

機関番号：32689

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2009～2010

課題番号：21800064

研究課題名（和文）神経変性疾患モデルハエを用いた神経変性とエネルギー代謝異常に関わる分子機構の解明

研究課題名（英文）Metabolic analysis in *Drosophila* models of neurodegenerative diseases

研究代表者：松田 七美

松田 七美 (MATSUDA NANAMI)

早稲田大学・先端科学・健康医療融合研究機構・講師

研究者番号：70360641

研究成果の概要（和文）：本研究では、神経変性発症に関わる普遍的な分子機構を探ることを目的として、エネルギー代謝異常と疾患発症機構との関連性に着目し、ショウジョウバエを用いて、*in vivo* RNAiにより組織・時間特異的に、パーキンソン病、及び筋萎縮性軸索硬化症2型 (ALS2) の責任遺伝子のショウジョウバエホモログ *dparkin*、及び *dals2* をノックダウンすることが可能な神経変性疾患モデルを作製し、解析を行った。それぞれの病態モデルにおいて、有意な寿命の短縮、及び行動量の減少が認められることを明らかにした。また、ALS2モデルを用いた生理学的・病理学的機能について遺伝学的解析から、dALS2が神経変性・神経細胞死に対する抑制作用をもつことを示唆する結果を得ており、現在、詳細なエネルギー代謝異常との関連性について機能解析を進めている。

研究成果の概要（英文）： There is increasing evidence that neurodegenerative diseases are a symptom of a deficiency in the regulation of mitochondrial function and metabolism, however the mechanism has been unclear. Mitochondria, as the central organelles in metabolic regulation might have a role to play in the common etiology of neurodegeneration. To address the roles of metabolic defect in neurodegenerative diseases, we established RNA interference-mediated *Drosophila parkin* (*dparkin*) knockdown flies and *Drosophila ALS2/alsin* (*dALS2*) knockdown flies, for Parkinson's disease and juvenile onset recessive familial amyotrophic lateral sclerosis (ALS2) models, respectively. We demonstrate that nervous system-specific knockdown of *dparkin* or *dALS2* caused shorter lifespan and lower locomotor activity. Currently we are exploring the relevance of abnormality of metabolism and mitochondrial dysfunction in neurodegenerative pathogenesis caused by deficiency of parkin or ALS2.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
平成21年度	1,070,000	321,000	1,391,000
平成22年度	970,000	291,000	1,261,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,040,000	612,000	2,652,000

研究分野： 総合領域

科研費の分科・細目： 脳神経科学・神経病理学

キーワード： 神経変性疾患、パーキンソン病、筋萎縮性軸索硬化症（ALS）、ショウジョウバエ、エネルギー代謝

1. 研究開始当初の背景

(1) ショウジョウバエは、全ゲノム配列が線虫に続き2番目に決定され、現在同定されている69個のヒト神経変性疾患原因遺伝子に対して、相同性を示すショウジョウバエ遺伝子が48個存在することから、複雑な神経系をもつ生物として神経変性疾患のモデル動物という観点からも注目されている (*Science* 287, pp2204-2215, 2000)。

(2) 申請者はこれまで、ショウジョウバエや線虫など様々なモデル動物を用いて、一貫してミトコンドリア機能やエネルギー代謝の制御機構に着目し、種を超えて保存された高次生物機能（発生、癌、神経変性疾患、老化など）の分子機構を明らかにすることを目的とした研究に従事してきた。このような研究背景から本研究課題において、パーキンソン病、ポリグルタミン病、アルツハイマー病をはじめとした多くの神経変性疾患において共通して観察される病態である、エネルギー代謝異常について特に着目して解析することより、神経変性・神経細胞死に関わる普遍的な遺伝的カスケードについて明らかにすることを着想した。

2. 研究の目的

本研究では、神経変性発症に関わる普遍的な分子機構を探ることを目的として、多くの神経変性疾患に共通してみられ、その発症メカニズムとの関連性について不明な点が多い病態としてエネルギー代謝異常に着目し、逆向き遺伝学が最も発達した多細胞生物であるショウジョウバエを用いて解析モデルを作製し、解析を行った。

3. 研究の方法

(1) 本研究では、エネルギー代謝異常が認められ、変性機構が不明であり、病態の異なる以下の2つの疾患の原因遺伝子を選択し、新しい神経変性疾患ショウジョウバエモデ

ルを作製し解析を行った。パーキンソン病の原因遺伝子 parkin、2型筋萎縮性側索硬化症 (Amyotrophic lateral sclerosis 2; ALS2) の原因遺伝子 ALS2。

(2) まず、上記の2疾患原因遺伝子に対する二本鎖RNAを神経組織特異的に発現させて *in vivo* RNA 干渉法 (RNAi) を行い、機能欠損型の病態モデルを作製した。はじめに、UAS 配列を含むプロモーターの下流に原因遺伝子 cDNA を inverted repeat に連結した P 因子ベクターをショウジョウバエゲノム上に挿入した系統を確立した。その系統と、複眼、及び脳特異的に GAL4 タンパク質を発現する系統 (GAL4 系統) を交配し、GAL4/UAS システムによる組織特異的な RNAi を行い、原因遺伝子の機能を抑制し、複眼や脳の変性により行動障害や致死性、エネルギー代謝の変化がみられるようなモデルを作製した (機能欠損型神経変性疾患モデル系統)。

(3) 前述した2つの神経変性疾患原因遺伝子の RNAi を複眼、及び脳で組織特異的に発現させて、機能欠損型の病態モデルを作製する。それぞれのモデルでみられる複眼や脳の変性、神経細胞死の表現型を組織学的、形態学的、生化学的に解析する評価系を確立し、対応するヒト疾患の病態表現型と比較する。また、神経変性によって生じる行動学的な異常を評価する目的で、歩行運動量、及びサーカディアンリズムの高感度解析系を開発する。これらの評価系を用いて、RNAi による原因遺伝子の機能抑制により、複眼や脳などの変性・細胞死、致死性、行動障害、エネルギー代謝異常がみられる病態モデルを作製する。これらの病態モデルにおいて、原因遺伝子産物 Parkin、及び ALS2 の生理学的・病理学的役割について、とくにエネルギー代謝異常との関連性について着目し、解析を行った。

4. 研究成果

(1) パーキンソン病、及び筋萎縮性軸索硬化症 2 型 (ALS2) の責任遺伝子のショウジョウバエホモログ *dparkin*、及び *dals2* について、UAS 配列を含むプロモーターの下流に責任遺伝子 cDNA を inverted repeat に連結した P-element ベクターをショウジョウバエゲノム上に挿入した系統 (RNAi 系統) を確立した。

(2) これらの RNAi 系統と神経組織特異的、及び複眼特異的に GAL4 タンパク質を発現する系統 (*elav*-GAL4 系統、及び *GMR*-GAL4 系統) を交配し、F1 世代において、GAL4/UAS システムを用いた *in vivo* RNAi を行い、その病態表現型 (原因遺伝子の機能抑制による致死性、行動異常など) を解析した。

(3) 神経特異的 *dparkin*、及び *dals2* ノックダウン疾患モデル系統 (*elav*>*dparkin*-IR、及び *elav*>*dals2*-IR) では、コントロール系統 (*elav*>*lacZ*-IR) と比較して、有意な寿命の短縮、及び行動量の減少が認められることを明らかにした。図 1 に、*elav*>*dals2*-IR 系統における上記の表現型について示す。

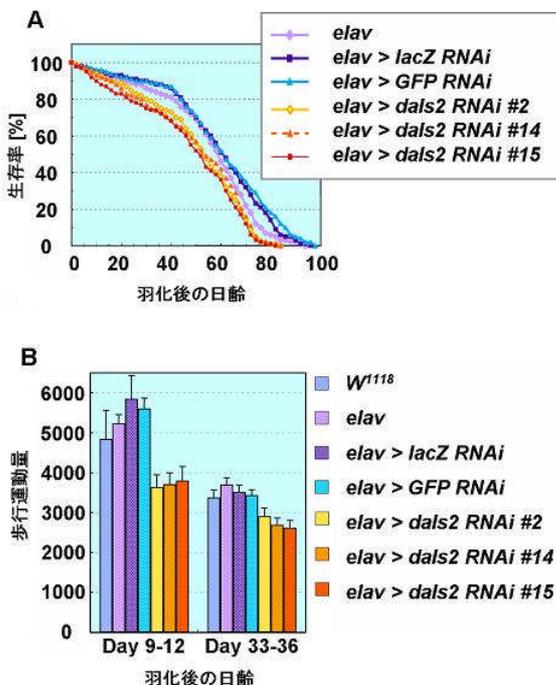


図 1 脳神経組織特異的な *dals2* 機能欠損ショウジョウバエにおける寿命の短縮と歩行運動量の減少

A: 寿命、B: 歩行運動量

(4) (3)、及び図 1 で述べた個体レベルにおける病態表現型 (短寿命、及び歩行運動量の減少) と、細胞レベルにおける病態表現型 (神経細胞の変性・細胞死) の関連性について調べるため、複眼 (視神経) のモデルを用いて ALS2 の病理学的機能解析を行った。

複眼特異的な *dals2* ノックダウン疾患モデル系統、及び *dals2* 過剰発現系統 (*GMR*>*dals2*-IR、及び *GMR*>*dals2*) では、コントロール系統 (*GMR*>*lacZ*-IR) と比較して、複眼の表現型は変化はみられず、正常であった (図 2A-C)。

複眼において、マシャド・ジョゼフ病 (MJD) の原因遺伝子産物 (MJD-78Q) を発現させると神経変性が誘導される (図 2D)。また、複眼において細胞死促進因子 Reaper を発現させると神経細胞死が誘導される (図 2G)。これらのモデルにおいて、dALS2 を共発現させると、MJD-78Q により誘導される神経変性、及び Reaper により誘導される神経細胞死が抑制された (図 2-F, H)。これらの結果から、dALS2 が神経保護作用をもつことが示された。

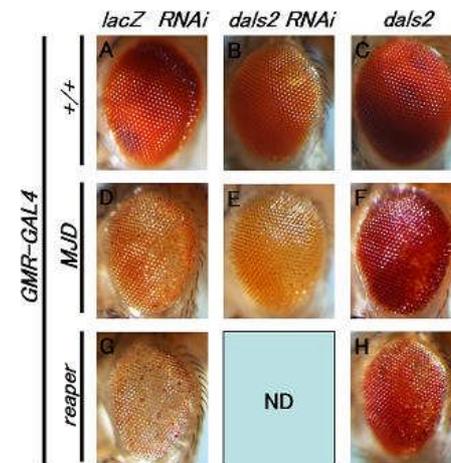


図 2 dALS2 は神経変性、及び神経細胞死を抑制する。

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)

[学会発表] (計 2 件)

(1) 金井麻衣、堤香菜子、合田亘人、松田七美：“神経変性疾患ショウジョウバエモデルにおけるエネルギー代謝異常の解析” 第 32 回日本分子生物学会年会、横浜、2009 年 12 月

(2) 堤香菜子、合田亘人、松田七美：“シヨウジョウバエの2型筋萎縮性側索硬化症モデルを用いたALS2/Alsinの機能解析” 第33回日本分子生物学会年会・第83回日本生化学会大会 合同大会 (BMB2010)、神戸、2010年12月

[その他]

ホームページ等

<http://www.aoni.waseda.jp/nanami.s.matsuda/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

松田 七美 (NANAMI SENOO-MATSUDA)
早稲田大学・理工学術院・講師
研究者番号：70360641