

Title	Alternative splicing regulates the transcriptional activity of <i>Drosophila</i> heat shock transcription factor in response to heat/cold stress
Author(s)	藤掛, 伸宏
Citation	大阪大学, 2006, 博士論文
Version Type	
URL	<a href="https://hdl.handle.net/11094/46254">https://hdl.handle.net/11094/46254</a>
rights	
Note	著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、 <a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed">大阪大学の博士論文について</a> をご参照ください。

***Osaka University Knowledge Archive : OUKA***

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

Osaka University

氏名	藤掛伸宏
博士の専攻分野の名称	博士(医学)
学位記番号	第 20156 号
学位授与年月日	平成 18 年 3 月 24 日
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 1 項該当 医学系研究科未来医療開発専攻
学位論文名	Alternative splicing regulates the transcriptional activity of <i>Drosophila</i> heat shock transcription factor in response to heat/cold stress (熱ショック転写因子の新規転写活性調節機構の解明とその活性化によるポリグルタミン病に対する治療法開発)
論文審査委員	(主査) 教授 戸田 達史  (副査) 教授 佐古田三郎 教授 内山 安男

#### 論文内容の要旨

##### [目的]

ポリグルタミン (PolyQ) 病は原因遺伝子内のグルタミンをコードする CAG リピート配列の異常伸長という共通の遺伝子異常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 疾患が知られている。PolyQ 病では様々な臨床遺伝学的な共通点や近年の分子生物学的研究成果から、共通の発症分子機構で神経変性が生じることが明らかにされてきたが、現在までに有効な治療法は確立されていない。その発症分子機構として、異常伸長 PolyQ 鎖を持つ原因蛋白質がミスフォールディングを起こし、神経細胞内で凝集し、封入体として蓄積することが神経変性を引き起こすと考えられている。これまでに蛋白質のフォールディングを助ける分子シャペロンである Hsp40、Hsp70 などについて、遺伝子発現による治療効果が示されている。しかし、単独の分子シャペロン遺伝子の過剰発現では細胞毒性が生じることが知られているため、私は内在性の分子シャペロン群を同調的に発現誘導する熱ショック転写因子 (HSF) の活性化による治療法を考えた。しかし、HSF の転写活性調節機構については従来から知られている翻訳後修飾だけではなく、近年転写レベルでの調節が示唆されているが、その分子機構は解明されていない。

本研究では、HSF の活性化による PolyQ 病の治療法を確立するために、i) HSF の転写活性調節機構を解明し、ii) HSF 活性化剤投与あるいは HSF の遺伝子発現による PolyQ 病の治療効果を検討することを目的とした。

##### [方法ならびに成績]

本研究では、*in vivo* での神経変性を簡便に評価できる PolyQ 病モデルショウジョウバエを用いて HSF 活性化による治療効果を評価した。

##### 1. HSF の転写活性調節機構の解明

ショウジョウバエ (*yw* 系統) 由来 total RNA から HSF 遺伝子 (dHSF) を RT-PCR 法で増幅し、クローニングを行なった。その結果、既知の dHSF 遺伝子 (dHSFa) に加えて、3 種の新規スプライシング変異体 (dHSFb、dHSFc、

dHSFd) を同定した。次に、ショウジョウバエを熱ショック (37°C、1 時間)、および低温ショック (4°C、2 時間) に暴露し、dHSF 全体の発現量変化、あるいは各 dHSF 変異体の発現量変化を定量的 RT-PCR にて評価した。その結果熱ショック暴露により、dHSF 全体の発現量は 1.55 倍、dHSFb は 2.64 倍に増加するが、dHSFc の発現量は 0.42 倍に減少することが明らかになった。一方で低温ショック暴露により、dHSF 全体の発現量は 2.09 倍、dHSFd は 5.24 倍に増加することが明らかとなった。さらに各 dHSF 変異体の転写活性をレポーターアッセイで測定したところ、dHSFa の転写活性に比べて dHSFc、dHSFd の転写活性はそれぞれ 4.06、9.44 倍であることが明らかとなった。

#### 2. A. HSF 活性化剤投与による PolyQ 病治療効果の検討

異常伸長 PolyQ 蛋白質を複眼に発現する PolyQ 病モデルショウジョウバエに様々な HSF 活性化剤を投与し、複眼変性を光学顕微鏡観察にて評価した。その結果、17-allylamino-17-demethoxygeldanamycin (17-AAG) 投与により濃度依存的に複眼変性が軽減することが明らかとなった。このときの異常伸長 PolyQ 蛋白質の封入体形成を 3 齢幼虫の複眼原基の免疫染色により評価したところ、封入体の減少が認められた。

#### B. dHSF の遺伝子発現による PolyQ 病治療効果の検討

dHSFa もしくは常時活性化型 dHSF を発現する遺伝子改変ショウジョウバエを作成し、PolyQ 病モデルショウジョウバエとの遺伝学的交配により、これらを異常伸長 PolyQ 蛋白質と共に複眼で発現させた。その結果、dHSFa もしくは常時活性化型 dHSF を遺伝子発現すると、予想に反して封入体が増加し、複眼変性の増悪を認めた。これらのショウジョウバエから total RNA を抽出し定量的 RT-PCR を行なったが、分子シャペロン遺伝子 (Hsp70、Hsp40) の発現誘導は認められなかった。

#### [総括]

1. HSF の新規スプライシング変異体を 3 種同定し、これらの転写活性が異なることを明らかにした。さらには、ストレスに応じて 4 種のスプライシング変異体の比が変わることで HSF の転写活性を調節するという新規の転写活性調節機構が明らかとなった。
2. HSF の活性化剤 17-AAG は PolyQ 病モデルショウジョウバエの複眼変性を抑制したが、HSF の遺伝子発現では複眼変性が増悪したため、両者では発現誘導される遺伝子群が異なることが考えられ、PolyQ 病の治療法開発にあたってこの点に注意する必要がある。

### 論文審査の結果の要旨

ポリグルタミン (PolyQ) 病はハンチントン病、などの 9 つの遺伝性神経変性疾患の総称である。PolyQ 病では共通の発症分子機構で神経変性が生じることが明らかにされてきた。申請者は、内在性の分子シャペロン群を同調的に発現誘導する熱ショック転写因子 (HSF) の活性化による治療法を考えている。本研究では、HSF の活性化による PolyQ 病の治療法を確立するために、i) HSF の転写活性調節機構を解明し、ii) HSF 活性化剤投与による PolyQ 病の治療効果を検討している。本研究から、HSF の新規スプライシング変異体が 3 種見つかри、さらにはスプライシングによる HSF の転写活性調節という新規の転写活性調節機構が明らかとなった。また、HSF の活性化剤 17-AAG が PolyQ 病の治療薬として有効であることを PolyQ 病モデルショウジョウバエで示した。PolyQ 病では現在までに有効な治療法は確立されていないことから、本研究は学位に値するものとする。