

氏名	じゃんたびろん さりにー JANTRAPIROM SALINEE
学位(専攻分野)	博士(学術)
学位記番号	博甲第889号
学位授与の日付	平成30年9月25日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当
研究科・専攻	工芸科学研究科 バイオテクノロジー専攻
学位論文題目	The roles of <i>Drosophila</i> ubiquilin in neurological disorders (神経疾患におけるショウジョウバエユビクリンの役割)
審査委員	(主査)教授 山口政光 教授 伊藤雅信 教授 宮田清司 准教授 吉田英樹

論文内容の要旨

RNA やタンパク質のホメオスタシスが神経系で重要な働きをしていることが明らかになりつつある。本申請論文では、これらの異常が筋萎縮性側索硬化症(ALS)や前頭側頭型認知症(FTD)などの神経疾患をもたらす仕組みを明らかにするために、ショウジョウバエモデルを用いて行った研究について英文で記述されている。本申請論文は、序論、第一章「キイロショウジョウバエにおけるヒト FUS 毒性制御の仕組み」、第二章「Ubiquilin (ユビクリン) の枯渇はキイロショウジョウバエに神経毒性を誘発する」と結論から構成されている。

序論では本研究の背景と目的が述べられている。タンパク質ホメオスタシスはタンパク質の生成と分解のバランスを意味し、細胞の生存と個体の健全な生育に重要である。このタンパク質ホメオスタシスの破綻は、アルツハイマー病、パーキンソン病、そして ALS などの神経変性疾患に関連していることが知られている。一般的にミスフォールドしたタンパク質は、ユビキチン・プロテアソーム系やオートファジーなどで除去される。これらの破綻が、毒性を持ったタンパク質の蓄積をもたらし、ALS を始めとする神経変性疾患発症の引き金となっている。ALS/FTD の原因因子として知られるユビクリンは、ユビキチン化されたミスフォールドタンパク質をプロテアソームにリクルートする働きを持つ。一方 RNA ホメオスタシスの破綻も、特に ALS/FTD 発症の主要な要因となっていることが示唆されている。ALS/FTD の原因因子として知られる TDP-43 や FUS は RNA 結合性タンパク質であり、ALS 患者や FTD 患者の神経細胞で、TDP-43 や FUS を含むタンパク質凝集体が観察されている。これまでに ALS の原因遺伝子として、タンパク質ホメオスタシスと RNA ホメオスタシスにそれぞれ関与する複数の遺伝子が同定されているが、両者の関連についてはまだよくわかっていない。このような学術的背景のもとに、申請者はショウジョウバエをモデルとして用いて、RNA ホメオスタシスとタンパク質ホメオスタシスの破綻が ALS/FTD などの神経変性疾患をもたらす仕組みについての研究を開始したことが述べられている。

第一章では、標的遺伝子の転写調節や転写後調節に関与する FUS による ALS 患者の神経細胞でのタンパク質凝集体形成とその変更の仕組みについて述べられている。ヒト FUS をショウジョウ

ョウバエの複眼原基で発現させると大部分が毒性を持つ可溶性となり、成虫複眼の形態形成異常を引き起こす。この時に細胞内で RNA プロセッシングや RNA-タンパク質複合体の隔離に機能する長鎖非コード RNA である hsr ω をノックダウンすると、ヒト FUS の転写産物が減少し、かつヒト FUS-LAMP1 の不溶性凝集体が形成される。この時、複眼の形態異常が回復するので、この不溶性凝集体に毒性は無いと判断される。このようにヒト FUS を含む凝集体形成によりヒト FUS 毒性を制御する経路が存在し、これに長鎖非コード RNA が関連していることが明らかにされた。

第二章では、ショウジョウバエのユビクリンが運動や学習能力が障害される神経変性疾患 ALS/FTD に関与することが述べられている。ユビクリンを全神経でノックダウンすると、ユビキチン化されたタンパク質が蓄積し、神経・筋接合部のシナプスや腹部神経節の形態異常を引き起こし、運動能力の低下を誘導する。また学習・記憶を司るキノコ体の形態も異常になり、学習・記憶能力の低下も観察された。ショウジョウバエの TDP-43 ホモログ (TBPH) に注目して解析すると、本来は核に局在する TBPH が、ユビクリンノックダウンにより、ユビキチン化されて細胞質に蓄積することが明らかになった。このユビキチン化された TBPH は細胞抽出液の可溶性画分に回収される。またユビキチン化された可溶性 TBPH はユビキチン・プロテアソーム系やオートファジー等を介してタンパク質恒常性維持に働くショウジョウバエ VCP を同時に過剰発現させると減少し、またその時に運動能力も回復させることから、神経毒性の原因となっていると考察している。

結論では、これら二つの研究から、RNA ホメオスタシスやタンパク質ホメオスタシスの破綻が、ALS/FTD を始めとする各種神経変性疾患発症の引き金となっていること、また今後の新規治療法開発の標的となりうることなど、今後の研究の展望について述べられている。

論文審査の結果の要旨

タンパク質ホメオスタシスはタンパク質の生成と分解のバランスを意味し、細胞の生存と個体の健全な生育に必須である。一般的にミスフォールドしたタンパク質は、ユビキチン・プロテアソーム系やオートファジーなどで除去され、これらの破綻が毒性を持ったタンパク質の蓄積をもたらし、様々な神経変性疾患発症の引き金になると考えられている。

筋萎縮性側索硬化症 (ALS) /前頭側頭型認知症 (FTD) の原因因子として知られる Ubiquilin (ユビクリン) は、ユビキチン化されたミスフォールドタンパク質をプロテアソームにリクルートする働きを持つ。一方 RNA ホメオスタシスの破綻も、特に ALS/FTD 発症の主要な要因となっていることが示唆されている。ALS/FTD の原因因子として知られる TDP-43 や FUS は RNA 結合性タンパク質であり、患者細胞で TDP-43 や FUS を含むタンパク質凝集体が観察されている。これまでに ALS/FTD の原因遺伝子として、タンパク質ホメオスタシスと RNA ホメオスタシスにそれぞれ関与する複数の遺伝子が同定されているが、両者の関連についてはまだよくわかっていない。このような学術的背景のもとに、申請者はショウジョウバエをモデルとして用いて、RNA ホメオスタシスとタンパク質ホメオスタシスの破綻が ALS/FTD 発症に至る仕組みについての研究を開始した。

まず申請者は、ヒト FUS をショウジョウバエの複眼原基で発現させると大部分が毒性を持つ可溶性となり、成虫複眼の形態異常を引き起こすことを見出した。この時に長鎖非コード RNA

(*hsrw*) をノックダウンすると、ヒト FUS の転写産物が減少し、かつヒト FUS-LAMP1 の不溶性凝集体が形成され、複眼形態異常が回復する。このようにヒト FUS を含む凝集体形成により、その毒性を制御する経路が存在し、これに長鎖非コード RNA が関与していることを見出した。

一方ショウジョウバエのユビクリンを全神経でノックダウンすると、ユビキチン化されたタンパク質が蓄積し、神経・筋接合部のシナプスや腹部神経節の形態異常を引き起こして、運動能力の低下を誘導する。また学習・記憶を司るキノコ体の形態も異常になり、学習・記憶能力の低下が観察された。ショウジョウバエの TDP-43 ホモログ (TBPH) に注目して解析すると、本来は核に局在する TBPH が、ユビクリンノックダウンにより、ユビキチン化されて細胞質に蓄積することを見出した。このユビキチン化された TBPH は細胞抽出液の可溶性画分に回収される。この時ユビキチン・プロテアソーム系やオートファジー等に関わる VCP を同時に過剰発現させるとこれが減少し、運動能力も回復させることから、このユビキチン化された TBPH が神経毒性の主要因となっていると考察している。

これら二つの研究は、ショウジョウバエをモデルとして用いて、RNA やタンパク質ホメオスタシスの破綻から、ALS/FTD 発症に至る仕組みを明らかにしたものであり、大きな学術的意義を持つ。また今後の新規治療法開発への道筋を示したものとして社会的意義も大きい。

これらの研究は、申請者が筆頭著者のものを含む、査読制度のある国際科学雑誌に掲載済みの下記の論文 2 編を基礎としている。

- 1) Luca Lo Piccolo, Salinee Jantrapirom, Yoshitaka Nagai and Masamitsu Yamaguchi (2017)
FUS toxicity is rescued by the modulation of lncRNA *hsrw* expression in *Drosophila melanogaster*. SCIENTIFIC REPORTS 7(1) 15660. doi: 10.1038/s41598-017-15944-y.
- 2) Salinee Jantrapirom, Luca Lo Piccolo, Hideki Yoshida and Masamitsu Yamaguchi (2018)
A new *Drosophila* model of *Ubiquilin* knockdown shows the effect of impaired proteostasis on locomotive and learning abilities. Experimental Cell Research 362, 461-471.
また参考論文として査読制度のある下記の国際科学雑誌 1 編にも掲載されている。
- 3) Salinee Jantrapirom, Luca Lo Piccolo, Hideki Yoshida and Masamitsu Yamaguchi (2018)
Depletion of Ubiquilin induces an augmentation in soluble ubiquitinated *Drosophila* TDP-43 to drive neurotoxicity in the fly. Biochimica et Biophysica Acta-Molecular Basis of Disease, 1864, 3038-3049.