

博士論文 (要約)

Ulk1 mRNA を介した TDP-43 の生物学的機能の検討

松川 浩二

[序論]

TDP-43 は筋萎縮性側索硬化症 (ALS) や前頭側頭葉変性症 (FTLD) などの神経変性疾患の病因タンパク質と考えられている。本論文においては、TDP-43 の生理機能解明を目的とした機能解析を行った。TDP-43 は DNA/RNA のプロセッシング過程において機能する RNA 結合性タンパク質である。本論文では、TDP-43 の結合標的候補として、オートファジー関連遺伝子である *Ulk1* に着目した。1. 神経系培養細胞における *TDP-43* 発現抑制実験、および、2. アデノ随伴ウイルス 9 型 (AAV9) ベクターを用いた神経細胞特異的 *TDP-43* 過剰発現マウスの解析を行い、*TDP-43* が *Ulk1* mRNA との結合を介してどのような機能的役割を持つかを検討した。

[結果]

1. 培養細胞を用いた検討

マウス神経芽細胞腫に由来する Neuro-2a 細胞を用いた検討を行った。まず、Neuro-2a 細胞に FLAG tag 付加 *TDP-43* を過剰発現し、RNA 免疫沈降実験を行ったところ、*TDP-43* と *Ulk1* mRNA が共沈降され、両者が直接結合する可能性が示された。一方で、RNA 認識モチーフ 1 を欠損する (Δ RRM1) 変異型 *TDP-43* と *Ulk1* mRNA は共沈降しなかったことから、*TDP-43* は RRM1 上で *Ulk1* mRNA と結合していると考えられた。次に *TDP-43* の発現抑制実験を行ったところ、*TDP-43* の発現抑制により *Ulk1* mRNA の発現量に変化はみられないが、Ulk1 タンパク質量が低下することが分かった。この発現低下はヒト野生型 *TDP-43* の発現により回復したが、 Δ RRM1 変異型 *TDP-43* では回復しなかったことから、*TDP-43* は *Ulk1* mRNA と結合し、Ulk1 タンパク質の発現を翻訳レベルにおいて制御していると考えられた。さらに、*TDP-43* の発現抑制によりオートファジーの指標である LC3-II 量の低下がみられた。この LC3-II 量の低下はヒト野生型 *TDP-43* の発現により回復したが、 Δ RRM1 変異型 *TDP-43* では回復しなかったことから、*TDP-43*

は RNA 結合依存的にオートファジーを制御する可能性が示唆された。これらの結果から、TDP-43 は Uik1 タンパク質の発現を調節することにより、オートファジーを制御していることが考えられた。

さらに、TDP-43 による Uik1 タンパク質の発現制御に必要な *Uik1* mRNA 上の配列を探索した。マウス *Uik1* 転写産物は、その 3' 非翻訳領域 (UTR) 上に TDP-43 のコンセンサスモチーフである UG リピート配列を持つ。そこで、*Uik1* mRNA の 3' UTR に存在する UG リピートを含む ~70 bp の配列をゲノム上から欠損させた Neuro-2a 細胞を、CRISPR/Cas9 システムを用いたゲノム編集により作出した。この細胞において、*TDP-43* の発現抑制実験を行ったところ、Uik1 タンパク質の発現低下はみられたものの、コントロールの Neuro-2a 細胞と比較して *TDP-43* の発現抑制による Uik1 タンパク質の発現低下率が有意に抑制された。この結果から、TDP-43 は部分的には *Uik1* mRNA の 3' UTR と結合し、Uik1 タンパク質の発現を制御していると考えられた。

2. AAV9 ベクターを利用した TDP-43 過剰発現マウスを用いた検討

アデノ随伴ウイルス 9 型 (AAV9) ベクターを用いて、神経細胞特異的にヒト野生型 TDP-43 を過剰発現するマウスを作出した。AAV9 ベクターに、hSynapsin I プロモーター下にヒト野生型 TDP-43 を発現するカセットを組み込んだ。出生後 1 日目に AAV9-TDP-43 の導入を行い、その後の経過を観察した。AAV9 ベクターを 1×10^{11} genome copies/body 投与したマウスは、著しい体重の減少を呈し、全ての個体が 3 週以内に死に至った。また、AAV9 ベクターを 0.5×10^{11} genome copies/body 投与したマウスは、ローターロッドテストの成績低下等の進行性の運動機能障害を呈することが分かった。また、脊髄や脳切片を免疫組織化学的に検討したところ、過剰発現した TDP-43 は特に神経細胞の核に強く発現し、一部は細胞質にも存在した。

次に TDP-43 過剰発現マウスにおいて、*Uik1* の発現を検討した。AAV9 ベクターを 2×10^{11}

genome copies/body 投与した TDP-43 過剰発現マウス脊髄において、コントロールと比較して *Ulk1* mRNA の発現が上昇し、一方 *Ulk1* タンパク質の発現は低下することが分かった。そこで、TDP-43 過剰発現による運動機能障害への *Ulk1* の関与を検討するために、*Ulk1* ノックアウト (KO) マウスを用いた解析を行った。*Ulk1* KO マウスにおいては、体重の増加や運動機能に異常はみられなかった。そこで、AAV9 ベクターを用いて TDP-43 の過剰発現を行ったところ、野生型マウスと比較して *Ulk1* homo KO マウスにおいて生存率が低下し、また、hetero KO マウスにおいてはローターロッドテストの成績が有意に低かった。これらの結果は、*Ulk1* の発現低下が TDP-43 過剰発現による運動機能障害を増悪させる可能性を示唆するものである。

[まとめ]

本研究において、培養細胞を用いた検討から、TDP-43 は *Ulk1* mRNA と結合し、*Ulk1* タンパク質の発現を調節することにより、オートファジーを制御するという機能を持つことが示唆された。また、TDP-43 を神経細胞に過剰発現するマウスを用いた解析から、TDP-43 の過剰発現により、*Ulk1* タンパク質の発現量が減少することを示した。さらに *Ulk1* を欠損することにより運動機能障害が増悪することから、*Ulk1* の発現低下が運動機能障害を増悪させる作用があることを見出した。これらの結果は、TDP-43 が *Ulk1* を介して生物学的機能を持つことを示唆したものである。しかしながら、それぞれの実験系において、TDP-43 による *Ulk1* の発現制御には異なった様式の機構が存在することが示唆された。この乖離には、培養細胞における発現抑制実験とマウスモデルにおける過剰発現実験の違いや、マウスモデルにおいて TDP-43 が神経機能障害を引き起こしたことによる二次的な変化が関与している可能性が考えられた。今後は、ヒトの ALS や FTLD の病態形成において *ULK1* がどのような挙動を示すかを明らかにし、神経変性に *ULK1* やオートファジーが関与している可能性について検証を進めたい。