G540E}) は PI(3)P 及び PI(4)P に対する親和性が低いことが判明した。

(5) 種々の初代培養細胞を用いた ALS2 存在意義の細胞特異性の解析

エンドサイトーシスならびに膜動態に果たす ALS2 の分子機能を明らかにするため、ALS2-KO マウス由来の初代培養細胞を用いて、血清刺激依存性の HRP 取込み活性の定量的解析を行なった。その結果、ALS2 の欠損により培養神経細胞での HRP 取込み活性が有意に低下したが、その活性の大部分は保持されることが判明した。従って、ALS2 と重複した分子機能を有する分子が存在すると想定される。そこで、そのような分子群 (Rab5GEF: VPS9 ドメインを有するファミリー分子) を標的とし、RNAi 法を用いて各々の遺伝子発現を抑制し、重複した生理的機能を有する分子の同定を試みた。その結果、RABGEF1 と RIN1 が ALS2 と協調的に神経突起伸長に関わることが示唆された。

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 10 件)

- ① Hadano S, Otomo A, Kunita R, Suzuki-Utsunomiya K, Akatsuka A, Koike M, Aoki M, Uchiyama Y, Itoyama Y, Ikeda JE (2010) Loss of ALS2/alsin exacerbates motor dysfunction in a SOD1^{H46R}-expressing ALS mouse model by disturbing endolysosomal trafficking. *PLoS ONE* 5, e9805. (査読有り)
- ② Yoshii Y, Hadano S, Otomo A, Suzuki K, Ikeda K, Ikeda JE, Iwasaki Y (2009) Natural history of young-onset amyotrophic lateral sclerosis. *Neurology* 73, 648-649. (査読有り)
- ③ Tanaka K, Okada Y, Kanno T, Otomo A, Yanagisawa Y, Shouguchi-Miyata J, Suga E,

Kohiki E, Onoe K, Osuga H, Aoki M, Hadano S, Itoyama Y, Ikeda JE (2008) A dopamine receptor antagonist L-745,870 suppresses microglia activation in spinal cord and mitigates the progression in ALS model mice. *Exp Neurol* 211, 378-386. (査読有り)

④ Otomo A, Kunita R, Suzuki-Utsunomiya K, Mizumura H, Onoe K, Osuga H, Hadano S, Ikeda JE (2008) ALS2/alsin deficiency in neurons leads to mild defects in macropinocytosis and axonal growth. *Biochem Biophys Res Commun* 370, 87-92. (査読有り)

⑤ Hadano S, Kunita R, Otomo A, Suzuki-Utsunomiya K, Ikeda JE (2007) Molecular and cellular function of ALS2/alsin: Implication of membrane dynamics in neuronal development and degeneration. *Neurochem Int* 51, 74-84. (査読有り)

⑥ Suzuki-Utsunomiya K, Hadano S, Otomo A, Kunita R, Mizumura H, Osuga H, Ikeda JE (2007) ALS2CL, a novel ALS2-interactor, modulates ALS2-mediated endosome dynamics. *Biochem Biophys Res Commun* 354, 491-497. (査読有り)

⑦ Kunita R, Otomo A, Mizumura H, Suzuki-Utsunomiya K, Hadano S, Ikeda JE (2007) The Rab5 activator ALS2/alsin acts as a novel Rac1 effector through Rac1-activated endocytosis. *J Biol Chem* 282, 16599-16611. (査読有り)

[学会発表] (計 28 件)

① Hadano S, Otomo A, Kunita R, Suzuki-Utsunomiya K, Akatsuka A, Koike M, Aoki M, Uchiyama Y, Itoyama Y, Ikeda JE (2010) ALS2/alsin, a Rab5 guanine nucleotide exchange factor, acts as a regulator for autophagosomal-endolysosomal protein degradation. *Keystone Symposia, Cell Death Pathway: Apoptosis, Autophagy and Necrosis (X3)*, Vancouver, Canada (March 12-17).

② Otomo A, Kunita R, Suzuki-Utsunomiya K, Ikeda JE, Hadano S (2009) Loss of Rac1-induced macropinosomal and endosomal localization of ALS2 underlies the pathogenesis for motor neuron diseases caused by missense mutations in the *ALS2* gene. 20th International Symposium on ALS/MND, Berlin, Germany

(December 8-10). (口頭発表)

③ Hadano S, Otomo A, Kunita R, Suzuki-Utsunomiya K, Yoshii Y, Aoki M, Itoyama Y, Iwasaki Y, Ikeda JE (2009) Generation and characterization of congenic lines of mutant SOD1 transgenic and *Als2* knockout mice. 20th International Symposium on ALS/MND, Berlin, Germany (December 8-10).

④ 秦野伸二 (2009) 筋萎縮性側索硬化症/運動ニューロン疾患研究の新展開。-オートファジーとエンドゾーム動態との関連について-。Cell Biology Summer Meeting 2009 (CBSM2009)、基調講演、つくば (July 11-12). (口頭発表)

⑤ Otomo A, Kunita R, Suzuki-Utsunomiya K, Hadano S, Ikeda JE (2008) Loss of Rac1-mediated macropinosomal recruitment of ALS2/alsin underlies the pathogenesis for motor neuron disease caused by missense mutations in the *ALS2* gene. BMB2008・第31回日本分子生物学会年会・第81回日本生化学会大会、合同大会, 神戸 (December 9-12). (口頭発表)

⑥ Hadano S, Otomo A, Kunita R, Suzuki-Utsunomiya K, Onoe K, Osuga H, Aoki M, Itoyama Y, Ikeda JE (2008) ALS2/alsin-deficient SOD1^{H46R} transgenic mice exhibit increased insoluble proteins in the spinal cord. 19th International Symposium on ALS/MND, Birmingham, U.K. (November 3-5). (口頭発表)

⑦ Hadano S, Otomo A, Kunita R, Suzuki-Utsunomiya K, Onoe K, Osuga H, Aoki M, Itoyama Y, Ikeda JE (2008) Loss of ALS2/alsin exacerbates motor dysfunction and axonal damage in SOD1^{H46R} transgenic mice. 第51回日本神経化学会、富山 (September 11-13). (口頭発表)

⑧ Kunita R, Otomo A, Mizumura H, Suzuki-Utsunomiya K, Hadano S, Ikeda JE (2007) The Rab5 activator ALS2/alsin acts as a novel Rac1 effector via Rac1-activated macropinocytosis. 第50回日本神経化学会、横浜 (September 10-12). (口頭発表)

⑨ Kunita R, Otomo A, Mizumura H, Suzuki-Utsunomiya K, Hadano S, Ikeda JE (2007) The Rab5 activator ALS2/alsin acts as a novel Rac1 effector through Rac1-activated macropinocytosis. Human Genome Meeting 2007, Montreal, Canada

(May 21-24). (口頭発表)

⑩ Otomo A, Kunita R Suzuki-Utsunomiya K, Mizumura H, Onoe K, Osuga H, Hadano S, Ikeda JE (2007) ALS2/alsin is localized to endosomes in primary cultured hippocampal neurons and implicated in axon elongation. Human Genome Meeting 2007, Montreal, Canada (May 21-24).

6. 研究組織

(1) 研究代表者

國田 竜太 (KUNITA RYOTA)
東海大学・医学部・特定研究員
研究者番号：90449124
(H19)

秦野 伸二 (HADANO SHINJI)
東海大学・医学部・准教授
研究者番号：60281375
(H20→H21) (H19：分担研究者)

(2) 研究分担者

秦野 伸二 (HADANO SHINJI)
東海大学・医学部・准教授
研究者番号：60281375
(H19) (H20→H21：研究代表者)

(3) 連携研究者

()

研究者番号：