



TITLE:

Human models of Parkinson's disease present impaired autophagy, mitophagy and mitochondria energy metabolism(Abstract_要旨)

AUTHOR(S):

ARIAS, Jonathan

CITATION:

ARIAS, Jonathan. Human models of Parkinson's disease present impaired autophagy, mitophagy and mitochondria energy metabolism. 京都大学, 2018, 博士(生命科学)

ISSUE DATE:

2018-01-23

URL:

<https://doi.org/10.14989/doctor.k20820>

RIGHT:

許諾条件により本文は2018-04-01に公開

(続紙 1)

| | | | |
|--|--|----|----------------|
| 京都大学 | 博士 (生命科学) | 氏名 | Jonathan ARIAS |
| 論文題目 | Human models of Parkinson's disease present impaired autophagy, mitophagy and mitochondria energy metabolism (パーキンソン病のヒト疾患モデルは、オートファジー、ミトファジー、およびミトコンドリアエネルギー代謝の障害を呈する) | | |
| (論文内容の要旨) | | | |
| <p>CRISPR-Cas9システムを用いたゲノム編集技術をヒト人工多能性幹細胞 (iPS細胞) に用いることによって、アイソジェニックな遺伝的疾患モデルを作製して解析することが可能になると期待されている。しかしながら、特定遺伝子の特定部位に一塩基置換を正しく導入するようなゲノム編集がなされたクローンを得るためには、非常に多くの細胞をスクリーニングする必要があると存在する。そこで、ヒトiPS細胞から特異的な変異が遺伝子の両アレルに正しく導入されたクローンを簡便かつ高効率に選択するために、申請者は複数の蛍光蛋白質を用いたフローサイトメトリー法を用いる新しい方法を開発し、その方法をFACS-assisted CRISPR-Cas9 editing (FACE)と命名した。FACE法では、ゲノムに遺伝子がランダムに挿入されたクローンや、標的部位において非相同末端結合が引き起こされたクローンを排除し、正しく相同組み換えが誘導されたクローンのみを効率よく取り出すことができることと示された。そして申請者は、α-シヌクレインの遺伝子SNCA中のパーキンソン病関連突然変異を含む一連の同一遺伝子系統のヒトiPS細胞を、FACE法を用いて作製することに成功した。そして、iPS細胞から神経幹細胞に分化させるとα-シヌクレインが発現し、SNCAに変異を有する神経幹細胞ではミトコンドリアの機能が低下していることを明らかにした。</p> <p>パーキンソン病は、世界で二番目に患者数が多い神経変性疾患であり、その発症に関わるとされる遺伝的要因として、およそ10の遺伝子における変異が報告されている。これらの遺伝子変異は、複数の細胞機能に影響をおよぼし、タンパク質のホメオスタシスの低下を引き起こすものを含むことが知られている。そこで申請者は、タンパク質のホメオスタシスの低下に関わる、オートファジー、ミトファジーとミトコンドリアのエネルギー代謝を低下させるパーキンソン病に関連する3つの遺伝子における複数の突然変異体を解析した。具体的には、パーキンソン病の患者細胞から作製されたLRRK2, VPS35, およびPINK1に突然変異体を有するiPS細胞の解析を行った。そして、オートファジーやミトファジーが早期の発生時期の細胞に対応するiPS細胞で盛んに誘導されていること、オートファジー関連突然変異を有するiPS細胞ではオートファジーが減少していること、オートファジーと比較してミトファジーは亢進していること、リソゾームの体積が減少していることを明らかにした。これらの現象が、パーキンソン病の発症に関わることが予想され、興味深い。</p> | | | |

(論文審査の結果の要旨)

ゲノム編集を実行する方法としてCRISPER-Cas9システムが確立され、ヒトiPS細胞にゲノム編集を行うことによって同一遺伝系統における遺伝的疾患モデルを作製して解析することが強く期待されている。このようなモデル系の作製においては、ゲノム編集で得られた一塩基多型系統のヒトiPS細胞やES細胞を高効率で取得することが重要な課題となっている。本論文で確立されたハイスループットFACS解析を用いたポリクローナルアイソジェニックiPS細胞ラインの作製法であるFACE法は、このような課題を克服する方法である。これまでの報告では、ゲノム編集を行ったiPS細胞から目的とする相同変異のみが引き起こされたクローンが取得される効率は0.3-2.8%であったが、FACE法によって濃縮した後には50%が目的とするクローンであるという。そして、FACE法を用いて、実際に α -シヌクレインの遺伝子SNCA中のパーキンソン病関連突然変異を含む一連の同一遺伝子系統のヒトiPS細胞を作製し、その解析までも行っていることは評価できる。

また、オートファジー、ミトファジーとミトコンドリアのエレルギー代謝を低下させるパーキンソン病に関連する3つの遺伝子(LRRK2, VPS35, およびPINK1)の突然変異体を有するヒトiPS細胞の解析においては、オートファジーとミトファジーが実行される各ステップを同定するために、従来広く行われてきた生化学的解析ではない新しい方法を確立して応用している。具体的には、オートファジーとミトファジーのマーカーとなるLC3とATP5C1遺伝子それぞれに、蛍光タンパク質とpHセンサーとなるタンパク質を融合した分子を作製し、オートファジーとミトファジーの各ステップを形態学的に定量することに成功している。この方法を用いることによって、オートファジー関連突然変異を有するiPS細胞ではオートファジーが減少していること、オートファジーと比較してミトファジーは亢進していること、リソゾームの体積が減少していることを明らかにすることが初めてなしえたと考えられ、評価できる。パーキンソン病患者で見いだされている病因に関連するとされる突然変異においては、他の遺伝的背景の影響を排除することが困難であり、絶対的な病因とは断定されていない。この点を考えると、本論文で解析したLRRK2, VPS35, およびPINK1のパーキンソン病に関連する突然変異体を、FACE法によってiPS細胞に導入し、同一遺伝系統における変異が神経変性疾患を誘導することができるのかを、今後明らかにすることができると強く期待される。

本論文の全編を通して、生命科学に関する高度で幅広い研究能力と学識が示されており、生命科学の理解・発展に寄与する新しい発見が論理的かつ一貫性をもって記述されている。よって、本論文は博士(生命科学)の学位論文として価値あるものと認めた。さらに、平成29年11月6日、論文内容とそれに関連した口頭試問を行なった結果、合格と認めた

論文内容の要旨及び審査の結果の要旨は、本学学術情報リポジトリに掲載し、公表とする。特許申請、雑誌掲載等の関係により、学位授与後即日公表することに支障がある場合は、以下に公表可能とする日付を記入すること。

要旨公開可能日： 年 月 日