

研究種目：若手研究（B）  
 研究期間：2008～2009  
 課題番号：20790612  
 研究課題名（和文） ポリグルタミン病における神経機能障害の関連遺伝子の *in vivo* スクリーニング  
 研究課題名（英文） A genetic screen for modifier of polyglutamine-induced neuronal dysfunction *in vivo*  
 研究代表者  
 藤掛 伸宏 (Fujikake Nobuhiro)  
 国立精神・神経センター 神経研究所 疾病研究第四部・科研費研究員  
 研究者番号：60467595

## 研究成果の概要（和文）：

神経変性疾患ポリグルタミン (PolyQ) 病では、発症の原因である異常伸長 PolyQ 蛋白質がミスフォールディングを起こし、神経細胞死を引き起こす。元来 PolyQ 病の神経症状はこの神経細胞死に起因すると考えられていたが、近年、神経症状は個々の神経細胞死よりもむしろ個体レベルでの可逆性神経機能障害に起因することが明らかにされた。しかし、その個体レベルでの可逆性神経機能障害の分子メカニズムは未だ解明されていない。本研究では、個体レベルでの可逆性神経機能障害に関わる遺伝子を同定しその分子メカニズムを明らかにすることを旨とし、PolyQ 病モデルショウジョウバエを用いたゲノムワイドな遺伝学的スクリーニングを行い、新規神経機能障害関連遺伝子として *Sup1* 遺伝子、*Sup5* 遺伝子を同定した。

## 研究成果の概要（英文）：

The neurological phenotypes of the polyglutamine (polyQ) diseases have been reported to be caused by neuronal dysfunction rather than cell death. However, the mechanisms involved in polyQ-induced neuronal dysfunction *in vivo* are not fully understood. To investigate the mechanisms of polyQ-induced neuronal dysfunction *in vivo*, we screened for modifier genes of neuronal dysfunction using a *Drosophila* polyQ disease model. As a result, we successfully identified *Sup1* and *Sup5* genes as new genes that are involved in the mechanisms of polyQ-induced neuronal dysfunction.

## 交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008 年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2009 年度	1,800,000	540,000	2,340,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：分子生物学・遺伝学・神経内科学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・神経内科学

キーワード：遺伝学、遺伝子、神経科学、脳神経疾患、ショウジョウバエ、神経変性疾患、ポリグルタミン病、スクリーニング

## 1. 研究開始当初の背景

近年、アルツハイマー病、パーキンソン病、ポリグルタミン (PolyQ) 病など多くの神経変性疾患において、それぞれ異なる蛋白質がいずれもミスフォールディングを起こし、凝集体を形成して神経細胞内外に蓄積することが明らかになった。このことから、これらの多彩な神経変性疾患において、蛋白質のミスフォールディング・凝集が神経変性を引き起こすという共通の発症分子メカニズムが存在すると思われるようになった。

このうち PolyQ 病は、原因蛋白質内のグルタミン鎖の異常伸長 (>40) により発症する遺伝性神経変性疾患の総称で、現在までにハンチントン病、種々の脊髄小脳失調症などの9疾患が知られており、いずれの疾患も有効な治療法は確立されていない。PolyQ 病では、異常伸長 PolyQ 蛋白質がミスフォールディングを生じ、その結果細胞内に凝集体として蓄積して、細胞レベル・個体レベルで様々な機能異常を来とし、最終的に神経細胞死を引き起こすと考えられている。これまで PolyQ 病の神経症状は神経細胞死に起因すると考えられていたが、近年 PolyQ 病モデル動物脳の詳細な解析から、著明な神経細胞死が観察される前から神経症状が出現することが示され、神経症状は神経細胞死よりもむしろ神経機能障害に起因し、さらに可逆性であることが明らかにされた。一方で最近 PolyQ 病モデルマウスの神経症状は、ニューロン回路内の細胞間相互作用の障害に起因することが示された。従って、PolyQ 病の発症における可逆性神経機能障害の解明のためには、培養細胞モデルではなく *in vivo* モデルを用いた解析が必須であると考えられた。

## 2. 研究の目的

本研究では、個体レベルでの神経機能障害の分子メカニズムを明らかにするため、可逆性神経機能障害に関わる遺伝子を網羅的に同定する。

## 3. 研究の方法

上記目的を達成するため、以下の研究を行った。

### (1) Def Flyを用いた1次スクリーニング

染色体上に様々な微小部分欠失を持つショウジョウバエ変異体のライブラリー Def Fly (欠失領域の総和は全ゲノムの約 95 % をカバー) と PolyQ 病モデルショウジョウバエ (GS-ExPolyQ Fly) との遺伝学的交配を行なった。そして次世代のショウジョウバエ (GS-ExPolyQ/Def Fly) の神経機能障害により引き起こされる寿命短縮を評価することで、GS-ExPolyQ Fly の可逆性神経機能障害の関連遺伝子が存在する候補染色体領域を決定した。(1次スクリーニング)

### (2) 遺伝子変異体ショウジョウバエを用い

## た2次スクリーニング

1次スクリーニングで同定した候補染色体領域内に存在する遺伝子に変異を持つショウジョウバエを用いて、1次スクリーニングと同様の解析を行ない、可逆性神経機能障害の関連遺伝子を同定した。(2次スクリーニング)

## 4. 研究成果

### (1) Def Flyを用いた1次スクリーニング

異常伸長 PolyQ 蛋白質を薬剤 (RU486) 誘導性に神経系に発現して神経機能障害による寿命短縮を来たす PolyQ 病モデルショウジョウバエ GS-ExPolyQ Fly を樹立した。この GS-ExPolyQ Fly と、Def Fly (224 系統) との遺伝学的交配を行ない、寿命短縮が改善される 11 系統の同定に成功した。さらに同定したこれら 11 の染色体微小領域欠損の神経細胞死 (PolyQ 病モデルショウジョウバエの複眼変性) に対する効果を検討し、神経細胞死を抑制しない 9 染色体微小領域を絞り込んだ。これら 9 染色体微小領域には神経機能障害特異的に働く遺伝子が存在すると考えられた。

### (2) 遺伝子変異体ショウジョウバエを用いた2次スクリーニング

2次スクリーニングとして、1次スクリーニングで同定した 9 つの染色体微小領域内に存在する各遺伝子に変異を持つショウジョウバエを用いて実験を行い、*Sup1* 遺伝子あるいは *Sup5* 遺伝子に変異を持つことで PolyQ 病の神経機能障害が抑制されることを明らかにした。さらに *Sup1* あるいは *Sup5* 遺伝子の神経系での RNAi によるノックダウンが GS-ExPolyQ Fly の寿命短縮を抑制することを明らかにし、PolyQ 病神経機能障害の新規関連遺伝子として *Sup1*、*Sup5* 遺伝子を同定した。

今後、*Sup1*、*Sup5* が関わる PolyQ 病神経機能障害の分子メカニズムを明らかにすることによって、新たな治療法の開発につながる事が期待される。

## 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 7 件)

- ① Nagai Y, Fujikake N, Popiel HA, Wada K. Induction of molecular chaperones as a therapeutic strategy for the polyglutamine diseases. *Curr. Pharm. Biotech.*, 11, 188-197, 2010 査読有
- ② 永井義隆, 藤掛伸宏 神経疾患とシャペロン *Clin. Neurosci.*, 27, 368-369, 2009 査読無
- ③ Okamoto Y, Nagai Y, Fujikake N, Akiko Popiel H, Yoshioka T, Toda T, Inui T.

Surface plasmon resonance characterization of specific binding of polyglutamine aggregation inhibitors to the expanded polyglutamine stretch. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 378, 634-639, 2009 査読有

- ④ Kanagawa M, Nishimoto A, Chiyonobu T, Takeda S, Miyagoe-Suzuki Y, Wang F, Fujikake N, Taniguchi M, Lu Z, Tachikawa M, Nagai Y, Tashiro F, Miyazaki J, Tajima Y, Takeda S, Endo T, Kobayashi K, Campbell KP, Toda T. Residual laminin-binding activity and enhanced dystroglycan glycosylation by LARGE in novel model mice to dystroglycanopathy. *Hum. Mol. Genet.* 18, 621-631, 2009 査読有
- ⑤ Popiel HA, Nagai Y, Fujikake N, Toda T. Delivery of the aggregate inhibitor peptide QBP1 into the mouse brain using PTDs and its therapeutic effects on polyglutamine disease mice. *Neurosci. Lett.*, 449, 87-92, 2009 査読有
- ⑥ Nakayama H, Hamada M, Fujikake N, Nagai Y, Zhao J, Hatano O, Shimoke K, Isosaki M, Yoshizumi M, Ikeuchi T. ER stress is the initial response to polyglutamine toxicity in PC12 cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 377, 550-555, 2008 査読有
- ⑦ Fujikake N, Nagai Y, Popiel HA, Okamoto Y, Yamaguchi M, Toda T. Heat shock transcription factor 1 (HSF1)-activating compounds suppress polyglutamine-induced neurodegeneration through induction of multiple molecular chaperones. *J. Biol. Chem.*, 283, 26188-26197, 2008 査読有

[学会発表] (計 11 件)

- ① ポピエル明子 ポリグルタミン病モデルマウスに対する凝集阻害ペプチド QBP1 を用いた遺伝子治療 第 82 回日本生化学会, 2009. 10. 21, ポートアイランド, 神戸
- ② Fujikake N. Opposing effects of HSF1 expression on tau- and polyglutamine-induced neurodegeneration *in vivo*. 4th

International Congress on Stress Responses in Biology and Medicine, 2009.10.6, Gateaux Kingdom Sapporo Hotel & Spa Resort, Sapporo, Japan

- ③ Nagai Y. 17-AAG, an HSF1-activator, suppresses polyglutamine-induced neurodegeneration via induction of molecular chaperones. 4th International Congress on Stress Responses in Biology and Medicine, 2009.10.6, Gateaux Kingdom Sapporo Hotel & Spa Resort, Sapporo, Japan
- ④ 永井義隆 凝集阻害ペプチド QBP1 を用いたポリグルタミン病に対する分子標的治療法の開発 第 54 回日本人類遺伝学会, 2009. 9. 23, グランドプリンスホテル高輪, 東京
- ⑤ 永井義隆 熱ショック転写因子 (HSF1) 活性化は分子シャペロン群の発現を誘導し、ポリグルタミン病の神経変性を抑制する 第 52 回日本神経化学会, 2009. 6. 22, 伊香保温泉 ホテル天坊, 群馬
- ⑥ Fujikake N. Pharmacological activation of heat shock transcription factor 1 suppresses polyglutamine-induced neurodegeneration through induction of multiple molecular chaperones. 5th Gordon Research Conference on CAG Triplet Repeat Disorders, 2009. 5. 31, Waterville Valley Resort, USA
- ⑦ Nagai Y. Surface plasmon resonance as a useful technique for screening for specific polyglutamine aggregation inhibitors. 5th Gordon Research Conference on CAG Triplet Repeat Disorders, 2009. 5. 31, Waterville Valley Resort, USA
- ⑧ 岡本 佑馬 表面プラズモン共鳴法を用いた異常伸長ポリグルタミンタンパク質に対する凝集阻害分子の結合特異性の解析 第 51 回日本神経化学会, 2008. 9. 11, 富山国際会議場, 富山
- ⑨ 藤掛 伸宏 17-AAG 投与による熱ショック転写因子の活性化はポリグルタミンが引き起こす神経変性を抑制する 第 31 回日本神経科学会, 2008. 7. 10, 東京国際フォーラム, 東京

- ⑩ 永井 義隆 ポリグルタミン蛋白質の毒性構造変移の捕捉－露出 $\beta$ シート仮説の提唱－ 第 31 回日本神経科学会, 2008. 7. 9, 東京国際フォーラム, 東京
- ⑪ 永井 義隆 蛍光相関分光法を用いた細胞内ポリグルタミン蛋白質オリゴマーの検出とその阻害 第 49 回日本神経学会 2008. 5. 15, パシフィコ横浜, 横浜

[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

藤掛 伸宏 (Fujikake Nobuhiro)

国立精神・神経センター 神経研究所 疾病研究第四部・科研費研究員

研究者番号：60467595