

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 3 日現在

機関番号：82611

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2014

課題番号：25860733

研究課題名(和文) GGGGCCリピートRNAに着目したALS遺伝子ネットワークのin vivo解析

研究課題名(英文) Establishment of a novel animal model of ALS expressing GGGGCC repeat RNA in Drosophila, and analyses of its pathogenic mechanisms

研究代表者

上山 盛夫 (Ueyama, Morio)

独立行政法人国立精神・神経医療研究センター・神経研究所 疾病研究第四部・科研費研究員

研究者番号：20386593

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：筋萎縮性側索硬化症(ALS)は、運動神経細胞の変性・脱落による運動障害を伴う重篤な疾患である。近年、その原因としてC9ORF72遺伝子非翻訳領域内のGGGGCCリピートの異常伸長が発見されたが、その発症分子メカニズムは解明されていない。そこで、異常伸長リピートによるALS発症メカニズムの解明を目的として、まずGGGGCCリピートRNAを発現するALSモデルショウジョウバエを樹立した。次いでALS原因遺伝子FUSと相互作用することを発見し、GGGGCCリピートによるALS発症にFUSが関わる可能性を示した。

研究成果の概要(英文)：Amyotrophic lateral sclerosis (ALS) is a devastating disease with movement disorder characterized by degeneration and loss of motor neurons. Recently, an abnormal expansion of GGGGCC repeat in the untranslated region of C9ORF72 gene has been found to be responsible for familial ALS. However, its molecular mechanism leading to ALS pathogenesis remains unclear. To elucidate the pathogenic mechanisms of ALS caused by an expanded repeat, we had established a novel Drosophila model of ALS expressing the GGGGCC repeat RNA. Next, we found that one of the causative gene of ALS, FUS genetically interacts with GGGGCC repeat, indicating that FUS contributes to pathogenic mechanisms of ALS related to GGGGCC repeat expansion.

研究分野：遺伝学

キーワード：脳・神経 脳神経疾患 RNA 遺伝子 ショウジョウバエ RNA結合蛋白質

1. 研究開始当初の背景

筋萎縮性側索硬化症(ALS)は、異常蛋白質の蓄積による封入体を伴った運動神経細胞が変性・脱落して運動障害を来し、最終的には死に至る神経変性疾患である。

近年、家族性および孤発性 ALS 患者における分子遺伝学的解析から、抗酸化に関わる *SOD-1*、RNA 代謝に関わる *TDP-43* や *FUS*、蛋白質分解に関わる *p62* や *UBQLN2* など、多くの原因遺伝子が同定された(Andersen et al., 2011)。しかし、ALS 病態におけるそれぞれの分子の相互関係は未解明である。

昨年、新たな ALS の原因としてアメリカとフィンランドの多数の家族性および孤発性 ALS 患者から *C9ORF72* 遺伝子非翻訳領域における GGGGCC リピート配列の異常伸長が発見され(DeJesus-Hernandez et al., 2011; Renton et al., 2011)、そして同様の異常伸長を持つ ALS 患者が日本にも存在することが報告された(Ogaki et al., 2012; Konno et al., 2012)。さらに驚くべきことに、神経細胞内封入体から既知 ALS 原因分子、*p62*、*TDP-43*、あるいは *UBQLN2* が発見された(Al-Sarraj et al., 2011; Brettschneider et al., 2012)。このことは、異常伸長リピート RNA が一見無関係な機能を持つ様々な ALS 原因遺伝子の異常を引き起こすことを示している。すなわち、異常伸長リピート RNA を中心にそれら ALS 原因分子との病態における相互関係を解明することで、ALS に共通する本質的な分子病態を明らかにできると考えられる。このような研究には *in vivo* での解析が必須であるが、リピート RNA により発症する動物モデルは未だ存在していない。

ALS 原因分子間の相互関係を *in vivo* において解明する上で、ショウジョウバエは、世代時間の短さ、遺伝子変異体の充実度、遺伝学的相互作用解析などの多様な実験手法の利用が可能といった、研究上の利点が数多くあり、有用である(例えば、遺伝子組換え体の作製に関して、マウスでは半年以上かかるが、ショウジョウバエでは2-3ヶ月で可能である)。実際に神経変性疾患の研究では多用されており(Bilen and Bonini, 2005)、当研究室においても上記の利点を踏まえ、すでに *TDP-43* や *FUS* など複数の ALS 原因遺伝子の神経変性疾患モデルショウジョウバエを樹立し、これらの遺伝子間相互作用を明らかにすることに成功している。

2. 研究の目的

異常伸長リピート RNA に伴う ALS の新しい *in vivo* 動物モデルとして、GGGGCC 異常伸長リピート RNA を発現するショウジョウバエモデルを樹立し、遺伝学的手法を用いて ALS 関連遺伝子を同定し、ALS の共通発症分子メカニズムを解明する。

3. 研究の方法

(1)異常伸長 GGGGCC リピート RNA 発現 ALS モデルショウジョウバエの樹立

異常伸長 GGGGCC リピートを発現する遺伝子改変ショウジョウバエを作製し、生存率解析、行動解析、寿命解析、および病理学的解析を行い、ALS モデル動物としての妥当性を検討する。

(2)異常伸長 GGGGCC リピートと ALS 原因遺伝子との遺伝学的相互作用解析

(1)で作製した ALS モデルショウジョウバエを用いて、遺伝学的手法により他の ALS 原因遺伝子 *p62*、*TDP-43* および *FUS* を神経で同時に発現させ、GGGGCC リピート RNA と ALS 原因遺伝子をそれぞれ単独に発現させた場合と比べて相乗的もしくは相加的な生存率回復・増悪の有無を評価し、異常伸長リピートの関連する ALS 発症との関連性を検討する。

4. 研究成果

(1)異常伸長 GGGGCC リピート RNA 発現 ALS モデルショウジョウバエの樹立

異常伸長 GGGGCC リピート RNA を発現するショウジョウバエを樹立し、その表現型を解析した。神経系における異常伸長 GGGGCC リピート RNA の発現は生存率の低下、進行性の運動機能障害、および寿命短縮を引き起こした。また複眼における異常伸長 GGGGCC リピート RNA の発現では複眼変性が生じた。RNA *in situ* hybridization により、リピート RNA の発現を検討したところ、異常伸長 GGGGCC リピート RNA を発現する個体でのみシグナルが検出された。本研究開始後に、異常伸長リピート RNA を鋳型として開始コドン ATG に依存しない翻訳により異常伸長したジペプチドリピート(GPR)タンパク質が産生されることが明らかになったことから、組織化学染色により、GPR タンパク質であるポリ(グリシン-アラニン)およ

びポリ(グリシン-アルギニン)の発現を検討したところ、異常伸長 GGGGCC リピート RNA を発現する個体でのみシグナルが検出された。リピート RNA および DPR タンパク質は *C9ORF72* 遺伝子異常による ALS 患者の病理で確認されており、異常伸長 GGGGCC リピート RNA を発現するショウジョウバエは、ALS の病理学的特徴も反映する優れたモデルであることが明らかになった。

(2)異常伸長 GGGGCC リピートと ALS 原因遺伝子との遺伝学的相互作用解析

(1)で作製した ALS モデルショウジョウバエを用いて、遺伝学的手法により他の ALS 原因遺伝子 *p62*、*TDP-43* および *FUS* を複眼で同時に発現させ、複眼変性を評価・検討することで GGGGCC リピート RNA と ALS 原因遺伝子の遺伝学的相互作用解析を行った。その結果、*p62* との共発現では、ALS モデルショウジョウバエが呈する複眼変性の明らかな変化は認めなかった。一方、*TDP-43* あるいは *FUS* の共発現では、ALS モデルショウジョウバエの呈する複眼変性が増悪、あるいは改善した。これらの結果から、ALS 原因遺伝子 *TDP-43* と *FUS* は異常伸長 GGGGCC リピート RNA が引き起こす神経変性に関与していると考えられた。*TDP-43* は *C9ORF72* 遺伝子異常による ALS 患者の病理において脳の広範囲において封入体中に存在することが確認されており、異常伸長 GGGGCC リピート RNA もしくはリピート由来の GPR タンパク質が結合し封入体形成を促進していることが考えられる。また *FUS* は *in vitro* で GGGGCC リピートと直接結合することが示されており、本研究は *in vivo* において相互作用していることを示した。*TDP-43* と *FUS* は ALS 原因遺伝子にも関わらず、GGGGCC リピート RNA 発現による神経変性に対して異なる効果を示す点は大変興味深い。これらの効果に対する分子基盤を解明するために、今回樹立した異常伸長リピート RNA を発現する ALS モデルショウジョウバエは有用であり、ALS の共通発症分子メカニズムの解明につながると期待される。

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 3 件)

上山盛夫、藤掛伸宏、永井義隆、神経変性疾患への新しい視点 -プリオン仮説- D. タウ蛋白による前頭側頭葉変性症

(FTLD-Tau) 3.その他の FTLD (異常蛋白の視点から)、*Clinical Neuroscience*、査読無、Vol.33、2015、312-314

<http://www.chugaiigaku.jp/item/detail.php?id=1656>

Y. Saitoh, N. Fujikake, Y. Okamoto, H. A. Popiel, Y. Hatanaka, M. Ueyama, M. Suzuki, S. Gaumer, M. Murata, K. Wada, and Y. Nagai, P62 plays a protective role in the autophagic degradation of polyglutamine protein oligomers in polyglutamine disease model flies, *Journal of Biological Chemistry*、査読有、Vol.290、2015、1442-1453 DOI 10.1074/jbc.M114.590281.

Y. Azuma, T. Tokuda, M. Shimamura, A. Kyotani, H. Sasayama, T. Yoshida, I. Mizuta, T. Mizuno, M. Nakagawa, N. Fujikake, M. Ueyama, Y. Nagai, and M. Yamaguchi, Identification of *ter94*, *Drosophila VCP*, as a strong modulator of motor neuron degeneration induced by knockdown of *Caz*, *Drosophila FUS*, *Human Molecular Genetics*、査読有、Vol.23、2014、3467-3480 DOI 10.1093/hmg/ddu055.

[学会発表](計 1 件)

上山盛夫、石黒太郎、藤掛伸宏、今野卓哉、小山哲秀、小野寺理、和田圭司、永井義隆、GGGGCC リピート RNA を発現する新規 ALS モデルショウジョウバエの樹立と病態解析、日本遺伝学会第 86 回大会、2014 年 9 月 19 日、長浜バイオ大学(滋賀県長浜市)

[その他]

ホームページ等

<http://www.ncnp.go.jp/nin/guide/r4/index.html>

6 . 研究組織

(1)研究代表者

上山 盛夫 (Ueyama Morio)

独立行政法人 国立精神・神経医療研究センター
一・神経研究所・疾病研究第四部・科研費研究
員

研究者番号：20386593