

平成 21 年 5 月 29 日現在

研究種目：若手研究 (B)  
 研究期間：2007 ～ 2008  
 課題番号：19700353  
 研究課題名 (和文) ゲノムワイドスクリーニングによる遅発性神経変性関連遺伝子の同定と解析

研究課題名 (英文) A Genome-wide screen for novel genes with a neuronal cell death in *Drosophila*

## 研究代表者

米倉 真一 (YONEKURA SHINICHI)

財団法人東京都医学研究機構・東京都神経科学総合研究所・研究員

研究者番号：40443113

## 研究成果の概要：

多くの神経変性疾患において、神経細胞死に先立ち軸索の変性が生じることが明らかとなっている。本研究から、milton というミトコンドリアの輸送に関与する遺伝子の異常により、軸索の変性が生じることが明らかとなった。milton はミトコンドリアのみならず、他のたんぱく質の輸送にも関与していることが明らかとなり、軸索内の物流輸送の異常により軸索変性が生じると考えられ、神経変性疾患の発症機構を解明する上で重要な知見と成りうる。

## 交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	1,900,000	0	1,900,000
2008 年度	1,400,000	420,000	1,820,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	420,000	3,720,000

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：神経科学・神経化学

キーワード：ショウジョウバエ、ミトコンドリア、軸索変性

## 1. 研究開始当初の背景

高齢者社会を迎え、アルツハイマー病、パーキンソン病などの難治性神経変性疾患の発症機構の解明が急務となっている。近年の研究により、これら神経変性疾患の病因遺伝子が明らかになってきており国内外問わず精力的に研究が進められているが、発症の分子メカニズムは依然として不明な点が多い。研究の進展の障害となっている大きな原

因の1つに、これらの神経変性疾患の多くが高齢になってから発症するため、疾患の遺伝学的研究が難しく、また人間そのものを対象とした研究も困難であることが挙げられる。一方、ショウジョウバエは遺伝学的な研究が容易であり、哺乳類の神経細胞死の特徴も兼ね備えた動物である。また、ヒトの疾患原因遺伝子として同定されている遺伝子の 3分の2がゲノム上に存在していることが明ら

かとなり、疾患研究として有用なモデル動物である。これらショウジョウバエの非常に高い有用性から、近年ショウジョウバエを用いた神経変性メカニズムの研究が世界的に盛んに行われてきているが、それら多くは既知遺伝子をベースとした研究がほとんどである。

## 2. 研究の目的

ショウジョウバエ、ヒトゲノムの解読が終了し、その情報基盤も整いつつある現在、ショウジョウバエを用いてゲノムワイドの網羅的なスクリーニングを行い、哺乳動物では困難な遺伝学、遺伝子工学的手法を効果的に活用していくことは、神経変性疾患の分子基盤を明らかにする一つの有効な手段であると考えられる。本研究は、遺伝学的手法が豊富に活用できるショウジョウバエを用いたゲノムワイドスクリーニングを行うことで、新たな神経変性疾患に関連する遺伝子を同定することを目的としたものであり、また同定した遺伝子を手がかりとして、神経変性の分子メカニズムの解明に努めるものである。

## 3. 研究の方法

(1) ゲノムワイドスクリーニング：ショウジョウバエを ethylmethane sulphonate (EMS) 処理することにより機能欠失変異体 (loss of function mutation) を作製し、第1段階としてホモ接合で致死である変異株を選択した。第1段階で選択した劣勢致死変異株から、MARCM法を用いて Photoreceptor neuron でのみ変異する動物を作製し、2次スクリーニングとして、発生期、成虫期に、共焦点レーザー走査顕微鏡を用いて Photoreceptor neuron が変性する変異体を模索した。

(2) 変異体の原因遺伝子の同定：神経変性のフェノタイプを有する変異体を得た後、遺伝学的手法を用いて、その原因遺伝子の同定

を行い、またヒト、マウスのホモログ遺伝子の検索をバイオインフォマティクスを用いて行った。

(3) 原因遺伝子のクローニングとレスキュー実験：同定した原因遺伝子を genomic PCR を行いクローニングし、ショウジョウバエの Pベクターに挿入し、得られた Pベクターを、embryo に injection することでトランスジェニックハエを作製した。作成後、トランスジェニックハエと変異体をクロスさせ、産まれてくる F1 の photoreceptor neuron を観察することで、神経変性のフェノタイプがレスキューされるのか検討した。

(4) 原因遺伝子の機能異常と神経変性との関連について：遺伝学的手法を用いて photoreceptor neuron を観察することで検討した。

## 4. 研究成果

(1) 本スクリーニングから遅発性神経変性のフェノタイプを有するショウジョウバエ 379A 株を得ることに成功した。379A 株は、生後すぐ ( Day 0 ) は神経回路形成、photoreceptor neuron の形態に変化は見られないが、その後、加齢と共に徐々に神経変性を引き起こす。また、この変異体は神経細胞死に先立って軸索変性を引き起こしていることが明らかとなった。

(2) 379A 株の原因遺伝子は、milton という遺伝子であることが明らかとなった。ヒトにおいても milton 遺伝子のホモログは存在し、アミノ酸レベルでの相同性は 30%であった。この分子は coiled-coiled domain を有し、この domain での相同性は約 60%と高い相同性を有しているものであった。

(3) milton 遺伝子の cDNA 全長は 5.2kb であり、全長をクローニング後、milton 遺伝子を過剰発現するトランスジェニックハエを作製し、レスキュー実験を行ったところ、

379A 株の神経変性のフェノタイプはレスキューされることを確認できた。

(4) milton はミトコンドリアの順行輸送に必要な不可欠な分子として明らかになっているが、379A 株においてもミトコンドリアの順行輸送に異常が認められた。しかしながら、軸索におけるミトコンドリアの輸送異常だけでは軸索の変性は生じないことが明らかとなった。近年、milton はミトコンドリアのみならず他のタンパク質の輸送に関与するアダプタータンパク質であることが明らかとなっている。379A 株における軸索変性は、軸索における、何らかのタンパクの輸送異常であることが予想されることから、今後、379A 株を解析していくことで、神経変性の分子基盤を明らかにしていけるものであると考えている。一方、同じ milton の変異体であっても変異部位により、軸索変性、軸索の異常伸長と全く異なるフェノタイプを有することを明らかにした。 milton は alternative splicingにより少なくとも4つのアイソフォームを有しているが、これら変異部位は異なる alternative splicing exon に存在していた。このことは、2つの milton 変異体において、それぞれ異なるアイソフォームが欠失している可能性を示唆するものであり、milton 遺伝子の分子多様性が軸索の形態維持において重要な役割を果たしている可能性があると考えられる。

#### 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 1 件)

- ① Hsu SN, Yonekura S, Ting CH, Robertson H, Iwai Y, Uemura T, Lee CH, Chila A. Conserved Alternative Splicing and Expression Patterns of Arthropod N-Cadherin. PLoS Genetics. 2009, Apr 5

(4):e100441

[学会発表] (計 4 件)

- ① 米倉真一、軸索変性関連遺伝子のゲノムワイドスクリーニング、第31回日本分子生物学会年会、2008年12月、横浜市
- ② Yonekura S. Abnormal mitochondrial transport cause age-dependent axonal degeneration in *DROSOPHILA*. Neuroscience 2008, November 2008, Washington DC USA.
- ③ Yonekura S. A genome-wide screen for novel genes with a neuronal cell death in *Drosophila*. Cold spring harbor laboratory meeting, "Neurobiology of Drosophila". October 2007, Cold spring harbor USA.
- ④ 米倉真一、神経細胞死関連遺伝子のゲノムワイドスクリーニング、第50回日本神経化学学会大会、2007年9月、横浜市

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

出願年月日:

国内外の別:

○取得状況 (計 0 件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

取得年月日:

国内外の別:

[その他]

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

米倉 真一 (YONEKURA SHINICHI)

東京都医学研究機構・東京都神経科学総合研  
究所・研究員

研究者番号：40443113

(2) 研究分担者

( )

研究者番号：

(3) 連携研究者

( )

研究者番号：