

厚生労働科学研究費補助金

こころの健康科学研究事業

ハンチントン病の根本的治療の実現をめざした最新 RNAi  
誘導技術を基盤とする先端的治療法の開発と確立  
(H18-こころ-一般-021)

平成20年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 北條 浩彦

平成21(2009)年 3月

厚生労働科学研究費補助金

こころの健康科学研究事業

ハンチントン病の根本的治療の実現をめざした最新 RNAi  
誘導技術を基盤とする先端的治療法の開発と確立  
(H18-こころ-一般-021)

平成20年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 北條 浩彦

平成21(2009)年 3月

## 目 次

I. 総括研究報告	-----	1
ハンチントン病の根本的治療の 実現をめざした最新 RNAi 誘導 技術を基盤とする先端的治療法 の開発と確立に関する研究 北條 浩彦		
II. 分担研究報告	-----	9
ハンチントン病の治療を目的と する異常伸長ポリグルタミンを 含む huntingtin とオートファ ジー関連因子との相互作用解析 和田 圭司		
III. 研究成果の刊行に関する一覧表	-----	13
IV. 研究成果の刊行物・別刷	-----	15

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 括 研 究 報 告 書

ハンチントン病の根本的治療の実現をめざした最新 RNAi 誘導技術を基盤とする  
先端的治疗法の開発と確立（H18-こころ一般-021）

研究者代表者 北條 浩彦 国立精神・神経センター神経研究所 室長

本研究は、難治性の神経変性疾患であるハンチントン病の根本的治療を目指し、RNA interference (RNAi)法を用いた新しい治療法の開発そしてその実現をめざした研究開発を行なう。H18~H19 年度の研究成果から、治療戦略としての RNAi の有効性が強く示唆された。しかしながら、その有効な技術を実際の治療に応用するためにはまだ多くの課題を解決しなければならない。特に正常型ハンチンチン遺伝子を抑制しないで変異型ハンチンチン遺伝子だけを特異的に抑制する新しい RNAi 誘導技術の確立、そしてヒトに近いモデル動物を用いた治療効果の検討が必要であると考えられる。そこで本年度は、変異型ハンチンチン遺伝子を特異的にノックダウンする対立遺伝子特異的 RNAi 誘導法の確立と霊長類実験動物であるコモンマーモセットを用いたモデル動物作出にむけた基礎的研究に取り組んだ。対立遺伝子特異的 RNAi の評価システム（特許出願中）を用いた解析から、ハンチンチン対立遺伝子を識別する siRNA (RNAi を誘導する小さな RNA 二量体)を選定し、さらにその siRNA を用いた RNAi 治療の可能な患者さまがいることも確認した。コモンマーモセットを用いた解析からは、コモンマーモセット・ハンチンチン遺伝子のタンパク質コード領域のクローニングに成功し、その全塩基配列を決定した。そしてその結果に基づき、コモンマーモセット・ハンチンチン遺伝子産物を検出できるツールの選定を行なった。これらの成果は、コモンマーモセット疾患モデル作出において有用なツールになると考えられる。

また、伸長したポリグルタミン鎖を持つ異常型ハンチンチンタンパク質と結合するタンパク質を解析し、オートファジー関連因子の一つである LC3-I との結合を見出した。

研究分担者 和田 圭司  
国立精神・神経センター  
神経研究所  
疾病研究第4部 部長

A. 研究の目的

本研究は、いままで有効な治療法がなかった難治性の神経変性疾患、ハンチントン病に対して、次世代の先端医療技術として注目されている RNA interference (RNAi)法を用いた根本的治療法の開発を目指している。ハンチントン病は、病因タンパク質である異常型ハンチン

チンタンパク質の不溶化・凝集が神経変性の原因であると考えられている。したがって、治療戦略的には、病因タンパク質の除去または特異的な遺伝子発現抑制などが根本的治療の道を開くと考えられる。ハンチントン病はすでに原因遺伝子であるハンチンチン遺伝子とその病変異が明らかにされている。したがって、変異型ハンチンチン遺伝子を特異的に発現抑制することが、ハンチントン病の根本的治療に直結すると考えられる。我々はこれに基づき、次世代の先端医療技術として注目されている RNAi 法を利用し、病因ハンチンチン遺伝子をターゲットとする small interfering RNA (siRNA: RNAi を誘導する小さな二本鎖 RNA) を設計し、その効果を検討してきた。その結果、治療戦略として RNAi の有用性が強く示唆された。しかし、それと同時に実際の治療に向けた今後の課題も示された。それらは、1) 変異型ハンチンチン遺伝子特異的な RNAi 誘導の必要性と、2) ヒトに近いモデル動物を使った治療法の検討の必要性である。これらは、安全な RNAi 治療の実現にかかわる重要な課題である。そこで本年度は、対立遺伝子特異的 RNAi 誘導の評価システムを用いてハンチンチン対立遺伝子を特異的に識別する siRNA の設計と評価を行なった。さらに、そのターゲット部位をヘテロでもつ患者さまがいることも確認した。コモンマーモセットを用いた解析については、コモンマーモセット・ハンチンチン遺伝子のクローニングに成功し、その塩基配列を明らかにした。また、異常型ハンチンチンタンパク質と結合するタンパク質のスクリーニングも行なった。

## B. 研究方法

### 1) 対立遺伝子特異的 RNAi 誘導のためのター

ゲット候補となるハンチンチン遺伝子コーディング領域内の一塩基多型 (SNP) を選択し、その SNP 部位を含む配列をオリゴ DNA 合成した (それぞれの対立遺伝子 (アリル) について合成した)。合成オリゴ DNA は、レポーター遺伝子であるホタル・ルシフェラーゼ遺伝子とウミシイタケ・ルシフェラーゼ遺伝子の 3'非翻訳領域 (3'UTR) に挿入し、レポーター対立遺伝子を構築した。

- 2) SNP 部位を含む領域の配列を基に、SNP 部位を含む複数の siRNA 二量体を設計し、化学合成した。
- 3) 上記 1) と 2) で構築した発現プラスミドと siRNA 二量体、そしてコントロールの  $\beta$ -ガラクトシダーゼ遺伝子を含む発現ベクターをヒト 293 細胞に共トランスフェクションした。
- 4) 24 時間後、細胞抽出液を調整し、発現したホタルそしてウミシイタケ・ルシフェラーゼと  $\beta$  ガラクトシダーゼの活性を測定した。その結果を基に、テストした siRNA 二量体のターゲット対立遺伝子配列に対する抑制効果と、もう片方の対立遺伝子配列に対する影響を解析した。設計した全ての siRNA 二量体について同様の解析を行い、対立遺伝子間で最も大きな差を示す siRNA 二量体を決定した。
- 5) さらに、siRNA に塩基置換を導入し、対立遺伝子の識別が増強するか否かを同様の評価システムを用いて評価した。
- 6) 被験者ゲノム DNA を用いて、ターゲット候補部位の SNP について、TaqMan プローブを用いたアリルタイピングを行なった。
- 7) コモンマーモセットのハンチンチン遺伝子転写産物をクローニングするために、ヒトとマウスのハンチンチン遺伝子を比較して、その中で比較的よく保存された領域を絞り込

み PCR 用のオリゴ DNA プライマーを設計した。

- 8) コモンマーモセットの脳組織又は不死化したリンパ球から全 RNA を抽出し、オリゴ (dT) プライマーと逆転写酵素を用いて cDNA を合成した。次に cDNA を鋳型に、上記 7) で設計した PCR プライマーを用いて PCR 反応を行い、得られた PCR 産物をプラスミドにクローニングした。クローン化された PCR 産物は塩基配列決定を行ない、ハンチンチン遺伝子由来であることを確認した。
- 9) 上記 7)、8) によって、コモンマーモセット・ハンチンチン遺伝子のタンパク質コード領域を含むクローニングを行なった。
- 10) 上記 9) の解析から単離されたクローンの塩基配列決定を行なった。
- 11) 上記 10) で用いたハンチンチン遺伝子配列を基に siRNA 二量体を設計し、化学合成した。
- 12) 不死化したコモンマーモセットリンパ球細胞を用いて、上記 11) で設計した siRNA による内在性ハンチンチン遺伝子のノックダウンを誘導し、その評価を RTリアルタイム PCR 法とウェスタンブロット法を用いて評価した。
- 13) 培養細胞 (Cos 7 細胞) に伸長したポリグルタミンを含むハンチンチンタンパク質を一過性に発現させ、免疫沈降を行った。その後、オートファジーに関連するタンパク質に対する様々な抗体を用いたウェスタンブロット解析によりハンチンチンタンパク質に結合するタンパク質の同定を行った。

### C. 研究結果

- 1) 対立遺伝子特異的 RNAi 誘導を実現するためにハンチンチン遺伝子転写産物内の 3 箇

所の一塩基多型 (SNP) 部位を選び、それぞれの SNP 部位を構成する対立遺伝子をターゲットとする siRNA を設計し、その効果を我々が確立したアッセイ系 (特許出願中) を用いて評価した。選んだ SNP 部位は、データベースから比較的ヘテロ接合体頻度の高いものを選んだ。レポーター対立遺伝子を用いた評価の結果、一つの SNP 部位の対立遺伝子に対して、それらを識別し、それぞれの対立遺伝子をノックダウンさせることができる siRNA を選定することができた。

- 2) 対立遺伝子の識別とノックダウン効果をさらに強めるために、siRNA に一塩基置換を導入し、その効果を検討した。その結果、siRNA のシード部位に塩基置換を導入すると効果が高まることが確認された。
- 3) その他の SNP 部位については、ターゲット対立遺伝子と非ターゲット対立遺伝子との間で識別が弱く、顕著な対立遺伝子特異的 RNAi を誘導させることができなかった。
- 4) 患者さまのゲノム DNA を用いた SNP タイピング解析から、上記で選定した対立遺伝子を識別する siRNA を用いた RNAi 治療の可能な患者さまが実際に存在することが確認された。
- 5) コモンマーモセット・ハンチンチン遺伝子を単離するために、コモンマーモセット脳組織または不死化したリンパ球細胞から全 RNA を抽出し、オリゴ (dT) プライマーを用いて cDNA を合成した。そして、ヒトとマウスハンチンチン遺伝子の保存された配列を基に PCR プライマーを設計し、PCR 法によってハンチンチンタンパク質をコードする全領域のクローニングを行なった。その結果、約 10 kb にもおよぶ PCR 増幅産物が得られ、プラスミドベクターにクロ

ーニング後、その全塩基配列決定を行なった。

- 6) 上記 5) の塩基配列決定から、コモンマーモセットとヒト・ハンチンチン遺伝子が高い相同性を持つことが示唆された。その結果に基づき、現在市販されているヒト・ハンチンチンタンパク質に対する抗体（3種類の抗体）とのクロス反応テストを行なった。その結果、テストした全ての抗体がコモンマーモセット・ハンチンチンタンパク質とクロス反応することが観察された。
- 7) 上記 8) と関連して、市販のヒト・ハンチンチン遺伝子に対する TaqMan プローブの応用の可能性についても検討した。その結果、コモンマーモセットのハンチンチン遺伝子転写産物についても検出可能であることが確認された。
- 8) 上記 6-7) の結果から、コモンマーモセット不死化リンパ球細胞内で発現する内在性ハンチンチン遺伝子を RNAi でノックダウンし、その抑制効果を mRNA レベルそしてタンパク質レベルで検出することができた。
- 9) 伸長したポリグルタミン鎖を含むハンチンチンタンパク質に結合するタンパク質について、オートファジー関連因子を中心にスクリーニングを行なった。その結果、microtubule associated protein 1A light chain3/LC3-I が結合することが明らかになった。この結合は通常のポリグルタミン鎖 (Q22) を含むハンチンチンタンパク質では認められなかった。

#### (倫理面への配慮)

本年度は、患者ゲノム DNA を用いたハンチンチン遺伝子内の SNP タイピングを実施し

た。実施に先立ち、被験者サンプルの使用について国立精神・神経センター倫理審査委員会で審査され、その承認を得てから解析を実施した。なお、解析した被験者サンプルは、既に単離され暗号化された被験者ゲノム DNA だけであり、新たに被験者からのサンプル調整は行なわなかった。

被験者に対する人権擁護に関しては、文部科学省、厚生労働省、経済産業省による「ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針」(平成13年3月29日)に則って、本研究に参加していただく被験者(被験者サンプルも含めて)全ての人権擁護に最大限配慮した。

動物を使用する研究計画は、すべて、国立精神・神経センター神経研究所動物実験倫理問題検討委員会で審議され承認を受けた。実際の動物使用に当たっては国の法律・指針ならびに米国立衛生研究所(NIH)の基準を守り、動物が受ける苦痛を最小限にとどめた。

#### D. 考察

安全な RNAi 治療法を実現するためには、従来のような正常型、変異型(異常型)両方をターゲットにする RNAi 誘導ではなく、異常型遺伝子だけを特異的にノックダウンする新しい RNAi 誘導法の確立が必要である。

変異型ハンチンチン遺伝子の病因となる変異はエキソン1内にコードされた長い CAG リピートであり、その部分を RNAi のターゲット部位にすると短い CAG リピートを持った正常型遺伝子までもターゲットになってしまう。そこで我々は、新しい識別部位として一塩基多型(SNP)部位に着目し、SNP 部位を構成する二つの対立遺伝子に対してそれぞれを特異的にノックダウンする siRNA の設計を試みた。

我々が確立した簡便な対立遺伝子特異的 RNAi 評価方法を使って設計した siRNA をスクリーニングし、対立遺伝子を識別して特異的な発現抑制を誘導する siRNA を選定することができた。これによって、ハンチンチン遺伝子のターゲット SNP 部位を調べることで、正常型ハンチンチン遺伝子を抑制しないで異常型ハンチンチン遺伝子だけを特異的に抑制する新しい RNAi 治療の可能性が開かれた。実際の患者群においてもこの治療法を受けることができるターゲット SNP 部位がヘテロの患者さまがいることも確認できた。しかしながら、ターゲット SNP 部位がホモであった場合、この治療法が使えないという弱点もあり、それを補うためにもハンチンチン遺伝子内の別の SNP 部位に対して同様の siRNA スクリーニングが必要であると考えられる。

RNAi 治療の実現に向けて、安全面に関するもう一つの課題は、ヒトに近い実験動物を用いた研究開発の必要性である。本研究では、霊長類実験動物であるコモンマーモセットを用いた研究を本格的にスタートさせ、まず、対象遺伝子であるハンチンチン遺伝子の単離・同定を行なった。ゲノム情報がほとんど分かっていないコモンマーモセットから目的の遺伝子をクローニングするために、ヒトとマウスのハンチンチン遺伝子間で進化的に保存された配列を基に PCR プライマーを設計し、それらを用いた RT-PCR 法によってコモンマーモセット・ハンチンチン cDNA のクローニングを行なった。このクローニング戦略によって、ハンチンチン遺伝子の Open reading frame (ORF) 全体をカバーするクローンの単離に成功した。そしてその塩基配列決定から、ヒト・ハンチンチン遺伝子配列と高い相同性を持つことが明らかになった。この結果を基に既存(市販)のヒト・ハンチンチン遺伝子産物を検出する抗体や TaqMan

プローブの応用の可能性を検討した結果、それらを応用できることが実証された。これによって、コモンマーモセットを使った今後の研究開発に不可欠なツールを得ることができた。

ハンチンチンタンパク質と結合するタンパク質のスクリーニングの結果、microtubule associated protein 1A light chain3/LC3-I が同定された。LC3-I は通常細胞質に存在するタンパク質で、オートファゴソーム膜に結合した後、リン脂質による修飾を受け LC3-II となってオートファゴソーム膜形成に関わる。面白いことに伸長したポリグルタミン鎖を含むハンチンチンタンパク質は非修飾型の LC3-I と結合し、リン脂質修飾型の LC3-II との結合は認められなかった。今回の結果は伸長したポリグルタミン鎖を含むハンチンチンタンパク質が LC3-I のオートファゴソーム膜結合を阻害し、マクロオートファジーの機能抑制をひきおこしている可能性を示唆する

## E. 結論

1) ハンチンチン遺伝子内の SNP 部位をターゲットとする新しい対立遺伝子特異的 RNAi 誘導の可能性を検討し、それぞれの対立遺伝子に対して特異的な RNAi ノックダウンを誘導する siRNA 二量体を選定した。この対立遺伝子特異的 RNAi 誘導法を応用することによって、正常型ハンチンチン遺伝子の発現はそのまま(影響しない)、異常型ハンチンチン遺伝子だけを特異的に発現抑制させる新しい RNAi 治療の可能性が開かれた。

2) 霊長類モデル動物作出のための基礎データとして、コモンマーモセット・ハンチンチン遺伝子の単離と同定を行い、完全な ORF をコードする約 10 kb の cDNA クローンの単離に成功した。そして、クローンの全塩基配列決定を行ない、ヒト・ハンチンチン遺伝子と高い相同



性を持つことを明らかにした。

3) コモンマーモセット・ハンチンチン遺伝子の塩基配列情報そしてコモンマーモセットの組織サンプルを用いて、コモンマーモセット・ハンチンチン遺伝子そして遺伝子産物を検出する TaqMan プローブ、PCR プライマーそして抗体を特定した。

4) 伸長したポリグルタミン鎖を含むハンチンチンタンパク質に結合するタンパク質のスクリーニングの結果、マクロオートファジー関連因子である LC3-I が同定された。

#### F. 健康危険情報 特になし。

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

Hohjoh H., Akari H., Fujiwara Y., Tamura Y., Hirai H., and Wada K. Molecular cloning and characterization of the common marmoset huntingtin gene. *Gene*, **432**: 60-66, 2009.

Tamura Y., Yoshida M., Ohnishi Y., and Hohjoh H. Variation of gene silencing involving endogenous microRNA in mammalian cells. *Mol Biol Rep*, 2008 Aug 12. [Epub ahead of print]

Doi Y., Oki S., Ozawa T., Hohjoh H., Miyake S., and Yamamura T. Orphan nuclear receptor NR4A2 expressed in T cells from multiple sclerosis mediates production of inflammatory cytokines. *Proc Natl Acad Sci USA*, **105**: 8381-8386, 2008.

Ohnishi Y., Tamura Y., Yoshida M., Tokunaga K., and Hohjoh H. Enhancement of allele discrimination by

introduction of nucleotide mismatches into siRNA in allele-specific gene silencing by RNAi. *PLoS ONE* **3**(5): e2248., 2008.

Kabuta, T., Furuta, A., Aoki, S., Furuta, K., Wada, K. Aberrant interaction between Parkinson's disease-associated mutant UCH-L1 and the lysosomal receptor for chaperone-mediated autophagy. *J. Biol. Chem.*, **283**: 23731-23738, 2008.

Kabuta, T., Wada, K.: Insights into links between familial and sporadic Parkinson's disease: Physical relationship between UCH-L1 variants and chaperone-mediated autophagy. *Autophagy*, **4**:827-9, 2008.

##### 2. 著書

佐々木裕之&北條浩彦、「機能性小分子 RNA の大規模シークエンス」 *実験医学*, **27**: 14-19., 2009.

##### 3. 学会発表

(特別講演・シンポジウム)

節家理恵子、古田晶子、和田圭司; ユビキチン C 末端加水分解酵素の機能. 神経組織の成長・再生・移植研究会第 23 学術集会. 千葉. 5. 17, 2008.

(国際発表)

Hohjoh H., and Tamura Y. "Variation of gene silencing contributes in a variety of gene expression in mammalian cells" 58<sup>th</sup> Annual Meeting of the American Society of Human Genetics, Philadelphia, Pennsylvania, USA., November 12, 2008.

Ohnishi Y., Toyoda A., Totoki Y., Watanabe T., Sasaki H., Tokunaga K., Sakaki Y., and Hohjoh H. "Sequence analysis of small RNAs present in preimplantation mouse embryos" 58<sup>th</sup> Annual Meeting of the American Society of Human Genetics, Philadelphia, Pennsylvania, USA., November 12, 2008.

Tamura Y., Yoshida M., Ohnishi Y., and Hohjoh H. "Gene silencing involving endogenous miRNAs contributes in a variety of mammalian cells' gene expression" 13<sup>th</sup> Annual Meeting of the RNA Society, Berlin, Germany, August 1, 2008.

(国内発表)

大西悠亮、十時泰、豊田敦、渡部聡朗、佐々木裕之、徳永勝士、榊佳之、北條浩彦、「マウス初期胚に存在する機能性 small RNA の解析」第 31 回日本分子生物学会年会、神戸、12. 9., 2008.

田村美子、北條浩彦、「マイクロ RNA とターゲット遺伝子に関わる遺伝子発現の多様化」第 31 回日本分子生物学会年会、神戸、12. 10., 2008.

北條浩彦、田村美子、「マイクロ RNA とターゲット遺伝子に関わる遺伝子発現の多様化」第 53 回日本人類遺伝学会、横浜、9.28., 2008.

北條浩彦、藤原優子、明里宏文、田村美子、和田圭司、「コモン・マーマーセットハンチンチン遺伝子のクローニングと解析」第 31 回日本神経科学大会、東京、7.10., 2008.

株田智弘、節家理恵子、三井丈史、衣川亜衣子、櫻井省花子、青木俊介、内田健康、和田圭司:カルボニル化 UCH-L1 とパーキンソ

ン病関連変異型 193M UCH-L1 に共通した異常な分子的性質. 第 31 回日本神経科学大会、東京、7. 9. 2008.

藤本陽平、古田晶子、松本隆、和田圭司:神経疾患における LAMP-2 サブタイプ特異的な発現調節機構. 第 31 回日本神経科学大会、東京、7. 11. 2008.

Kabuta, T., Furuta, A., Aoki, S., Furuta, K., Wada, K: Aberrant interaction between familial Parkinson's disease-associated mutant UCH-L1 and the lysosomal receptor for chaperone-mediated autophagy. 第 51 回日本神経化学学会大会、富山、9. 11. 2008.

Konya, C., Kabuta, T., Kinugawa, A., Wada, K: Decreased secretion of UCH-L1 and SOD1 by the mutations associated with neurodegenerative diseases. 第 51 回日本神経化学学会大会、富山、9. 11. 2008.

Nagamine, S., Kabuta, T., Yamamoto, K., Takahashi, A., Wada, K: The de-ubiquitinating enzyme, UCH-L1, and lipid peroxidation. 第 51 回日本神経化学学会大会、富山、9. 11. 2008.

Nagamine, S., Kabuta, T., Yamamoto, K., Takahashi, A., Wada, K: The de-ubiquitinating enzyme, UCH-L1, and lipid peroxidation. 第 51 回日本神経化学学会大会、富山、9. 11. 2008.

Suzuki, M., Setsuie, R., Wada, K: Regulation of energy homeostasis by UCH-L1 and UCH-L3. 第 51 回日本神経化学学会大会、富山、9. 11. 2008.

Nagamine, S., Kabuta, T., Yamamoto, K., Takahashi, A., Wada, K: The de-ubiquitinating enzyme, UCH-L1, and lipid peroxidation. BMB2008, 兵庫、

12. 10, 2008.

三井丈史、株田智弘、株田千華、内田健康、和田圭司：UCH-L1 による細胞増殖促進。  
BMB2008, 兵庫, 12. 11, 2008.

H. 知的所有権の出願・登録状況（予定を含む）  
特になし。

ハンチントン病の治療を目的とする異常伸長ポリグルタミンを含む huntingtin と  
オートファジー関連因子との相互作用解析

研究分担者 和田 圭司 国立精神・神経センター神経研究所疾病研究第四部 部長  
研究協力者 紺谷 千穂 国立精神・神経センター神経研究所疾病研究第四部

本研究は有効な治療法の乏しい難治性神経変性疾患に対してその発症機序の解明と臨床応用が十分可能な治療法の開発を目標とする。その達成にむけてハンチントン病に焦点を当て、異常型 huntingtin タンパク質の凝集体形成や細胞死の分子機序の解明、モデル動物を用いた原因遺伝子産物の除去による異常タンパク質の凝集・不溶化防止とタンパク質分解系の適正な活性化を通じた神経機能不全の補正を目指す。今年度はハンチントン病の原因タンパク質である、伸長したポリグルタミン鎖を持つ異常型 huntingtin タンパク質と相互作用するタンパク質を調査し、オートファジー関連因子との結合を見出した。

A. 研究目的

本研究は、これまで難治性とされている神経変性疾患の発症メカニズムの解明とその根本的治療法を開発すること目標とする。現在知られている神経変性疾患の病態形成には、神経細胞死が大きく関与しているが、最近、神経細胞死だけではなく神経細胞機能不全という状態が発症を大きく左右している事もわかってきた。神経細胞機能不全は可逆的な状態にあると考えられており、その原因として病因タンパク質の不溶化・凝集が想定されている。したがって、神経変性疾患の治療には、神経細胞死に対する再生医療に加え、原因遺伝子産物の除去、特異的発現抑制による神経機能不全の修復がその根本的治療の道を開くと考えられる。

神経変性疾患の一つであるハンチントン病は、huntingtin 遺伝子のエクソン1でCAG

反復が異常伸長する。その結果、遺伝子産物である huntingtin タンパク質は、異常に長いグルタミントラックを含み選択的に大脳基底核の線条体ニューロンの細胞死を誘導する。ハンチントン病はこれまで、その細胞死の機序と有効な治療方法が見つかっていない。我々はこれまで、脱ユビキチン化酵素 UCH-L1 の研究を行ってきたが、近年、若年発症のハンチントン病患者においてその UCH-L1 の S18Y 多型とハンチントン病発症との関連が報告された。神経細胞の変性防止についても、siRNA を用いた変異遺伝子の発現抑制を細胞レベルやハンチントン病モデルマウスを用いて検討し、shRNA 発現ベクターの有効性も示してきた。本研究ではこれらの成果をもとに、神経細胞の変性防止にかかわるタンパク質を捉えることを試みた。具体的には、ハンチントン病におけ

る神経細胞死のメカニズムの解明と共に、神経細胞の変性防止についてハンチントン病の原因タンパク質(異常型ハンチンチンタンパク質)と相互作用するタンパク質の同定を試みた。

## B. 研究方法

(1)ハンチントン病原因タンパク質と相互作用するタンパク質の同定

培養細胞(Cos 7細胞)に伸長したポリグルタミンを含む huntingtin タンパク質を transient に発現させ、免疫沈降を行った。その後、オートファジーに関連するタンパク質に対する様々な抗体を用いた Western blot 解析により huntingtin タンパク質に結合するタンパク質の同定を行った。

## C. 研究結果

(1)ハンチントン病における細胞死のメカニズム解明

オートファジーは細胞内の浄化メカニズムとしてユビキチン-プロテアソーム分解と並んで重要である。オートファジーはハンチントン病を始めとする神経変性疾患等の原因異常タンパク質の蓄積を低下させ、これらの発症に対して抑制的に働くことが知られている。そこで伸長したポリグルタミンを含む Huntingtin タンパク質に相互作用するタンパク質について、オートファジー関連因子を中心にスクリーニングを行なった。その結果、microtubule associated protein 1A light chain3/LC3-I が同定された。この結合は通常のポリグルタミン(Q22)を含む Huntingtin タンパク質では確認されなかった。

## D. 考察

パーキンソン病、ハンチントン病など神経変性疾患については近年の分子遺伝学的解析か

ら家族性疾患を中心にいくつもの病因遺伝子が同定された。数多くの孤発性については病因の特定はいまだなされていないが家族性の成果を進展させることで、対症療法の高度化だけでなく根本的治療法開発も展望できるとの期待が高まっている。成因に関しては国内外における研究から、蛋白質の構造変化、凝集、蓄積と神経細胞死・神経変性との関連が示されており conformation 病の概念確立とともに、アポトーシスに加えて神経細胞機能不全も神経変性の主因として位置づけられるようになってきている。このような潮流の中で、神経変性疾患の分子機序を明らかにし、よりヒトに近いモデル動物を使い、先端的かつ臨床応用可能な治療法を開発することが重要であると考えられる。

ハンチントン病を含む多くの神経変性疾患で観察される異常タンパク質の蓄積は、細胞内タンパク質管理機構の破綻によるものと考えられている。UCH-L1 は脱ユビキチン化酵素、ユビキチンリガーゼ、ユビキチンキャリアタンパク質としての機能を所有し、その多機能性が神経発生、アポトーシス、神経伝達などの制御に密接に関与することが明らかとなっている。また神経変性疾患に認められる種々のユビキチン陽性封入体に UCH-L1 が存在することから、UCH-L1 は様々な神経変性疾患との関連性が示唆されている。前年度の研究から UCH-L1 が huntingtin タンパク質レベルを減少させる可能性が示唆された。UCH-L1 が発現した細胞ではユビキチン-プロテアソーム系のタンパク質分解が亢進し、細胞内の不要なタンパク質である huntingtin タンパク質を分解した、あるいは転写・翻訳レベルでの huntingtin タンパク質合成抑制が働いたのではないかと予想された。

今年度は視野を拡大し、前述のユビキチン-プロテアソーム系と並んでタンパク質管理機構に重要とされるオートファジーについて、

huntingtinタンパク質との関連性を調査した。

オートファジーはマクロオートファジー、ミクロオートファジー、シャペロン介在性オートファジー (CMA) に分類できる。通常オートファジーと呼ばれるパルクなタンパク質分解システムはマクロオートファジーのことを指す。神経細胞でのマクロオートファジーの欠損は異常タンパク質の蓄積と神経脱落を引き起こすことや、マクロオートファジーにより神経変性疾患の原因となる異常タンパク質の蓄積を低下させて発症に対して抑制的に働くことが明らかとなっている。

Huntingtinタンパク質と相互作用するタンパク質のスクリーニングの結果、microtubule associated protein 1A light chain3/LC3-I が同定された。LC3-Iは通常細胞質に存在するタンパク質で、オートファゴソーム膜に結合した後、リン脂質による修飾を受けLC3-IIとなってオートファゴソーム膜形成に関わる。おもしろいことに伸長したポリグルタミンを含むhuntingtinタンパク質は非修飾型のLC3-Iとのみ結合し、リン脂質修飾型のLC3-IIとの結合は認められなかった。今回の結果は伸長したポリグルタミンを含むhuntingtinがLC3-Iのオートファゴソーム膜結合を阻害し、マクロオートファジーの機能抑制をひき起こしたという可能性を示唆する。今後は伸長したポリグルタミンを含むhuntingtinによるマクロオートファジーの機能変化を調査し、それが治療ターゲットとして適格となるか検討する予定である。

また、最近の報告でマクロオートファジーとCMAが相互に補填し合うことが示された。さらに以前我々はUCH-L1がCMAによって分解されることを示した。以上のことより、我々はハンチントン病におけるhuntingtin、UCH-L1、マクロオートファジー、CMAとの間には相関性があるのではないかと推測しており、その解

明を今後の課題としている。

さらに今後、ヒト病態に近い臨床像を呈することが予想されるモデルとして中型動物や小型霊長類で将来モデルを作製する基盤を築き、先端的治療法開発に向けて応用することをめざしていく。これらの研究はハンチントン病の根本的治療法開発をめざす上で必須のものであり、その研究計画の達成は他の神経変性疾患にも応用可能な治療技術を提供し、広く神経難病の克服に貢献すると考える。

#### E. 結論

伸長したポリグルタミンを含む huntingtin タンパク質に結合するタンパク質のスクリーニングの結果、マクロオートファジー関連因子である LC3-I が同定された。

#### F. 健康危険情報

特になし

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

Kabuta, T., Furuta, A., Aoki, S., Furuta, K., Wada, K. Aberrant interaction between Parkinson's disease-associated mutant UCH-L1 and the lysosomal receptor for chaperone-mediated autophagy. *J. Biol. Chem.*, **283**: 23731-23738, 2008.

Kabuta, T., Wada, K.: Insights into links between familial and sporadic Parkinson's disease: Physical relationship between UCH-L1 variants and chaperone-mediated autophagy. *Autophagy*, **4**:827-829, 2008.

##### 2. 学会発表

(特別講演・シンポジウム)

節家理恵子、古田晶子、和田圭司:ユビキチン

C末端加水分解酵素の機能. 神経組織の成長・再生・移植研究会第23学術集会, 千葉, 5.17, 2008.

(国内学会)

株田智弘, 節家理恵子, 三井丈史, 衣川亜衣子, 櫻井省花子, 青木俊介, 内田健康, 和田圭司: カルボニル化 UCH-L1 とパーキンソン病関連変異型 I93M UCH-L1 に共通した異常な分子の性質. 第31回日本神経科学大会, 東京, 7.9, 2008.

藤本陽平, 古田晶子, 松本隆, 和田圭司: 神経疾患における LAMP-2 サブタイプ特異的な発現調節機構. 第31回日本神経科学大会, 東京, 7.11, 2008.

Kabuta, T., Furuta, A., Aoki, S., Furuta, K., Wada, K: Aberrant interaction between familial Parkinson's disease-associated mutant UCH-L1 and the lysosomal receptor for chaperone-mediated autophagy. 第51回日本神経化学学会大会, 富山, 9.11, 2008.

Konya, C., Kabuta, T., Kinugawa, A., Wada, K: Decreased secretion of UCH-L1 and SOD1 by the mutations associated with neurodegenerative diseases. 第51回日本神経化学学会大会, 富山, 9.11, 2008.

Nagamine, S., Kabuta, T., Yamamoto, K., Takahashi, A., Wada, K: The de-ubiquitinating enzyme, UCH-L1, and lipid poroxidation. 第51回日本神経化学学会大会, 富山, 9.11, 2008.

Nagamine, S., Kabuta, T., Yamamoto, K., Takahashi, A., Wada, K: The de-ubiquitinating enzyme, UCH-L1, and lipid poroxidation. 第51回日本神経化学学会大会, 富山, 9.11, 2008.

Suzuki, M., Setsuie, R., Wada, K: Regulation

of energy homeostasis by UCH-L1 and UCH-L3. 第51回日本神経化学学会大会, 富山, 9.11, 2008.

Nagamine, S., Kabuta, T., Yamamoto, K., Takahashi, A., Wada, K: The de-ubiquitinating enzyme, UCH-L1, and lipid peroxidation. BMB2008, 兵庫, 12.10, 2008.

三井丈史, 株田智弘, 株田千華, 内田健康, 和田圭司: UCH-L1 による細胞増殖促進. BMB2008, 兵庫, 12.11, 2008.

H. 知的所有権の出願・登録状況(予定を含む)

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

## 研究成果の刊行に関する一覧表

## 書籍

著者氏名	論文タイトル名	書籍全体の編集者名	書籍名	出版社名	出版地	出版年	ページ
佐々木裕之 & 北條浩彦	機能性小分子RNA の大規模シーク エンス	服部正平 (企画)	実験医学	羊土社	東京	2009	14-19

## 雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Ohnishi Y., Tamura Y., Yoshida M., Tokunaga K., and Hohjoh H	Enhancement of allele discrimination by introduction of nucleotide mismatches into siRNA in allele-specific gene silencing by RNAi.	<i>PLoS ONE</i>	3(5)	e2248	2008
Doi Y., Oki S., Ozawa T., Hohjoh H., Miyake S., and Yamamura T.	Orphan nuclear receptor NR4A2 expressed in T cells from multiple sclerosis mediates production of inflammatory cytokines.	<i>Proc Natl Acad Sci USA.</i>	105	8381-8386	2008
Hohjoh H., Akari H., Fujiwara Y., Tamura Y., Hirai H., and Wada K.	Molecular cloning and characterization of the common marmoset huntingtin gene. <i>Gene</i>	<i>Gene</i>	432	60-66	2009
Tamura Y., Yoshida M., Ohnishi Y., and Hohjoh H.	Variation of gene silencing involving endogenous microRNA in mammalian cells.	<i>Mol Biol Rep</i>		Epub ahead of print	2008
Kabuta, T., Furuta, A., Aoki, S., Furuta, K. and Wada, K.	Aberrant interaction between Parkinson's disease-associated mutant UCH-L1 and the lysosomal receptor for chaperone-mediated autophagy.	<i>J. Biol. Chem.</i>	283	23731-23738	2008
Kabuta, T. and Wada, K.	Insights into links between familial and sporadic Parkinson's disease: Physical relationship between UCH-L1 variants and chaperone-mediated autophagy.	<i>Autophagy</i>	4	827-829	2008



研究成果の刊行物・別刷



## Molecular cloning and characterization of the common marmoset huntingtin gene

Hirohiko Hohjoh<sup>a,\*</sup>, Hirofumi Akari<sup>b</sup>, Yuko Fujiwara<sup>a,c</sup>, Yoshiko Tamura<sup>a</sup>, Hirohisa Hirai<sup>d</sup>, Keiji Wada<sup>c</sup>

<sup>a</sup> Department of Molecular Genetics, National Institute of Neuroscience, NCNP, 4-1-1 Ogawahigashi, Kodaira, Tokyo 187-8502, Japan

<sup>b</sup> Laboratory of Disease Control, Tsukuba Primate Research Center, National Institute of Biomedical Innovation, Tsukuba, Ibaraki, Japan

<sup>c</sup> Department of Degenerative Neurological Diseases, National Institute of Neuroscience, NCNP, Kodaira, Tokyo, Japan

<sup>d</sup> Primate Research Institute, Kyoto University, Inuyama, Aichi, Japan

### ARTICLE INFO

#### Article history:

Received 24 July 2008

Received in revised form 4 November 2008

Accepted 5 November 2008

Available online 24 November 2008

Received by M. Di Giulio

#### Keywords:

Common marmoset

Huntingtin

Gene silencing

Immortalized cell line

### ABSTRACT

We report here for the first time the isolation and identification of the common marmoset (*Callithrix jacchus*) huntingtin (*Htt*) gene, whose ortholog in humans is known to be related to Huntington's disease (HD). A 9396 nucleotide complementary DNA (cDNA) carrying the putative full-length open reading frame of the marmoset *Htt* gene was identified, and highly conserved nucleotide and amino acid sequences among primates were observed. Based on this data and using tools evaluated for the detection of the marmoset *Htt* gene, we have demonstrated gene silencing against the expression of endogenous *Htt* gene in immortalized common marmoset mononuclear cells by means of RNA interference (RNAi). Taken together, the data presented here may assist us in realizing a non-human primate HD model with the common marmoset.

© 2008 Elsevier B.V. All rights reserved.

### 1. Introduction

Huntington's disease (HD) is an autosomal dominant neurodegenerative disease characterized by progressive and selective neural cell death associated with choreic movement and dementia (Walker, 2007). The responsible gene for HD, the huntingtin (*Htt*) gene, has been identified on chromosome 4q16.3 (Gusella et al., 1983; Gilliam et al., 1987), and an aberrant length of a CAG triplet repeat in exon 1, followed by expanded tracts of polyglutamine in the *Htt* polypeptide, is greatly involved in the onset of HD (Huntington's-Disease, 1993). Although the molecular mechanisms of either normal or aberrant *Htt* protein are still poorly understood, HD model animals (Mangiarini et al., 1996; Kazemi-Esfarjani and Benzer, 2000; von Horsten et al., 2003) and cells (Lunkes and Mandel, 1998) for understanding the pathogenesis of HD and developing therapies have been established by means of genetic engineering based on the genetic information of *Htt*. The use of an animal model that is closely related to humans may be particularly promising.

The common marmoset (*Callithrix jacchus*) is classified into the Callitrichidae family of Platyrrhini (New World monkeys) and has been

used as a non-human primate experimental animal in various research fields including gene therapy, autoimmune disease, organ transplantation, and pharmacology (Kendall et al., 1998; Doods et al., 2000; Deisboeck et al., 2003; t'Hart et al., 2003). Accordingly, it is worth promoting studies with the common marmoset aimed at overcoming neurodegenerative diseases such as HD, as the animal's close relationship to humans makes it well suited to this kind of study. Indeed, a recent study has generated a non-human primate HD model with the rhesus monkey (*Macaca mulatta*) (Palfi et al., 2007; Yang et al., 2008).

In this report, we describe for the first time the isolation and characterization of a cDNA encoding the putative full-length open reading frame of the common marmoset *Htt* gene, and present experimental data based on the isolated cDNA. The data presented here may provide us with useful information for establishing non-human primate HD models with the common marmoset.

### 2. Materials and methods

#### 2.1. Preparation of total RNA

Common marmoset total RNA was isolated from the brain tissue of a stillborn marmoset fetus and immortalized monocytes (described below) using Trizol (Invitrogen). The experiments with the common marmoset complied with protocols approved by the ethical committee for primate research of the National Center of Neurology and Psychiatry and adhered to the legal requirements of Japan.

Abbreviations: HD, Huntington's disease; *Htt*, huntingtin; RNAi, RNA interference; cDNA, complementary DNA; PBMC, peripheral blood mononuclear cell; RT, reverse transcription; PCR, polymerase chain reaction; ORF, open reading frame; APP, amyloid precursor protein; GAPDH, glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase; GFP, green fluorescence protein; CMV, Cytomegalovirus.

\* Corresponding author.

E-mail address: [hohjoh@ncnp.go.jp](mailto:hohjoh@ncnp.go.jp) (H. Hohjoh).

## 2.2. Established common marmoset cell lines

Adult common marmosets being reared at the Primate Research Institute of Kyoto University or Tsukuba Primate Research Center were anesthetized by ketamine, which was approved by the Animal Welfare and Animal Care Committees of both institutes, and peripheral blood was collected. From the collected blood samples, peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) were purified and immortalized by infection of a 488-77 strain of *Herpesvirus saimiri* (kindly provided by Dr. R. C. Desrosiers) as previously described (Akari et al., 1996). The established marmoset cell lines, designated HSCJ-110, HSCJ-009, and HSCJ-002, were phenotypically activated CD3+T lymphocytic cells and grown in RPMI-1640 medium (Sigma) supplemented with 10% FCS, 50 mM 2-mercaptoethanol, and antibiotics.

## 2.3. Reverse transcription – (real time) polymerase chain reaction [RT-(real time) PCR]

The common marmoset total RNAs were subjected to complementary DNA (cDNA) synthesis using oligo(dT) primers and a Superscript III reverse transcriptase (Invitrogen), according to the manufacturer's instructions, and polymerase chain reaction (PCR) using the cDNAs as templates was carried out by means of the ABI GeneAmp PCR system 9700 (Applied Biosystems). In the case of real time PCR, the cDNAs were examined by the AB 7300 Real Time PCR System (Applied Biosystems) with a TaqMan Universal PCR Master Mix together with Assays-on-Demand Gene Expression products (Applied Biosystems) or a SYBR Green PCR Master Mix together with Perfect Real Time Primers (Takara Bio) or designed PCR primers, according to the manufacturers' instructions. Synthesized oligonucleotide primers and purchased primer and probe were as follows:

Synthesized oligonucleotide primers:

HD1-F: 5'-TATAGAATTCGGGAGACCCGATGGCGAC-3'  
 HD1-ORF-R: 5'-TCAAGCGCCGCTCAGCAGGTGGTACCTTG-3'  
 HD1-1900R2: 5'-TAAAGGATCCCCGTCTAACACAAITTCAG-3'  
 cjHtt(1139)-F: 5'-TTATAGCTGGAGGGCGTTC-3'  
 cjHtt(1254)-R: 5'-GACGTCCGACCTCGATTAG-3'

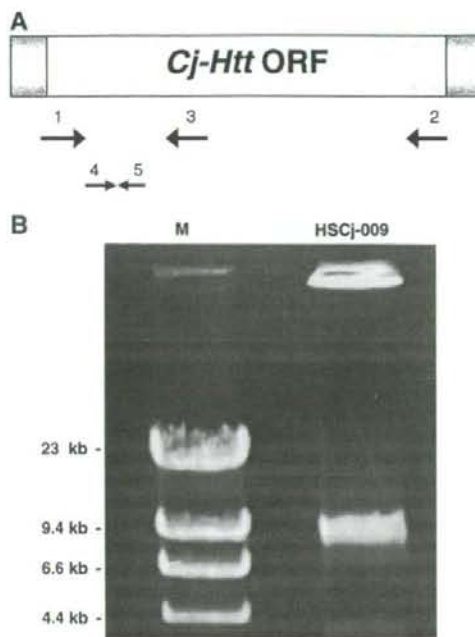
Purchased primer and probe:

Assays-on-Demand Gene Expression product for the human *Htt* gene (Assay ID: Hs00169273\_m1) (Applied Biosystems).

Perfect Real Time Primers for the human *GAPDH* gene (Primer-Set ID: HA067812) (Takara Bio).

## 2.4. Cloning and sequence analysis of the full-length ORF of the marmoset *Htt* gene

Complementary DNA derived from the common marmoset total RNA was subjected to PCR amplification using *TaKaRa LA Taq* polymerase (TAKARA BIO) with the HD1-F and HD1-ORF-R primers under the following thermal cycling conditions: heat denaturation at 94 °C for 1 min, 30 cycles of amplification including denaturation at 94 °C for 20 s and extension at 68 °C for 12 min, and a final extension at 72 °C for 10 min. The PCR product was examined by agarose gel electrophoresis followed by ethidium bromide staining, and an approximately 9.4 kb PCR band (Fig. 1) was purified from the gels using a TOPO XL gel purification kit (Invitrogen). The resultant PCR product was inserted into the pCR-XL-TOPO plasmid with a TOPO XL PCR cloning kit (Invitrogen) and then sequence determination of the insert was carried out. To clarify uncertain nucleotide sequences, additional RT-PCR targeting of uncertain regions followed by sequence determination was performed and the precise nucleotide sequence was confirmed. The determined nucleotide sequence encoding a putative full-length ORF of the common marmoset *Htt* gene has been registered in the GenBank database: accession number, AB443866.



**Fig. 1.** RT-PCR amplification. (A) Schematic drawing of putative *Htt* cDNA. Open reading frame (ORF) is indicated by a yellow box. Arrows indicate synthesized PCR primers, which are designed in possibly conserved nucleotide sequences: 1, HD1-F; 2, HD1-ORF-R; 3, HD1-1900R2; 4, cjHtt(1139)-F; 5, cjHtt(1254)-R (detailed in Materials and methods). (B) RT-PCR. The first strand cDNA was synthesized by RT using RNA isolated from immortalized common marmoset mononuclear cells (HSCJ-009) as a template and oligo(dT) as a primer. The following PCR was carried out using HD1-F and HD1-ORF-R primers. The resultant PCR products were analyzed by gel electrophoresis with 0.6% agarose gel followed by ethidium bromide staining. Hind III-digested  $\lambda$ DNA was used as a DNA size marker (M). (For interpretation of the references to colour in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

## 2.5. Western blotting

Equal amounts (~35  $\mu$ g) of protein extracts from the common marmoset and mouse brain tissues and established PBMC lines (described above) were separated by SDS-PAGE with 5% polyacrylamide gels and electrophoretically blotted onto PVDF membranes (Millipore). Membranes were blocked for 1 h in blocking solution [5% non-fat milk in TBST buffer (25 mM Tris-HCl, pH 7.4, 150 mM NaCl and 0.1% Tween-20)] and incubated with 1/1000 dilution of mouse anti-huntingtin protein monoclonal antibodies [MAB2166 and MAB2170 (Chemicon); ab7666 (Abcam)] followed by washing in TBST buffer and further incubation with sheep anti-mouse Ig, HRP-linked whole Ab (GE Healthcare). Antigen-antibody complexes were visualized using ECL plus Western Blotting Detection Reagent (GE Healthcare). After detection of signals, the membranes were subjected to antibody removal in Re-Blot Plus strong antibody stripping solution (Chemicon) followed by washing in TBST buffer, and then incubated with 1/1000 dilution of mouse anti-APP [MAB348 (Chemicon)] monoclonal antibody. Subsequent processes were the same as described above.

## 2.6. Gene silencing of marmoset *Htt* by RNA interference

To monitor gene silencing against the common marmoset *Htt* gene, we constructed a reporter plasmid carrying the 5'-terminal region of the marmoset *Htt* linked with the *GFP* reporter gene: the PCR product obtained from RT-PCR with the HD1-F and HD1-1900R2 primers was

**Table 1**  
Sequence homologies (%) among various species' *Htt* genes

<i>Homo sapiens</i>	<i>Callithrix jacchus</i>	<i>Canis lupus familiaris</i>	<i>Bos taurus</i>	<i>Sus scrofa</i>	<i>Mus musculus</i>	<i>Rattus norvegicus</i>
<i>Homo sapiens</i>	95.1	87.0	84.0	84.1	86.1	85.8
	97.0	92.0	89.5	88.6	91.2	91.2
<i>Canis lupus familiaris</i>		86.6	84.0	83.9	85.6	85.1
		91.4	88.4	87.9	90.8	90.9
<i>Callithrix jacchus</i>			84.5	84.4	84.0	83.8
			89.4	89.7	89.2	89.3
<i>Bos taurus</i>				86.8	81.2	81.3
				89.3	87.1	87.4
<i>Sus scrofa</i>					80.9	80.8
					86.9	87.2
<i>Mus musculus</i>						95.9
						97.6
<i>Rattus norvegicus</i>						

Figures in upper and lower stands represent nucleotide and amino acid sequence homologies, respectively, between two species.

trimmed with EcoRI and BamHI, and inserted into the pd2EGFP-N1 plasmid (Clontech) treated with the same restriction enzymes. The resultant reporter (5'*Cj-Htt-GFP*) plasmid and synthetic siRNA duplex targeting the marmoset *Htt* (cjHtt-1 siRNA duplex) were cotransfected into mouse neuroblastoma Neuro2a cells by Lipofectamine 2000 transfection reagent (Invitrogen) as described previously (Sakai and Hohjoh, 2006). Two days after transfection, the cells were examined by a fluorescent microscope. When the endogenous marmoset *Htt* gene was inhibited by RNAi, the cjHtt-1 siRNA duplex (0.4 nmol/transfection) was introduced into HSCJ-009 cells ( $1 \times 10^6$  cells/transfection) by means of a Nucleofector system (Amaxa Biosystems) according to the manufacturer's instructions. Two days after transfection, total RNA and cell lysate were prepared from the cells and examined by RT-real time PCR and Western blotting, respectively.

The nucleotide sequences of synthesized cjHtt-1 siRNA were as follows:

Sense: 5'-GCCUUUGAGUCCUCAAGUUU-3'  
Antisense: 5'-ACUUGAGGGACUCAAAAGCCUU-3'

## 2.7. Sequence data and computational analyses

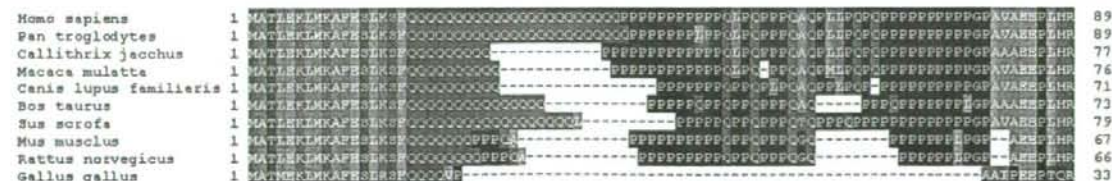
The *Htt* sequence data derived from various species were as follows [GenBank accession number]: human (*Homo sapiens*) [NM\_002111]; chimp (*Pan troglodytes*) [XM\_517080]; rhesus macaque (*Macaca mulatta*) [XM\_001086119]; canine (*Canis lupus familiaris*) [XM\_536221]; bovine (*Bos taurus*) [XM\_866758]; wild boar (*Sus scrofa*) [NM\_213964]; mouse (*Mus musculus*) [NM\_010414]; rat (*Rattus norvegicus*) [XM\_573634]; chicken (*Gallus gallus*) [XM\_420822]. Although the rhesus macaque *Htt* sequence [XM\_001086119] contains 20 undetermined nucleotides at positions 4932–4951 followed by 6 suspensive amino acid sequences, the sequence was used and examined together with the other sequences in this study.

Sequence homology analysis of either nucleotide or amino acid sequences was carried out by means of the GENETYX software (Software Development Co., Ltd., Tokyo, Japan), where all the parameters were set at default. For identification of the HEAT repeats in the *Cj-Htt* protein sequences, the REP program (<http://www.embl-heidelberg.de/~andrade/papers/rep/search.html>) developed by Andrade et al. was used.

## 3. Results and discussion

### 3.1. Isolation and characterization of the common marmoset *Htt* gene

To isolate and identify the common marmoset *Htt* (*Cj-Htt*) gene and/or gene products, we focused on conserved regions in the *Htt* gene and isolate cDNA clone of the *Cj-Htt* transcript. Highly homologous regions (sequences) between the human and mouse *Htt* genes, whose corresponding regions in the *Cj-Htt* gene were also expected to remain conserved, were selected, and PCR primers were designed for such regions. We add that such conserved regions are also detectable by BLAST search with the human *Htt* as a query on the Trace archive of the CJ-database in NCBI. RT-PCR with the designed primers and total RNA extracted from common marmoset brain tissue and established cell lines was carried out, and an approximately 9.4 kb long PCR product, which was expected to contain the full-length open reading frame (ORF) of *Cj-Htt*, was obtained (Fig. 1). The PCR product was subjected to sequence determination and then compared with various species' *Htt* genes. From the results, it was clear that the PCR product, which is 9396 nucleotides in length, was derived from the common marmoset *Htt* gene which encodes a predicted 3131 amino acid long *Cj-Htt* polypeptide (the sequence accession number in GenBank is AB443866). Sequence homologies in the *Htt* gene among various species are indicated in Table 1. From the data, it appears that both the nucleotide and predicted amino acid sequences of the *Cj-Htt*



**Fig. 2.** Alignment of amino acid sequences in the *Htt* exon 1 and its corresponding regions. Sequence data were aligned based on the human *Htt* exon 1 (top line). Amino acid residues are color-coded based on the biochemical properties of the residues: hydrophobic amino acids in orange, polar amino acids with uncharged R groups in green, acidic amino acids in pink, basic amino acids in light blue, and special amino acids in dark blue.