

## 論文内容の要旨

論文提出者氏名 楯村 由紀恵

論文題目 (注意: 日本語のタイトルまで英訳していただく必要はありません。)

Overexpression of *ter94*, *Drosophila VCP*, improves motor neuron degeneration induced by knockdown of *TBPH*, *Drosophila TDP-43*

### 論文内容の要旨

筋萎縮性側索硬化症 (ALS)は進行性の運動神経変性疾患であり、発症から2-5年の間に死に至る病気である。ALSの病態における有名な特徴として、通常は核に多く存在する TAR DNA-binding protein 43 (TDP-43)が細胞質に異常凝集することが知られている。*TBPH*はヒトにおけるTDP-43のショウジョウバエホモログである。先行研究では、*TBPH*をノックダウン (KD) するとショウジョウバエの運動機能低下や運動神経変性が核の機能喪失によって引き起こされることが報告されている。また、以前に我々はヒトにおけるVCPのショウジョウバエホモログである *ter94*がヒトにおける *FUS*のショウジョウバエホモログである *Caz*をノックダウンすることによって起こるショウジョウバエの運動神経変性を調節する因子であることを2013年に論文発表している。この研究では、TDP-43に関連したALSの病態へのVCPの影響を調べることを目的として、ショウジョウバエを用いて *TBPH*と *ter94*の遺伝的相互作用を研究した。

複眼原基特異的に *TBPH*-KD ショウジョウバエを作成し、その成虫複眼を操作型電子顕微鏡 (KEYENCE VE7800) で観察した。この複眼特異的 *TBPH*-KD による表現型を指標として、*ter94*の機能喪失型ショウジョウバエ、*ter94*の過剰発現型ショウジョウバエをそれぞれ交配し、成虫複眼の形態変化を確認した。運動機能の測定を目的として、神経特異的に *TBPH*をノックダウンしたショウジョウバエを作成し、運動能力と神経筋接合部 (NMJ)における運動ニューロンの形態を観察、中枢神経 (CNS)におけるTBPH蛋白を免疫染色し、複眼特異的 *TBPH*-KD のスクリーニングで得られた *ter94*との遺伝的相互作用を調べた。運動能力測定 (climbing assay) は、20匹の雄の成虫を直径3cmの円を底面とした20cm程度の高さのガラス瓶に入れ、tappingによって全ての成虫を底面に落とした後に成虫がガラス壁面を登るのをビデオで記録した。これを5回繰り返し、tapping後の5秒後で画像を静止し、2cm毎につけられたメモリを1匹が一つ越えるとclimbing scoreを1点として換算し、スコア化した。羽化後、3日、7日、14日、21日、28日目まで測定した。NMJの観察は、3齢幼虫をHL3 saline中で解剖し、4% paraformaldehyde/PBSで30分間固定、2% BSA/PBS/0.1% TritonX-100で30分間ブロッキングして、FITC結合ヤギ抗HRP抗体で染色した。共焦点レーザー走査型顕微鏡 (Carl Zeiss LSM510) でZ軸方向に1 $\mu$ mの間隔でスライスして得た各切片をマージさせた。第4筋肉上のNMJにおける神経枝の長さをMetaMorph imaging systemを

用いて測定した。CNSのTBPH蛋白の免疫染色では3齢幼虫をHL3 saline中で解剖し、4% paraformaldehyde/PBSで15分間固定、Phalloidinで染色、10% NGS/PBS/0.1% TritonX-100で30分間ブロッキングして、ウサギ抗TBPH抗体で染色、DAPIで染色した。共焦点レーザー走査型顕微鏡 (Carl Zeiss LSM510) で観察した。統計解析はGraph Pad Prismを用い、独立二群間の比較解析はMann-Whitney U test、独立した三群以上の統計解析はone-way ANOVAを用いて、その中の二群間の検定にはDunnett検定を用いた。

複眼原基特異的 *TBPH*-KD では個眼の融合や剛毛の消失などの rough eye 表現型を認めた。*TBPH*-KD と *ter94* 欠失変異系統との交配により、rough eye の増強が確認された。また、*TBPH*-KD と *ter94* の過剰発現系統との交配により、rough eye の改善が確認された。また、神経特異的 *TBPH*-KD では運動能力が顕著に低下し、神経特異的 *TBPH*-KD に *ter94* 欠失変異系統を交配すると、運動能力は3日から14日までの測定においてさらに低下した。神経特異的 *TBPH*-KD に *ter94* 過剰発現系統を交配すると運動能力が改善した。次にNMJの神経枝の長さを測定すると神経特異的 *TBPH*-KD では短縮が認められ、神経終末ボタンの数の減少が認められた。*TBPH*-KD と *ter94* 欠失変異系統の交配では、神経枝の長さ、神経終末ボタンの数や大きさには変化が見られなかった。*TBPH*-KD と *ter94* 過剰発現系統の交配では神経枝の長さ、神経終末ボタンの数が改善した。CNSの免疫染色では、神経特異的 *TBPH*-KD でTBPH蛋白は低下しており、*ter94* 欠失変異系統を交配することではTBPHの染色された蛋白は変化を認めなかった。*ter94* 過剰発現系統を交配するとTBPH蛋白の上昇が認められた。

今回の結果により、*ter94*の過剰発現が *TBPH*-KD ショウジョウバエにおける複眼の変性や運動能力の低下、運動神経終末の長さ、CNSにおけるTBPHの蛋白量を改善することがわかった。この結果は以前に我々が報告した、*Caz*-KDにおける *ter94*の作用に類似している。TDP-43 (TBPH) と *FUS* (*Caz*) は構造上も類似点を多数持っている。その機能は、mRNAの代謝に大きく関わり、核-細胞質間輸送にも関わっている。一方、VCP (*ter94*) はオートファジー、細胞膜癒合、核-細胞質間輸送などに関わる多機能蛋白である。近年、核-細胞質間輸送を元に戻すことが、神経変性を減少させることが酵母、マウスのALS/FTLDモデルで報告されている。(Jovicic A et al. 2015; Ward ME et al. 2014; Boeynaems et al. 2016) 核-細胞質間輸送はALS/FTLDの治療目標となりうることを述べている文献もある。(Moisse K et al. 2009) 我々の今回の結果はヒトにおけるTDP-43とVCPの関係を反映していると考え、VCPはTDP-43の核-細胞質間輸送において、TDP-43を核内へ輸送する方向にシフトさせる可能性を考えた。これはCNSにおいてTBPHの核内蛋白量が *ter94* 過剰発現によって上昇したことに準拠する。我々の結果は、VCPの過剰発現がTDP-43に関連するALSの神経変性を抑制する可能性を示唆する。このことは今後のALSの病態メカニズムの研究や根本治療薬の探索に貢献するものと期待される。