

200400742B

厚生労働省科学研究費補助金 こころの健康科学研究事業

ALS2 分子病態解明と ALS治療技術の開発

平成14～16年度 総合研究報告書

7

主任研究者 池田 穰衛  
東海大学総合医学研究所分子神経科学部門  
平成17 (2005) 年3月

## 目 次

研究者一覧

I.	総合研究報告	
	ALS2分子病態解明とALS治療技術の開発	1
II.	研究成果の刊行に関する一覧表	15
III.	研究成果の刊行物・別刷	

## 研究者一覽

ALS2 分子病態解明と ALS 治療技術の開発  
研究者一覧

	氏名	所属	職名
主任研究者	池田 穰衛	東海大学総合医学研究所	教授
分担研究者	祖父江 元	名古屋大学大学院医学系研究科神経内科学	教授
	岩倉 洋一郎	東京大学医科学研究所ヒト疾患モデル研究センター	教授
	成宮 周	京都大学医学研究科神経・細胞薬理学	教授
研究協力者	中野 今治	自治医科大学神経内科	教授
	青木 正志	東北大学医学部神経内科	講師

# I. 総合研究報告書

厚生労働科学研究費補助金（こころの健康科学研究事業）

総合研究報告書

ALS2 分子病態解明と ALS 治療技術の開発

主任研究者 池田 稜衛

東海大学総合医学研究所分子神経科学部門 教授

研究要旨

筋萎縮性側索硬化症（ALS）は上位運動ニューロンおよび下位運動ニューロンの選択的変性を特徴とする神経変性疾患である。ALS の分子病態は未だ不明であり、その治療薬ならびに治療法も確立されていない。ALS の根治療法・治療薬の開発には ALS 発症原因遺伝子の解析を通して ALS の分子病態ならびに運動神経変性の分子機序を明らかにすることが必須である。本研究事業では、我々が単離・同定した家族性 ALS の新たな遺伝子“ALS2 遺伝子”に注目し、以下の 3 項目の研究を実施した；（1）ALS2 遺伝子が ALS あるいは類似運動ニューロン疾患の病態における修飾因子として働いている可能性に関する研究、（2）ALS2 疾患モデル動物としての *Als2* 遺伝子欠損マウスの作出、（3）ALS2 遺伝子産物（ALS2 蛋白質）およびその機能ドメイン（グアニンヌクレオチド交換因子；GEF）の細胞内分子機能に関する研究。本研究を実施した 3 年間（平成 14～16 年度）において、各研究項目に関して以下のような成果が得られた。（1）本邦の孤発性 ALS ならびにその類似運動ニューロン疾患患者および健常者の血液サンプルの集積ならびに *ALS2* 遺伝子配列解析を行った。特に、本邦の孤発性 ALS 患者 115 名と健常者 110 名における *ALS2* 遺伝子配列多型の統計的解析結果から、*ALS2* 遺伝子が孤発性 ALS の発症危険因子としての可能性が低いことが示された。（2）*Als2* ノックアウトマウスの作出に成功した。1 年 9 ヶ月齢を経過した現時点ではヒト ALS 様の運動ニューロン疾患症状を示さないことが確認された。（3）ALS2 蛋白質が新規の Rab5GEF であることを発見し、細胞内においてはエンドゾーム動態調節に関わることを明らかにした。また、Rho 情報伝達の神経細胞軸索伸長および細胞分裂期における新規分子作用の解明、ならびに脳内において ALS2 蛋白質と結合する蛋白質因子の同定の成功などの成果も得られた。

分担研究者

研究協力者

祖父江 元 （名古屋大学大学院医学系研究科神経内科学 教授）

中野 今治 （自治医科大学神経内科 教授）

岩倉 洋一郎 （東京大学医科学研究所 ヒト疾患モデル研究センター 教授）

青木 正志 （東北大学医学部神経内科 講師）

成宮 周 （京都大学医学研究科神経・細胞薬理学 教授）

A. 研究目的

筋萎縮性側索硬化症（ALS）は上位運動ニューロンおよび下位運動ニューロンの選択的変性を特徴とする “heterogeneous group of

inexorable neurodegenerative disorders”である。我が国における ALS 発症頻度は欧米諸国の例に等しく 10 万人当たり 1～2 人と決して低くない頻度である。ALS の発症・進行に係わると思われる幾つかの危険因子は知られているものの、確固たる生化学的情報も少なく、分子病態も未だ不明で、分子レベルでの確定診断法ならびに治療法も確立されていない。ALS 患者の大多数は孤発例で、家族性の発症頻度は僅か 10%程度である。しかし、すべての ALS は、運動ニューロンの機能障害・変性という点においては共通することから、家族性 ALS の原因遺伝子に注目した分子病態研究は、孤発性 ALS の分子発症機序の解明と ALS ならびに ALS 関連運動ニューロン疾患の治療技術の開発に効果的な研究戦略の一つと考えられる。

我々は、家族性 ALS の原因遺伝子としては、ALS 1 型の原因遺伝子 (*SOD1* 遺伝子) に次いで 2 番目となる、若年発症型 ALS 2 型原因遺伝子 “*ALS2* 遺伝子” を同定した (Nature Genetics 29:166-173, 2001)。本研究では、この *ALS2* 遺伝子に注目し、以下の 3 項目の研究を遂行する。(1) 本邦の孤発性 ALS および ALS 類似運動ニューロン疾患 (原発性側索硬化症、痙性対麻痺、脊髄性筋萎縮症) の患者を対象として、患者 *ALS2* 遺伝子における遺伝子配列多型および変異配列を同定することにより、*ALS2* 遺伝子が ALS あるいはその他の運動ニューロン疾患の症候や予後、さらには発症そのものに関わる修飾因子 (あるいは危険因子) として働いている可能性に関して検討する。(2) *ALS2* は劣性遺伝形式を示す疾患であることから、*ALS2* 疾患モデル動物として *Als2* 遺伝子欠損マウスを作出する。そして、作出したモデルマウスの分子病態解析を行う。(3) *ALS2* 遺伝子産物 (*ALS2* 蛋白質) の細胞内挙動と機能解析を行う。*ALS2* 蛋白質はそのアミノ酸配列中に複数のグアニンヌクレオチド交換因子 (GEF) の機能ドメイン配列を有することから、*ALS2* 蛋白質はある種の低分子量 G 蛋白質の活性化因子であると推定される。ここでは、そのような推

定分子機能を手掛かりにして、*ALS2* 蛋白質あるいは類縁の蛋白質因子が有する実際の細胞内分子機能を解明し、運動ニューロンの機能障害ならびに変性における分子的役割を明らかにする。以上のような 3 項目の研究を通して、本研究では最終的に ALS の分子病態解明と治療法開発のための知見・情報の収集、基本技術ならびに実験系の確立を目指す。

## B. 研究方法

(1) 孤発性 ALS および痙性対麻痺患集積と資料収集ならびに DNA (SNP) 解析

第 1 項目の研究では、本邦の孤発性 ALS および ALS 類似運動ニューロン疾患 (原発性側索硬化症、痙性対麻痺、脊髄性筋萎縮症) 患者の臨床症候の解析および DNA 試料の収集を行う。また、併せて健常者の血液サンプルの収集を行う。そして、それらを *ALS2* 遺伝子配列解析に供し、病態発現における *ALS2* 遺伝子変異・多型の関与について解析する。本研究では、*ALS2* 遺伝子全長の 80Kb のゲノム領域中の 18kb のゲノム配列を解読する。該当領域には、*ALS2* 遺伝子のプロモーター領域、全 34 エクソンおよび各エクソン・イントロンの境界領域が含まれている。方法は、末梢血液から抽出したゲノミック DNA を鋳型としてプロモーターおよび各エクソンを含むゲノム領域を PCR 法により増幅し、その増幅産物の遺伝子配列を解読するものである。得られた配列は、コンピュータ解析ソフトにより配列比較を行い、遺伝子配列多型および変異を検出する。そして、最終的に得られた多型・変異と臨床症候との相関を統計学的手法により解析する。

(2) *ALS2* モデル疾患マウスの作出

第 2 項目の研究では、*ALS2* 疾患モデルマウスを作出することを目標とする。先に我々が同定したチュニジアの *ALS2* 家系の遺伝子変異は、*ALS2* 遺伝子の第 3 エクソンにおける一塩基対欠失であることから、その変異と同等の変異マ

ウスを作出することを意図して、マウス *Als2* 相同遺伝子の第3エクソンにネオマイシン耐性遺伝子を挿入し、第3エクソン以降が欠損するようにターゲティングベクターをデザインした。そして、そのターゲティングベクターをマウス ES 細胞に導入し、相同組換え体クローンを取得、さらにそれらをキメラマウス作製に供した。さらに、作製したキメラマウスから生殖系列キメラマウスを同定し、その後計画的交配により最終的に *Als2* 遺伝子欠損マウスの作出を行った。作出した *Als2* 遺伝子欠損マウスは、体重変動および行動学的解析等の継続観察を行うとともに、該当マウスにおける各種遺伝子および蛋白質発現の変動を生化学的・細胞組織学的手法により解析した。

### (3) ALS2 蛋白質の分子動態と神経変性機序について

第3項目に関しては、ALS2 蛋白質の細胞および生体内における分子機能を解明することを目指す。研究初年度は、ALS2 蛋白質アミノ酸配列中に存在する2つの GEF ドメイン (DH/PH および VPS9) に注目して、それら分子機能の解明を目指した。DH/PH ドメインは、Rho 系の低分子量 GTPase の活性化因子であると推定されることから、Rho 情報伝達の神経系での分子機能と ALS2 の DH/PH 自身の触媒活性の検討を行った。一方、VPS9 ドメインは、Rab 系の低分子量 GTPase を基質として機能している可能性を考慮し、ALS2 の VPS9 ドメインの本来の基質の同定を生化学的および細胞生物学的手法により試みた。研究二年度目は、ALS2 の DH/PH ドメインの神経細胞形態における役割を探るため、これが活性化されると思われる Rho 情報伝達の神経系での役割を特に Rho 下流のエフェクター分子に注目して解析した。また、このドメイン自身の触媒活性の検討を昨年度に引き続き行った。さらに、研究初年度に明らかにされた ALS2 蛋白質 C 末端領域の VPS9 ドメインが有する Rab5 活性化およびエンドソーム動態調節メカニズムを解明するため、酵母

two-hybrid 法を用いることにより、ALS2 に結合する活性調節因子の単離・同定を試みた。そして、研究最終年度は、ALS2 の DH/PH ドメインの神経細胞形態における役割をさらに探るため、これが活性化されると思われる Rho 情報伝達の細胞ならびに個体における役割を特に Rho 下流のエフェクター分子に注目して解析した。また、神経系において ALS2 蛋白質が担う細胞内分子シグナル系ならびに生理的機能を明らかにするため、免疫沈降法を用いて脳内において ALS2 蛋白質と結合する因子の単離・同定を試みた。

### (倫理面への配慮)

患者および健常者における *ALS2* 遺伝子変異および遺伝子配列多型については、倫理委員会の承認に基づき、患者とその家族および健常者の方々の納得と協力(インフォームドコンセント)を得た上で実施した。また、動物実験に際しては各大学における組換え DNA 実験安全委員会ならびに動物実験委員会の承認を得た上で実施した。

## C. 研究結果

### (1) 孤発性 ALS および痙性対麻痺患集積と資料収集ならびに DNA (SNP) 解析

孤発性 ALS および痙性対麻痺患集積と資料収集ならびに DNA (SNP) 解析については、名古屋大学において、97 例の孤発性 ALS 患者を集積し、ElEscorial に基づく臨床表現型の解析を実施し、同時に当該患者の遺伝子の収集と *ALS2* 遺伝子変異解析・遺伝子配列多型解析を実施した(祖父江、池田)。自治医科大学では、孤発性 ALS 患者 61 症例、痙性対麻痺 7 症例の試料収集が完了し(中野)、解析が現在も進行中である(池田)。東北大学およびその関連施設の孤発性 ALS および家族性痙性対麻痺患者の資料収集にあたり、家族性形成対麻痺 2 症例の試料収集ならびに解析を行った(青木)。こ



れまでに、収集した 115 例の患者ならびに 110 名の健常者の各試料についての *ALS2* 遺伝子の全 34 エクソンならびに遺伝子プロモーターの DNA 解析を完了した(池田)。現在までに見いだされた遺伝子配列多型は、総計 56 ヶ所(5' 上流プロモーター領域; 7 ヶ所、翻訳エクソン内; 16 ヶ所、3' 非翻訳領域; 5 ヶ所、イントロン領域; 28 ヶ所)であった。また、イントロンにおける 2 ヶ所の欠失および 3 ヶ所の挿入多型が見いだされた。これらの多型の中には、翻訳されるアミノ酸の置換を伴う SNP (9 ヶ所) や、115 症例中 1 症例でのみ見いだされているような稀な SNP、あるいはその逆に多型出現頻度の高いものが存在することが明らかとなった(祖父江、池田)。これらの遺伝子配列多型における孤発性 ALS の発症および臨床症候への関与の有無を解析するため、孤発性 ALS 患者と健常者の各遺伝子配列多型頻度をカイ 2 乗検定法により統計解析を行った。その結果、いずれの多型においても 5 パーセント未満の危険度での有意性を認めることができなかった(池田)。したがって、*ALS2* 遺伝子は、少なくとも本研究で解析した孤発性 ALS 患者群における主要な発症修飾・危険因子ではないと推定された。しかしながら、10%未満の危険度レベルでは有意性を示す多型が複数個観察されたことから、さらに解析数を増やすことにより、統計学的有意性を証明できる可能性も残される結果であった。つまり、*ALS2* 遺伝子は、minor ではあるが ALS 発症に関連している可能性は現時点で否定できないと結論できる。

## (2) *ALS2* モデル疾患マウスの作出と解析

*ALS2* モデル疾患マウスの作出について、研究初年度には、*Als2* 遺伝子の第 3 エクソンの一部を欠損させ、代わりにネオマイシン耐性遺伝子を挿入したコンストラクトを構築した(池田)。このコンストラクトを ES 細胞 (E14.1) に導入し、ネオマイシン耐性クローンを 14 クローン選別した。これらのクローン細胞と 8 細胞期胚とを凝集させ子宮に移植することによ

り、4 クローンの ES 細胞に由来するキメラマウス(キメラ率 100%のみ)が合計で 43 匹得られた(岩倉)。研究二年度目には、成功した 6 クローンの ES 細胞に由来するキメラマウスから 2 系統の生殖系列キメラマウスが得られ(岩倉)、そしてこれらのキメラマウスを交配させることにより、最終的に目的とする *Als2* 遺伝子欠損マウス(2 系統; 17C6 および 21B5)の作出に成功するという成果を得ることができた(岩倉、池田)。そして、解析に必要な個体数を確保するため、17C6 系統について計画的交配を行い、総計 240 匹の F2 個体を得た(岩倉、池田)。研究最終年度には、*Als2* 欠損マウス個体における *ALS2* 蛋白質の発現について、ウェスタンブロット法を用いて解析した結果、その発現が完全に消失していることが判明した。したがって、本研究で用いた *Als2* 遺伝子欠損マウスは、*ALS2* 蛋白質を全く発現していない個体であることが再確認された(池田)。その後、当該マウスを 12-21 ヶ月齢まで加齢させて観察を行ったが、*Als2* 遺伝子完全欠損マウスはヒトの運動ニューロン疾患様の病態は未だ示していない。また、*ALS2* 蛋白質の機能との関連が想定される膜移送・細胞骨格動態に関連した一群の蛋白質の *Als2* 欠損マウス脳神経系における発現を解析したが、*Als2* 遺伝子欠損によりその発現が変動するものは見いだされなかった(池田)。一方、免疫組織学的解析を行った結果、24 週齢の *Als2* 欠損マウスの脳・脊髄において、活性グリアおよび星状グリア細胞に局在する蛋白質の染色性が上昇していることが判明した(池田)。このことは、*Als2* 欠損マウスの神経組織において何らかの傷害が進行し、グリア細胞の増加が起こっている可能性を示唆している。しかし、神経細胞数の変動は観察されていないことから、細胞死が進行しているという証拠は得られなかった。現在、72 週齢のマウスについても同様な神経病理学的解析を行っている。以上の解析は、全て 129/01a と C57BL/6J の交雑系を用いたものであり、遺伝的背景の影響を受けている可能性を

否定できない。そのような可能性を排除するため、現在戻し交雑により C57BL/6J および FVB/N 背景を有する *Als2* 欠損系統への純系化を行っている。

### (3) ALS2 蛋白質の分子動態と神経変性機序について

研究初年度には、ALS2 の DH/PH ドメインの神経細胞形態における役割を探るため、これが活性化されると思われる Rho 情報伝達の神経系での役割とこのドメイン自身の触媒活性の検討を行った。前者では、これまで神経突起退縮のみに働くと考えられていた Rho が下流分子の使い分けにより軸索の伸長にも退縮にも働くことを見出した。後者では、DH/PH ドメインを含む幾つかの ALS2 断片を、HeLa、3T3、N1E-115 などの細胞で発現しその表現型から基質 Rho 蛋白質の同定を試みたが、Rac1 との共存が認められたものの、その低分子量 G 蛋白質を活性化しているという証拠は得られなかった (成宮)。ALS2 の VPS9 ドメインに関しては、それが Rab5 低分子量 G 蛋白質を特異的に活性化することを見いだした。さらに、この機能は ALS2 の DH/PH ドメインによって増強されることが判明した (池田)。また、この機能は細胞質内輸送やシグナル伝達に必要なエンドソーム動態の調節に密接に関わっている事が示唆された。研究年度二年目には、ALS2 蛋白質の DH/PH ドメインの神経細胞形態における役割を探るため、これが活性化されると思われる Rho 情報伝達の神経系での役割とこのドメイン自身の触媒活性の検討を昨年度に引き続き行った (成宮)。前者では、Rho が下流分子の使い分けにより軸索の伸長 (mDia) にも退縮 (ROCK; Rho キナーゼ) にも働くことから、さらに各下流分子の分子作用メカニズムについての解析を行った。ROCK の神経系での役割を探るためそのアイソフォームの一つである ROCK-II 遺伝子を欠損したマウスを作製したが、これまでのところ脳脊髄において神経構築の異常は観察されていない (成宮)。また、mDia の分子機

能を、GFP-fusion を用いた speckle 法で解析し、これが真直ぐなアクチン線維の形成に働いていることを *in vivo* で立証した (成宮)。さらに、mDia のアイソフォームの一つ mDia3 が分裂期微小管の染色体キネトコアへの安定的結合に関与していることを示した (成宮)。後者では、DH/PH ドメインに結合する基質 Rho 蛋白質の同定を酵母 two-hybrid 法により試みたが、明確な候補基質は発見されなかった (成宮、池田)。一方、ALS2 蛋白質に結合する因子の探索過程で、ALS2 蛋白質自体がその C 末端領域を介して結合することを見いだした (池田)。そして、ALS2 蛋白質が生体内では多量体形成をしていること、さらに ALS2 蛋白質が有する Rab5 の活性化およびその活性化を介するエンドソーム動態調節においては、ALS2 蛋白質多量体形成が必須であるという知見が得られた (池田)。研究最終年度には、ALS2 の DH/PH ドメインの神経細胞形態における役割をさらに探るため、これが活性化されると思われる Rho 情報伝達の神経系での役割とこのドメイン自身の触媒活性の検討を引き続き行った (成宮)。Rho 経路の神経系での役割を解析する目的で、ROCK-I 遺伝子について targeting を行い、欠損マウスを作製した。当該マウスを解析した結果、ROCK-I が発生期における特定部位での細胞間を結びつけるようなアクトミオシンリングの形成に関与していることが明らかとなったが、脳神経での異常は観察されなかった (成宮)。また、mDia1 を RNAi でノックダウンすることによりその分子機能を解析した結果、mDia1 が細胞の極性の発現に関与し、また、細胞接着斑の回転の調節を行っていることを明らかにした (成宮)。さらに、Rho family GEF である Ect2 の細胞分裂期における役割を、Ect2 の RNAi および dominant negative 体の発現などにより解析した結果、Ect2 は分裂前期から中期にかけては Cdc42 の調節因子として核分裂に、分裂後期から終期にかけては Rho の調節因子として働くことを明らかにした (成宮)。一方、ALS2 蛋白質に結合する因子を同定

するため、ALS2 に特異的なポリクローナル抗体を用いた免疫沈降実験を行った。その結果、マウス脳組織抽出液から ALS2 蛋白質と共沈する複数の蛋白質因子の同定に成功した(池田)。また、ゲノム解析から ALS2 蛋白質の C 末端領域と高い相同性を示す蛋白質をコードする新規 ALS2 相同遺伝子、ALS2 C-terminal like (ALS2CL)、の同定に成功した(池田)。さらに、この ALS2CL 蛋白質は、低分子量 G 蛋白質 Rab5 と結合することにより、ALS2 が関与するエンドゾーム動態調節を修飾する可能性を示した(池田)。

#### D. 考察

ALS2 遺伝子は、2001 年に我々の研究グループにより常染色体劣性遺伝形式を示す若年発症 ALS 2 型および若年発症家族性原発性側索硬化症 (PLSJ) の原因遺伝子として同定されたものである。しかし、その後の海外の研究グループにおける研究により、当該遺伝子がそれらの疾患のみならず、あるタイプの家族性痙性対麻痺 (HSP) の原因遺伝子であることが明らかとなってきた。これまでの ALS2 遺伝子変異に関する研究から、現時点で合計 9 つの家系から 9 種類の遺伝子変異が発見され、いずれの遺伝子変異も正常な ALS2 蛋白質の翻訳を喪失させるものであることが明らかにされている。したがって、患者においては、正常な ALS2 蛋白質の翻訳、ならびに ALS2 蛋白質の本来発揮すべき機能が損なわれ、それにより運動ニューロン機能障害および細胞死が引き起こされていると考えられる。特に、ALS2 遺伝子変異と臨床症状との関連から、ALS2 遺伝子の機能喪失は主に上位運動ニューロンの機能障害および変性に関与しているものと想定される。

近年、Al-Chalabi らはイギリスおよびアメリカの ALS 患者、また Hand らはカナダおよびフランスの ALS 患者における ALS2 遺伝子変異の検索に関しての報告をしているが、いずれの

解析においても ALS2 遺伝子における変異の発見には至っていない。本邦においては、我々の継続的な検索にもかかわらず、現時点では ALS2 遺伝子変異を持つ患者は見いだされていない。従って、ALS2 遺伝子変異は、ある種の家族性 ALS のみならず、その関連運動ニューロン疾患の原因となっている反面、ALS 症例の大多数を占める孤発性 ALS の直接的原因ではない可能性が高いと考えられた。また、本研究による孤発性 ALS 患者における ALS2 遺伝子配列多型の解析により、ALS2 遺伝子の多型配列と孤発性 ALS 発症との間には明確な関連が証明されなかったことから、ALS2 遺伝子は孤発性 ALS の主要な修飾因子・危険因子ではないことが明らかとなった。近年、同様な研究結果が北米の ALS 患者においても報告されている。しかしながら、本研究の結果は、統計的には有意とは言えないが、有意性が存在する可能性が残される結果であった。実際、今回の結果に関して特定の遺伝子配列多型の頻度の違いが、もし 10 倍の人数の患者ならびに健常者を解析した際にも観察されれば、明らかに有意な差として証明することができると推定される。したがって、今回の解析レベルでの結果に基づいた場合には、遺伝子型と疾患発症との間に関連があるとは言えないが、その関連性が全く無いと断言できるデータではないと考えられる。事実最近、Kanekura らは、SOD1 遺伝子変異により引き起こされる家族性 ALS 1 型のモデル細胞において、ALS2 蛋白質が変異した SOD1 蛋白質と結合することにより変異 SOD1 の毒性を減弱させ、それにより細胞死を抑制することを示している。このことは、ALS2 遺伝子産物が、ALS2 遺伝子変異を原因としない運動ニューロン疾患の発症過程における調節因子である可能性を示唆するものである。よって、今後も例数を増やして解析を継続することにより、ALS2 遺伝子が孤発性 ALS の病態発現に関わる可能性についてさらに詳細に検証してゆく必要があるものと思われる。

一方、ALS2 モデルマウスとしての *Als2* 遺伝

子欠損マウスに関しては、当初生後1年以内には発症することを予想していたが、生後1年9ヶ月を経過した現時点においても当該マウスは疾患発症には至っていない。遅発性の症状を呈する可能性なども考慮し、今後も継続的に観察および解析をする必要があると考えられる。現時点でマウスが発症していないため、当該マウスの神経変性モデル動物としての妥当性を疑われる可能性も否定できない。近年、我々のグループ以外にもカナダおよびアメリカの研究グループが類似の方法により *Als2* ノックアウトマウスを作出したことを学会発表している。そして、両グループとも同様に該当マウスは運動ニューロン疾患様の症状を呈さないとしている (personal communications)。したがって、マウスにおいては *Als2* 遺伝子の存在自体は必須でないとも考えられる。しかしながら、我々のグループを含めたいずれの解析においても、遺伝学的背景が一定でない F2 マウスを用いて観察・解析しているなどの問題もあるため、戻し交配による純系化、およびその他の遺伝子改変マウスとの交配などの検討が必要であると考えられる。さらに、たとえ症状が顕在化しない場合においても、詳細な神経病理学的・生理学的解析を進めることにより、神経細胞における ALS2 蛋白質喪失の影響が解明され、それにより疾患の分子病態解析が飛躍的に進行する可能性もある。事実、神経病理学的な予備的解析結果から、24 週齢の *Als2* 遺伝子欠損マウス (F2) において活性グリアおよび星状グリア細胞の増加が観察されており、同様の解析を純系化した個体を用いて今後の詳細な解析をすることが重要と考えられる。

ALS2 蛋白質およびその機能ドメインの分子的作用に関し、これまで我々は、C 末端の MORN-VPS9 領域を介した ALS2 蛋白質の Rab5 低分子量 G 蛋白質特異的 GEF 活性の同定、さらに ALS2 蛋白質のエンドソーム動態への調節機能の同定などの成果を挙げてきた。また、分子生物学的ならびに生化学的解析により、ALS2 蛋白質自体が多量体形成をすること、多量体形成

が ALS2 蛋白質のエンドソーム動態調節においても必須であることを明らかにした。これらの結果に基づき、ALS2 蛋白質はその特異的低分子量 G 蛋白質活性化を介して様々な細胞内物質輸送やシグナル伝達に関与している分子であると推定される。さらに研究最終年度には、免疫沈降法を用いた解析により、マウスの脳内において ALS2 蛋白質と結合して存在する複数の蛋白質因子の同定に成功した。近年、多くの神経変性疾患発症の分子機構として細胞内物質輸送系あるいはシグナル伝達系の異常が想定されていることから、今後のこれら結合因子のより詳細な研究により、ALS2 蛋白質の細胞内分子機能およびそのシグナル伝達系の実体が明らかにされる可能性が高いと考えられる。本研究では、ALS2 が有する DH/PH ドメイン機能の解析を試みたが、同ドメインに直接結合する因子の同定には至らなかった。しかし、細胞生物学的解析により同 DH/PH ドメインが ALS2 蛋白質の C 末端 Rab5GEF 活性によるエンドソーム肥大化作用を顕著に促進すること、また ALS2 蛋白質の N 末端に存在する RLD ドメインが DH/PH と MORN-VPS9 ドメインのエンドソームに対する分子作用を抑制的に制御していることを明らかにした。したがって、細胞内において ALS2 蛋白質は、その各ドメインのユニークな分子作用により協調的にエンドソーム動態調節に寄与していると推定された。近年、Toppらおよび Kanekura らは、生化学的実験により同ドメインが Rac1 と結合するという結果を報告していることから、これらのエンドソーム動態調節に Rac1 が関与している可能性が示唆される。一方、Rho ファミリー低分子量 GTP 結合蛋白質の活性化モチーフとして知られる DH/PH ドメインの機能とこの欠損が筋萎縮性索硬化症の症状発現に果たす役割を検討するため、これが活性化されるとされる Rho 情報伝達の神経系での役割の検討を行った。その結果、Rho が下流分子の使い分けにより軸索の退縮にも伸長にも働くこと、mDia が真直ぐなアクチン線維の形成に働いていること、また、分裂

期、間期を問わず微小管の安定化に働くことなどの Rho 蛋白による細胞機能制御について新しい知見を得ることができた。これは、神経細胞形態や機能の制御に通じるものであるが、今後これらの作用と ALS2 蛋白質の機能発現の間を詰めていくことが必要である。今後、以上のような解析を継続することにより、ALS2 蛋白質の神経細胞での役割が解明され、その喪失により発症する運動ニューロン疾患の発症機序が分子レベルで解明されることが期待される。

## E. 結論

本研究により、ALS2 遺伝子の配列多型と孤発性 ALS 発症との間には明確な関連は存在しないことが明らかとなった。しかしながら、統計的には有意とは言えないが、有意性が存在する可能性が残される結果であった。よって、今後も例数を増やして解析を継続することにより、ALS2 遺伝子が孤発性 ALS の病態発現に関わる可能性について明らかにされる可能性があるものと思われる。また、ALS2 モデルマウスとしての *Als2* 遺伝子欠損マウスに関しては、当初生後 1 年以内には発症することを予想していたが、生後 1 年 9 ヶ月を経過した現時点においても当該マウスは疾患発症には至っていない。遅発性の症状を呈する可能性なども考慮し、今後も継続的に観察および解析をする必要があると考えられる。さらに、たとえ症状が顕在化しない場合においても、詳細な神経病理学的・生理学的解析を進めることにより、神経細胞における ALS2 蛋白質喪失の影響が解明され、それにより疾患の分子病態解析が飛躍的に進行する可能性もある。一方、ALS2 蛋白質およびその機能ドメインの分子的作用に関して、これまでに DH/PH ドメインの Rho 情報伝達の神経系での新たな分子機能の同定、ALS2 蛋白質の Rab5 低分子量 G 蛋白質特異的 GEF 活性の同定、ALS2 蛋白質のエンドソーム動態への調節機能の同定、脳内において ALS2 蛋白質と結合して

存在する複数の蛋白質因子の同定などの成果が得られた。

近年、多くの神経変性疾患発症の分子機構として細胞内物質輸送系あるいはシグナル伝達系の異常が想定されている。従って、ALS2 遺伝子変異による運動ニューロン機能障害・細胞死も類似の分子メカニズムにより引き起こされている可能性が高い。現在、我々は発症分子メカニズムの全容解明に向けて、生化学的・細胞生物学的手法による ALS2 蛋白質の分子機能解析、および作出された *Als2* 遺伝子欠損マウスの行動学的・組織病理学的解析を継続して行っている。今後、このような実験を通して ALS2 蛋白質の細胞内分子機能およびそのシグナル伝達系の実体および ALS2 蛋白質の個体レベルでの機能が明らかにされることが期待される。それにより、ALS およびその関連運動ニューロン疾患患者における ALS2 遺伝子配列の変異・多型の生物学的な意義も解明され、その臨床症候の分子的理解、分子診断法、治療法・治療薬開発への道が開かれるものと考えている。

## F. 健康危険情報

特記すべきことなし

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

1) Wang F, Corbett D, Osuga H, Osuga S, Ikeda JE, Slack RS, Hogan MJ, Hakim M, and Park DS : Inhibition of cyclin-dependent kinase improves CA1 neuronal survival and behavioral performance after global ischemia in the rat. *J Cereb Blood Flow Metab* 22: 171-182, 2002.

2) Xu M, Okada T, Sakai H, Miyamoto N, Yanagisawa Y, MacKenzie AE, Hadano S, and

- Ikeda JE : Functional human NAIP promoter and transcriptional elements of the human *NAIP* and *ΨNAIP* genes. *Biochim Biophys Acta* 1574 (1): 35-50, 2002.
- 3) Okada T, Gondo Y, Goto J, Kanazawa I, Hadano S, and Ikeda JE : Unstable transmission of the RS447 human megasatellite tandem repetitive sequence that contains the *USP17* gene encoding a functional deubiquitinating enzyme. *Hum Genet* 110 (4): 302-313, 2002.
- 4) Singaraja RR, Hadano S, Metzler M, Givan S, Wellington CL, Warby S, Yanai A, Gutekunst CA, Leavitt BR, Yi H, Fichter K, Gan L, McCutcheon K, Chopra V, Michel J, Hersch SM, Ikeda JE, and Hayden MR : *HIP14*, a novel ankyrin domain-containing protein, links huntingtin to intracellular trafficking and endocytosis. *Hum Mol Genet* 11 (23): 2815-2828, 2002.
- 5) Kunita R, Otomo A, and Ikeda JE : Identification and characterization of novel members of the CREG family, putative secreted glycoproteins expressed specifically in brain. *Genomics* 80(5): 456-460, 2002.
- 6) Otomo A, Hadano S, Okada T, Mizumura H, Kunita R, Nishijima H, Showguchi-Miyata J, Yanagisawa Y, Kohiki E, Suga E, Yasuda M, Osuga H, Nishimoto T, Naurumiya S, and Ikeda JE: *ALS2*, a novel guanine nucleotide exchange factor for the small GTPase *Rab5*, is implicated in endosomal dynamics. *Hum Mol Genet* 12 (14): 1671-1687, 2003.
- 7) Nagano I, Murakami T, Shiote M, Manabe Y, Hadano S, Yanagisawa Y, Ikeda JE, and Abe K : Single-nucleotide polymorphisms in uncoding regions of *ALS2* gene of Japanese patients with autosomal-recessive amyotrophic lateral sclerosis. *Neurol Res* 25 (5): 505-509, 2003.
- 8) Storbeck CJ, Drmanic S, Daniel K, Waring JD, Jirik FR, Parry DJ, Ahmed N, Sabourin LA, Ikeda JE, and Korneluk RG : Inhibition of myogenesis in transgenic mice expressing the human *DMPK* 3' -UTR. *Hum Mol Genet* 13(6): 589-600, 2004.
- 9) Tanaka K, Showguchi-Miyata J, Miyamoto N, and Ikeda JE : Novel nuclear shuttle proteins, *HDBP1* and *HDBP2*, bind to neuronal cell-specific cis-regulatory element in the promoter for the human Huntington's disease gene. *J Biol Chem* 279(8): 7275-7286, 2004.
- 10) Kunita R, Otomo A, Mizumura H, Suzuki K, Showguchi-Miyata J, Yanagisawa Y, Hadano S, and Ikeda JE : Homo-oligomerization of *ALS2* through its unique carboxy-terminal region is essential for the *ALS2*-associated *Rab5* guanine nucleotide exchange activity and its regulatory function on endosome trafficking. *J Biol Chem* 279(37): 38626-38635, 2004.
- 11) Hadano S, Otomo A, Suzuki-Utsunomiya K, Kunita R, Yanagisawa Y, Showguchi-Miyata J, Mizumura H, and Ikeda JE : *ALS2CL*, the novel protein highly homologous to the carboxy-terminal half of *ALS2*, binds to *Rab5* and modulates endosome dynamics. *FEBS Lett* 575(1-3): 64-70, 2004.
- 12) Okada Y, Sakai H, Kohiki E, Suga E, Yanagisawa Y, Tanaka K, Hadano S, Osuga H, and Ikeda JE : A Dopamine D4 receptor

antagonist attenuates ischemia-induced neuronal cell damage via upregulation of neuronal apoptosis inhibitory protein. *J Cereb Blood Flow Metab*, 2005 (in press).

## 2. 学会発表

- 1) Tanaka K, Shouguchi-Miyata J, Miyamoto N, and Ikeda JE : Functional analysis of the putative transcription factors for the human Huntington' s disease gene. *Human Genome Meeting 2002, Programme and Abstract book*, p115 (poster no:148), Shanghai, China, April 14-17, 2002.
- 2) Hadano S, Hand CK, Osuga H, Yanagisawa Y, Otomo A, Devon RS, Miyamoto N, Shouguchi-Miyata J, Okada Y, Singaraja R, Figlewicz DA, Kwiatkowski T, Hosler BA, Sagie T, Skaug J, Nasir J, Brown RH Jr, Scherer SW, Rouleau GA, Hayden MR, and Ikeda JE : Identification and characterization of the ALS2 causative gene that encodes a protein containing multiple GEF domains. *Human Genome Meeting 2002, Programme and Abstract book*, p191 (poster no:420), Shanghai, China, April 14-17, 2002.
- 3) Hadano S : A causative gene underlying familial amyotrophic lateral sclerosis 2 (ALS2). *The Third International Symposium on the Study of Brain Function. Program*, P112 (019-1), Fukuoka, Japan, May 9-10, 2002.
- 4) Ikeda JE, Otomo A, Kunita R, Yoshida E, Hadano S, and Osuga H : ALS2 gene accounting for amyotrophic lateral sclerosis 2 encodes multi guanine exchange factor (GEF) domains acting for small GTPases. *神経化学 41 (3)*, 第 45 回日本神経化学会大会抄録号、p354 (P01-F-18/MS4-6)、札幌、July 17-19, 2002.
- 5) 田中一則、将口 (宮田) 淳子、池田穰衛 : Functional analysis of the putative transcription factors for human Huntington' s disease gene. *神経化学 41 (3)*, 第 45 回日本神経化学会 (札幌) 大会抄録集号 41(3)、p355(P01-F-19)、札幌、July 17-19, 2002.
- 6) Tanaka K, Shouguchi-Miyata J, Miyamoto N, and Ikeda JE : Molecular behavior of the putative transcriptional factors for the human Huntington' s disease. *THE 15TH NAITO CONFERENCE ON MOLECULAR BIOLOGICAL APPROACHES FOR INTRACTABLE DISEASE [III]. PROGRAM, ABSTRACTS, LIST OF PARTICIPANTS*, p82(PS[II]-27)、葉山(湘南国際村センター、神奈川)、October 2-5, 2002.
- 7) 池田穰衛 : NAIP の抗アポトーシス機序と神経変性防御薬の開発. *生化学 74 (8)*、第 75 回日本生化学会大会発表抄録集、p645 (2S28-6)、京都、October 14-17, 2002.
- 8) 田中一則、宮本なつき、将口 (宮田) 淳子、池田穰衛 : ハンチントン病遺伝子転写調節候補因子の細胞内分子動態、第 25 回日本分子生物学会年会プログラム・講演要旨集、P766 (2P-0406)、横浜、December 11-14, 2002.
- 9) 國田竜太、大友麻子、池田穰衛 : 脳特異的に発現する新規推定分泌糖タンパク質、ヒト CREG2 並びにマウス Creg2 の cDNA 単離と発現解析. 第 25 回日本分子生物学会年会プログラム・講演要旨集、p583 (1P-0962)、横浜、December 11-14, 2002.
- 10) 田中一則、宮本なつき、将口 (宮田) 淳子、池田穰衛 : Nuclear Shuttle 活性を有する転写調節因子の解析:ハンチントン病遺伝子転写の分子機序、第 20 回染色体ワークショップ、p31 (38)、京都、January 30-February 1, 2003.

- 11) Hadano S, Yanagisawa Y, Showguchi-Miyata J, Otomo A, Kunita R, Mizumura H, and Ikeda JE : Identification and characterization of a novel gene ALS2 C-terminal like (ALS2CL) which encodes a protein highly homologous to the carboxy-terminal half of the ALS2 protein. XIX International Congress of Genetics, Abstracts & Posters, p70 (3.A.0286), Melbourne, Australia, July 6-11, 2003.
- 12) Kunita R, Otomo A, and Ikeda JE : Identification and characterization of novel members of the CREG family putative secreted glycoproteins expressed specifically in brain. XIX International Congress of Genetics, Abstracts & Posters, p120 (1.C.0060), Melbourne, Australia, July 6-11, 2003.
- 13) Tanaka K, Miyamoto N, Shouguchi-Miyata J, and Ikeda JE : Molecular behavior of novel nuclear shuttle proteins, HDBP1 and HDBP2, which are candidate transcriptional regulators for the human Huntington's disease gene. XIX International Congress of Genetics, Abstracts & Posters, p184 (3.E.0362), Melbourne, Australia, July 6-11, 2003.
- 14) Otomo A, Hadano S, Okada T, Mizumura H, Kunita R, Nishijima H, Showguchi-Miyata J, Yanagisawa Y, Kohiki E, Suga E, Yasuda M, Osuga H, Nishimoto T, Naurumiya S, and Ikeda JE : ALS2, a novel guanine nucleotide exchange factor for the small GTPase Rab5, is implicated in endosomal dynamics. 神経化学 42 (2-3)、264 (N057/MS1-4)、第 46 回日本神経化学会大会抄録号、新潟、September 24-26, 2003.
- 15) Hadano S, Otomo A, Yanagisawa Y, Showguchi-Miyata J, Suzuki K, Kunita R, Mizumura H, and Ikeda JE : ALS2 C-terminal like (ALS2CL): identification and characterization of the novel conserved gene that encodes a protein highly homologous to the carboxy-terminal half of the ALS2 protein. 神経化学 42 (2-3)、265 (N059)、第 46 回日本神経化学会大会抄録号、新潟、September 24-26, 2003.
- 16) 岡田義則、酒井治美、古曳英理、須賀恵津子、大須賀等、池田穰衛 : NAIP 発現誘導化合物の in vitro および in vivo における抗アポトーシス効果. 第 26 回日本分子生物学会年会プログラム・講演要旨集、p441 (01L-5)、神戸、December 10-13, 2003.
- 17) 田中一則、宮本なつき、池田穰衛 : 酸化ストレス応答による HD 遺伝子転写調節領域結合因子の細胞内局在変化. 第 26 回日本分子生物学会年会プログラム・講演要旨集、p595 (1PA-337)、神戸、December 10-13, 2003.
- 18) 大友麻子、秦野伸二、岡田武也、水村光、國田竜太、西嶋仁、将口(宮田)淳子、柳澤佳子、古曳英理、須賀恵津子、安田政実、大須賀等、西本毅治、成宮周、池田穰衛 : 筋萎縮性側索硬化症 2 型遺伝子産物 ALS2 の Rab5GEF 活性とエンドソーム動態調節機能. 第 26 回日本分子生物学会年会プログラム・講演要旨集、p1030 (4PC-086)、神戸、December 10-13, 2003.
- 19) 國田竜太、秦野伸二、大友麻子、水村光、鈴木恭子、成宮周、池田穰衛 : ヒト ALS2 タンパク質の初期エンドソーム融合は ALS2\_DH/PH ドメインによって特異的に増強される. 第 26 回日本分子生物学会年会プログラム・講演要旨集、p1030 (4PC-087)、神戸、December 10-13, 2003.
- 20) 秦野伸二、大友麻子、柳沢佳子、将口(宮



田) 淳子、鈴木恭子、國田竜太、水村光、池田穰衛：ALS2CL：新規 ALS2 相同遺伝子の同定とその構造解析。第 26 回日本分子生物学会年会プログラム・講演要旨集、p1031 (4PC-088)、神戸、December 10-13、2003.

21) Kunita R, Hadano S, Otomo A, Mizumura H, Okada T, Suzuki K, Narumiya S, and Ikeda JE : The DH/PH domain of ALS2 strongly enhances the C-terminal MORN/VPS9 domain-mediated endosome fusions. Keystone Symposia, Traffic control: Rab GTPases in Vesicular Transport (J3), Abstract p55(207), Breckenridge/Colorado, U. S. A., January 20-25, 2004.

22) Otomo A, Hadano S, Okada T, Mizumura H, Kunita R, Nishijima H, Showguchi-Miyata J, Yanagisawa Y, Kohiki E, Suga E, Yasuda M, Osuga H, Nishimoto T, Narumiya S, and Ikeda JE : Amyotrophic lateral sclerosis type 2 gene encodes protein, ALS2, is a novel guanine nucleotide exchange factor for Rab5 and implicates in endosomal dynamics. Keystone Symposia, Traffic control: Rab GTPases in Vesicular Transport (J3), Abstract p57(215), Breckenridge/Colorado, U. S. A., January 20-25, 2004.

23) Tanaka K, Shouguchi-Miyata J, Miyamoto N, and Ikeda JE : The analysis of molecular function of nuclear-cytoplasm shuttling proteins, SLC2A4 and ZNF395, which bind to the novel cis-regulatory element in the human HD gene promoter. Human Genome Meeting 2004, Programe and Abstract book, p31 (workshop abstract no: 65)/ p114 (poster no: 269), Berlin, Germany, 2004.

24) Hadano S, Kakuta S, Sudo K, Otomo A, Kunita R, Mizumura H, Suzuki K, Iwakura Y,

and Ikeda JE : Towards delineation of the pathogenesis for juvenile recessive motor neuron diseases: Generation and characterization of the Als2 knockout mice. Human Genome Meeting 2004, Programe and Abstract book, p30-31 (workshop abstract no: 64)/ p112 (poster no: 262), Berlin, Germany, 2004.

25) Hadano S, Shiina T, Showguchi-Miyata J, Hashimoto N, Aoki M, Inoko H, Sobue G, and Ikeda JE : Single nucleotide polymorphism analysis of the ALS2 gene and its regulatory region in Japanese patients with sporadic amyotrophic lateral sclerosis. Amyotroph. Lateral Scler. Other Motor Neuron Disord. 5 (suppl. 2), 73-74 (P22) (15th International Symposium on ALS/MND, Philadelphia, USA, 2004.

26) 池田穰衛：劣性遺伝の運動ニューロン疾患：ALS2 遺伝子変異と神経細胞死の機序。第 45 回日本神経学会総会、シンポジウム 3-4 脊髄小脳変性症と運動ニューロン疾患、東京、2004.

27) 秦野伸二：神経疾患の Mechanism-based Remedy. 東海大学総合医学研究所第 7 回公開研究報告会、プログラム・要旨パンフレット、東京、2004.

28) 秦野伸二：ALS2 の分子病態解析-ALS2 タンパク質の分子機能およびモデルマウス作製の試み-。第 8 回新潟神経内科シンポジウム「ALS の病態と治療」、新潟、2004.

29) Hadano S, Kakuta S, Sudo K, Otomo A, Kunita R, Mizumura H, Suzuki K, Iwakura Y, and Ikeda JE : Generation and characterization of the Als2 knockout mice. 神経化学 43 (2-3)、490 (P2-187)、第 47 回日

本神経化学会(大阪)大会抄録号(Neuro2004)、大阪、2004.

30) Okada Y, Sakai H, Kohiki E, Suga E, Tanaka K, Hadano S, Osuga H, and Ikeda JE : Antiapoptotic effect of the NAIP up-regulating dopamine receptor ligands. 神経化学 43 (2-3)、361 (OB2-07)、第 47 回日本神経化学会(大阪)大会抄録号(Neuro2004)、大阪、2004.

31) 池田穰衛：神経変性の mechanism-based 治療技術の開発：筋萎縮性側索硬化症. 神経化学 43 (2-3)、114、第 47 回日本神経化学会(大阪)大会抄録号(Neuro2004)、大阪、2004

32) 岡田義則、酒井治美、古曳英理、須賀恵津子、田中一則、秦野伸二、池田穰衛：NAIP 発現誘導 Dopamine D4 antagonist の抗アポトーシス効果. 戦略的創造科学研究推進事業(CREST・SORST) JOINT SYMPOSIUM”脳神経科学の最先端 2004”、プログラム講演要旨集 p20 (P24)、東京、2004.

33) 大友麻子、秦野伸二、岡田武也、水村光、國田竜太、西嶋仁、将口(宮田)淳子、柳澤佳子、古曳英理、須賀恵津子、安田政実、大須賀等、西本毅治、成宮周、池田穰衛：筋萎縮性側索硬化症 2 型遺伝子産物 ALS2 の Rab5GEF 活性とエンドゾーム動態調節機能. 戦略的創造科学研究推進事業(CREST・SORST) JOINT SYMPOSIUM”脳神経科学の最先端 2004”、プログラム講演要旨集 p21 (P25)、東京、2004.

34) 國田竜太、大友麻子、水村光、鈴木(宇都宮)恭子、将口(宮田)淳子、柳澤佳子、秦野伸二、池田穰衛：ALS2 タンパク質多量体形成の生理的意義. 戦略的創造科学研究推進事業(CREST・SORST) JOINT SYMPOSIUM”脳神経科学の最先端 2004”、プログラム講演要旨集 p21 (P26)、東京、2004.

35) 秦野伸二、角田茂、須藤カツ子、大友麻子、國田竜太、水村光、鈴木(宇都宮)恭子、将口(宮田)淳子、柳澤佳子、古曳英理、須賀恵津子、宮本なつき、岩倉洋一郎、池田穰衛：Als2 ノックアウトマウスの作出と解析. 戦略的創造科学研究推進事業(CREST・SORST) JOINT SYMPOSIUM”脳神経科学の最先端 2004”、プログラム講演要旨集 p22 (P27)、東京、2004.

36) 國田竜太、大友麻子、水村光、鈴木(宇都宮)恭子、将口(宮田)淳子、柳澤佳子、秦野伸二、池田穰衛：ALS2 タンパク質の多量体形成は、ALS2 による低分子量 G タンパク質 Rab5 活性化および細胞内でのエンドゾーム融合活性に必須である. 第 27 回日本分子生物学会年会プログラム・講演要旨集、p998 (3PB-422)、神戸、2004.

37) 鈴木恭子、秦野伸二、大友麻子、國田竜太、水村光、将口(宮田)淳子、柳澤佳子、須賀恵津子、池田穰衛：ALS2 相同遺伝子産物 ALS2CL は新規 ALS2 結合タンパク質である. 第 27 回日本分子生物学会年会プログラム・講演要旨集、p998 (3PB-423)、神戸、2004.

38) 秦野伸二、角田茂、須藤カツ子、大友麻子、國田竜太、鈴木(宇都宮)恭子、水村光、将口(宮田)淳子、柳澤佳子、宮本なつき、古曳英理、須賀恵津子、岩倉洋一郎、池田穰衛：若年発症型劣性家族性 ALS 疾患モデル Als2 遺伝子欠損マウスの作出と解析. 第 27 回日本分子生物学会年会プログラム・講演要旨集、p998 (3PB-424)、神戸、2004.

## 2. 総説・著書

1) 田中一則、池田穰衛：Huntington 病の分子病態と神経細胞死の分子機構. 最新医学 57 (7)、52-57、2002.

2) 秦野伸二：家族性 ALS の新たな遺伝子. BRAIN MEDICAL 14 (1)、47-54、2002.

3) 秦野伸二：ALS の原因遺伝子. 生化学 74 (6)、483-489、2002.

4) 秦野伸二：筋萎縮性側索硬化症原因遺伝子の同定とゲノム研究. ゲノム医学 2 (3)、231-240、2002.

5) 大須賀等、大友麻子、秦野伸二、池田穰衛：ALS2 とその原因遺伝子. 最新医学 57 (9) (増刊号：臨床遺伝子学 2002)、2237-2249、2002.

6) 秦野伸二、池田穰衛：家族性筋萎縮性側索硬化症 2 型 (ALS2) の原因遺伝子. 脳機能の解明-生命科学の主潮流-、第 8 章神経変性疾患の遺伝子異常と病態解明、赤池紀扶、東英穂、阿部康二、久保千春編、ガイア出版会、福岡、p299-305、2002.

7) 秦野伸二：新しい家族性筋萎縮性側索硬化症遺伝子：ALS2-運動ニューロン疾患における分子接点. 医学のあゆみ 205 (2)、119-123、2003.

8) 池田穰衛：劣性遺伝の運動ニューロン疾患：ALS2 遺伝子変異と神経細胞死の機序. 臨床神経学 44 (11)、792-794、2004.

9) 秦野伸二：116. 筋萎縮性側索硬化症原因遺伝子. 予防医学事典、松島綱治、酒井敏行、石川昌、稲寺秀邦 編、朝倉書店、東京、2005 (印刷中)

#### H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得 なし
2. 実用新案登録 なし
3. その他 なし

## II. 研究成果の刊行に関する一覧表