

平成 29 年 4 月 19 日現在

機関番号：82609

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2016

課題番号：15K18370

研究課題名(和文)プロフィリン1変異体の細胞毒性に関する研究

研究課題名(英文)The mechanism of cytotoxicity from ALS-linked Profilin 1 mutations

研究代表者

田中 良法(TANAKA, Yoshinori)

公益財団法人東京都医学総合研究所・認知症・高次脳機能研究分野・研究員

研究者番号：00747933

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,200,000円

研究成果の概要(和文)：筋萎縮性側索硬化症(ALS)では、核タンパク質TDP-43が病的な形をとって運動神経の細胞質に蓄積する。核内のTDP-43の働きは細胞生存に不可欠であるため、TDP-43の蓄積はALSの病因として考えられている。本研究では、病的なTDP-43を蓄積する家族性ALSの原因として同定されたPFN1遺伝子の異常が、TDP-43蓄積に与える影響を調べた。異常型PFN1を細胞に発現させると、PFN1凝集体が形成され、TDP-43を捕捉すること、さらには、捕捉されたTDP-43の一部が病的なTDP-43となり、正常なTDP-43を病的なTDP-43に変換して、TDP-43の蓄積を促進することが示された。

研究成果の概要(英文)：The nuclear protein TDP-43 accumulates at the cytoplasm of motor neurons, as a pathological form, in the patients of amyotrophic lateral sclerosis (ALS). As the role of TDP-43 in the nucleus is essential, the accumulation of pathological TDP-43 is identified as a cause of ALS. In the present study, we investigated the effect of ALS-linked PFN1 gene mutations, a cause of familial ALS characteristic of TDP-43 accumulation, on the accumulation of TDP-43 using cultured cells. The cells expressing mutant PFN1 harbored PFN1 aggregates, and those sequestered TDP-43. Furthermore, TDP-43 sequestered into PFN1 aggregates was partly converted into the pathological form of TDP-43 that promotes TDP-43 accumulation like a pathological prion.

研究分野：分子神経病理学

キーワード：Profilin1 TDP-43 ALS mutation aggregates LC3 seeding prion

1. 研究開始当初の背景

申請者の研究室では、ヒトの神経変性疾患で認められる不溶化した細胞内異常構造物の解析から、筋萎縮性側索硬化症(ALS)と前頭側頭葉変性症(FTLD)で認められる細胞質内異常構造物の主要構成成分として TDP-43 を同定するなど、神経変性疾患で認められる細胞質内で不溶化し、凝集するタンパク質の性状について解析を進めてきた。TDP-43 は不均一核リボヌクレオタンパク質(hnRNP)に分類される核に主に局在するタンパク質で、RNA と結合し、RNA の安定性やスプライシングを調節するなど生理的に重要な役割を持つ。TDP-43 陽性の細胞質内異常構造物が認められる神経、グリア細胞では、本来局在する核における TDP-43 の免疫反応性が減少、及び消失している様子が観察される。そのため、細胞質内異常構造物の毒性は、タンパク質本来の生理的な機能の消失のために生じるものと想定されてきた。しかし近年、細胞質内異常構造物そのものの毒性も、神経変性疾患の発症に重要な役割をもつことが指摘されている。

近年、ヒトにおける PFN1 遺伝子の変異が家族性 ALS の原因となることが報告され、変異型 PFN1 の発現による ALS 発症機構に注目が集まっている。PFN1 は細胞骨格の 1 つであるアクチン繊維の形成を促進する働きがある。変異型 PFN1 はアクチン結合能を欠如すること、変異型 PFN1 を発現した細胞ではアクチン重合能の阻害によりアクチン繊維の形成が抑制されることから、変異型 PFN1 による細胞骨格の形成阻害が ALS 発症に関与していると考えられている。一方で、興味深いことに、変異型 PFN1 は細胞質内で界面活性剤耐性の不溶化した凝集体を形成すること、その一部は TDP-43 と共局在することが示されている。そこで申請者は、PFN1 変異体が ALS 発症を誘導する機構として、アクチン重合能の阻害の他に、PFN1 変異体が TDP-43 の生理的な機能を阻害することで毒性を発揮する機構を想定して実験を行った。

2. 研究の目的

本研究では変異型 PFN1 が TDP-43 を捕捉することで、毒性を発揮する可能性を中心に、変異型 PFN1 による細胞毒性誘導機構の解明を目的として以下の 5 項目について検討を行う。

- (1)PFN1 と TDP-43 の相互作用部位の同定
- (2)変異型 PFN1 が TDP-43 の動態・性状に与える影響
- (3)変異型 PFN1 が遺伝子発現、スプライシング及びタンパク質発現に与える影響
- (4)細胞内小器官等に変異型 PFN1 が与える影響
- (5)PFN1 タンパク質のプリオン様性状解析

3. 研究の方法

- (1)PFN1 と TDP-43 の相互作用部位の同定

PFN1 と TDP-43 の相互作用について、共免疫沈降法により解析を行う。さらに結合部位の詳細な解析のために、TDP-43 部分欠損体を作成し、PFN1 との相互作用を解析する。(2)変異型 PFN1 が TDP-43 の動態・性状に与える影響

野生型 PFN1 と変異型 PFN1 を細胞に発現させて、TDP-43 の局在、界面活性剤耐性などを解析・比較する。

(3)変異型 PFN1 が遺伝子発現、スプライシング及びタンパク質発現に与える影響

野生型 PFN1 と変異型 PFN1 を発現させた細胞で、TDP-43 の下流の因子の発現量、及び TDP-43 がスプライシングを調節している因子のスプライシングアイソフォームを比較する。

(4)細胞内小器官等に変異型 PFN1 が与える影響

変異型 PFN1 凝集体が細胞内小器官の機能を阻害する可能性を検討するために、変異型 PFN1 と細胞内小器官マーカーの局在を検討する。共局在する場合、その器官の機能低下について調べるとともに、その器官において PFN1 と相互作用するタンパク質についても検討する。また、凝集体はタンパク質分解系の機能を阻害することが報告されていることから、ユビキチン・プロテアソーム系及びオートファジー・リソソーム系の機能に与える影響を調べる。

(5)PFN1 タンパク質のプリオン様性状解析

野生型 PFN1 と変異型 PFN1 を発現させた細胞の界面活性剤不溶性画分をレシピエントとなる細胞に導入することでプリオン様性状を比較する。

4. 研究成果

細胞に変異型 PFN1 を発現させると、ユビキチン及び p62 陽性の界面活性剤不溶性の PFN1 凝集体を細胞質内に形成し、その一部は TDP-43 が共局在した。PFN1 凝集体は他にも、オートファジーを誘導する因子 LC3 を捕捉して、LC3 の脂質修飾を阻害していた。また、プロテアソームの阻害により形成されるアグリソーム様の構造物が、変異型 PFN1 を発現した細胞では形成されなかった。変異型 PFN1 と TDP-43 を共発現した細胞では、TDP-43 の蓄積が亢進し、リン酸化 TDP-43 の蓄積が認められた。TDP-43 の部分欠損体を用いた解析から、C 末端側のプリオン様領域が変異型 PFN1 の発現による TDP-43 の蓄積亢進に必要であることが明らかとなった。さらに、PFN1 変異体を発現させた細胞から得られた界面活性剤不溶性画分をシードとして TDP-43 発現細胞に導入すると、TDP-43 の不溶化が亢進し、細胞内にリン酸化された TDP-43 が蓄積した。

以上の結果から、ALS の原因となる変異によって凝集した PFN1 は、TDP-43 を細胞質内で捕捉すること、さらには、捕捉した TDP-43 の構造変化を促すことで、TDP-43 のシード依

存在的蓄積を誘起するという新たな ALS 発症メカニズムが示唆された。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 5 件)

Tanaka Y, Suzuki G, Matsuwaki T, Hosokawa M, Serrano G, Beach TG, Yamanouchi K, Hasegawa M, Nishihara M. Progranulin regulates lysosomal function and biogenesis through acidification of lysosomes. *Hum Mol Genet.*, 26, pp969-88, 2017, DOI: <https://doi.org/10.1093/hmg/ddx011>, 査読有

Tanaka Y and Hasegawa M. Profilin 1 mutants form aggregates that induce accumulation of prion-like TDP-43. *Prion.*, 10, pp283-9. 2016, DOI: <http://dx.doi.org/10.1080/19336896.2016.1207033>, 査読有

Tanaka Y, Nonaka T, Suzuki G, Kametani F, Hasegawa M. Gain-of-function profilin 1 mutations linked to familial amyotrophic lateral sclerosis cause seed-dependent intracellular TDP-43 aggregation. *Hum Mol Genet.*, 25, pp1420-33, 2016, DOI: <https://doi.org/10.1093/hmg/ddw024>, 査読有

Nonaka T, Suzuki G, Tanaka Y, Kametani F, Hirai S, Okado H, Miyashita T, Saitoe M, Akiyama H, Masai H, Hasegawa M. Phosphorylation of TAR DNA-binding Protein of 43 kDa (TDP-43) by Truncated Casein Kinase 1 δ Triggers Mislocalization and Accumulation of TDP-43. *J Biol Chem.*, 291, pp5473-83, 2016, DOI: [10.1074/jbc.M115.695379](https://doi.org/10.1074/jbc.M115.695379), 査読有

Kanazawa K, Kawamura K, Takahashi T, Miura M, Tanaka Y, Koyama M, Toriyabe M, Igarashi H, Nakada T, Nishihara M, Nishizawa M, Shimohata T. Multiple therapeutic effects of progranulin on experimental acute ischemic stroke. *Brain.*, 138, pp1932-48, 2015, DOI: [10.1093/brain/awv079](https://doi.org/10.1093/brain/awv079), 査読有

[学会発表](計 10 件)

Tanaka Y, Suzuki G, Hosokawa M, Kametani F, Hasegawa M, Nishihara M. Progranulin overexpression decrease levels of the matured form of cathepsin D due to enhancement of lysosomal acidification. 『第 39 回日本神経科学大会』、パシフィコ横浜 (神奈川県横浜市)、2016 年 7 月 21 日

Tanaka Y, Nonaka T, Suzuki G, Kametani F, Hasegawa M. Mutations in the PFN1 gene induce degenerative changes through aggregation of both mutant PFN1 and TDP-43. 14th IGAKUKEN International Symposium, 東京都医学総合研究所 (東京

都世田谷区)、2016 年 6 月 30 日

田中良法 「プログラニューリンはリソソームの酸性化を促進する」 『第 1 回プログラニューリン研究会』、岐阜大学サテライトキャンパス (岐阜県岐阜市)、2016 年 5 月 28 日

田中良法 「ALS の原因となるプロフィリン 1 変異は機能獲得により TDP-43 の蓄積を誘起する」 『H27 年度 ALS 病態解明班 成果報告会』、都市センターホテル (東京都千代田区)、2016 年 1 月 26 日

田中良法 「原因タンパク質から探る FTL/ALS の発症機構」 『第 57 回獣医学特論』、東京大学弥生講堂 (東京都文京区)、2016 年 1 月 15 日

Tanaka Y and Nonaka T. Gain-of-function Profilin 1 mutations linked to familial amyotrophic lateral sclerosis cause intracellular TDP-43 aggregation. 『脳内環境平成 27 年度冬の班会議』、京都大学芝蘭会館 (京都市左京区)、2016 年 1 月 8 日

Tanaka Y, Nonaka T, Suzuki G, Kametani F, Hasegawa M. Mutations in the *PFN1* gene induce degenerative changes through aggregation of both mutant PFN1 and TDP-43. *Neuroscience 2015*, SfN's 45th annual meeting, Oct. 17-21 in Chicago (U.S.A.)

Tanaka Y, Nonaka T, Suzuki G, Kametani F, Hasegawa M. Gain-of-function Profilin 1 mutations linked to familial amyotrophic lateral sclerosis cause intracellular TDP-43 aggregation. *Brain Protein Aging and Dementia Control*, 1st International Symposium 2015, 野依記念学術交流館 (愛知県名古屋市) 2015 年 10 月 9 日-10 月 10 日

田中良法、野中隆、鈴木元治郎、亀谷富由樹、長谷川成人 「ALS の原因となるプロフィリン 1 の変異は TDP-43 の凝集を誘起する」 『第 41 回日本認知症学会』、リンクステーションホテル青森 (青森県青森市)、2015 年 10 月 3 日

Kanazawa M, Kawamura K, Takahashi T, Miura M, Tanaka Y, Koyama M, Toriyabe M, Igarashi H, Nakada T, Nishihara M, Nishizawa M, Shimohata T. Progranulin mediates neurovascular protection via multiple therapeutic effects in experimental acute ischemic stroke. *Brain 2015*, Jun. 27-30 in Vancouver (Canada)

[図書](計 0 件)

[産業財産権]

出願状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：

番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況（計 0 件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
刊行物

田中良法 前頭側頭葉変性症(FTLD)の原因
因子プログレニューリンのリソソームにおけ
る機能的役割を解明 『都医学研 NEWS』
No.25、pp.4、2017年4月

田中良法 プロフィリン1遺伝子の異常
によって筋萎縮性側索硬化症(ALS)が発症す
る仕組みを解明 『都医学研 NEWS』No.22、
pp.3、2016年7月

ホームページ等

<http://www.igakuken.or.jp/topics/2017/0110.html>

<http://www.igakuken.or.jp/topics/2016/0128.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

田中 良法 (TANAKA, Yoshinori)
公益財団法人東京都医学総合研究所・認知
症高次脳機能研究分野・研究員
研究者番号：00747933

(2) 研究分担者

なし ()

研究者番号：

(3) 連携研究者

長谷川 成人 (HASEGAWA, Masato)
公益財団法人東京都医学総合研究所・認知
症高次脳機能研究分野・分野長
研究者番号：10251232

野中 隆 (NONAKA, Takashi)
公益財団法人東京都医学総合研究所・認知
症高次脳機能研究分野・副参事研究員
研究者番号：30356258

亀谷 富由樹 (KAMETANI, Fuyuki)
公益財団法人東京都医学総合研究所・認知
症高次脳機能研究分野・主席研究員
研究者番号：70186013

鈴木 元治郎 (SUZUKI, Genjiro)
公益財団法人東京都医学総合研究所・認知
症高次脳機能研究分野・主席研究員
研究者番号：60466034

細川 雅人 (HOSOKAWA, Masato)
公益財団法人東京都医学総合研究所・認知
症高次脳機能研究分野・主席研究員
研究者番号：00435116

(4) 研究協力者

なし ()