

審査の結果の要旨

氏名 井原 涼子

本研究は、筋萎縮性側索硬化症（ALS）およびユビキチン陽性封入体を伴う前頭葉側頭葉変性症（FTLD-U）のユビキチン陽性封入体の主要構成成分であり、家族性 ALS（FALS）の病因遺伝子の一つでもある TDP-43 に着目し、ALS 及び FTLD-U を総称した TDP-43 プロテノパチーの病態機序を明らかにするため、野生型及び FALS 変異型、機能ドメイン欠失型ヒト TDP-43 を導入したトランスジェニックショウジョウバエ（tg fly）の組織学的解析、生化学的解析、行動解析を行い、その結果から得られた仮説に対して *in vitro* の RNA 結合実験により検証を試みたものであり、下記の結果を得ている。

1. 複眼特異的野生型 TDP-43 tg fly は、独立した 3 ラインで同量の TDP-43 タンパク質の発現と表現系を認め、走査電子顕微鏡による複眼外部形態の評価において、対照として用いた lacZ tg fly と比較して剛毛の極性の乱れと個眼の配列の乱れを認めた。TDP-43 tg fly の組織学的解析では、通常であれば規則正しく配列する光受容細胞の核の配列が乱れ、網膜の空胞変性を認めた。免疫組織化学により TDP-43 は主に光受容細胞の核内に発現していることを確認した。発現した TDP-43 のリン酸化、ユビキチン化は認められなかった。また、TDP-43 の発現量を増加させた TDP-43 (2x) tg fly においては、網膜の空胞変性がより増悪し、変性の程度は容量依存的であることがわかった。
2. A315T、Q343R、G298S、M337V の 4 つの FALS 変異型 TDP-43 tg fly は、いずれも野生型 TDP-43 tg fly と同等の発現量を認めた。いずれの FALS 変異型 TDP-43 tg fly も、野生型 TDP-43 tg fly と比して、複眼の外部形態では個眼の融合や剛毛の極性の乱れが目立ち、組織学的にも網膜の空胞変性がより顕著であった。免疫組織化学により変異型 TDP-43 は核内に局在することが確認された。この実験より、FALS 変異による毒性の増強が示された。
3. ALS モデルに近付けるため、運動ニューロン特異的に野生型及び家族性 ALS 変異型 TDP-43 を発現する tg fly の解析を行った。組織学的には運動ニューロン・筋とも顕著な変化を認めなかったが、TDP-43 tg fly は lacZ tg fly よりも寿命が著明に短縮し、FALS 変異型 TDP-43 tg fly は野生型 TDP-43 tg fly よりもさらに寿命が短縮した。また、日齢依存的な運動機能障害も認められた。

4. TDP-43 tg fly の毒性発揮機序の解析のため、各種機能ドメイン欠失型 TDP-43 を複眼特異的に発現させた tg fly の作出・解析を行った。C 末端領域、Gly rich domain を欠失した変異体は網膜の空胞変性が著明に増悪し、一方 RNA recognition motif (RRM) 1、RRM1+RRM2 を欠失した変異、RNA 結合能が低下することが知られている W113A/R151A 変異体の tg fly は網膜の変性は消失あるいは軽減された。この結果から、毒性の発揮には RRM1 が必要であること、また C 末端領域の欠失により毒性が増強することが示された。
5. TDP-43 は正常では核内に存在し、ALS・FTLD-U の病理では核から消失し細胞質に封入体を形成するため、核と細胞質のどちらで毒性を呈するか検討のため、核移行シグナルに変異を入れた NLS mt を作成した。NLS mt tg fly において変異型 TDP-43 は細胞質に局在し、発現量は野生型 TDP-43 tg fly の 1.5 倍程度であった。外部形態では剛毛の脱落が顕著であり、網膜の空胞変性も高度であった。NLS mt にさらに RRM 欠失、あるいは W113A/R151A 変異を持つ二重変異体では毒性は全く消失した。また、NLS mt に FALS 変異を加えると FALS 変異による毒性増強効果はさらに強調されることが示された。
6. 組織で認められた毒性の程度と、組織に発現した変異型 TDP-43 タンパク質の不溶性の程度の相関を調べるため、界面活性剤・変性剤を用いた段階抽出を行い、毒性と不溶性に一定の傾向はないことが示された。
7. 上記までの検討で RRM が毒性発揮に必要であることから、C 末端領域の欠失あるいは FALS 変異により毒性が増強することから、「毒性発揮には RNA 結合能が必要で、C 末端領域の変異により RNA 結合能が上昇している」との仮説を立て、electromobility shift assay によって *in vitro* で RNA 結合能を評価した。その結果、C 末端領域の欠失では RNA 結合能が上昇し、C 末端領域に位置する FALS 変異体でも RNA 結合能が上昇していることが示された。

以上、本論文はトランスジェニックショウジョウバエを用いて TDP-43 の毒性発揮機序には RRM が必要であり、FALS 変異により毒性増強が見られることを示し、FALS 変異の変異効果は RNA 結合能の上昇に起因する可能性を示した。特に FALS 変異による毒性増強は培養細胞を用いた研究からは示されておらず、FALS 変異の変異効果が何に起因するかいまだに明らかになっていない点において、非常に価値のある研究である。本研究は、神経変性疾患において蓄積する物質が不溶性の獲得によって毒性を獲得するとのミスフォールディング仮説ではなく、これまであまり注目されてこなかった正常機能の破綻による疾病発症の可能性に目を向けるものであり、神経変性疾患の病態研究においても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。