

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 8 日現在

機関番号：32661

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26350982

研究課題名(和文) 個体遺伝学による神経変性の普遍的分子機構解明：細胞内蛋白質輸送異常の関与

研究課題名(英文) Elucidating the molecular mechanisms of neurodegeneration by genetic studies focused on the mechanisms of 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) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：われわれはこれまでに、細胞内タンパク質トラフィック制御機構の異常が、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。本研究では、われわれが独自に発見した、アルツハイマー病原因分子APPの細胞内輸送調節分子であるyataに着目し、ショウジョウバエモデルを用いた遺伝学的解析から、APPのシナプス輸送の特異的阻害がアルツハイマー病のモデル病態に対して顕著な治療効果を示すことを見出した。また、前頭側頭型認知症の原因分子についても併せて解析を行い、発生前に生じた神経系の異常が神経変性の原因になりうることを見出した。

研究成果の概要(英文)：We have clarified that abnormalities in the regulatory mechanisms of intracellular protein trafficking cause neurodegeneration. In this study, we focused on the *Drosophila yata* gene which regulates intracellular trafficking of APP that is a causative molecule of Alzheimer's disease. We revealed that specific inhibition of synaptic transport of APP significantly ameliorates the pathology of the *Drosophila* model of Alzheimer's disease. We also analyzed the causative molecule of frontotemporal dementia and found that impaired neural development causes neurodegeneration.

研究分野：分子神経生物学

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 シ
ナプス 小胞輸送

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。

第一にわれわれは、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な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複眼や翅などの発生異常を示す。yata 変異体では、APP およびいくつかのタンパク質が細胞体に異常蓄積する。特に、yata のヌル変異体ショウジョウバエも、yata マウスオースログである SCYL1 遺伝子のヌル変異体も、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。

第二にわれわれは、小胞体上の輸送調節部位で機能する前頭側頭型認知症の原因分子 VCP/TER94 の機能欠損が神経変性を引き起こすことをショウジョウバエで見出し、解析を進めてきた。VCP 変異によって生じる前頭側頭型認知症では、TDP43 の局在異常と蓄積が生じる。

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的手法を用いて明らかにしていくことを目的とした。そのために、われわれが従来より解析してきた 2 種類の神経変性変異体ショウジョウバエである yata と VCP について併せて解析を行った。また、両変異体ともに、晩発性神経変性症状が生じる以前に、発生異常の表現型が観察される。そこで、本研究では、発生研究に適した特徴を持つショウジョウバエの系の利点を生かし、発生期に脳に生じた異常が後に晩発性の神経変性を引き起こす可能性について、個体遺伝学的手法を用いて検討した。

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 (APP および VCP) 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ス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。特に、ニューロンの細胞体・軸索・シナプスが空間的に明瞭に分離していて、なおかつヒト脳の大部分を占めるグルタミン酸作動性ニューロンのモデルとなる、幼虫運動ニューロンの系を用いて、免疫組織化学の手法などを用いて解析を行った。また、蛹および成虫脳の表現型の解析を、パラフィン切片のヘマトキシリン・エオジン染色によって行った。蛹および成虫脳においては、ホールマウント脳標本を免疫組織化学的に染色し、共焦点レーザー顕微鏡を用いて脳全体の連続光学切片像を取得し、それを用いてコンピュータを用いて三次元再構成解析を行うことによって、脳全体および脳の一部の領域の容積を測定する実験を行った。また、複眼および脳の標本を用いて、電子顕微鏡を用いた解析を行った。

4. 研究成果

(1) アルツハイマー病の原因分子である APP は、ニューロンの細胞体から軸索輸送によってシナプスに輸送され、シナプス末端においてシナプス形成を促進する生理的機能を有する。そこでわれわれは、ショウジョウバエアルツハイマー病モデルのシナプス病態に対して、yata 機能欠損が回復効果を示すかどうかを検討した。われわれは幼虫運動ニューロンにおいて、ヒト変異型 APP を Gal4/UAS システムを用いて発現誘導した。発現誘導した APP タンパク質は、運動ニューロンの細胞体から軸索を輸送されていき神経筋シナプスに局在した。これに対して、yata 遺伝子をノックダウンすることによって、APP の発現量には変化がなかったにもかかわらず、APP のシナプス局在が有意に減少した。その一方で、ファシクリン II、シナプトタグミン、システインストリングプロテインなどの他のシナプス分子のシナプス局在には変化がなかった。以上の結果から、yata ノックダウンによって APP のシナプス輸送を特異的に阻害できることがわかった。次にわれわれは、yata ノックダウンが APP 発現による表現型に及ぼす効果を調べた。APP 発現によって、神経筋シナプスの形態的異常 (異常に小さなブートの過形成) が引き起こされたのに対して、yata ノックダウンによってこの表現型が劇的に回復した。また、APP 発現によって、発生過程および羽化後の個体死亡が引き起こされたのに対して、yata ノックダウンによってこの表現型が劇的に回復した。以上の結果から、yata を標的として APP のシナプス輸送を特異的に減少させることによって、ショウジョウバエアルツハイマー病モデルの病態を回復させることができることがわかった。

(2) われわれは、前頭側頭型認知症の原因分子である VCP/TER94 について、遺伝学的解析を進めた。その結果、VCP 変異が発生途上の神経幹細胞の増殖異常を引き起こしてい

ることを示唆する知見を得た。また、VCP の下流ではたらく分子を同定し、この分子の過剰発現によって VCP 変異表現型が回復することを明らかにした。

(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、電子顕微鏡を用いて詳細に解析した。その結果、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。この異常な細胞内構造について遺伝学的な解析を行った結果、光に対する複眼細胞のダメージ防御機構と関連を有することを示唆する知見を得た。

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 Mizuki Tomizawa, Kohei Tsumaki, Masaki Sone, Characterization of the activity of beta-galactosidase from *Escherichia coli* and *Drosophila melanogaster* in fixed and non-fixed *Drosophila* tissues, *Biochimie Open*, 査読有、3巻、2016年、1-7

DOI:

<http://dx.doi.org/10.1016/j.biopen.2016.06.001>

2 Hikaru Ito, Kyota Fujita, Kazuhiko Tagawa, Xigui Chen, Hidenori Homma, Toshikazu Sasabe, Jun Shimizu, Shigeomi Shimizu, Takuya Tamura, Shin-ichi Muramatsu, Hitoshi Okazawa, HMGB1 facilitates repair of mitochondrial DNA damage and extends the lifespan of mutant ataxin-1 knock-in mice, *EMBO molecular medicine*, 査読有、7巻、2015、1-123

DOI: 10.15252/emmm.201404392

3 Risa Shiraiishi, Takuya Tamura, Masaki Sone, Hitoshi Okazawa, Systematic analysis of fly models with multiple drivers reveals different effects of Ataxin-1 and Hungtin in neuron subtype-specific expression, *PLoS One*, 査読有、9巻、2014、e116567

DOI: 10.1371/journal.pone.0116567

4 田村拓也, 岡澤均, 神経変性疾患の細胞死と Hippo pathway – 神経変性は Hippo pathway で制御されるか?、*医学のあゆみ*, 査読無、251巻、2014、449-454

[学会発表](計20件)

1 Masaki Sone, Effect of specific inhibition of synaptic delivery of APP by loss-of-function of yata in the *Drosophila* Alzheimer's disease model, EURON-Japan double degree program international workshop "New developments applied to neuroscience", 2017年1月25日、京都府立医科大学(京都府京都市)

2 太田麻友、Thomas Senard、Dennis Kruk、

鈴木章弘、中山実、浜千尋、曽根雅紀、ショウジョウバエ Hikaru genki タンパク質のシナプス輸送における発生時期特異的な制御機構、第39回日本分子生物学会年会、2016年12月2日、パシフィコ横浜(神奈川県横浜市)

3 中山実、西村理、工樂樹洋、曽根雅紀、浜千尋、アセチルコリン受容体集積を制御する分泌性シナプス間隙タンパク質 Hig、第39回日本分子生物学会年会、2016年12月2日、パシフィコ横浜(神奈川県横浜市)

4 風呂谷航人、矢島隆明、豊川誉陽、中山実、田村拓也、岡澤均、曽根雅紀、yata 機能欠損による APP シナプス輸送阻害のショウジョウバエアルツハイマー病モデルへの効果、第39回日本分子生物学会年会、2016年12月1日、パシフィコ横浜(神奈川県横浜市)

5 Koto Furotani, Takaaki Yajima, Motoharu Toyokawa, Minoru Nakayama, Takuya Tamura, Hitoshi Okazawa, Masaki Sone, Effect of inhibition of synaptic delivery of APP by loss-of-function of yata for the *Drosophila* Alzheimer's disease model, 日本ショウジョウバエ研究会第12回研究集会、2016年9月9日~2016年9月11日、立教大学(東京都豊島区)

6 Mayu Ota, Dennis Kruk, Thomas Senard, Akihiro Suzuki, Minoru Nakayama, Chihiro Hama, Masaki Sone, A developmental-stage specific regulatory mechanisms of synaptic transport of the *Drosophila* Hikaru genki protein, 日本ショウジョウバエ研究会第12回研究集会、2016年9月9日~2016年9月11日、立教大学(東京都豊島区)

7 Minoru Nakayama, Osamu Nishimura, Shigehiro Kuraku, Masaki Sone, Chihiro Hama, Regulation of acetylcholine receptor clustering by synaptic cleft protein Hig and the receptor subunits, 日本ショウジョウバエ研究会第12回研究集会、2016年9月9日~2016年9月11日、立教大学(東京都豊島区)

8 曽根雅紀、富澤美月、有本絵莉、塩原真美、鈴木えみ子、アミロイド前駆体タンパク質の細胞内輸送異常を示すショウジョウバエ yata 変異体複眼の形態解析、第39回日本神経科学大会、2016年7月20日、パシフィコ横浜(神奈川県横浜市)

9 太田麻友、Dennis Kruk、鈴木章弘、中山実、浜千尋、曽根雅紀、ショウジョウバエ Hikaru genki タンパク質のシナプスにおける発生時期特異的な制御機構、第39回日本神経科学大会、2016年7月20日、パシフィコ横浜(神奈川県横浜市)

10 風呂谷航人、矢島隆明、田村拓也、岡澤均、曽根雅紀、yata 機能欠損による APP シナプス輸送阻害のショウジョウバエアルツハイマー病モデルへの効果、第39回日本神経科学大会、2016年7月20日、パシフィコ横浜(神奈川県横浜市)

11 矢島隆明、田村拓也、岡澤均、曽根雅紀、ショウジョウバエアルツハイマー病モデ

ルにおける yata 遺伝子による APP 輸送制御、第 37 回日本分子生物学会年会、2014 年 11 月 25 日、パシフィコ横浜（神奈川県横浜市）

1 2 妻木廣平、曽根雅紀、シヨウジョウバエ個体内生理的条件における ガラクトシダーゼ活性の検討、2014 年 11 月 26 日、パシフィコ横浜（神奈川県横浜市）

1 3 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、曽根雅紀、井元清哉、宮野悟、岡澤均、脊髄小脳失調症 I 型の分子病態コアネットワークの解明、第 37 回日本分子生物学会年会、2014 年 11 月 26 日、パシフィコ横浜（神奈川県横浜市）

1 4 Takuya Tamura、Sam S Barclay、Kyota Fujita、Hikaru Ito、Kazumi Motoki、Teppei Shimamura、Kazuhiko Tagawa、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、第 37 回日本神経科学大会、2014 年 9 月 13 日、パシフィコ横浜（神奈川県横浜市）

1 5 Kyota Fujita、Yoko Nakamura、Tutomu Oka、Hikaru Ito、Takuya Tamura、Kazuhiko Tagawa、Toshikazu Sasabe、Asuka Katsuta、Kazumi Motoki、Hiroki Shiwaku、Chisato Yoshida、Masaki Sone、Hitoshi Okazawa、A functional deficiency of TERA/VCP/p97 contributes to impaired DNA repair in multiple polyglutamine diseases、第 37 回日本神経科学大会、2014 年 9 月 12 日、パシフィコ横浜（神奈川県横浜市）

1 6 田村拓也、岡澤均、昆虫モデルから見る神経疾患の特異性と普遍性、第 7 回分子高次機能研究会、2014 年 8 月 25 日、KKR 沼津はまゆう（静岡県沼津市）

1 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、曽根雅紀、井元清哉、宮野悟、岡澤均、脊髄小脳失調症 I 型における DNA 損傷修復異常のコアネットワーク解析、第 55 回日本神経病理学会総会学術研究会、2014 年 6 月 6 日、学術総合センター（東京都千代田区）

1 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、吉田千里、曽根雅紀、岡澤均、複数のポリグルタミン病に共通する TERA/VCP/p97 の DNA 損傷修復機能不全、第 55 回日本神経病理学会総会学術研究会、2014 年 6 月 6 日、学術総合センター（東京都千代田区）

1 9 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、曽根雅紀、井元清哉、宮野悟、岡澤均、脊髄小脳失調症 I 型における DNA 損傷修復異常のコアネットワーク解析、第 55 回日本神経学会学術大会、2014 年 5 月 23 日、

福岡国際会議場（福岡県福岡市）

2 0 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、吉田千里、曽根雅紀、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 55 回日本神経学会学術大会、2014 年 5 月 23 日、福岡国際会議場（福岡県福岡市）

〔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

曽根 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

(4)研究協力者

なし