

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 7 日現在

機関番号：82611

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24591286

研究課題名(和文) ショウジョウバエを用いたALS原因遺伝子群ネットワークのin vivo解析

研究課題名(英文) In vivo analyses of networks in ALS-causing genes using fly models

## 研究代表者

藤掛 伸宏 (Fujikake, Nobuhiro)

独立行政法人国立精神・神経医療研究センター・神経研究所疾病研究第四部・科研費研究員

研究者番号：60467595

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)：筋萎縮性側索硬化症(ALS)は運動ニューロンが変性・脱落して運動障害を来す難治性の神経変性疾患である。近年、ALS発症の原因遺伝子が多数同定され、これらの遺伝子の機能は多岐にわたることが明らかとなった。本研究では、これらALS原因遺伝子群の相互関係を複数のALSモデルショウジョウバエを用いた解析により解明することで、ALSに共通する病態・治療標的を明らかにすることを目的とした。本研究から、微小管依存的な細胞内輸送の機能低下がALS原因遺伝子TDP-43の毒性獲得関与を示し、さらに微小管依存的輸送の活性化がALSの新たな治療標的候補となることが明らかとなった。

研究成果の概要(英文)：Amyotrophic lateral sclerosis (ALS) is a progressive neurodegenerative disease which is characterized by selective motor neuron degeneration in brain and spinal cord. Recently, many genes which function in various cellular events have been identified as ALS-causing genes. To elucidate the common pathomechanisms and therapeutic targets of ALS caused by various genes, we analyzed networks in ALS-causing genes using ALS model flies. In this study, we successfully show that toxicity of TDP-43, an ALS-causing gene, is evoked by dysfunction of microtubule-dependent transport, and revealed that activation of microtubule-dependent transport is a new therapeutic target for ALS.

研究分野：神経変性疾患

キーワード：神経分子病態学 遺伝学 神経科学 筋萎縮性側索硬化症 TDP-43 dynactin 1 神経変性疾患 ショウジョウバエ

## 1. 研究開始当初の背景

筋萎縮性側索硬化症 (ALS) は運動ニューロンが変性・脱落して運動障害を来し死亡する難治性の神経変性疾患であり、患者のおよそ 10% は遺伝性に発症する。1993 年に一部の遺伝性 ALS 家系の原因として SOD1 遺伝子変異が初めて同定され、これまでは変異 SOD1 を中心に ALS の研究が進められてきた。しかし近年、遺伝性 ALS 家系の分子遺伝学的解析から驚くべきことに RNA 代謝 (TDP-43、FUS) や蛋白質分解 (UBQLN2、VCP)、シグナル伝達 (OPTN) など細胞内での機能が全く異なる遺伝子の変異が次々と同定され (Andersen et al. Nat Rev Neurol, 2011)、ALS の病態は単一ではなく多岐にわたることが明らかとなった。

一方でこれまで変異 SOD1 を標的として ALS の治療候補が開発されてきたが、これらの ALS 患者に対する臨床試験では期待される成果が得られていない (Andrews Curr Neurol Neurosci Rep, 2009)。これらのことから従来の単一の原因遺伝子に基づく研究だけでは ALS の本質的な病態の解明および臨床的に有効な治療薬の開発は困難であり、それらのためには多数の原因遺伝子の相互関係すなわち ALS 原因遺伝子群ネットワークを明らかにする必要があると考えられる。

ALS 原因遺伝子群の相互関係を様々な遺伝性 ALS 変異により発症する多数のモデル動物を用いて検討するには、マウスでは大規模な施設が必要となるため、ショウジョウバエや線虫のような小型の実験動物モデルの方が適している。近年、神経変性疾患の *in vivo* モデルとして注目されてきているショウジョウバエは、体長が約 3 mm と小さく多産なため狭い飼育スペースで多系統の維持・解析が可能であり、加えて世代時間が短く (10 ~ 14 日)、遺伝子組換え体の作製が安価 (約 3 万円 / 遺伝子) なため、複数の疾患モデルを樹立し解析するにはマウスに比べてはるかに優れている (Marsh et al. Neuron, 2006)。申請者は、これまで一貫して神経変性疾患モデルショウジョウバエを用いた病態解明・治療法開発研究を行ってきており (FEBS Lett, 2005、J Biol Chem, 2008)、現在申請者の所属している研究室では 120 系統以上からなる様々な神経変性疾患のモデルショウジョウバエのライブラリーを保有している。申請者自身も若手研究 (B) (平成 20 ~ 21 年度、H22 ~ 23 年度) の支援を受け、TDP-43 を発現するショウジョウバエを樹立し、これらのショウジョウバエが複眼変性、進行性運動障害を呈し、寿命短縮を認めることを明らかにした。続いて FUS を発現するショウジョウバエを樹立し、TDP-43 が惹き起す神経変性を FUS が相乗的に増悪することを遺伝学的解析にて明らかにした。すなわち、ALS 原因遺伝子群ネットワークの解析におけるショウジョウバエの有用性を示していた。

## 2. 研究の目的

ALS の新しいモデル動物として、遺伝性 ALS 原因遺伝子 (OPTN、VCP、UBQLN2、DCTN1、C9ORF72) を発現し神経変性・神経症状を再現するショウジョウバエを多系統樹立する。これら ALS 原因遺伝子発現ショウジョウバエを用いて遺伝学的な解析を行い、相乗的に神経変性・神経症状が増悪する ALS 原因遺伝子の組み合わせを次々と明らかにすることで、*in vivo* での ALS 原因遺伝子群ネットワークを解明する。

## 3. 研究の方法

1) 様々な ALS 原因遺伝子を発現するモデルショウジョウバエの樹立  
ALS の原因遺伝子 (OPTN、VCP、UBQLN2、DCTN1) の cDNA は Thermo Fisher Scientific 社より購入し、PCR 法により ALS 変異を cDNA に導入する。C9ORF72 は非翻訳領域における GGGGCC リピートの異常伸長変異であるため、ヒト由来培養細胞のゲノムから PCR 法により C9ORF72 遺伝子の非翻訳領域を増幅してプラスミドへクローニングし、変異を導入 (GGGGCC 700 リピート、1600 リピート) する。それぞれの野生型・変異型遺伝子を pUAST ベクターへ挿入し、遺伝子組換えショウジョウバエを作製する (BestGene 社に委託)。

2) 多数の ALS モデルショウジョウバエを用いた遺伝学的な解析

上記 1) で作製した ALS モデルショウジョウバエを用いて遺伝学的手法により、2 つの原因遺伝子をそれぞれ単独に、および同時にショウジョウバエ複眼変性に発現させ、相乗的あるいは相加的な複眼変性増悪の有無を評価する。

次にヒト ALS 原因遺伝子のショウジョウバエホモログに対する RNAi を発現するノックダウンショウジョウバエをショウジョウバエストックセンター (VDRC) から入手し、複眼変性の増悪が相乗的であるか相加的であるか遺伝学的手法にて評価する。

## 4. 研究成果

1) 様々な ALS 原因遺伝子を発現するモデルショウジョウバエの樹立

ヒト DCTN1 遺伝子を発現するショウジョウバエを作成し、複眼にて発現させた結果、DCTN1 の発現により弱い複眼変性を認めた。GGGGCC リピートの発現では強い複眼変性を認めた。UBQLN2 の発現では複眼にわずかな異常を認めたが、はっきりとは結論できなかった。一方で VCP の発現およびショウジョウバエ OPTN オルソログの RNAi によるノックダウンでは明らかな表現型を認めなかった。

2) 多数の ALS モデルショウジョウバエを用いた遺伝学的な解析

TDP-43 を発現するショウジョウバエと新たに樹立した様々なショウジョウバエを交

配した結果、RNAiによるDCTN1の発現低下によりTDP-43複眼変性が増悪することが明らかとなった。一方でDCTN1の過剰発現により複眼変性が抑制されたことから、TDP-43とDCTN1は遺伝学的に関連があることが示唆された。

DCTN1は微小管依存的輸送に働くことから、微小管依存的輸送に関わる他の遺伝子の変異体についても遺伝学的交配を行った結果、順行輸送に関わるkinesinおよび逆行輸送に関わるdyneinの機能低下においてもTDP-43複眼変性が増悪することが明らかとなった。

さらにDCTN1について免疫沈降を行った結果、細胞内でTDP-43がDCTN1と結合していることが明らかとなった。そしてDCTN1をノックダウンするとTDP-43の細胞内輸送が遅延することを明らかにし、これらのことからTDP-43はDCTN1依存的に細胞内で輸送されていることが明らかとなった。

DCTN1のノックダウンによりTDP-43蛋白質がどのように変化するか免疫組織化学にて検討したところ、TDP-43の凝集体が増加していることを明らかにした。そしてさらに蛍光相関分光法を用いてショウジョウバエ複眼で発現したEGFP-TDP-43を解析したところ、DCTN1のノックダウンによりTDP-43のオリゴマー形成が促進されることを明らかにした。TDP-43のオリゴマーが細胞毒性を持つことを確認するためにin vitroで作成したTDP-43オリゴマーをNeuro-2A細胞の培養液中に添加したところ、細胞死が有意に生じた。以上の結果から、DCTN1のノックダウンはTDP-43の細胞内輸送を障害し、毒性構造体であるオリゴマー形成を促すと結論した。

一方で、今回得られた知見をALSの治療法開発に役立てることを考えて、微小管依存的輸送を活性化する薬剤をTDP-43発現ショウジョウバエに投与した結果、寿命の延長、複眼変性の抑制、そして毒性オリゴマーの減少が確認され、微小管依存的輸送活性化剤が治療効果を発揮することが明らかとなった。

## 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)

Saitoh Y, Fujikake N, Okamoto Y, Popiel HA, Hatanaka Y, Ueyama M, Suzuki M, Gaumer S, Murata M, Wada K, Nagai Y. p62 plays a protective role in the autophagic degradation of polyglutamine protein oligomers in polyglutamine disease model flies. *J Biol Chem.* 2015 290:1442-53. doi: 10.1074/jbc.M114.590281.

Miura E, Hasegawa T, Konno M, Suzuki M, Sugeno N, Fujikake N, et al. VPS35 dysfunction impairs lysosomal degradation of -synuclein and

exacerbates neurotoxicity in a *Drosophila* model of Parkinson's disease. *Neurobiol Dis.* 2014 71:1-13. doi: 10.1016/j.nbd.2014.07.014.

Azuma Y, Tokuda T, Shimamura M, Kyotani A, Sasayama H, Yoshida T, Mizuta I, Mizuno T, Nakagawa M, Fujikake et al. Identification of ter94, *Drosophila* VCP, as a strong modulator of motor neuron degeneration induced by knockdown of Caz, *Drosophila* FUS. *Hum Mol Genet.* 2014 23:3467-80. doi: 10.1093/hmg/ddu055.

Sasayama H, Shimamura M, Tokuda T, Azuma Y, Yoshida T, Mizuno T, Nakagawa M, Fujikake N et al. Knockdown of the *Drosophila* fused in sarcoma (FUS) homologue causes deficient locomotive behavior and shortening of motoneuron terminal branches. *PLoS One.* 2012 7:e39483. doi: 10.1371/journal.pone.0039483.

上山盛夫、藤掛伸宏、永井義隆 その他のFTLD-異常蛋白質の視点から *Clinical Neuroscience* 2015 33:312-4 <http://www.chugaiigaku.jp/item/detail.php?id=1656>

### 〔学会発表〕(計 3件)

藤掛伸宏、木村展之、長野清一、斉藤勇二、横関明男、小野寺理、和田圭司、永井義隆 DCTN1依存的輸送の障害はTDP-43のオリゴマー形成を促進する 第55回日本神経学会学術大会 2014.5.24 福岡国際会議場、福岡

Nobuhiro Fujikake, Nobuyuki Kimura, Yuji Saitoh, Akio Yokoseki, Osamu Onodera, Keiji Wada, Nagai Yoshitaka Aggregation of TDP-43 is triggered by insufficiency of microtubule-dependent transport in the cytoplasm, leading to neurodegeneration in *Drosophila* AD/PD 2013 2013. 3. 6-10 Firenze Fiera, Florence, Italy

Nobuhiro Fujikake, Nobuyuki Kimura Yuji Saitoh, Mari Suzuki, Akio Yokoseki, Osamu Onodera, Keiji Wada, Yoshitaka Nagai Impairment of microtubule-dependent transport of TDP-43 triggers its aggregation, leading to neurodegeneration in *Drosophila* models of TDP-43 proteinopathies SfN2013 2013.11.9-13 San Diego, CA, USA

### 〔図書〕(計 0件)

〔産業財産権〕

出願状況（計 0件）

取得状況（計 0件）

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

藤掛 伸宏 (Nobuhiro Fujikake)

独立行政法人国立精神・神経医療研究セン

ター 神経研究所 科研費研究員

研究者番号：60467595