







学位論文審査の結果の要旨

審査区分 課・論	第 680 号	氏名	森崎 郁子
審査委員会委員	主査氏名	井原 健二	
	副査氏名	駒 阿 勉	
	副査氏名	黒川 竜 紀	
論文題目 Modeling a human CLP1 mutation in mouse identifies an accumulation of tyrosine pre-tRNA fragments causing pontocerebellar hypoplasia type 10 (CLP1 遺伝子変異を導入した橋小脳低形成 10 型モデルマウスの作製とその病態解明)			
論文掲載雑誌名 Biochemical and Biophysical Research Communications			
論文要旨 <p>[背景] 遺伝性神経変性症候群である橋小脳低形成 Pontocerebellar hypoplasia (PCH) 10 型 (PCH10) の原因が CLP1 (p. R140H) 遺伝子変異である可能性について、著者の研究室では以前に報告した。しかしながら、CLP1 の R140H 変異が神経変性疾患である PCH10 の直接的原因であるかどうかの検証はなされていない。そこで今回、CLP1-R140H 変異を導入したノックインマウスを独自に作製し疾患発症との関連性とその病態分子機構の解明を試みた。</p> <p>[研究方法および結果] CRISPR/Cas9 システムを用いたゲノム編集により PCH10 患者で同定された R140H 変異を導入したノックインマウスを作製した (CLP1-R140H マウス)。そして神経生理学的実験により、CLP1-R140H マウスは有意に運動・協調運動が低下していることを証明した。また脳の面積および重量の測定と、脊髄と大脳皮質における運動ニューロンの形態および数を解析し、また小脳のプルキンエ細胞についても免疫染色により解析した。その結果、進行性の小頭症と大脳皮質における上位運動ニューロンの有意な減少を認めた。これらの結果より、CLP1-R140H マウスは進行性の神経変性症を示すことを証明した。次に神経毒性を示す tRNA 断片 (5' Tyr-tRF) の細胞内蓄積の有無についてノーザンブロットにより解析したところ、CLP1-R140H マウスにおいて神経毒性のある 5' Tyr-tRF の蓄積を認めた。特に胎児期において顕著であり、神経の初期発生段階に悪影響を及ぼすと推定した。</p> <p>[考察] CLP1-R140H ノックインマウスの解析により、CLP1 の R140H 遺伝子変異が PCH10 の直接的原因であることが明らかになった。ヒト CLP1 遺伝子変異患者から採取した細胞では、5' Tyr-tRF の蓄積がないと報告されているが、これは 5' Tyr-tRF が最も強く蓄積する胎児期ではなく、その時期を過ぎた年齢に採取した細胞を用いたため検出できなかったものと考えられる。</p> <p>[結語] CLP1 の R140H 変異は神経変性症候群の PCH10 の原因遺伝子であり、神経毒性を示す 5' Tyr-tRF の細胞内蓄積が疾患発症の原因である。</p> <p>本研究は、橋小脳低形成症 10 型 (PCH10) の患者で同定された CLP1 遺伝子変異 (p. R140H) が中枢神経系の異常を起こすことを CLP1-R140H ノックインモデルマウスを用いて明らかにしたものである。このため、審査員の合議により本論文は学位論文に値すると判定した。</p>			

最終試験
の結果の要旨
~~学力の確認~~

審査区分 ①・論	第680号	氏名	森崎郁子
審査委員会委員	主査氏名	井原健一	
	副査氏名	歌阿勉	
	副査氏名	黒川竜紀	
<p>学位申請者は本論文の公开发表を行い、各審査委員から研究の目的、方法、結果、考察について以下の質問を受けた。</p> <p>1. 緒言</p> <ul style="list-style-type: none"> ・橋小脳低形成症の疾患概念を説明せよ。 ・CLP1R140Hの機能は野生型と比べて違いがあるのか。 ・CLP1R140H変異によりTSEN複合体の機能に影響を与えるのか。 ・R140HによりCLP1蛋白質の構造が大きく変化し分解してしまう可能性について、細胞レベルまたは<i>in silico</i>解析によりあらかじめ確認しなかったか。 <p>2. 研究方法</p> <ul style="list-style-type: none"> ・他のマウスの系統ではフェノタイプは違うのか。 ・老齢マウスで表現型が現れたと報告しているが、生後どのような時期にどのような評価によってどのような表現型を観察したのか。そして最初に症状が出現した時期はいつ頃だったか。 <p>3. 結果と考察</p> <ul style="list-style-type: none"> ・チロシンtRNA断片の蓄積は大人になると減少するのに、フェノタイプが出るのが遅いのはなぜか。 ・TSEN複合体構成タンパク質の変異でも今回と同じようなフェノタイプが出るのか。 ・他の橋小脳低形成症でもチロシンtRNA断片の蓄積が見られるのか。 ・CLIP1遺伝子変異を導入したノックインマウスにおいて、神経組織、特に上位運動ニューロンに障害が限定されているのはなぜか。錐体外路系など、神経組織のその他の部位に障害はみられなかったか。 ・患者でチロシンtRNA断片の蓄積が見られなかったと報告されているが、その患者の年齢と今回の老齢マウスの月齢は相関しているのか。 <p>これらの質疑に対して、申請者は概ね適切に回答した。よって審査委員の合議の結果、申請者は学位取得有資格者と認定した。</p>			

(注) 不要の文字は2本線で抹消すること

学 位 論 文 要 旨

氏名 森崎 郁子

論 文 題 目

Modeling a human CLP1 mutation in mouse identifies an accumulation of tyrosine pre-tRNA fragments causing pontocerebellar hypoplasia type 10

(CLP1 遺伝子変異を導入した橋小脳低形成 10 型モデルマウスの作製とその病態解明)

要 旨

[緒言]

遺伝性神経変性症候群である橋小脳低形成 Pontocerebellar hypoplasia (PCH) は、これまでに 15 の病型とその原因遺伝子が報告されているが、我々は橋小脳低形成症 10 型 (PCH10) の原因が CLP1 (p.R140H) 遺伝子変異である可能性を以前に報告した。CLP1 は、RNA の 5'末端をリン酸化する酵素として初めて報告された RNA キナーゼである。tRNA 合成において、数種の tRNA 前駆体はイントロンを含んでおり、成熟化の際に tRNA splicing endonuclease (TSEN) 複合体によって除去される必要がある。CLP1 はその TSEN 複合体の構成分子であり、tRNA の成熟化に関与していることが明らかとなっている。しかしながら、CLP1 の R140H 変異が神経変性疾患である PCH10 の直接的原因であるかどうかの検証はなされておらず、発症の分子機構も明らかになっていない。そこで、今回我々は CLP1-R140H 変異を導入したノックインマウスを独自に作製して、疾患発症との関連性とその病態分子機構の解明を試みた。

[研究方法および結果]

PCH10の患者と同じR140H変異を導入したCLP1-R140Hノックインマウス(CL P1-R140Hマウス)をCRISPR/Cas9システムを用いたゲノム編集により作製した。まず、歩幅距離による運動機能測定、ロータロッドテストによる協調運動測定等の神経生理学的実験を行なったところ、CLP1-R140Hマウスは有意に運動・協調運動が低下していた。さらに、脳の面積および重量の測定と、脊髄と大脳皮質における運動ニューロンの形態および数をChAT抗体による免疫染色とNissl染色で解析した。また、小脳のプルキンエ細胞についてもCalbindin抗体を用いた免疫染色を行なって解析した。その結果、脊髄の下位運動ニューロンと小脳には異常はなかったが、進行性の小頭症と大脳皮質における上位運動ニューロンの有意な減少を認めた。この結果より、CLP1-R140Hマウスは明らかに進行性の神経変性症を示すことが判明した。

我々は、CLP1のキナーゼ活性消失によるtRNA前駆体の成熟化異常によって、神経毒性を示すtRNA断片(5Tyr-tRF)の細胞内蓄積が生じることを以前に報告している。そこで、ノーザンブロットによりRNA断片の蓄積を解析したところ、CLP1-R140Hマウスにおいても神経毒性のある5Tyr-tRFの蓄積を認めた。特に、胎児期において顕著であり、神経の初期発生段階に悪影響を及ぼすのではないかと考えられた。

[考察]

CLP1-R140Hマウスの解析により、CLP1のR140H遺伝子変異がPCH10の直接的原因であることが明らかになった。ヒトCLP1遺伝子変異患者から採取した細胞では、5Tyr-tRFの蓄積がないと報告されているが、これは5Tyr-tRFが最も強く蓄積する胎児期ではなく、その時期を過ぎた年齢に採取した細胞を用いたため検出できなかったものと考えられる。

[結語]

CLP1のR140H変異は神経変性症候群のPCH10の原因遺伝子であり、神経毒性を示す5Tyr-tRFの細胞内蓄積が疾患発症の原因であることが示唆された。