

## 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 24 年 6 月 1 日現在

機関番号：32607

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2009 ～ 2011

課題番号：21700397

研究課題名（和文）マーモセット運動ニューロンを用いた ALS2 原因遺伝子産物の分子機能解析

研究課題名（英文） Analysis of ALS2 function in motor neurons form common marmoset

研究代表者

大友 麻子 (Asako Otomo)

北里大学・理学部・講座研究員

研究者番号：50535226

研究成果の概要（和文）：本研究は、ヒト及びヒトに類似性の高い霊長類の運動ニューロンを用いて作製した ALS2 タンパク質欠失細胞を用いて ALS2 タンパク質の機能を明らかにし、ALS2 タンパク質機能喪失による神経細胞死や機能異常の分子背景を解明することを目的とする。そのための第一歩として、マーモセット ALS2 遺伝子を同定し、マーモセット ALS2 遺伝子を発現抑制するマーモセット ES クローンのクローニングを行った。

研究成果の概要（英文）：To understand the molecular mechanisms underlying neuronal dysfunction and cell death caused by loss of ALS2, we tried to generate ALS2 deficient cellular model using marmoset ES cells. We succeeded in determining ALS2 sequence in marmoset, and cloned siRNA-mediated ALS2 down-regulated marmoset ES cells. By differentiating these ES clones, we will analyze the function of ALS2 in primate motor neuron.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	1,600,000	480,000	2,080,000
2010 年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2011 年度	800,000	240,000	1,040,000
年度			
年度			
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：分子神経科学、細胞生物学

科研費の分科・細目：神経科学・神経解剖学・神経病理学

キーワード：ALS、ALS2、筋萎縮性側索硬化症 2 型、マーモセット、運動ニューロン

## 1. 研究開始当初の背景

ALS2 は、劣性遺伝形式をとる若年発症型の ALS である。2001 年、ALS2 の原因遺伝子（ALS2 遺伝子）が同定された。その後、一連の生化学的及び細胞生物学的機能解析がなされ、ALS2 タンパク質が細胞内膜動態調節に関与する分子であることが明らかにされた。さらに、ALS2 疾患の分子病態解析を目的として *Als2* ノックアウトマウスが作出

され、その病理・病態解析がなされた。しかし、*Als2* ノックアウトマウスには、ヒト ALS2 疾患に見られる運動ニューロンの機能変性や細胞死は認められなかった。これまでに明らかになった ALS2 タンパク質の生化学的・細胞生物学的な基本には細胞特異性が認められず、運動ニューロンの生存・機能維持に必須の ALS2 タンパク質の分子機能は未だ明らかにされていない。運動ニューロンに特異

的な ALS2 タンパク質の分子機能を迅速かつ簡便に解析するためには、ALS2 疾患に見られる運動ニューロンの機能異常を再現する *in vitro* 細胞モデル系の構築が必要である。

## 2. 研究の目的

本研究は、マーモセット運動ニューロンを用いて、家族性筋萎縮性側索硬化症 2 型(ALS2)の原因遺伝子産物 (ALS2 タンパク質) の運動ニューロンにおける分子機能を解明することを目的とする。本研究では、ヒトに類似性が高く、実験動物としての利点が多いマーモセットに着目し、マーモセット EScell 由来運動ニューロンを用いて、RNA 干渉法 (siRNA 法) により、ALS2 タンパク質欠失マーモセット運動ニューロンを作製する。その ALS2 タンパク質欠失マーモセット運動ニューロンの細胞表現型やタンパク質分子の発現変化を解析することによって、ALS2 タンパク質の運動ニューロンにおける機能を明らかにする。

## 3. 研究の方法

本研究では、マーモセット *ALS2* 遺伝子のクローニングし、これまでに決定しているヒト *ALS2* 遺伝子に対する特異的 siRNA の配列を参考にして、マーモセット *ALS2* 遺伝子に対する siRNA ベクターを構築する。次にマーモセットの由来の EScell に対して、*ALS2* 遺伝子に対する siRNA 発現ベクターを挿入した ES クロノンを遺伝子挿入・クローニングによって取得する。同時に、マーモセットの由来の EScell から運動ニューロンへの分化誘導系を確立する。確立した分化誘導方法によってマウス及びマーモセットの由来の EScell クロノンを運動ニューロンに分化誘導する。分化誘導によって得た *ALS2* タンパク質欠失マーモセット運動ニューロンを用いて、その細胞表現型とタンパク質分解に関与する分子の発現挙動変化について解析する。必要に応じて *ALS2* タンパク質欠失マーモセット運動ニューロンとその細胞表現型について比較する。

## 4. 研究成果

① マーモセット ES 細胞の培養方法の確立  
理化学研究所バイオリソースセンターより入手したマーモセット ES 細胞を用い、先行研究 [Sasaki et al., Stem Cells. 2005] に従って、マーモセット ES 細胞の培養を行った。これらの ES 細胞から抽出・精製した mRNA を用いて RT-PCR を行った結果、マーモセット ES 細胞は未分化マーカーを発現していることが確認した。また、ES 細胞のアルカリフォスファターゼ活性をアルカリフォスファターゼを用いた染色で確認した結果、ES 細胞のコロニーが染色された。

② マーモセット ES 細胞の神経幹細胞及び

## 神経細胞への分化誘導方法の確立

先行研究 [Zhang et al., Nat Biotechnol. 2001;19(12):1129-1133., Li et al., Stem Cells. 2008;26(4):886-893.] を参考に、ES 細胞の神経幹細胞の方法を確立した。各種神経細胞への分化誘導方法についても検討中である。

③ マーモセット *ALS2* 遺伝子の cDNA クローニング

ES 細胞から得た mRNA を鋳型に、マーモセット *ALS2* 遺伝子の cDNA クローニングを行った。cDNA クローンの配列決定を行い、マーモセット *ALS2* 遺伝子のコーディング領域についての DNA 配列を決定した結果、マーモセット *ALS2* 遺伝子は、ヒト *ALS2* 遺伝子と同じく 1657 アミノ酸残基をコードし、そのアミノ酸配列は、ヒト *ALS2* タンパク質のアミノ酸配列と 98%一致していることが明らかとなった。

④ マーモセット *ALS* 遺伝子を発現抑制するノックダウンベクターの構築

pSingle-tTet-shRNA vector を基本骨格としたマーモセット *ALS2* 遺伝子を特異的に発現抑制するノックダウンベクター及び psiRNA-DUO を用いてノックダウンベクターを構築した。次に、このベクターが蛍光タンパク質 EGFP を発現し、さらには、*ALS2* の発現抑制効果を持つことを、構築したベクターをマーモセット ES 細胞に導入した後に、回収した細胞から抽出したタンパク質サンプルを用いたウエスタンブロット解析によって解析した。その結果、EGFP の発現及び *ALS2* 遺伝子の発現抑制効果が認められた。よって、今回構築したプラスミドベクターは、*ALS2* 遺伝子に対する発現抑制効果を持つことが明らかとなった。

⑤ *ALS2* 遺伝子発現抑制マーモセット ES クロノンの選択と解析

現在、pSingle-tTet-shRNA vector を基本骨格としたマーモセット *ALS2* 遺伝子を特異的に発現抑制するノックダウンベクター及び psiRNA-DUO を用いてマーモセット *ALS2* 遺伝子をテトラサイクリン依存的に発現抑制する ES 細胞株の選定とそれらの細胞を用いた機能解析を行っている。

今後、これらの ES クロノンを運動ニューロンへと分化誘導し、*ALS2* 疾患に見られる運動ニューロンの機能異常を再現する *in vitro* 細胞モデル系の構築を行う予定である。この、霊長類運動ニューロンを用いた *ALS2* 疾患モデル細胞は、新規の疾患モデル細胞である。*ALS2* 疾患モデル細胞は、新たな疾患分子機構研究の材料となるとともに創薬スクリーニングにも利用できるツールとなることが期待できる。

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 8 件)

- ① 大友麻子、潘麗、秦野伸二  
Dysregulation of the Autophagy-Endolysosomal System in Amyotrophic Lateral Sclerosis and Related Motor Neuron Diseases. *Neurology Research International*, 2012 年、In press. <http://www.hindawi.com/journals/nri/>
- ② 潘麗、吉井康弘、大友麻子、小川温子、岩崎泰雄、秦野伸二  
Different human copper-zinc superoxide dismutase mutants, SOD1G93A and SOD1H46R, exert distinct harmful effects on gross phenotype in mice. *PLoS One*, 2012 年、7 巻、3 号、e33409. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0033409>
- ③ 大友麻子、國田竜太、鈴木 (宇都宮) 恭子、池田讓衛、秦野伸二  
Defective relocalization of ALS2/alsin missense mutants to Rac1-induced macropinosomes accounts for loss of their cellular function and leads to disturbed amphisome formation. *FEBS Lett.* 2011 年、585 巻、5 号、730-736 頁、<http://dx.doi.org/10.1016/j.febslet.2011.01.045>
- ④ 吉井康弘、大友麻子、潘麗、大塚正人、秦野伸二  
Loss of glial fibrillary acidic protein marginally accelerates disease progression in a SOD1 (H46R) transgenic mouse model of ALS. *Neuroscience Research*, 2011 年、70 巻、3 号、321-329 頁、<http://dx.doi.org/10.1016/j.neures.2010.06.004>
- ⑤ 秦野伸二、吉井康弘、大友麻子、國田竜太、鈴木 (宇都宮) 恭子、潘麗、角田茂、岩崎泰雄、岩倉洋一郎、池田讓衛  
Genetic background and gender effects on gross phenotypes in congenic lines of ALS2/alsin-deficient mice. *Neuroscience Research*, 2010 年、68 巻、2 号、131-136 頁 <http://dx.doi.org/10.1016/j.neures.2010.06.004>
- ⑥ 吉井康弘、秦野伸二、大友麻子、川邊清一、池田憲、岩崎泰雄

Lower serum lipid levels are related to respiratory impairment in patients with ALS.

*Neurology*, 2010 年、74 巻、24 号、2027 頁、<http://www.neurology.org>

- ⑦ 秦野伸二、大友麻子、國田竜太、鈴木 (宇都宮) 恭子、赤塚明、小池正人、青木正志、内山安男、糸山泰人、池田讓衛  
Loss of ALS2/Alsin exacerbates motor dysfunction in a SOD1-expressing mouse ALS model by disturbing endolysosomal trafficking. *PLoS One*, 2010 年、5 巻、3 号、e9805 <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0009805>
- ⑧ 吉井康弘、秦野伸二、大友麻子、鈴木恭子、池田憲、池田讓衛、岩崎泰雄  
Natural history of young-adult amyotrophic lateral sclerosis. *Neurology*, 2009 年、73 巻、8 号、648-649、<http://www.neurology.org>

[学会発表] (計 3 件)

- ① 大友麻子、國田竜太、鈴木 (宇都宮) 恭子、池田讓衛、秦野伸二  
Defective relocalization of ALS2/alsin to Rac1-induced macropinosomes accounts for loss of its cellular function and leads to disturbed amphisome formation, 22<sup>nd</sup> INTERNATIONAL SYMPODIUM on ALS/MND, poster presentation, Sidney Australia, 30 November, -3 December, 2011
- ② 大友麻子、國田竜太、鈴木 (宇都宮) 恭子、池田讓衛、秦野伸二  
Rab5 and its activator ALS regulate autophagosome maturation and autophagoly, 21<sup>st</sup> INTERNATIONAL SYMPODIUM on ALS/MND, poster presentation, orland, U.S.A, 10-14 December, 2010
- ③ 大友麻子、國田竜太、鈴木 (宇都宮) 恭子、池田讓衛、秦野伸二  
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, 20<sup>th</sup> INTERNATIONAL SYMPODIUM on ALS/MND, oral presentation, Berlin, Germany, 7-10 December, 2009

[図書] (計 0 件)

〔産業財産権〕

○出願状況（計 0 件）

○取得状況（計 0 件）

〔その他〕

ホームページ等  
なし

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

大友 麻子 (Asako Otomo)  
北里大学・理学部・講座研究員  
研究者番号：50535226