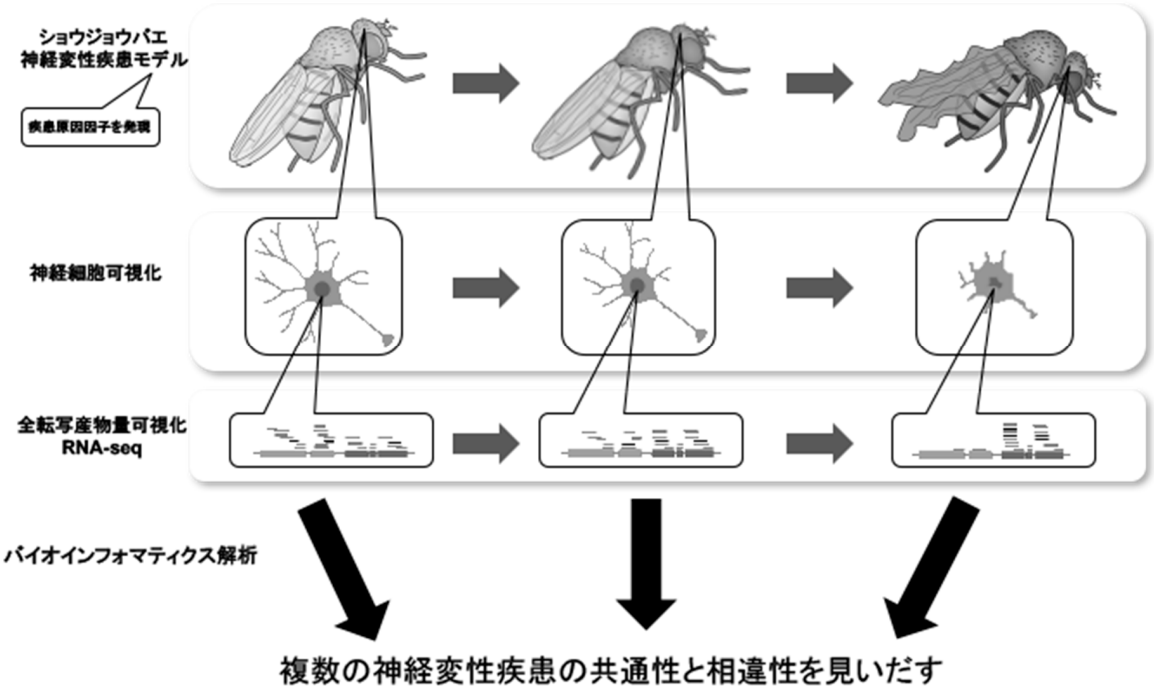
139　トランスクリプトーム解析による神経変性疾患間の比較	杉江　淳

【目的】アルツハイマー型認知症、パーキンソン病、ハンチントン病等、脳の広範囲で神経細胞の変性が進行する疾患があり、それぞれの疾患に対応する原因タンパク質が近年特定されてきている。アルツハイマー型認知症に関与するAβやリン酸化Tauをはじめ、パーキンソン病に関与するα-synuclein、ハンチントン病に関与するポリグルタミン鎖が伸長したHuntingtin等が挙げられる。しかしながら、これらの異なる疾患原因タンパク質によって引き起こされる神経変性の病態機序の共通性または相違性についてほとんど理解が進んでいない。本研究では、モデル生物のショウジョウバエを用いて、神経変性の進行を疾患間で比較をすることによって、神経変性の共通性と相違性を見いだすことを目的とした。

【方法】ショウジョウバエの脳内のキノコ体という特異的な神経組織で蛍光タンパク質と共に神経変性疾患原因因子であるTau、α-synuclein、Huntingtinを発現させ、経時的に樹状突起、軸索で起こる神経変性を記載した。

【結果】アルツハイマー型認知症に関与する病気型Tauは長期的な発現により、軸索が矮小化する表現系が確認された。しかし、樹状突起は異常な構造を取ることは確認されなかった。パーキンソン病の原因因子であるα-synucleinにおいては、軸索及び樹状突起の構造異常は見られなかった。これは、α-synucleinがショウジョウバエではホモログが存在しないため細胞への毒性が効果的でなかった可能性が示唆された。ハンチントン病に関して、ポリグルタミン化していないヒトHuntingtinでは6週間後でも軸索及び樹状突起に構造異常が認められなかった。一方で、ポリグルタミン化したHuntingtinでは軸索は1週間後では異常が見られなかったものの、6週間後では軸索の矮小化が観察された。

ショウジョウバエモデルを用いて、個体・細胞・分子レベルで神経変性疾患の全体像を理解する



139. トランスクリプトーム解析による神経変性疾患間の比較

杉江　淳

新潟大学 研究推進機構 超域学術院 脳病態解析分野

Key words：ショウジョウバエ，神経変性疾患

緒　言

脳の広範囲で神経細胞の変性が進行する疾患として、タウオパチー、シヌクレオパチー、ポリグルタミン病等がよく知られているが、根本的な治療法はまだ存在していない。年齢依存的に発症率が増加するこれらの疾患は、超高齢化社会である我が国においてますます深刻になる為、喫緊の社会的問題であると言える。このことから多くの研究がこれまでになされ、それぞれの疾患に対応する原因タンパク質が特定されてきている。例えば、アルツハイマー型認知症に関与するAβやリン酸化Tauをはじめ、パーキンソン病に関与するα-synuclein、ハンチントン病に関与するポリグルタミン鎖が伸長したHuntingtin等が挙げられる。しかしながら、これらの異なる疾患タンパク質によって引き起こされる神経変性の病態機序の共通性または相違性について比較した研究は少なく、ほとんど分かっていなかった。本研究では、61%の遺伝子がヒトとの間に保存されており、中心的な神経の機能や分子の働きが保存されているショウジョウバエを用いて、特定細胞における変性の進行を疾患間で比較をすることによって、神経変性の共通性と相違性を見いだすことを目的とした。

方　法

1. ショウジョウバエの疾患タンパク質発現系統

タウオパチーに関して、OK107-Gal4ドライバー［1］を用いてGFPと共に野生型のヒトTau［2］、リン酸化サイトを阻害したTau^{S2A}［3］、病気型Tau^{V337M}［2］をキノコ体で発現させた。シヌクレオパチーに関して、OK107-Gal4ドライバーを用いてGFPと共に野生型のヒトα-synuclein［4］、α-$synuclein^{A30P}$［4］、α-$synuclein^{A53T}$［4］をキノコ体で発現させた。ポリグルタミン病に関して、OK107-Gal4ドライバーを用いてGFPと共にポリグルタミン化していないヒト$Huntingtin^{Q0}$［5］またはポリグルタミン化したヒト$Huntingtin^{Q128}$［5］をキノコ体で発現させた。

2. 抗体免疫染色

キノコ体で疾患タンパク質を発現させ、成虫になってから1週間、5週間、または6週間経ったショウジョウバエの脳をリン酸緩衝生理食塩水（PBS）中で解剖し、4%ホルムアルデヒドで50分間固定した。その後、0.3% PBT中に400倍希釈した抗Tau抗体（T46）（Thermo Fisher Scientific）、抗α-synuclein抗体（ミリポア）、または抗Huntingtin抗体(Enzo)により4℃で一晩インキュベーションした。次に、0.3% PBTで3回洗浄したのち、0.3% PBT中に400倍希釈した二次抗体mouse alexa568 (Thermo Fisher Scientific)、またはrabbit alexa568 (Thermo Fisher Scientific) により4℃で一晩インキュベーションした。0.3% PBTで3回洗浄してからマウント剤Vectashieldに解剖脳を包埋し、スライドガラス上にマウントした。そして、共焦点顕微鏡A1R（ニコン株式会社）を用いてスキャニングを行った。その後Fijiのz-projection機能により画像の三次元構築を行った。

結果および考察

1. キノコ体における疾患タンパク質を発現に対する神経変性の表現型及び疾患タンパク質の局在パターン

タウオパチーの疾患原因因子として、野生型ヒトTau、2か所のセリン残基のリン酸化サイトをアラニンに置換したTau^{S2A}、そして病気型のTau^{V337M}をそれぞれキノコ体で発現させた。そして、キノコ体を細胞膜に局在するGFPで可視化し、抗Tau抗体を用いてTauタンパク質の細胞内の局在を観察した（図1A～H）。その結果、成虫に羽化してから1週間の段階では、軸索においても樹状突起においても構造の異常は見られなかった（図1A～D軸索；図1E-H樹状突起）。Tau^{S2A}では軸索でも樹状突起でもTauタンパクの局在が観察されたのに対し（図1C，1G）、野生型Tau及びTau^{V337M}では樹状突起での局在は見られたが（図1F～G）、軸索での局在は非常に弱かった（図1B，1D）。これらの結果から、Tauの軸索への局在はリン酸化されないことが重要であることが示された。また、野生型Tau及びTau^{V337M}ではGFPの発現が見られない多くの領域でも観察された。これはTauのターンオーバーの期間が非常に長いため、発生段階で発現している細胞に残ったTauのシグナルであることがわかった（data not shown）。このことから、Tauのターンオーバーの期間もリン酸化状態が関係していることが示唆された。

シヌクレオパチーの疾患原因因子として、野生型ヒトα-synuclein、病気型のα-synuclein^{A30P}、またはα-synuclein^{A53T}をそれぞれキノコ体で発現させた。そして、キノコ体を細胞膜に局在するGFPで可視化し、抗α-synuclein抗体を用いてα-synucleinタンパク質の細胞内の局在を観察した（図2A～H）。その結果、成虫に羽化してから1週間の段階では、軸索においても樹状突起においても構造の異常は見られなかった（図2A～D軸索；図2E～H樹状突起）。そして、どのタイプのα-synucleinも軸索でも樹状突起でもα-synucleinタンパクの局在が観察された（図2B'～D'軸索；2F'～2H'樹状突起）。

ポリグルタミン病の疾患原因因子として、ポリグルタミン化していないヒトHuntingtin^{Q0}、ポリグルタミン化したHuntingtin^{Q128}をそれぞれキノコ体で発現させた。そして、キノコ体を細胞膜に局在するGFPで可視化し、抗Huntingtin抗体を用いてHuntingtinタンパク質の細胞内の局在を観察した（図3A～F）。その結果、Huntingtin^{Q128}において軸索及び樹状突起の構造が矮小化する異常が見られた（図3C軸索；図3F樹状突起）。Huntingtin^{Q0}では軸索でも樹状突起でもHuntingtinタンパクの局在が観察されたのに対し（図3B'軸索，3E'樹状突起）、Huntingtin^{Q128}では軸索及び樹状突起での凝集した発現パターンが観察された（図3C'軸索，3F'樹状突起）。これらの結果から、Huntingtinの凝集はポリグルタミン化が必要であり、ポリグルタミン化Huntingtinは細胞へ毒性を示すことが明らかになった。

2. 長期的な疾患タンパク質発現によるキノコ体神経細胞の変性

キノコ体でそれぞれ疾患タンパク質を発現させ、経時的（1週間、5または6週間）にキノコ体を観察し、樹状突起、軸索で起こる構造異常を調べた。

タウオパチーに関して、どのタイプのTauでも成虫に羽化してから1週間の段階では、軸索においても樹状突起においても構造の異常は見られなかった（図4A～D軸索；図4E～H樹状突起）。6週間後になると、病気型Tau^{V337M}で軸索が矮小化する表現系が確認された（図4D'矢頭）。しかしながら、樹状突起は異常な構造を取ることは確認されなかった（図4H'）。これらの結果から、病気型Tauは長期的な発現により、特に軸索への毒性を発揮するということが明らかになった。

シヌクレオパチーに関して、どのタイプのα-synucleinにおいても、軸索及び樹状突起の構造異常は見られなかった（図5A～5H）。羽化してから5週間後の個体においても、同様に構造異常は観察されなかった（図5A'～5H'）。過剰発現による細胞への毒性が効果的でなかったのは、α-synucleinがショウジョウバエではホモログが存在しないため、生理学的にα-synucleinと関与する分子メカニズムがないことが可能性として考えられた。

ポリグルタミン病に関して、ポリグルタミン化していないヒトHuntingtin^{Q0}では6週間後でも軸索及び樹状突起に構造異常が認められなかった（図6B'，6E'）。一方、ポリグルタミン化したHuntingtin^{Q128}では軸索は1週間後では異常が見られなかったものの（図6C）、6週間後では軸索の矮小化が観察された（図6C'矢頭）。樹状突起においては1週間後からすでに空洞化が起こっており（図6F矢頭）、6週間後では空洞化及び矮小化していた（図6F'矢頭）。

以上から、ポリグルタミン化した Huntingtin は早い段階で樹状突起に毒性を発揮し、次第に軸索でも変性を誘導することが示唆された。

本研究から、疾患原因因子によって引き起こされる神経変性細胞死において、軸索、樹状突起それぞれの異変が経時的に記載された。これらの結果から、これまでに発見されなかった神経変性疾患間で共通する、または疾患特異的に変性を起こしやすい部位が明らかになり、神経変性の病態分子メカニズムの知見を得ることが期待できる。この経時的な構造異常プロファイルをもとに、今後は神経細胞が変性を起こしていない若い時期から変性を起こす老齢の時期まで複数のタイムポイントでキノコ体の細胞体を直接解剖して、RNA シークエンシングを行い、長鎖ノンコーディング RNA を含む全 mRNA のプロファイリングを得る。そして発現に変動がある RNA を網羅的に解析することによって、細胞が健常な状態からそれぞれの異常タンパク質が変性を引き起こすまでにどのようなことが起こっているのかを詳細に記述する。また、細胞死が起こる前から死ぬまでの間で、今までに知られていない細胞死に関与する因子を特定する。さらに、特定した候補因子の機能解析を行うことによって新たな関与因子が絡んだ神経変性の病態分子メカニズムの知見を得ることができ、早い段階で変動する因子群については特異的なまたは疾患共通に神経変性疾患への早期介入のためのターゲットとして期待ができる。

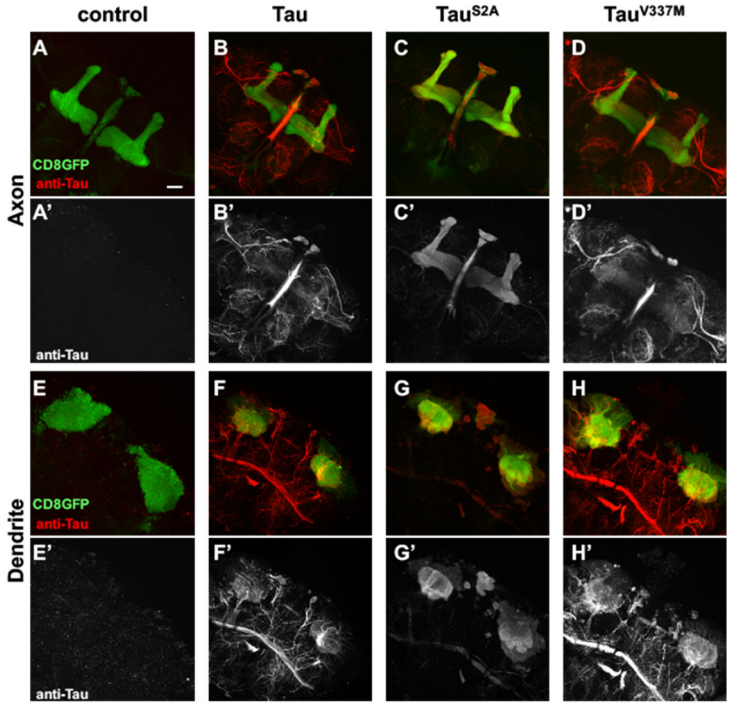


図 1. ショウジョウバエキノコ体におけるタウオパチーの疾患原因因子の発現パターン

（A～H）キノコ体の軸索（A～D）及び樹状突起領域（E～H）を細胞膜に局在する GFP で可視化した（A～H 緑）。そして、野生型ヒト Tau（B，F）、Tau^{S2A}（C，G）、病気型 Tau^{V337M}（D，H）をそれぞれキノコ体で発現させ、抗 Tau 抗体を用いて Tau タンパク質の細胞内の局在を可視化した（A～H 赤，A'～H'白）。スケールバーは 30 μm。

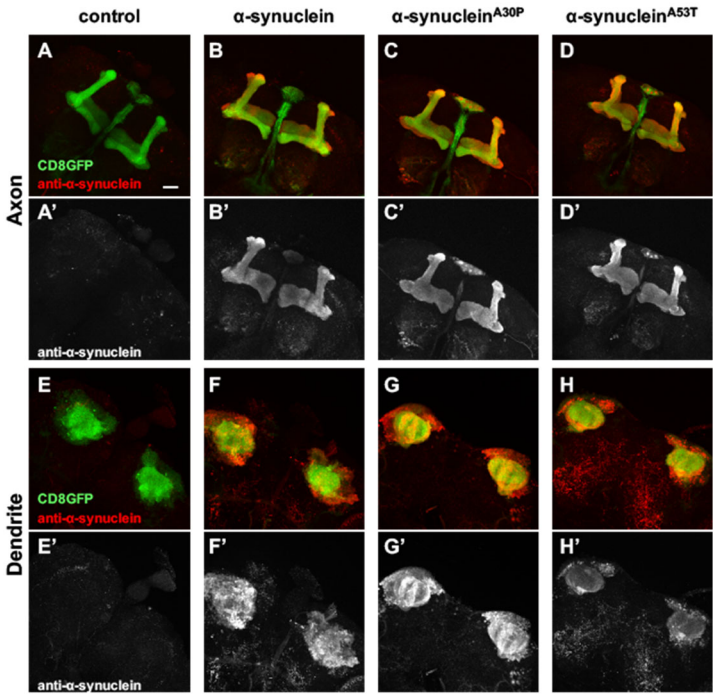


図 2. ショウジョウバエキノコ体におけるシヌクレオパチーの疾患原因因子の発現パターン
（A～H）キノコ体の軸索（A～D）及び樹状突起領域（E～H）を細胞膜に局在する GFP で可視化した（A～H 緑）。そして、野生型ヒト α-synuclein (B, F)、α-synucleinA30P (C, G)、α-synucleinTauA53T (D, H) をそれぞれキノコ体で発現させ、抗 α-synuclein 抗体を用いて α-synuclein タンパク質の細胞内の局在を可視化した（A～H 赤，A'～H'白）。スケールバーは 30 μm。

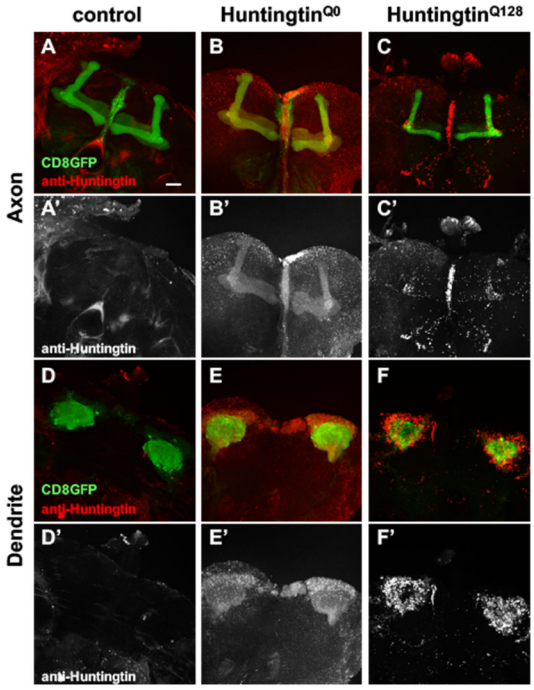


図 3. ショウジョウバエキノコ体におけるポリグルタミン病の疾患原因因子の発現パターン
（A～F）キノコ体の軸索（A～C）及び樹状突起領域（D～F）を細胞膜に局在する GFP で可視化した（A～F 緑）。そして、非ポリグルタミン化ヒト Huntingtin (B, E)、ポリグルタミン化ヒト Huntingtin (C, F) をそれぞれキノコ体で発現させ、抗 Huntingtin 抗体を用いて Huntingtin タンパク質の細胞内の局在を可視化した（A～F 赤，A'～F'白）。スケールバー 30 μm。

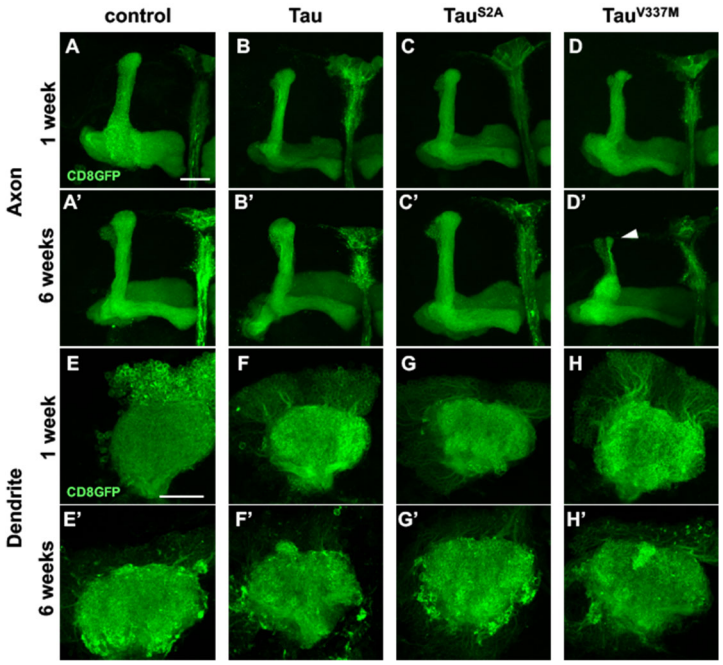


図 4. タウオパチーの疾患原因因子の発現による経時的なキノコ体構造変化

（A～H）キノコ体の軸索（A～D）及び樹状突起領域（E～H）を細胞膜に局在する GFP で可視化した（A～H 緑）。そして、野生型ヒト Tau（B, F）、Tau^{S2A}（C, G）、病気型 Tau^{V337M}（D, H）をそれぞれキノコ体で発現させ、抗 Tau 抗体を用いて Tau タンパク質の細胞内の局在を可視化した（A～H 赤, A'～H'白）。スケールバーは 30 μm。

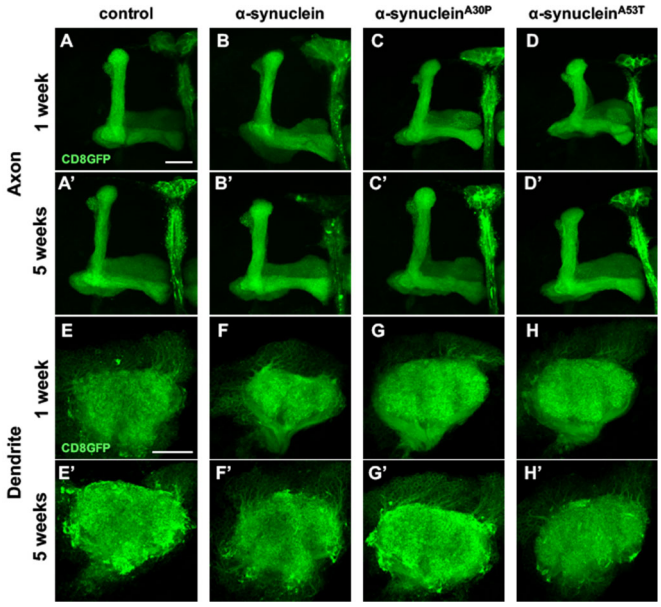


図 5. シヌクレオパチーの疾患原因因子の発現による経時的なキノコ体構造変化

（A～H）キノコ体の軸索（A～D）及び樹状突起領域（E～H）を細胞膜に局在する GFP で可視化した（A～H 緑）。そして、野生型ヒト α-synuclein（B, F）、α-$synuclein^{A40P}$（C, G）、α-$synuclein^{A53T}$（D, H）をそれぞれキノコ体で発現させた。羽化後 1 週間のキノコ体（A～H）と 5 週間後のキノコ体（A'～H'）。スケールバーは 30 μm。

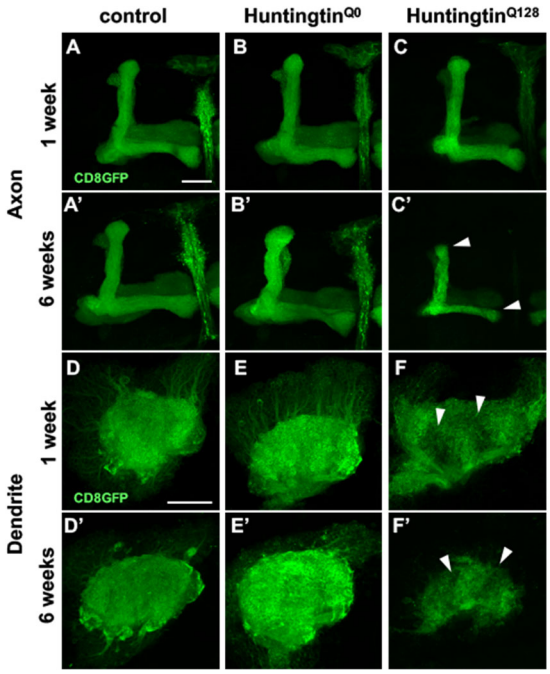


図 6. シヌクレオパチーの疾患原因因子の発現による経時的なキノコ体構造変化

（A～F）キノコ体の軸索（A～C）及び樹状突起 3 領域（D～F）を細胞膜に局在する GFP で可視化した（A～F 緑）。そして、非ポリグルタミン化ヒト Huntingtin（B, E）、ポリグルタミン化ヒト Huntingtin（C, F）をそれぞれキノコ体で発現させた。羽化後 1 週間のキノコ体（A～F）と 6 週間後のキノコ体（A'～F'）。スケールバーは 30 μm。

文　献

1) Lee, T., Lee, A., Luo, L. Development of the Drosophila mushroom bodies: sequential generation of three distinct types of neurons from a neuroblast. Development. 1999 126(18): 4065--4076. PMID: 10457015

2) Wittmann CW, Wszolek MF, Shulman JM, Salvaterra PM, Lewis J, Hutton M, Feany MB. Tauopathy in Drosophila: neurodegeneration without neurofibrillary tangles. Science. 2001 Jul 27;293(5530):711-714. PMID:11408621 DOI:10.1126/science.1062382

3) Chatterjee, S., Sang, T.K., Lawless, G.M., Jackson, G.R. Dissociation of tau toxicity and phosphorylation: role of GSK-3beta, MARK and Cdk5 in a Drosophila model. Hum. Mol. Genet. 2009 18(1): 164--177. PMID:18930955 DOI:10.1093/hmg/ddn326

4) Feany, M.B., Bender, W.W. A Drosophila model of Parkinson's disease. Nature. 2000 404(6776): 394--398. PMID:10746727 DOI:10.1038/35006074

5) Wyan-Ching Mimi Lee, Motojiro Yoshihara, J. Troy Littleton. (2004) Cytoplasmic aggregates trap polyglutamine-containing proteins and block axonal transport in a *Drosophila* model of Huntington's disease. Proc Natl Acad Sci U S A. 2004 Mar 2; 101(9): 3224–3229. PMID:14978262 DOI:10.1073/pnas.0400243101