

令和 3 年 6 月 4 日現在

機関番号：24303

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K07796

研究課題名(和文) ショウジョウバエモデルを用いたリボソーム病神経障害の分子病態解明と治療探索

研究課題名(英文) Uncovering the pathophysiological mechanisms of neurodevelopmental disorders associated with ribosomopathies using Drosophila

研究代表者

千代延 友裕 (Chiyonobu, Tomohiro)

京都府立医科大学・医学(系)研究科(研究院)・助教

研究者番号：40571659

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：リボソーム生合成に関わる遺伝子の変異による疾患は「リボソーム病」と総称される。細胞の基本機能を担うリボソームの障害による症状は広範で多臓器に渡り、患者は神経発達症も合併する。リボソーム病のひとつである Shwachman-Diamond 症候群の原因遺伝子 SBDS のショウジョウバエホモログ CG8549 を神経特異的にノックダウンすることにより、学習能力・運動能力の低下、多動・睡眠障害、けいれん閾値の低下などの表現型を認め、病理学的にはシナプス形態変化を認めることを明らかにした。これらはヒトの神経発達症で認める症状を模倣しており、本モデルはリボソーム障害による神経発達症の新規治療探索に応用できる。

研究成果の学術的意義や社会的意義

近年、神経発達症の病態としてリボソーム機能障害が着目されているが、神経症状に着目したリボソーム病のモデル生物はこれまでに報告がない。本研究で確立したショウジョウバエモデルは、リボソーム障害による神経発達症の新規治療探索研究に応用できると考えられ、学術的に意義の高い結果と考えている。

研究成果の概要(英文)：Genetic defects in ribosome biogenesis result in a group of diseases called ribosomopathies. Patients with ribosomopathies manifest multiorgan phenotypes, including neurodevelopmental disorders (NDDs). A well-characterized ribosomopathy, Shwachman-Diamond syndrome (SDS), is mainly associated with loss-of-function mutations in SBDS. In the present study, we investigated the phenotypes of *Drosophila melanogaster* following knockdown of the *Drosophila* ortholog of SBDS, CG8549, to directly study the neurological consequences. The pan-neuron-specific knockdown of CG8549 results in learning impairments, locomotive disabilities, hyperactivity, mechanically induced seizures, and anatomical defects in presynaptic terminals. Screening genes that interact with CG8549 by using this model will contribute to a better understanding of the pathogenesis of NDDs induced by defects in ribosomal biogenesis.

研究分野：小児神経学

キーワード：神経発達症 リボソーム ショウジョウバエ

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

リボソームはあらゆる生物の細胞内に存在し、mRNA の遺伝情報からタンパク質を合成する「翻訳」を担う。近年、種々の疾患でリボソーム生成に関わる遺伝子の変異が同定され、これらは「リボソーム病」と総称される。リボソーム病には Schwachman-Diamond 症候群、Diamond-Blackfan 貧血、先天性角化不全症などが含まれ、多くは造血障害を呈するため、これまでは血液領域を中心に研究が進められてきた。しかし、細胞の基本機能を担うリボソームの障害による症状は広範で多臓器に渡り、患者は知的能力症、自閉スペクトラム症、てんかんなどの神経合併症も認める。また、逆に神経発達症患者の網羅的遺伝子解析からリボソーム関連遺伝子のバリエーションが同定されることもあり、近年、神経発達症の病態としてリボソーム機能障害が着目されている。

以上より、神経機能障害に着目したリボソーム病モデル生物の解析は、希少疾患リボソーム病の神経合併症に対する新規治療探索につながることに加え、神経発達症の病態解明に新たな知見を与える可能性があると考えられた。

2. 研究の目的

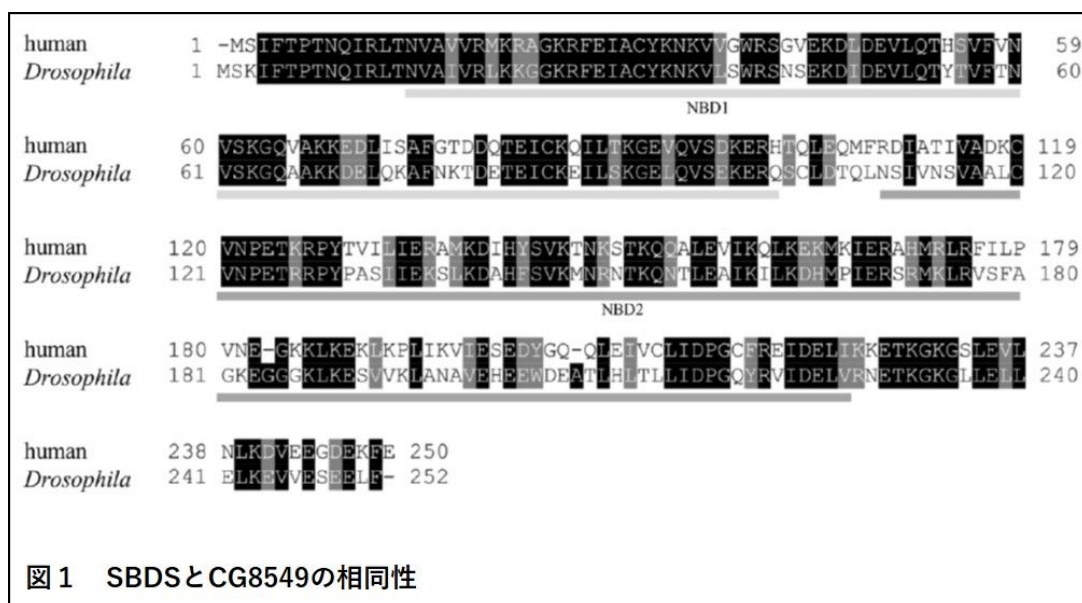
- (1) リボソーム病モデルショウジョウバエを用い、これまで着目されることのなかった神経障害に焦点を置いて、その分子病態を明らかにする。
- (2) さらに、モデルショウジョウバエの表現型を改善する遺伝的相互作用因子を同定し、リボソーム病神経障害の分子標的治療開発の基盤となる知見を得る。

3. 研究の方法

- (1) Schwachman-Diamond 症候群の原因遺伝子 *SBDS* のオルソログである *CG8549* を GAL4/UAS システムを用いて神経特異的にノックダウンしたショウジョウバエを作成し、その表現型を解析した。
- (2) *CG8549* の複眼特異的ノックダウンにより成虫複眼に形態異常が生じることから、観察が容易な複眼形態を指標に、交配により遺伝学的相互作用因子の探索を行った。

4. 研究成果

相同性比較では、*CG8549* とヒト *SBDS* の間に高い保存性が見られ、58%の同一性と87%の類似性が示された。2つ存在するヌクレオチド結合ドメインに関して、N末端ヌクレオチド結合ドメイン (NBD1) とC末端ヌクレオチド結合ドメイン (NBD2) がそれぞれ71%と49%の同一性を示し、高度に保存されていることが示された (図1)。以後、本研究では *CG8549* を *dSBDS* と記述する。



(1) 神経特異的 *dSBDS* ノックダウンショウジョウバエの表現型解析

2つの RNAi 系統と神経特異的 GAL4 ドライバーである *elav-GAL4* を用いて、神経特異的に *dSBDS* をノックダウンした2系統 (*elav>UAS-dSBDS-IR₄₇₆₋₈₂₁*, *elav>UAS-dSBDS-IR₆₁₇₋₉₈₀*) を作出した。成虫頭部における *dSBDS* の mRNA 発現量 (定量的 RT-PCR) は、対照よりも有意に低く、両系統と

もに効果的にノックダウンされていることが示された。

幼虫期の検討では、Crawling assay において、対照と比較して2つのノックダウン系統では異常な運動軌跡が見られ、始点から終点までの距離が有意に短縮しており、運動機能の障害が認められた(図2)。また、嗅覚と報酬による学習を評価する Odor/taste learning assay では、ノックダウン系統において報酬の有無による嗜好性の違いが認められず、嗜好性から計算した Learning Index (LI) に有意な低下を認め、学習機能の障害が明らかとなった。

成虫期の検討では、Climbing assay において、ノックダウン系統では加齢とともに進行する運動機能障害を認めた(図3)。また、機械刺激により誘発される痙攣を評価する Bang sensitivity assay により、ノックダウン系統においていれん閾値の有意な低下を認めた。さらに、活動量の概日リズムと睡眠時間の記録により、全ての活動時間帯においてノックダウン系統では対照と比較して活動量が多く、夜間の睡眠時間が短縮していることが示された。

最後に、幼虫の神経筋接合部の病理学的評価を行った。ノックダウン系統ではシナプス末端ブトン構造のサイズが対照と比較して有意に拡大しており、またプレシナプス活性帯の数が有意に増加していた(図4)。これらの結果は *dSBDS* がシナプスの形態形成や機能に重要な役割を果たしていることを示唆している。

これらの表現型はヒトの神経発達症で認める症状を模倣しており、本モデルはリボソーム障害による神経発達症の新規治療探索研究に応用できると考えられる。神経症状に着目したりボソーム病のモデル生物はこれまでに

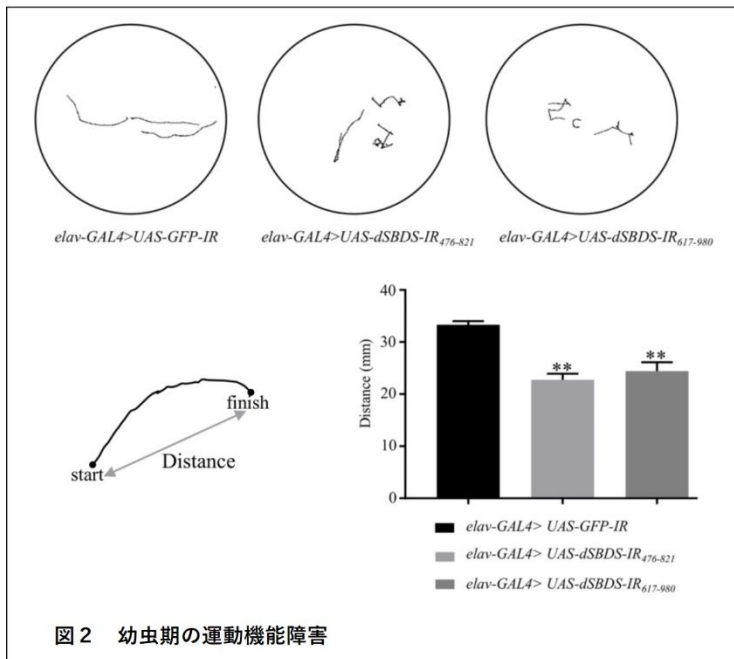


図2 幼虫期の運動機能障害

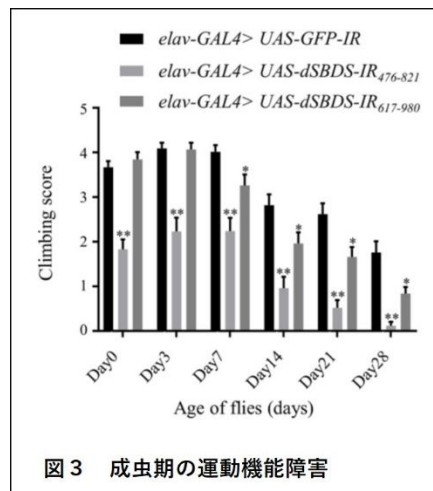


図3 成虫期の運動機能障害

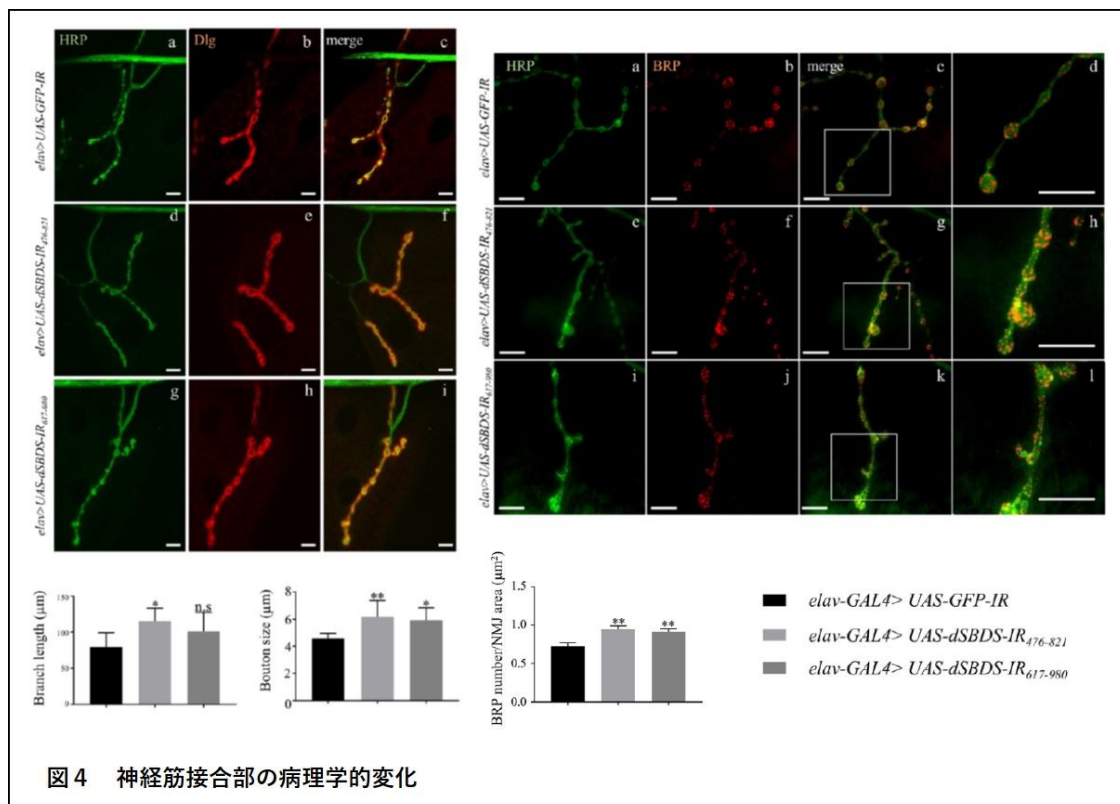


図4 神経筋接合部の病理学的変化

報告がなく、学術的に意義の高い結果と考えられる。

(2) 遺伝学的相互作用因子の探索

複眼原基特異的 *GAL4* ドライバーである *GMR-GAL4* を用いて、複眼原基特異的に *dSBDS* をノックダウンした系統は成虫複眼に形態異常を生じた。この観察が容易な複眼形態を指標に、交配により遺伝学的相互作用因子の探索を行った。その結果、アポトーシス阻害因子である *Diap1* および *p35* の過剰発現は複眼形態異常を回復させ、*Tor* (*Target of rapamycin*) の変異アリルは複眼形態異常を増強させることが示された。それらが示す意義についてはさらなる検討が必要であるが、治療標的の同定につながる重要な手がかりと考えられる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Ueoka Ibuki, Takai Akari, Yamaguchi Mizuki, Chiyonobu Tomohiro, Yoshida Hideki, Yamaguchi Masamitsu	4. 巻 386
2. 論文標題 Novel genetic link between the ATP-binding cassette subfamily A gene and hippo gene in <i>Drosophila</i>	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Experimental Cell Research	6. 最初と最後の頁 111733 ~ 111733
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.yexcr.2019.111733	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Takai Akari, Yamaguchi Masamitsu, Yoshida Hideki, Chiyonobu Tomohiro	4. 巻 21
2. 論文標題 Investigating Developmental and Epileptic Encephalopathy Using <i>Drosophila melanogaster</i>	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences	6. 最初と最後の頁 6442 ~ 6442
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/ijms21176442	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Takai Akari, Chiyonobu Tomohiro, Ueoka Ibuki, Tanaka Ryo, Tozawa Takenori, Yoshida Hideki, Morimoto Masafumi, Hosoi Hajime, Yamaguchi Masamitsu	4. 巻 739
2. 論文標題 A novel <i>Drosophila</i> model for neurodevelopmental disorders associated with Shwachman-Diamond syndrome	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Neuroscience Letters	6. 最初と最後の頁 135449 ~ 135449
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.neulet.2020.135449	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 高井あかり、千代延友裕、上岡伊吹、山口瑞季、田中領、吉田英樹、山口政光
2. 発表標題 ショウジョウバエモデルを用いたリボソーム生合成異常による神経発達症の病態解析
3. 学会等名 第42回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 山口政光、東裕美子、櫛村由紀恵、上岡伊吹、高井あかり、吉田英樹、千代延友裕、徳田隆彦
2. 発表標題 ショウジョウバエモデルで明らかにしたALS, CMT, ASDへのHippo遺伝子の関与
3. 学会等名 第72回日本細胞生物学会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 高井あかり、千代延友裕、上岡伊吹、田中領、戸澤雄紀、吉田英樹、森本昌史、山口政光
2. 発表標題 ショウジョウバエを用いた神経発達症研究 - リボソーム病への応用 -
3. 学会等名 第62回日本小児神経学会学術集会
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 分担者	吉田 英樹 (Yoshida Hideki) (30570600)	京都工芸繊維大学・応用生物学系・准教授 (14303)	

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 協力者	高井 あかり (Takai Akari)	京都府立医科大学・小児科学・大学院生	
研究 協力者	山口 政光 (Yamaguchi Masamitsu)	京都工芸繊維大学・応用生物学系・名誉教授	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------