



| | |
|------------------------|---|
| Title | The study on mechanism of neuronal cell death in amyotrophic lateral sclerosis regarding U6 snRNA expression change. [an abstract of dissertation and a summary of dissertation review] |
| Author(s) | 矢原, 真郎 |
| Citation | 北海道大学. 博士(生命科学) 甲第13164号 |
| Issue Date | 2018-03-22 |
| Doc URL | http://hdl.handle.net/2115/69917 |
| Rights(URL) | https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/ |
| Type | theses (doctoral - abstract and summary of review) |
| Additional Information | There are other files related to this item in HUSCAP. Check the above URL. |
| File Information | Masao_Yahara_review.pdf (審査の要旨) |



[Instructions for use](#)

学位論文審査の要旨

博士の専攻分野の名称 博士(生命科学) 氏名 矢原 真郎

| | | | |
|-------|----|----|-------|
| 審査担当者 | 主査 | 教授 | 金城 政孝 |
| | 副査 | 教授 | 出村 誠 |
| | 副査 | 教授 | 幸田 敏明 |
| | 副査 | 教授 | 芳賀 永 |

学位論文題名

The study on mechanism of neuronal cell death in amyotrophic lateral sclerosis regarding U6 snRNA expression change.

(U6 snRNA の発現量変動に着目した筋萎縮性側索硬化症における神経細胞死機構に関する研究)

博士学位論文審査等の結果について (報告)

本研究では、Transactivation response RNA/DNA-binding protein 43 kDa (TDP-43)機能の喪失に伴う神経細胞死のメカニズムを明らかにすることを目的とし、TDP-43 ノックダウン細胞を用いた snRNA 発現量解析を行った結果、U6 snRNA の発現量が減少し、その減少が、神経細胞死や異常 RNA スプライシングに寄与することを報告した。

第1章では、まず、筋萎縮性側索硬化症 (ALS) は運動ニューロンが神経細胞死を起こす難治性の神経変性疾患であることから、ALS の神経細胞死に関わるメカニズム解明の社会的意義について言及した。次に、これまでに、ALS 責任遺伝子の中に、TDP-43 をはじめとした RNA スプライシングに関与する機能を持つものが複数存在することから、ALS で起こる神経細胞死の原因として RNA スプライシングの関与に注目していること、および、TDP-43 の核内における機能の喪失が ALS における神経細胞死の一因として考えられているにも関わらず、TDP-43 機能の喪失から神経細胞死に至るメカニズムは未知な部分が多いという課題点を挙げ、この点について RNA スプライシングの観点から取り組むことを述べた。

RNA スプライシングを行うスプライセオソームを構成する主要なコンポーネントに核内低分子 RNA (snRNA) があるが、その一つである U6 snRNA の発現量が、ALS 患者の脊髄中で減少することが報告されている。第2章では、この点に着目し、TDP-43 機能喪失のモデルとして TDP-43 ノックダウン細胞を用い、U6 snRNA の発現量解析を行った。TDP-43 をノックダウンするために、神経芽細胞種 Neuro2A に対し siRNA を導入した結果、TDP-43 タンパク質発現量が 2%まで減少した。この系を用いて、U6 snRNA 発現量を尿素による変性ポリアクリルアミドゲル電気泳動(Urea-PAGE)と逆転写定量的 PCR で解析した結果、TDP-43 ノックダウン細胞内において U6 snRNA の発現量は約 50%まで減少した。さらに、細胞破碎液中の TDP-43 を免疫沈降で回収したところ、回収した TDP-43 に U6 snRNA が結合していた。し

たがって、ALS 患者の脊髄内同様、TDP-43 の機能を低下させた場合に、U6 snRNA の発現量が低下すること、ならびに、そのメカニズムとして、U6 snRNA が TDP-43 に結合することで、安定化を受けている可能性があることを示唆した。

第3章では、TDP-43 ノックダウン細胞内における U6 snRNA 発現量減少の神経細胞死への寄与について調べた。TDP-43, U6 snRNA それぞれノックダウンした Neuro2A 細胞を、Propidium Iodide (PI) を用いて死細胞染色で観察したところ、細胞生存率の有意な低下が見られた。TDP-43 ノックダウン細胞に対し、外来性の U6 snRNA を導入することで U6 snRNA 発現量を回復させたところ、細胞生存率が TDP-43 をノックダウンしない場合とほぼ同レベルまで回復した。これらのことから、TDP-43 ノックダウンに伴う U6 snRNA の発現量減少は TDP-43 ノックダウンすることで起こる細胞死に関与していることが明らかになった。

さらに、TDP-43 ノックダウン細胞内で起こることが報告されている異常 RNA スプライシングが、細胞死に関与すると示唆されていることから、U6 snRNA 発現量減少がこれらを介して細胞死に至るメカニズムがあるのではないかと考えた。TDP-43 ノックダウン細胞の U6 snRNA 発現量を回復させ、RNA スプライシングの状態を観察した結果、Dnajc5 および Sortilin 1 遺伝子の RNA スプライシング異常が回復したことから、U6 snRNA の発現量減少は、Dnajc5 および Sortilin 1 の RNA スプライシング状態に関与していることが明らかになった。しかし、スプライシング状態は完全に回復するには至らず、細胞生存率の回復への寄与は小さいと考えられた。RNA スプライシング状態が高い回復率を示す遺伝子は、細胞死の直接的な原因となることが予想されるため、これらを同定していくことが今後の課題であると結論付けている。

以上より、TDP-43 機能の喪失は U6 snRNA の発現量を減少させ、U6 snRNA 発現量減少はスプライシング異常を介して細胞死に寄与するということがわかった。

これを要するに、著者は、TDP-43 機能を喪失した時に起こる snRNA の発現量変化に生理的意義があることの新知見を得たものであり、神経変性疾患に対してその原因究明に貢献するところ大なるものがある。

よって著者は、北海道大学博士（生命科学）の学位を授与される資格あるものと認める。