

[過程-2]

審査の結果の要旨

氏名 松川 浩二

本研究は、筋萎縮性側索硬化症や前頭側頭葉変性症の病因タンパク質と考えられている TDP-43 が生物学的にどのような機能を持つか明らかにすることを目的としている。特に、オートファジー関連遺伝子である *Ulk1* に着目し、RNA 結合性タンパク質である TDP-43 が *Ulk1* を結合標的とし、どのような機能的役割を担うか検討したものである。神経系培養細胞である Neuro-2a 細胞における TDP-43 発現抑制実験、およびアデノ随伴ウイルス 9 型 (AAV9) ベクターを用いたマウス個体における神経細胞特異的 TDP-43 過剰発現マウスの解析を行い、以下の結果を得ている。

1. Neuro-2a 細胞を用いた RNA 免疫沈降実験から、TDP-43 が *Ulk1* mRNA と結合することが示された。
2. Neuro-2a 細胞において、TDP-43 の発現を抑制することにより、*Ulk1* の発現が mRNA レベルでは変化しないのに対し、タンパク質レベルにおいて低下したことから、TDP-43 は *Ulk1* の発現を翻訳レベルにおいて制御することが示唆された。
3. Neuro-2a 細胞において、TDP-43 の発現を抑制することにより、オートファジーの低下がみられた。
4. TDP-43 の発現抑制による *Ulk1* タンパク質の発現低下、およびオートファジーの低下には、TDP-43 の RNA 認識モチーフ 1 (RRM1) が関与していることが示された。
5. CRISPR/Cas9 システムを用いたゲノム編集により、*Ulk1* mRNA の 3'非翻訳領域 (UTR) 上に存在する TDP-43 の結合配列である UG リピートをゲノム上から欠損させた Neuro-2a 細胞を樹立した。この細胞において、TDP-43 の発現抑制による *Ulk1* タンパク質の発現低下率が減少したことから、TDP-43 は部分的には、*Ulk1* mRNA と 3' UTR 上で結合することにより、*Ulk1* タンパク質の発現を制御していることが示唆された。
6. ヒト野生型 TDP-43 を Synapsin I プロモーター下で発現する AAV9 ベクターを作出した。出生後 1 日に AAV9 ベクターを静脈注射することにより、TDP-43 を神経細胞に過剰発現するマウスを得た。

7. TDP-43 を過剰発現するマウスは導入した AAV9 ベクター量に依存して、致死性や体重の低下がみられた。協調運動機能の指標として行ったローターロッドテストの成績は、コントロールと比較して TDP-43 を過剰発現するマウスにおいて低下し、また、TDP-43 を過剰発現するマウスでは 3 ヶ月齢と比較して 6 ヶ月齢時の成績が低下した。
8. TDP-43 を過剰発現するマウス脊髄において、*Ulk1* mRNA の発現は上昇していたが、一方で *Ulk1* タンパク質の発現は低下していた。
9. *Ulk1* ノックアウト (KO) マウスは発達の異常や運動機能の異常を呈さなかった。しかし、AAV9 ベクターを用いて TDP-43 を過剰発現したところ、野生型、ヘテロ KO マウスと比較して *Ulk1* ホモ KO マウスにおいて致死性が上がった。また、野生型と比較して、ヘテロ KO マウスにおける 1 ヶ月齢時のローターロッドテストの成績が低かった。

以上、本論文は神経系培養細胞における *TDP-43* 発現抑制実験および *TDP-43* 過剰発現マウスの解析という 2 つの実験系を用いて、*TDP-43* が *Ulk1* を介した機能を持つことを示唆するものである。Neuro-2a 細胞を用いた実験結果は、*TDP-43* が *Ulk1* mRNA との結合依存的に *Ulk1* タンパク質の発現を制御し、さらに下流のオートファジーを調節することを示唆する。また、*TDP-43* を神経細胞に過剰発現するマウスの解析結果は、*TDP-43* の過剰発現が運動機能障害を導き、また、*Ulk1* の発現低下が *TDP-43* 過剰発現による運動機能障害に対して増悪作用を持つことを示唆する。本研究は、*TDP-43* が *Ulk1* mRNA を結合標的とし、機能的意義を持つことを見いだした初めての成果である。*TDP-43* の生理機能を理解する上では重要な貢献をなすと考えられ、学位の授与に値するものと考えられる。