

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 3 日現在

機関番号：12602

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2013

課題番号：24700374

研究課題名(和文) 脊髄小脳変性症1型へのDNA損傷修復の関与の解析

研究課題名(英文) DNA damage repair in SCA1 pathology

研究代表者

田村 拓也(Tamura, Takuya)

東京医科歯科大学・難治疾患研究所・助教

研究者番号：80396647

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円、(間接経費) 1,020,000円

研究成果の概要(和文)：in vivoスクリーニングとIPAネットワーク解析を組み合わせた解析の結果、脊髄小脳失調症1型(SCA1)の病態に関与する遺伝子を特定した。SCA1回復遺伝子を基に構成されたネットワークはDNA損傷修復の中でも相同組換え修復に関与しており、その中心的役割をRPA1遺伝子が果たしていることを示した。実際にRPA1遺伝子はSCA1におけるDNA損傷を軽減し、治療効果があった。また、chk1の発現はSCA1病態を悪化させた。chk1の阻害剤はSCA1を回復し、治療薬剤の候補として考えられた。

研究成果の概要(英文)：We tested the effect of their overexpression on lifespan and developmental viability in SCA1 Drosophila model expressing ATX1-82Q. We identified genes previously unknown to be involved in CAG-/polyQ-related pathogenesis that function in multiple DNA damage repair systems. Beyond the significance of each repair system, systems biology analyses unraveled the core networks connecting positive genes in the gene screen that could contribute to SCA1 pathology. In particular, RPA1, which had the largest effect on lifespan in the SCA1 fly model, was located at the hub position linked to such core repair systems, including homologous recombination (HR). We revealed that ATXN1 actually interacted with RPA1. Furthermore, mutant but not normal ATXN1 impaired the dynamics of RPA1 in the nucleus after DNA damage. In addition, chemical and genetic inhibitions of Chk1 elongated lifespan. Collectively, we elucidated core networks for DNA damage repair in SCA1 that might include the aberrant usage of HR.

研究分野：脳神経科学

科研費の分科・細目：神経化学・神経薬理学

キーワード：ショウジョウバエ DNA損傷修復

1. 研究開始当初の背景

脊髄小脳変性症 1 型 (SCA1) は、Ataxin-1 のポリグルタミン鎖が異常伸長することにより発症するポリグルタミン病の一種である。ポリグルタミン病においては、『疾患タンパクが核内部へ移行することが病態進行上きわめて重要』と考えられている。この考えの背景には、変異型 Ataxin-1 の核移行シグナルを欠損させたトランスジェニックマウスでは病変が極めて軽いこと (Klement et al., Cell 1998) また核移行を阻害した変異型ハンチンチンの毒性は極めて軽微であること (Saudou et al., Cell 1998) が挙げられる。そこで、我々は核内でのポリグルタミン蛋白の機能に注目し、研究を進めてきた。その中で近年 HD 病態における核機能異常の一つとして、DNA 二重鎖切断の増加を明らかにしている。変異型ハンチンチンが DNA 損傷修復因子である Ku70 と結合し、DNA 修復に必要な酵素である DNA-PK の活性低下を介して病態を引き起こしている事を示した (Enokido et al., JCB 2010)。

一方、申請者は SCA1 病態における DNA 二重鎖切断の関与を示すデータを得ている (未発表)。また、モデルショウジョウバエを使った実験では、Ku70 の過剰発現が SCA1 の表現型を回復することも見出している (図 1)。加えて、申請者はすでに、このショウジョウバエ SCA1 モデルを利用し、生存や寿命に影響を与える DNA 損傷修復因子の *in vivo* スクリーニングを行っており、複数の遺伝子を特定している。

Harry Orr らや Huda Zoghbi らのグループにより、SCA1 発症メカニズムには、異常型 Ataxin-1 の gain-of-function による部分と loss-of-function による部分があることが示されている (Lim et al., Nature 2008、minireview Zoghbi and Orr JBC 2009)。最近申請者は野生型 Ataxin-1 を Hela 細胞に導入すると DNA 二重鎖切断修復において、single strand annealing (SSA) の用いられる割合が低下するという変化を発見した。この現象は野生型 Ataxin-1 に特異的で、変異型では見られなかった (図 2)。この事は Ataxin-1 が本来 DNA 二重鎖切断修復における役割を持っており、変異によりその機能が失われ、DNA 損傷を修復できず SCA1 病態につながる可能性を示唆している。一方、変異型 Ataxin-1 の gain-of-function が原因である可能性も否定されない。

2. 研究の目的

本研究計画は脊髄小脳変性症 1 型 (SCA1) の病態における DNA 損傷修復異常の関与を明らかにしようとするものである。SCA1 は Ataxin-1 のポリグルタミン鎖が異常伸長 (変異) する事により引き起こされるポリグルタミン病の一つである。申請者は、最近 SCA1

病態における DNA 損傷の増加を見出している。また、SCA1 モデル動物の病態を回復させる複数の DNA 損傷修復関連遺伝子をスクリーニングにより見出した。加えて、野生型 Ataxin-1 の生理的な機能として DNA 修復への関与を示唆するデータも得ている。これらのデータを基に、DNA 損傷の増加及び Ataxin-1 の変異による DNA 修復機能の低下が SCA1 病態に関与するのか明らかにしたい。

3. 研究の方法

本研究において、目的別 3 つの計画を立てている。

- ・ SCA1 における DNA 損傷の増加が loss-of-function によるものか gain-of-function によるものか明らかにするため、Hela 細胞に野生型、変異型 Ataxin-1 を導入し、また shRNA により内在性の Ataxin-1 を減少させ DNA 損傷耐性及び修復経路の変化を観察する。

- ・ SCA1 の表現型において、発生期か成熟後のどちらで DNA 損傷修復経路の関与が大きいか明らかにするため、時期特異的な発現システムを使い表現型、DNA 損傷及び修復経路の変化を観察する。

- ・ SCA1 において影響を受ける DNA 損傷修復分子経路を解明するため、モデルショウジョウバエのスクリーニングより得られた遺伝子どうしの遺伝的結合 (genetic interaction) を示す。

4. 研究成果

in vivo スクリーニングと IPA ネットワーク解析を組み合わせた解析の結果、脊髄小脳失調症 1 型 (SCA1) の病態に関与する遺伝子を特定した。SCA1 回復遺伝子を基に構成されたネットワークは DNA 損傷修復の中でも相同組換え修復に関与しており、その中心的役割を RPA1 遺伝子が果たしていることを示した。実際に RPA1 遺伝子は SCA1 における DNA 損傷を軽減し、治療効果があった。また、chk1 の発現は SCA1 病態を悪化させた。chk1 の阻害剤は SCA1 を回復し、治療薬剤の候補として考えられた。

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 4 件)

1. Fujita, K., Nakamura, Y., Oka, T., Ito, H., Tamura, T., Tagawa, K., Sasabe, T., Katsuta, A., Motoki, K., Shiwaku, H., Sone, M., Yoshida, C., Katsuno, M., Eishi, Y., Murata, M., Taylor, JP., Wanker, EE., Kono, K., Tashiro, S., Sobue, G., La, Spada, AR., and

- Okazawa, H. (2013) A functional deficiency of TERA/VCP/p97 contributes to impaired DNA damage repair in multiple polyglutamine diseases. **Nature Commun.** 4:1816. doi: 10.1038/ncomms2828
2. Li, C., Ito, H., Fujita, K., Shiwaku, H., Yunlong Qi, Y., Tagawa, K., Tamura, T., Okazawa, H. (2013) Sox2 transcriptionally regulates Pqbp1, an Intellectual Disability-Microcephaly causative gene, in neural stem progenitor cells. **PLOS ONE** 8, e68627. doi: 10.1371/journal.pone.0068627
 3. Barclay, S.S., Tamura, T., Ito H., Fujita, K., Tagawa, K., Shimamura, T., Katsuta, A., Shiwaku, H., Sone, M., Imoto, S., Miyano, S. and Okazawa, H. (2014) Systems biology analysis of *Drosophila in vivo* screen data elucidates core networks for DNA damage repair in SCA1. **Hum Mol Genet** 23:1345-64. doi: 10.1093/hmg/ddt524. Epub 2013 Oct 31.
 4. Tamura T., Sone M., Nakamura Y., Shimamura T., Imoto S., Miyano S. and Okazawa H. (2012). A restricted level of PQBP1 is needed for the best longevity of *Drosophila*. **Neurobiology of Aging** . 2013 Jan;34(1):356.e11-20. doi: 10.1016/j.neurobiolaging.2012.07.01
- [学会発表](計 16件)
1. Tamura, T., Barclay, S, S., Fujita, K., Ito, H., Motoki, K., Shimamura, T., Tagawa, K., Katsuta, A., Shiwaku, H., Sone, M., Tagawa, K., Imoto, S., Miyano, S., Okazawa, H. “Replication-dependent DNA repair in SCA1 pathology.” Neuro2013, Kyoto International Conference Center, Kyoto, Tokyo, 2013.6.20-23 (6/20)(Poster)
 2. 田村 拓也, Barclay S Sam, 藤田 慶大、伊藤 日加瑠、本木 和美、島村 徹平、田川 一彦、勝田 明寿香、曾根 雅紀、井元 清哉、宮野 悟、岡澤 均 第 5 4 回日本神経学会学術大会「脊髄小脳変性症 1 型における DNA 損傷修復遺伝子の効果;in vivo screening による解析」(ポスター)、東京国際フォーラム、2013.5.29-6.1 (発表日 5/30)
 3. 藤田慶大、中村蓉子、岡努、伊藤日加瑠、田村拓也、田川一彦、岡澤均 第 32 回日本認知症学会学術集会「TERA/VCP/p97 の DNA 修復機能不全は複数の神経変性疾患に関与する」(ポスター) キッセイ文化ホール・松本市総合体育館、2013.11.8-10 (発表日 11/9)
 4. 田村拓也 第六回高次分子機能研究会「神経変性疾患モデルショウジョウバエを用いたバイオインフォマティク解析」(口演)、軽井沢ホテル、2013.9.17-19 (発表日 9/17)
 5. 藤田慶大、中村蓉子、岡努、伊藤日加瑠、田村拓也、田川一彦、笹邊俊和、勝田明寿香、本木和美、塩飽裕紀、曾根雅紀、吉田千里、岡澤均 第 36 回日本分子生物学会年会 「複数のポリグルタミン病における TERA/VCP/p97 の DNA 損傷修復機能不全」(ポスター) 神戸ポートアイランド、2013.12.3-6 (発表日 12/4)
 6. 田村 拓也、岡澤 均、「脊髄小脳失調症 1 型における複製依存的 DNA 修復の関与」運動失調症の病態解明と治療法開

発に関する研究班 平成 25 年度班会議
都市センターホテル 東京 2014.1.8-9
(発表日 1/9)

7. 田村 拓也、Barclay S Sam、藤田 慶大、伊藤 日加瑠、本木 和美、島村 徹平、田川 一彦、勝田 明寿香、曾根 雅紀、井元 清哉、宮野 悟、岡澤 均 第 6 回 CBIR 若手インスパイアシンポジウム「脊髄小脳失調症 1 型の病態を制御する DNA 損傷修復機構」(口演) 東京医科歯科大学、2014.2.2
8. 藤田慶大、中村蓉子、岡努、伊藤日加瑠、田村拓也、田川一彦、笹邊俊和、勝田明寿香、本木和美、塩飽裕紀、曾根雅紀、吉田千里、岡澤均 第 6 回 CBIR 若手インスパイアシンポジウム「複数のポリグルタミン病における TERA/VCP/p97 の DNA 損傷修復機能不全」(口演) 東京医科歯科大学、2014.2.2
9. 田村 拓也、曾根 雅紀、岩坪 威、田川 一彦、Erich Wanker、岡澤 均 「DNA 修復タンパク質・Ku70 はハンチントン病の神経変性を抑制する」 第 53 回日本神経学会学術大会 東京国際フォーラム 東京 2012.5.25 (ポスター)
10. 田村 拓也、「SCA1 病態における DNA 損傷修復異常」第五回分子高次機能研究会 KKR ホテルびわこ 滋賀 2012.8.27-29
11. Sam S. Barclay、田村 拓也、伊藤 日加瑠、島村 徹平、勝田 明寿香、曾根 雅紀、塩飽 裕紀、田川 一彦、井元 清哉、宮野 悟、岡澤 均「脊髄小脳変性症 1 型における DNA 損傷修復遺伝子の効果：in vivo スクリーニング」第 35 回日本神経科学大会 名古屋国際会議場 名古屋 2012.9.18-21
(ポスター)
12. 田村拓也、中村蓉子、塩飽裕紀、岡澤均、
「PQBP1 遺伝子発現量と症状の相関関

係」第 31 回日本認知症学会学術集会
つくば国際会議場 筑波
2012.10.26-28

13. 田村 拓也、曾根 雅紀、中村 蓉子、島村 徹平、井元 清哉、宮野 悟、岡澤 均「発現量依存的に寿命をコントロールする遺伝子、PQBP1」第 35 回分子生物学会年会 福岡国際会議場マリメッセ福岡 福岡 2012.12.11-14
14. 田村 拓也、曾根 雅紀、中村 蓉子、島村 徹平、井元 清哉、宮野 悟、岡澤 均「発現量依存的に寿命をコントロールする遺伝子、PQBP1」第 85 回日本生化学会大会 福岡国際会議場マリメッセ福岡 福岡 2012.12.14-16
15. Chan Li, Hikaru Ito, Kyota Fujita, Hiroki Shiwaku, Yunglong Qi, Kazuhiko Tagawa, Takuya Tamura, Hitoshi Okazawa “Sox2 transcriptionally regulates Pqbp1, an intellectual disability -microcephaly causative gene, in neural stem progenitor cells” 第 5 回 東京医科歯科大学 CBIR 若手インスパイアシンポジウム 東京医科歯科大学 東京 2013.2.23
16. 田村 拓也、Sam Barclay、藤田 慶大、伊藤 日加瑠、本木 和美、島村 徹平、勝田 明寿香、塩飽 裕紀、曾根 雅紀、田川 一彦、井元 清哉、宮野 悟、岡澤 均、「脊髄小脳変性症 1 型における DNA 損傷修復遺伝子の効果；in vivo screening による解析」第 5 回 東京医科歯科大学 CBIR 若手インスパイアシンポジウム 東京医科歯科大学 東京 2013.2.23

〔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

2014.3.7 難治疾患研究所 優秀論文賞

2013.3.8 難治疾患研究所発表会 優秀賞
（第1位）

6. 研究組織

(1)研究代表者

田村 拓也 (TAMURA Takuya)

東京医科歯科大学・難治疾患研究所・助教

研究者番号：80396647

(2)研究分担者

なし ()

研究者番号：

(3)連携研究者

なし ()

研究者番号：