

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 13 日現在

機関番号：24303

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2014～2015

課題番号：26893227

研究課題名(和文)モデルショウジョウバエを用いたALS病態機序の解明と新規治療法への応用

研究課題名(英文)The pathologic clarification of ALS and its application to new therapeutic strategy by using Drosophila model.

研究代表者

東 裕美子 (Azuma, Yumiko)

京都府立医科大学・医学部附属病院・専攻医

研究者番号：00453093

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,300,000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選択的に変性・脱落する難治性の神経変性疾患であり、その分子機序は未解明である。本研究ではALS発病に関与する分子メカニズムを解明するために、家族性ALSの原因遺伝子であるTAR DNA-binding protein43(TDP-43)及びFused in sarcoma(FUS)をノックダウンしたショウジョウバエモデルを樹立した。そしてゲノムワイドな遺伝学的スクリーニングを行い両モデルに共通して相互作用する新規関連候補遺伝子を複数同定した。またFUSノックダウンにより生じる複眼異常の分子メカニズムにはEGFR経路が関与していることを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：Amyotrophic lateral sclerosis (ALS) is a devastating neurodegenerative disease that is characterized by degeneration of motor neurons in the brain and spinal cord. The molecular mechanisms of ALS have not been clarified. To investigate the mechanisms of ALS-induced neuronal dysfunction in vivo, we employed Drosophila TDP43- or Drosophila FUS- knockdown ALS models for suitable genetic-screening. As a result, we successfully identified new some genes that are involved in both ALS model flies.

And, mutation in EGFR pathway-related genes rescued the Drosophila FUS-knockdown induced rough-eye phenotype; fusion of cone cells and ommatidia. Our findings suggest that Drosophila FUS negatively regulates the EGFR signaling pathway.

研究分野：分子生物学・遺伝学・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 筋萎縮性側索硬化症

## 1. 研究開始当初の背景

筋萎縮性側索硬化症(ALS)は原因不明の選択的な運動ニューロン変性により四肢筋力低下、球麻痺、呼吸筋麻痺を来し、人工呼吸器を装着しなければ発症から5年以内に死に至る疾患である。現在根本治療薬はなく、病態の解明及び治療法の開発が切望されている。

ALSの10%を占める家族性ALSでは、*TAR DNA-binding protein43(TDP-43)*や*Fused in sarcoma(FUS)*などの重要な原因遺伝子が近年報告されており、TDP-43は孤発性ALSの運動ニューロンへの異常蓄積が確認されている。TDP-43とFUSはともにRNA代謝に関連する蛋白質で、これらは正常細胞では核に存在するが、ALSの運動ニューロンでは細胞質に異常な凝集体を形成する(gain of toxic function)ために、本来の核局在が失われている(loss of function)。我々はこのFUSのloss of functionに注目し、2009年からALSのモデル動物としてFUSをノックダウン(KD)した遺伝子改変ショウジョウバエの作成と解析に取り組んできた。その結果、(1)FUSのショウジョウバエホモログである*Cabeza(Caz)*をKDしたショウジョウバエシステムを樹立し、Cazの機能喪失が運動ニューロン障害を来すことと、(2)Caz-KDモデルショウジョウバエで認められる運動神経変性を修飾する因子として、ヒトVCPのショウジョウバエホモログである*ter94*を同定した。

## 2. 研究の目的

モデルショウジョウバエを用いて家族性ALSに共通して相互作用する遺伝子を探索し、ALSの原因遺伝子及び関連分子の相互作用のメカニズムを解明する。着目遺伝子として、RNA代謝に関連する*TAR DNA-binding protein43(TDP-43)*あるいは*Fused in sarcoma(FUS)*、またALSの危険因子である*FIG4*のloss of functionモデルを樹立し、その機能解析を行う。さらにFUSのショウジョウバエモデルにおける成虫複眼の形態異常の分子メカニズムを解明する。

## 3. 研究の方法

### (1) FUSのノックダウンが引き起こす複眼変性のメカニズム

FUSのショウジョウバエホモログである*Cabeza(Caz)*をノックダウンすることで引き起こされる成虫複眼の形態異常の分子メカニズムを明らかにするために、Caz-KDモデルを用いて遺伝学的相互作用のスクリーニング及び幼虫期に分化する光受容細胞、蛹期に分化する錐細胞(cone cell)をそれぞれ免疫組織化学的に解析する。

### (2) TDP-43のノックダウンモデルの樹立

TDP-43のショウジョウバエホモログである*TBPH*をノックダウンすることで引き起こされる複眼及び神経系における神経変性を解析し、ALSモデルとしての妥当性を検討する。

複眼の形態学的異常の評価。目的とする遺伝子を複眼特異的に発現させて、成虫複眼の形態学的異常の有無を走査型電子顕微鏡により観察する。

model flyの運動能力評価。成虫が管状のガラス壁面を上る様子をビデオで記録し、30秒間に壁面を上った速さをclimbing scoreとして数値換算して解析する。

model flyの運動神経変性評価。神経筋接合部(NMJ)における運動神経終末の形態学的検討を行う。3齢幼虫で筋肉上のNMJを分離し、抗HRP抗体を用いて染色し、共焦点レーザー顕微鏡にてNMJにおける運動神経終末のシナプス長およびシナプスポタンクの総数を比較検討する。

寿命評価。3日毎にmodel flyの生存総数を数えて比較解析する。

### (3) FIG4のノックダウンモデルの樹立

ALSの危険因子である*FIG4*をノックダウンすることで引き起こされる複眼及び神経系における神経変性を解析する。解析方法は(2)の～に準じる。

### (4) ALSモデルショウジョウバエを用いた候補遺伝子のスクリーニング

Caz-KDあるいは*TBPH-KD* model flyと機能的相互作用する候補分子をもつショウジョウバエシステムとの遺伝学的交配を行い、次世代のショウジョウバエを解析する。解析はスクリーニングに適した成虫複眼を走査型電子顕微鏡により観察する。またショウジョウバエ突然変異系統ライブラリーとの交配を行い、網羅的な遺伝学的スクリーニングを併せて行う。

## 4. 研究成果

### (1) FUSのノックダウンが引き起こす複眼変性のメカニズム

FUSのショウジョウバエホモログである*Cabeza(Caz)*をノックダウンすることで引き起こされる成虫複眼の形態異常はアポトーシス阻害因子p35にて改善し、caspase3活性が上昇していたことより、過剰なapoptosisが誘導されていることが示唆された。さらに個眼の構成細胞である錐細胞(cone cell)はCaz-KDにより融合することから、Cazはcone cellの分化誘導を抑制するために成虫複眼の形態異常が起こることが示唆された。また、Cazはcone cellの分化に関与するECFR経路を負に制御していることを明らかにした。以上の結果をExp Cell Res誌(Exp Cell Res. 326; 36-45, 2014.)に報告した。

### (2) TDP-43のノックダウンモデルの樹立

*TBPH*をノックダウンすると成虫複眼の形態異常、運動能力の低下、寿命の低下、神経筋接合部におけるsynaptic branchの短縮が生じることを明らかにした。

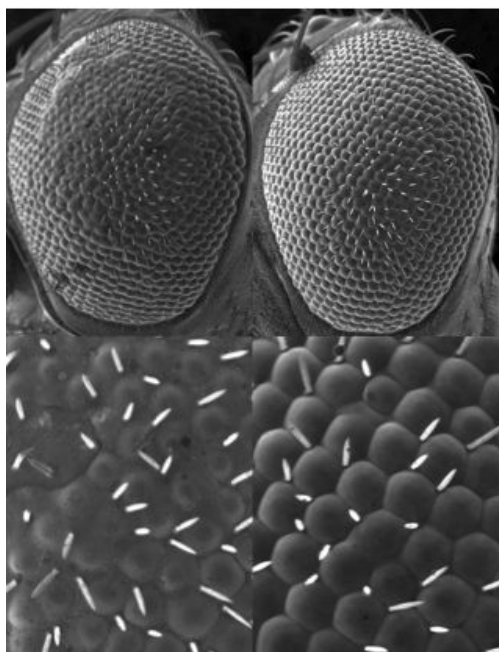
### (3) FIG4のノックダウンモデルの樹立

*FIG4*のショウジョウバエホモログであるをノックダウンすると成虫複眼の形態異常、運動能力の低下、寿命の低下、神経筋接合部

における synaptic branch の短縮, synaptic bouton の減少が生じることを明らかにした。以上の結果を Exp Neurol 誌(Exp Neurol 277; 86-95, 2016.)に報告した。

#### (4) ALS モデルショウジョウバエを用いた候補遺伝子のスクリーニング

*Caz*-KD 及び *TBPH*-KD モデルにおいて認められる複眼の形態異常を指標として行った遺伝学的スクリーニングから、両モデルに共通して作用する複数の関連候補分子を新たに同定した。下図に *Caz*-KD モデルの結果を一部図示する。今後、この候補遺伝子を神経特異的に発現させて、運動能力、運動神経変性、寿命の評価を行い、さらにその分子メカニズムを解析する必要がある。



*Caz*-KD

*Caz*-KD×X

*Caz*-KD モデルショウジョウバエにおける複眼の形態変化

#### 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 2 件)

Kyotani A, Azuma Y, Yamamoto I, Yoshida H, Mizuta I, Mizuno T, Nakagawa M, Tokuda T, Yamaguchi M. Knockdown of the *Drosophila* FIG4 induces deficient locomotive behavior, shortening of motor neuron, axonal targeting aberration, reduction of life span and defects in eye development. Exp Neurol 277; 86-95, 2016. 査読有  
DOI: 10.1016/j.expneurol.2015.12.011.

Shimamura M, Kyotani A, Azuma Y, Yoshida H, Binh Nguyn T, Mizuno T, Nakagawa M, Tokuda T, Yamaguchi M. Genetic link between Cabeza, a *Drosophila* homologue of Fused in Sarcoma(FUS), and the EGFR signaling pathway. Exp Cell Res 326; 36-45, 2014. 査読有  
DOI: 10.1016/j.yexcr.2014.06.004.

〔学会発表〕(計 12 件)

京谷茜, 東裕美子, 山本格, 吉田英樹, 水田依久子, 水野敏樹, 中川正法, 徳田隆彦, 山口政光: ALS と CMT 関連遺伝子 FIG4 を用いたショウジョウバエモデルの構築とモデルが示す表現型変更因子の同定. 日本分子生物学会年会(第 38 回), 2015.12.1, 神戸ポートアイランド(兵庫県, 神戸市).

山本格, 東裕美子, 京谷茜, 吉田英樹, 水田依久子, 上山盛夫, 藤掛伸宏, 水野敏樹, 徳田隆彦, 山口政光: ヒト ALS 原因遺伝子 FUS が誘導する凝集体形成を阻害する因子の探索. 日本分子生物学会年会(第 38 回), 2015.12.1, 神戸ポートアイランド(兵庫県, 神戸市).

中村綾, 山口政光, 山本格, 京谷茜, 吉田英樹, 東裕美子, 水田依久子, 水野敏樹, 中川正法, 徳田隆彦: ショウジョウバエモデルを用いた複数の ALS 原因遺伝子が関与する共通経路の遺伝学的探索. 日本分子生物学会年会(第 38 回), 2015.12.1, 神戸ポートアイランド(兵庫県, 神戸市).

京谷茜, 東裕美子, 吉田英樹, 水田依久子, 水野敏樹, 中川正法, 徳田隆彦, 山口政光: シャルコー・マリー・トゥース病(CMT)原因遺伝子 FIG4 ノックダウンを用いた新規ショウジョウバエ疾患モデルの構築と FIG4 機能解明. 4 大学連携研究フォーラム(第 5 回), 2015.11.25, 京都工芸繊維大学 60 周年記念館(京都府, 京都市).

山本格, 東裕美子, 水田依久子, 徳田隆彦, 上山盛夫, 永井義隆, 吉田英樹, 山口政光: ヒト ALS 原因遺伝子 FUS が誘導する凝集体形成を阻害する因子の探索. 4 大学連携研究フォーラム(第 5 回), 2015.11.25, 京都工芸繊維大学 60 周年記念館(京都府, 京都市).

Kyotani A, Azuma Y, Yamamoto I, Yoshida H, Mizuta I, Nakagawa M, Tokuda T and Yamaguchi M: Development of novel *Drosophila* model for Amyotrophic Lateral Sclerosis (ALS) and Charcot-Marie-Tooth

disease (CMT) by knockdown of the dFIG4 gene and identification of its genetic interactions. Vietnamese-Japanese Students' Scientific Exchange Meeting 2015, 2015.10.31, 京都大学吉田キャンパス(京都府, 京都市).

東裕美子, 徳田隆彦, 山本格, 京谷茜, 櫛村由紀恵, 吉田誠克, 水田依久子, 水野敏樹, 中川正法, 藤掛伸宏, 上山盛夫, 永井義隆, 吉田英樹, 山口政光:  
Identification of genes modulating TDP-43 by *Drosophila* model of amyotrophic lateral sclerosis. 日本神経学会総会(第 56 回), 2015.5.21, 朱鷺メッセ(新潟県, 新潟市).

京谷茜, 東裕美子, 吉田英樹, 水田依久子, 水野敏樹, 徳田隆彦, 山口政光: 筋萎縮性側索硬化症(ALS)の分子病態解明へ向けての原因遺伝子 FIG4 を用いたショウジョウバエモデルの構築. 4 大学連携研究フォーラム(第 4 回), 2014.12.2, 稲盛記念会館(京都府, 京都市).

京谷茜, 東裕美子, 吉田英樹, 水田依久子, 水野敏樹, 徳田隆彦, 山口政光: 筋萎縮性側索硬化症(ALS)の分子病態解明へ向けての原因遺伝子 FIG4 を用いたショウジョウバエモデルの構築. 日本分子生物学会年会(第 37 回), 2014.11.25, パシフィコ横浜(神奈川県, 横浜市).

山本格, 東裕美子, 京谷茜, 吉田英樹, 水田依久子, 上山盛夫, 藤掛伸宏, 水野敏樹, 徳田隆彦, 山口政光: ALS モデルショウジョウバエを用いた分子シャペロン dmrj の生体内機能解析. 日本分子生物学会年会(第 37 回), 2014.11.25, パシフィコ横浜(神奈川県, 横浜市).

東裕美子, 徳田隆彦, 京谷茜, 吉田誠克, 水田依久子, 水野敏樹, 中川正法, 藤掛伸宏, 上山盛夫, 永井義隆, 山口政光:  
The search of genes modulated FUS by *Drosophila* amyotrophic lateral sclerosis. 日本ショウジョウバエ研究会(JDRC) (第 11 回), 2014.6.6, 金沢歌劇座(石川県, 金沢市).

東裕美子, 徳田隆彦, 京谷茜, 吉田誠克, 水田依久子, 水野敏樹, 中川正法, 藤掛伸宏, 上山盛夫, 永井義隆, 山口政光:  
The search of genes modulated FUS by *Drosophila* amyotrophic lateral sclerosis. 日本神経学会総会(第 55 回), 2014.5.21, 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)

○取得状況(計 0 件)

〔その他〕

なし

6. 研究組織

(1)研究代表者

東 裕美子 (AZUMA YUMIKO)

京都府立医科大学・医学部附属病院・専攻医

研究者番号: 00453093