

学位論文審査の結果の要旨

審査区分 課・論	第 655 号	氏 名	八 塚 洋 之
審 査 委 員 会 委 員		主査氏名	栗田 洋孝 
		副査氏名	伊東 弘樹 
		副査氏名	清川 裕 
<p>論文題目 Exosc2 deficiency leads to developmental disorders by causing a nucleotide pool imbalance in zebrafish (ゼブラフィッシュにおいて Exosc2 欠損はヌクレオチド代謝バランスの不均衡を生じ発達障害の原因となる) 論文掲載雑誌名 Biochemical and Biophysical Research Communications</p> <p>論文要旨 【緒言】 RNA エキソソームは、様々な RNA を分解・修飾するタンパク質複合体であり、RNA エキソソームを構成する分子種の1つの EXOSC2 の遺伝子変異は、神経変性症候群の原因となることが報告されているが、その病態機構については不明である。そこで、本論文はゼブラフィッシュを用いて <i>exosc2</i> 遺伝子ノックアウトによる神経変性疾患の発症機構を解明することを目的とした。</p> <p>【研究対象および方法】 CRISPR/Cas9 システムにて <i>exosc2</i> 遺伝子欠損ゼブラフィッシュ (<i>exosc2</i>^{-/-}) を作製し、蛍光実体顕微鏡により表現型を解析した。また行動解析としてロコモーター活性を測定した。神経学的な評価として運動神経核を GFP 蛍光タンパク質により観察できる Tg(CM.isl1: GFP) strain と <i>exosc2</i>^{-/-} を交配し、その脊髄運動神経核を観察した。また電子顕微鏡にてミエリンの観察を行った。ヌクレオチド代謝の評価としてミエリン関連遺伝子の qRT-PCR 及び質量分析計によるメタボライト測定を行いその結果を解析した。ラパマイシンを投与した <i>exosc2</i>^{-/-} 群をコントロール群と比較した。</p> <p>【結果】 <i>exosc2</i>^{-/-} では側弯、小頭症、小眼球症等の表現型を示し 10 日前後で死亡した。網膜ロドプシンの減少を認め、脊髄運動神経核の有意な減少およびロコモーター活性の低下を認めた。ミエリンの形成不全と軸索の萎縮を認め、ミエリン関連遺伝子の mRNA レベルが、野生型と比較して有意に増加を認めた。これは RNA エキソソーム不全により分解されるべき mRNA が蓄積したものと思われ、ヌクレオチド再生におけるサルベージ経路の破綻が考えられた。実際、質量分析によりリボヌクレオシド三リン酸の減少を認め、ヌクレオチド代謝バランスの不均衡が示唆された。<i>exosc2</i>^{-/-} に mRNA 代謝促進作用のあるラパマイシンを投与したところ、ヌクレオチド代謝バランスの異常が改善し、生存期間の延長、小頭症の改善、網膜ロドプシンの増加、脊髄運動神経核の増加を認めた。以上より、<i>exosc2</i>^{-/-} の表現型は、RNA エキソソームの機能不全によるヌクレオチド代謝バランスの不均衡によって生じたと考えられた。</p> <p>【考察】 本研究において、ゼブラフィッシュの疾患動物モデルの解析により、EXOSC2 遺伝子異常に伴う神経変性疾患の病態の分子メカニズムの一端が解明された。この結果は、アルツハイマー病などのその他の神経変性疾患の分子病態メカニズム解明にも役立つ可能性がある。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ものと判定した。</p>			

最終試験
の結果の要旨
学力の確認

審査区分 課・論	第 655 号	氏名	八塚 洋之
審査委員会委員	主査氏名	柴田 洋孝	(柴田)
	副査氏名	伊東 弘樹	(伊東)
	副査氏名	清小路	(清小路)
<p>学位申請者は本論文の公開発表を行い、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> <ol style="list-style-type: none"> 1. 既報の遺伝的病因による網膜色素変性症の中で EXOSC2 の変異の報告はあるか？ 2. zebrafish は色の識別はヒトとどのように異なるか？またそれほどのように調べられるか？ 3. 網膜変性、神経細胞欠陥、早老症などの患者にはどの程度 EXOSC2 遺伝子変異の患者がいるか？ 4. exosc2 heterozygote knockout マウスおよび zebrafish の表現型はどのようになるか？ 5. 眼組織特異的な EXOSC2 遺伝子のノックダウンモデルを作製できるのか。 6. exosc2^{-/-} の zebrafish では、他の RNA exosome complex component の発現量は変化するか？ 7. zebrafish の雌雄は、結果へ影響しないのか。 8. exosc2^{-/-} では脳、眼の大きさが小さくなり網膜のロドプシン量が減少しているが、生存率が短くなる理由は何か？ 9. zebrafish は明るさと色の両者を識別できるのか？ 10. 網膜の光受容タンパクのロドプシン量（桿体）が減少しているが、錐体のロドプシン量も変化するか？ 11. zebrafish に光を照射したときの光受容蛋白レベルは変化するか？ 12. ラパマイシンの投与量設定の根拠は何か。 13. ラパマイシンによる mRNA 代謝促進以外の影響はないか。 14. ラパマイシン投与により表現型のいくつかの改善を認めているが、locomotor activity も改善したのか？ 15. RNA exosome complex の中で exosc3 変異が橋小脳変性症をおこし、exosc2 変異が網膜色素変性症をきたすという部位特異性はどのような機序で起こると推測されるか？ 16. 論文 p.1472 最後の sentence の「exosc2^{-/-}」は「exosc2^{+/+}」の間違いではないのか？ 17. Fig 2A Representative trajectory plot に関して、どのようにして計測したのか？ 18. ミエリンの変性をもとに exosc2 欠損における神経異常が起こると考えて myelin basic protein の mRNA level を検討しているが、Fig 2E 電子顕微鏡写真でミエリンの変性に加えて、軸索もかなり変性しているように見えるがミエリン蛋白の異常だけで説明できるのか？ <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 八塚 洋之

論 文 題 目

..... Exosc2 deficiency leads to developmental disorders by causing a nucleotide pool imbalance in zebrafish

..... (ゼブラフィッシュにおいて Exosc2 欠損はヌクレオチド代謝バランスの不均衡を生じ発達障害の原
因となる)

要 旨

緒言 (目的)

RNA エキソソームは、様々な RNA を分解・修飾する多タンパク質複合体であり、RNA の品質管理に重要な役割を担っている。この RNA エキソソームを構成する分子 EXOSC2 の遺伝子変異は、神経変性症候群の原因となることが報告されているが、その病態機構については不明な点が多い。本論文は RNA エキソソームに関連した神経変性疾患動物モデルを作製し、その病態機構を解明することを目的とする。

研究対象及び方法 (材料を含む)

CRISPR/Cas9 システムにて exosc2 遺伝子欠損ゼブラフィッシュ (*exosc2*^{-/-}) を作製し、蛍光実体顕微鏡による観察等、その表現型を解析した。また行動解析としてロコモーター活性を測定した。神経学的な評価として運動神経核を GFP 蛍光タンパク質により観察できる Tg(CM.isl1: GFP)strain と *exosc2*^{-/-} を交配し、その脊髄運動神経核を観察した。また電子顕微鏡にて、そのミエリンの観察を行った。ヌクレオチド代謝の評価としてミエリン関連遺伝子の qPCR 及び質量分析計によるメタボライト (リボヌクレオシド三リン酸) 測定を行いその結果を解析した。ラパマイシンを投与した *exosc2*^{-/-} 群をコントロー

ル群と比較し、各種実験を行いその結果を解析した。

結果

exosc2^{-/-}は側弯、小頭症、小眼球症等の表現型を示し10日前後で死亡した。ロドプシン免疫染色においては、網膜ロドプシンの減少がみられた。また、ロコモーター活性が低下し、脊髓運動神経核の有意な減少が認められた。電子顕微鏡解析においてミエリンの形成不全と軸索の萎縮がみられたことから、ミエリン関連遺伝子の mRNA を定量したところ、野生型と比較し *exosc2*^{-/-}では有意な増加がみられた。これは RNA エキソソーム不全により分解されるべき mRNA が蓄積したものと思われ、ヌクレオチド再生におけるサルベージ経路の破綻が考えられた。実際、質量分析によりリボヌクレオシド三リン酸の減少を認め、ヌクレオチド代謝バランスの不均衡が示唆された。ラパマイシンは mRNA decay 等を含め mRNA の代謝を促進する作用がある。そこで、*exosc2*^{-/-}にラパマイシンを投与したところ、ヌクレオチド代謝バランスの異常が改善し、生存期間の延長、小頭症の改善、網膜ロドプシンの増加が観察された。また脊髓運動神経核の増加も観察された。この結果より、*exosc2*^{-/-}の表現型は、RNA エキソソームの機能不全によるヌクレオチド代謝バランスの不均衡によって生じたと考えられた。

考察

exosc2^{-/-}は、RNA エキソソームの機能不全により、上記のような表現型を呈することが示唆された。その病態メカニズムとして、RNA エキソソームの機能不全に伴う、特定の基質 RNA の異常蓄積等によるヌクレオチド代謝バランスの不均衡が考えられた。ラパマイシンは、mRNA の代謝を促進することによって、ヌクレオチド代謝バランスの不均衡を是正し、*exosc2*^{-/-}の表現型を改善させたと考えられた。

結語 (まとめ)

本研究において、ゼブラフィッシュの疾患動物モデルの解析により、EXOSC2 遺伝子異常に伴う神経変性疾患の病態の分子メカニズムの一端が解明された。この結果は、アルツハイマー病などの神経変性疾患の分子病態メカニズム解明にも役立つ可能性がある。