

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 16 日現在

機関番号：32661

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23500401

研究課題名(和文)細胞内蛋白質輸送の異常によって生じる神経変性機構

研究課題名(英文)Mechanisms of neurodegeneration caused by impaired intracellular protein trafficking

研究代表者

曽根 雅紀 (SONE, Masaki)

東邦大学・理学部・准教授

研究者番号：00397548

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円、(間接経費) 1,200,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、細胞内タンパク質輸送に生じた異常が神経変性・神経変性疾患の発症にいかなる役割を果たすのかを、ショウジョウバエ遺伝学を用いた研究手法によって解析した。われわれが発見したyata遺伝子は、アルツハイマー病の原因分子であるアミロイド前駆体タンパク質の輸送調節に必要とされる。われわれはyata遺伝子およびその関連分子について遺伝学的解析および分子機能解析を行い、細胞内タンパク質輸送異常がいかなる細胞メカニズムの異常を介して神経変性を引き起こすのかを明らかにし、神経変性疾患の治療法開発に結びつく手がかりを得た。

研究成果の概要(英文)：We studied mechanisms how impaired intracellular protein trafficking cause neurodegeneration or neurodegenerative diseases by means of Drosophila genetics. yata gene, which we identified, is required for the trafficking of Amyloid precursor protein that is a causative molecule of Alzheimer's disease. We performed genetic and molecular analyses of yata gene and some related genes, clarified how impaired intracellular protein trafficking cause abnormalities in cellular mechanisms and eventually neurodegeneration, and obtained clues to develop therapeutic methods of neurodegenerative diseases.

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：脳神経科学・神経科学一般

キーワード：ショウジョウバエ 神経変性 神経変性疾患 アルツハイマー病 認知症 細胞内タンパク質輸送

1. 研究開始当初の背景

近年、ショウジョウバエを用いた疾患研究が様々な疾患を対象に行われているが、ショウジョウバエの系がその有用性を広く認められているのが神経変性疾患である。アルツハイマー病などの神経変性疾患には根治的治療法がない場合が多く、治療法の開発およびその手がかりとなる病態解明が社会的に重要な課題である。

われわれは、細胞内小胞輸送異常が神経変性を引き起こす重要なメカニズムであることを独自の研究から明らかにしてきた。われわれはアルツハイマー病の原因分子である APP (アミロイド前駆体タンパク質) の細胞内輸送に必要とされる新しい分子として yata をショウジョウバエで発見し、解析を進めてきた。さらに、yata の機能欠損が神経変性症状を引き起こすことを明らかにしてきた。yata ヌル変異体ショウジョウバエは、脳萎縮・複眼変性・早期死亡などの神経変性症状および発生異常を示す。yata 変異体では、APP およびいくつかのタンパク質が小胞体近傍に異常蓄積する。また、小胞体からゴルジ体への輸送小胞被覆である COPII が異常蓄積する。特に、yata のヌル変異体ショウジョウバエも、yata マウスオーソログのヌル変異体も、共に神経変性症状を呈することから、yata の機能欠損が種を超えて神経変性を引き起こすことがわかっている。

2. 研究の目的

本研究は、細胞内小胞輸送制御の神経変性における役割を、ショウジョウバエ個体遺伝学の手法を用いて明らかにしていくことを目的とした。yata および関連するその他の分子の分子機能・変異表現型・相互作用を個体レベルで調べていくことによって、細胞内小胞輸送に関わる分子群相互の機能的な関連を明らかにした。また、yata 変異体においては APP を含めたいくつかの分子の輸送に障害が生じる一方で、シナプトタグミンなどの恒常的にシナプスに輸送される分子の輸送は正常であることから、yata は APP および関連分子に対する特異的な細胞内輸送制御分子であることが示唆されている。さらに、それらの yata 標的分子のシナプスへの輸送が発生段階などの条件によって On/Off 制御を受けることから、yata はそれらの特異的標的分子の小胞体からの輸送をダイナミックに On/Off 制御していることが示唆されている。そこで本研究においては、yata およびその他の変異体の解析から、細胞内輸送 On/Off 制御の分子機構と脳機能・神経変性における生理的意義を明らかにすることを目指した。

3. 研究の方法

yata 変異およびその他の関連分子について、変異体または多重変異体を作成し、表現型解析を行った。ヒト遺伝性疾患の原因分子については、Gal4/UAS 法を用いて、ヒトの遺

伝子または疾患原因変異と同じ変異を導入したハエのオーソログ遺伝子を発現誘導することによって、疾患モデルショウジョウバエを作成した。主な表現型としては、羽化時の生存率、羽化後の寿命、複眼変性(外部形態、個眼ラブドメアの数、複眼の厚み)、脳容積などを調べた。免疫染色法によって得られた結果を共焦点レーザー顕微鏡を用いて観察することによって、封入体形成分子などの蓄積を調べた。定量 PCR 法やウェスタンブロット法によって、導入遺伝子の発現や異常分子の蓄積を調べた。透過型電子顕微鏡を用いて変異体の微細形態の異常の有無を調べた。

4. 研究成果

(1) われわれは、yata および関連するその他の分子について、ショウジョウバエの系において、遺伝学的解析および分子機能解析を行った。まずわれわれは、yata と分子間相互作用する候補分子を同定し、それらの候補分子の変異と yata 変異との遺伝学的相互作用を調べた結果、いくつかの分子の変異が yata 変異表現型に対して回復または増悪効果を示すことを見出した。このことから、分子間相互作用候補分子と yata とが、機能的な関連を確かに有していることが明らかになった。また、yata と類似の細胞機能に参与することが示唆されている前頭側頭型認知症原因分子の変異体について、多重変異で表現型解析を行った結果、ひとつの分子のノックダウンによって他の分子の変異表現型が有意にレスキューされることが見出された。

(2) われわれは、yata ヌル変異体ホモ接合体の詳細な表現型解析を、成虫の複眼および三令幼虫の脂肪体の系を用いて行った。その結果、蛋白質分解系に関連する異常が生じていることを示唆する知見が得られた。また、前頭側頭型認知症原因分子の変異体について、多重変異体においてみられたレスキュー効果について、定量 PCR 法を用いた転写産物の量の解析、ウェスタンブロット法を用いた翻訳産物の解析、免疫染色法による封入体形成分子の解析などを含む分子レベルでの解析によって、解釈の裏付けとなるデータを得た。また、yata の制御下にある発生段階特異的な細胞内トラフィッキング制御メカニズムに生じた異常がいかにして神経変性などの神経病態を引き起こしていくのかを明らかにするために、yata の細胞内トラフィッキング制御標的分子のひとつである HIG タンパク質について解析を行い、輸送調節とタンパク質分解に密接な関連があることを示唆する知見を得た。

(3) われわれは、yata ヌル変異体の複眼と脳における表現型を、光学顕微鏡および電子顕微鏡を用いて詳細に解析した。その結果、yata ヌル変異体においては、野生型の赤眼の

バックグラウンドと比較して、white 変異による白眼のバックグラウンドにおいては、空胞形成を含む顕著な進行性変性が生じることを見出した。さらに、その微細形態を電子顕微鏡を用いて観察することによって、細胞内トラフィッキングのメカニズムに何らかの異常が生じていることを示唆する異常な細胞内小器官の蓄積が生じていることを見出した。また、ヒトアルツハイマー病の原因分子をショウジョウバエにおいて Gal4/UAS システムを用いて発現誘導したアルツハイマー病モデルショウジョウバエの表現型に対して、yata 変異が修飾効果を示すことを見出した。この表現型について、共焦点レーザー顕微鏡などを用いて表現型解析を行った。

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 5 件)

Sam S. Berclay, Takuya Tamura, Hikaru Ito, Kyota Fujita, Kazuhiko Tagawa, Teppei Shimamura, Asuka Katsuta, Hiroki Shiwaku, Masaki Sone, Seiya Imoto, Satoru Miyano, Hitoshi Okazawa, Systems biology analysis of Drosophila in vivo screen data elucidates core networks for DNA damage repair in SCA1, Human Molecular Genetics, 査読有、23 巻、2014、1345-1364
DOI:10.1093/hmg/ddt524.

Kyota Fujita, Yoko Nakamura, Tsutomu Oka, Hikaru Ito, Takuya Tamura, Kazuhiko Tagawa, Toshikazu Sasabe, Asuka Katsuta, Kazumi Motoki, Hiroki Shiwaku, Masaki Sone, Chisato Yoshida, Masahisa Katsuno, Yoshinobu Eishi, Miho Murata, J. Paul Taylor, Erich E. Wanker, Kazuteru Kono, Satoshi Tashiro, Gen Sobue, Albert R. La Spada, Hitoshi Okazawa, A functional deficiency of TERA/VCP/p97 contributes to impaired DNA repair in multiple polyglutamine diseases, Nature Communications, 査読有、4 巻、2013、1816
DOI:10.1038/ncomms2828.

Chen Li, Hikaru Ito, Kyota Fujita, Hiroki Shiwaku, Yunlong Qi, Kazuhiko Tagawa, Takuya Tamura, Hitoshi Okazawa, Sox2 transcriptionally regulates PQBP1, an Intellectual Disability-Microcephaly causative gene, in neural stem progenitor cells, PLoS One, 査読有、8 巻、2013、e68627
DOI:10.1371/journal.pone.0068627

Takuya Tamura, Masaki Sone, Yoko Nakamura, Teppei Shimamura, Seiya Imoto, Satoru Miyano, Hitoshi Okazawa, A restricted level of PQBP1 is needed for

the best longevity of Drosophila, Neurobiology of Aging, 査読有、34 巻、2013、356.e11-356.e20
DOI:10.1016/j.neurobiaging.2012.07.015.

Takuya Tamura, Masaki Sone, Takeshi Iwatsubo, Kazuhiko Tagawa, Erich E. Wanker, Hitoshi Okazawa, Ku70 alleviates neurodegeneration in Drosophila models of Huntington's disease, PLoS One, 査読有、6 巻、2011、e27408
DOI:10.1371/journal.pone.0027408

[学会発表](計 24 件)

田村拓也, Sam S. Berclay, 藤田慶太、伊藤日加瑠、本木和美、島村徹平、田川一彦、勝田明寿香、曽根雅紀、井元清哉、宮野悟、岡澤均、脊髄小脳変性症 1 型の病態を制御する DNA 損傷修復機構、第 6 回 CBIR 若手インスパイアシンポジウム、2014 年 2 月 2 日、東京医科歯科大学(東京都文京区)

藤田慶太、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、塩飽裕樹、曽根雅紀、吉田千里、岡澤均、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、第 6 回 CBIR 若手インスパイアシンポジウム、2014 年 2 月 2 日、東京医科歯科大学(東京都文京区)

藤田慶太、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、塩飽裕樹、曽根雅紀、吉田千里、岡澤均、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、第 36 回日本分子生物学会年会、2013 年 12 月 4 日、神戸国際会議場、神戸国際展示場、神戸ポートピアホテル(兵庫県神戸市)

Masaki Sone, Mami Shiohara, Genetic analysis of the Drosophila yata gene that controls intracellular trafficking of Amyloid precursor protein, Neuroscience 2013 (Society for neuroscience annual meeting), 2013 年 11 月 11 日、San Diego Convention Center (アメリカ合衆国カリフォルニア州サンディエゴ)

藤田慶太、中村蓉子、岡努、伊藤日加瑠、田村拓也、田川一彦、岡澤均、TERA/VCP/p97 の DNA 修復機能不全は複数の神経変性疾患に關与する、第 32 回日本認知症学会学術集会、2013 年 11 月 9 日、キッセイ文化ホール・松本市総合体育館(長野県松本市)

田村拓也、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、第 6 回高次分子機能研究会、

2013年9月17日、軽井沢ホテル(長野県軽井沢町)

Takuya Tamura, Sam. S. Berclay, Kyota Fujita, Hikaru Ito, Kazumi Motoki, Teppei Shimamura, Kazuhiko Tagawa, Asuka Katsuta, Masaki Sone, Seiya Imoto, Satoru Miyano, Hitoshi Okazawa, Causative pathway underlying in spinocerebellar ataxia type 1, 第36回日本神経科学大会・第56回日本神経化学会大会・第23回日本神経回路学会大会合同年会, 2013年6月20日、国立京都国際会館(京都府京都市)

田村拓也, Sam S. Berclay, 藤田慶太、伊藤日加瑠、本木和美、島村徹平、田川一彦、勝田明寿香、曽根雅紀、井元清哉、宮野悟、岡澤均、脊髄小脳変性症I型におけるDNA損傷修復遺伝子の効果: in vivo スクリーニングによる解析, 第54回日本神経学会学術大会, 2013年5月30日、東京国際フォーラム(東京都千代田区)

田村拓也, Sam Barclay, 藤田慶太、伊藤日加瑠、本木和美、島村徹平、勝田明寿香、塩飽裕樹、曽根雅紀、田川一彦、井元清哉、宮野悟、岡澤均、脊髄小脳変性症I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CBIR若手インスパイアシンポジウム, 2013年2月23日、東京医科歯科大学(東京都文京区)

Chen 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CBIR若手インスパイアシンポジウム, 2013年2月23日、東京医科歯科大学(東京都文京区)

田村拓也、曽根雅紀、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, 2012年12月15日、福岡国際会議場・マリンメッセ福岡(福岡県福岡市)

田村拓也、曽根雅紀、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回日本分子生物学会年会, 2012年12月14日、福岡国際会議場・マリンメッセ福岡(福岡県福岡市)

田村拓也、中村蓉子、塩飽裕樹、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, 2012年10月26日~2012年10月28日、つくば国際会議場(茨城県つくば市)

田村拓也、Sam S. Berclay、伊藤日加瑠、黒巢佳祐、塩飽裕樹、島村徹平、田川一

彦、勝田明寿香、曽根雅紀、井元清哉、宮野悟、岡澤均、第35回日本神経科学大会, 2012年9月19日、名古屋国際会議場(愛知県名古屋市)

田村拓也、SCA1病態におけるDNA損傷修復異常, 第5回分子高次機能研究会, 2012年8月27日~2012年8月29日、KKRホテルびわこ(滋賀県大津市)

曽根雅紀、田村拓也、岩坪威、岡澤均、核内・核近傍の分子を標的とした神経変性疾患モデルショウジョウバエ研究, 東京医科歯科大学・第3回難治疾患共同研究拠点シンポジウム(招待講演), 2012年7月31日、東京医科歯科大学(東京都文京区)

田村拓也、曽根雅紀、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, 2012年5月24日、東京国際フォーラム(東京都千代田区)

曽根雅紀、ショウジョウバエを使って脳の病気を解き明かす, 日本動物学会第64回関東支部大会(招待講演), 2012年3月17日、東邦大学習志野キャンパス(千葉県船橋市)

鈴木章弘、曽根雅紀、細胞内蛋白質輸送スイッチング機構の脳機能発現における役割, 日本動物学会第64回関東支部大会, 2012年3月17日、東邦大学習志野キャンパス(千葉県船橋市)

田村拓也、曽根雅紀、Sam Berclay、伊藤日加瑠、塩飽裕樹、田川一彦、岡澤均、脊髄小脳変性症I型におけるDNA損傷修復の関与, 第34回日本神経科学大会, 2011年9月15日、パシフィコ横浜(神奈川県横浜市)

⑳ 田村拓也、曽根雅紀、伊藤日加瑠、塩飽裕樹、田川一彦、岡澤均、ポリグルタミン病とDNAダメージ, 第4回分子高次機能研究会, 2011年8月28日、かんぼの宿(熊本県阿蘇市)

㉑ 田村拓也、曽根雅紀、岡澤均、PQBP-1を介したポリグルタミン病の認知障害の分子メカニズム, 第52回日本神経学会学術大会, 2011年5月20日、名古屋国際会議場(愛知県名古屋市)

㉒ 阿部大数、曽根雅紀、田村拓也、白石理沙、岡澤均、in vivo スクリーニングに適した新規HD, SCA1モデル動物の開発, 第52回日本神経学会学術大会, 2011年5月19日、名古屋国際会議場(愛知県名古屋市)

㉓ 曽根雅紀、田村拓也、岡澤均、SCA1病態におけるDNA損傷修復機構の関与, 第52回日本神経学会学術大会, 2011年5月19日、名古屋国際会議場(愛知県名古屋市)

[図書](計0件)

〔産業財産権〕

出願状況（計 1 件）

名称：細胞腫選択的に光活性化可能なケージド化合物

発明者：古田寿昭、曾根雅紀、鈴木商信、岡映里

権利者：学校法人東邦大学

種類：特許

番号：特願 2013-36379

出願年月日：2013 年 2 月 26 日

国内外の別： 国内

取得状況（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：

〔その他〕

6．研究組織

(1)研究代表者

曾根 雅紀 (SONE, Masaki)

東邦大学・理学部・准教授

研究者番号：00397548

(2)研究分担者

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

(3)連携研究者

岡澤 均 (OKAZAWA, Hitoshi)

東京医科歯科大学・難治疾患研究所・教授

研究者番号：50261996