



Title	Multiple knockout mouse and embryonic stem cell models reveal the role of miR-124a in neuronal maturation
Author(s)	前田, 和
Citation	大阪大学, 2024, 博士論文
Version Type	VoR
URL	https://doi.org/10.18910/96406
rights	
Note	

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

The University of Osaka

論文内容の要旨

氏名 (前田 和)	
論文題名	Multiple knockout mouse and embryonic stem cell models reveal the role of <i>miR-124a</i> in neuronal maturation (多重欠損のマウスとES細胞モデルにより明らかとなった <i>miR-124a</i> の神経成熟における役割)
論文内容の要旨	

マイクロRNAは、動植物において様々な生物学的プロセスの遺伝子発現を制御する短いタンパク質非コードRNAである。多くのマイクロRNAが脊椎動物の中枢神経系で発現していることが知られているが、その中でも、マイクロRNA-124a (*miR-124a*) は中枢神経系特異的に極めて高い発現を示すマイクロRNAである。*miR-124a*の塩基配列と神経系特異的な発現パターンは、線虫 (*C. elegans*) から、ヒトを含む哺乳類まで進化的によく保存されている。*miR-124a*は、ヒトやマウスにおいてゲノム中に*miR-124a-1/2/3*の3か所でコードされている。一方、*miR-124a*の神経系の発生や機能における役割については不明な点が多い。

本研究においては、マウスとES細胞において*miR-124a*の多重欠損のモデルを作製し、表現型を解析することにより、*miR-124a*の脳神経細胞の発生における役割を検証した。*miR-124a-3*はマウス脳においてバックグラウンドレベルでしか発現が見られなかったこと、*miR-124a-1/2/3*トリプルヘテロマウスは不妊で、その交配によって*miR-124a-1/2/3*トリプルノックアウト (TKO) マウスが得られなかったことから、*miR-124a-1/2*ダブルノックアウト (DKO) マウスを作製し、解析した。その結果、*miR-124a-1/2* DKOマウスは周産期致死を示すことが明らかとなった。DKOマウス脳のRNA-seq解析により、神経細胞のマーカーの発現レベルはコントロールと*miR-124a-1/2* DKOマウスの脳においてほとんど変化は見られないが、*miR-124a-1/2* DKOマウス脳において発現の低下が見られた遺伝子群において、神経細胞のシナプス形成や機能に関連する遺伝子群がエンリッチしていることが示された。さらに、認知症や筋萎縮性側索硬化症 (ALS) の発症や進行に関与している転写因子Tardbp/TDP-43が*miR-124a-1/2* DKOマウス脳において不活性化していることを見出した。マウス神経系の培養細胞株においてTardbpをノックダウンすると、神経突起の伸長が抑制された。また、*miR-124a-1/2/3* TKOマウスの代替として、CRISPR-Cas9システムを用いてマウス*miR-124a-1/2/3* TKO ES細胞を作製した。神経細胞分化誘導条件下において経時的な観察と免疫染色や遺伝子発現の解析を行うことによって、*miR-124a-1/2/3* TKO ES細胞は神経細胞に分化する能力を持つことが示された。以上のことから、*miR-124a*は神経細胞の初期発生よりも成熟により大きな役割を持つことが示された。

本研究は、哺乳類の中枢神経系の発生におけるマイクロRNAの機能的な役割についての理解を進め、神経科学の進歩に大きく寄与するものであると考えられる。

論文審査の結果の要旨及び担当者

氏名 (前田和)	
	氏名 (職)
	主査 教授 古川 貴久
論文審査担当者	副査 教授 松野 健治
	副査 教授 志賀 向子

論文審査の結果の要旨

マイクロ RNA(miRNA)は、様々な生物種において遺伝子発現調節に関わっていることが知られているタンパク質非コード短鎖 RNA である。ヒトやマウスの脳においては、数百種類以上もの miRNA が発現していると報告されている。しかしながら、それぞれの miRNA が生体レベルで哺乳類を含む脊椎動物の中枢神経系の発生に、どの程度重要な機能を有するかは未だよく分かっていない。学位申請者は、網膜や脳を含む中枢神経系に特異的に高発現する miRNA-124a(miR-124a) に注目し、マウスやヒトでゲノム上に 3 箇所コードされている miR-124a の多重欠損マウスや ES 細胞を用いた機能メカニズム解析を行うことで、miR-124a の生体機能メカニズムの解明を目指した。

本学位論文は、miR-124a-1 に加えて miR-124a-2, -3 の各欠損マウスを作製し、周産期致死を示した miR-124a-1, -2 のダブル欠損マウス脳のトランскルiptオーム解析から、miR-124a によって制御される遺伝子群を同定したところ、神経細胞のシナプス形成や神経機能に関わる神経成熟関連遺伝子群であることを明らかにした。さらに本論文では、miR-124a-1, -2, -3 のトリプル欠損 ES 細胞を作製し神経細胞への分化能を解析したところ、神経細胞の分化初期マーカーの発現が観察されたこと、および培養神経細胞を用いたアッセイから、miR-124a は神経細胞の初期分化には必須でなく、神経細胞の成熟に必須の機能を有することを見出している。加えて、本論文は miR-124a-1, -2 のダブル欠損マウス脳のトランскルiptオーム解析データのバイオインフォマティックス解析から、miR-124 の欠損が筋萎縮性側索硬化症や一部の認知症の原因遺伝子として知られる Tardbp/TDP-43 の機能低下と関連していることも示した。ヒト前頭側頭型認知症患者の死後脳サンプルで、ヒト miR-124a の低下が報告されていることから、本論文の結果は、ヒト認知症の発症や病態メカニズムの理解を深めるための重要知見をもたらしている。

以上のことから、本研究成果は、分子発生学、神経科学、細胞生物学、医学の進歩に寄与するところが大きい。よって、本論文は博士（理学）の学位論文として十分価値あるものと認める。