

令和元年5月27日現在

機関番号：11301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2018

課題番号：17K14955

研究課題名(和文) RNAを標的とした新規ALS治療薬の開発

研究課題名(英文) Analysis of RNAs associated with TDP-43 aggregation for development of novel ALS therapeutics

研究代表者

中川 直(Nakagawa, Tadashi)

東北大学・医学系研究科・助教

研究者番号：30707013

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：本研究者は筋萎縮性側索硬化症(ALS)の発症過程において必須な役割を果たすと考えられているTDP-43の細胞質凝集体の形成に、TDP-43に結合するRNAが促進的に働くことを見出している。この成果に基づき、TDP-43に結合するRNAの分解を誘導することでTDP-43の細胞質凝集体を減少させ、ALSの発症を抑制できるか検討している。本研究ではこれを達成するためのタンパク質のデザインを試みた。その結果、TDP-43に結合し、それに結合しているRNAを分解することができるタンパク質の作成に成功した。今後はこのタンパク質の効果と毒性を検討し、ALSに対する新規治療薬として機能するか調べる予定である。

研究成果の学術的意義や社会的意義

筋萎縮性側索硬化症(ALS)は運動神経の変性による筋肉の萎縮により発症後数年で死に至る極めて重篤な疾患であるが、発症の詳細なメカニズムおよび治療法が確立されていない。ほぼすべてのALS患者の運動神経において観察されるTDP-43タンパク質の細胞質凝集体がALS発症に寄与すると考えられているものの、これをターゲットとした治療戦略は立てられていない。本研究では、TDP-43タンパク質の細胞質凝集体に直接作用して、それを減少させる可能性のあるタンパク質の作成に成功した。今後このタンパク質の効果と毒性を評価することで、ALSの原因療法に寄与しうる治療薬の開発につながるものと期待される。

研究成果の概要(英文)：Nearly all of the amyotrophic lateral sclerosis (ALS) patients contain cytoplasmic aggregation of TDP-43 in their degenerating motor neurons. Although aggregated TDP-43 was shown to contribute to the ALS pathogenesis, the molecular mechanisms by which TDP-43 forms cytoplasmic aggregation were not fully understood. I previously found that RNAs associated with TDP-43 contributes to the formation of cytoplasmic TDP-43 aggregation. Based on this finding, I hypothesized that induced degradation of TDP-43-associated RNA led to the dissolution of already formed TDP-43 aggregation.

In this study, I developed the protein that binds to TDP-43 and induces degradation of TDP-43-associated RNAs in the cytoplasm. This protein might be effective for dissolution of TDP-43 aggregation and thus reducing the pathology caused by TDP-43 aggregation.

研究分野：ユビキチン化を介したタンパク質および核酸制御

キーワード：ALS TDP-43 細胞内凝集体形成 RNA RNA分解酵素

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

(1) ALS(筋萎縮性側索硬化症)は運動神経の変性による筋肉の萎縮により発症後数年で死に至る重篤な疾患であるが、発症の詳細なメカニズムおよび治療法が確立されていない。

ほぼすべての ALS 患者の運動神経において、通常核に存在する TDP-43 タンパク質が細胞質に凝集体を形成すること、および、この細胞質凝集体はストレス顆粒と呼ばれる構造体に形成されることが報告されていた。この細胞質凝集体は ALS の発症過程において必須な役割を果たすと予想されていたものの、TDP-43 のストレス顆粒への移行メカニズムおよびそれに伴う細胞質凝集体の形成メカニズムは不明であった。

(2) ストレス顆粒は RNA を核として形成されること、および TDP-43 は RNA 結合タンパク質であることから、本研究者は以前、RNA が TDP-43 とストレス顆粒の結合を仲介し、TDP-43 の細胞質凝集体形成に寄与するという可能性に基づき研究を行った。その結果、以下のような結果が得られた。

RNA 結合ドメインに変異を導入し、RNA との結合を減弱させた TDP-43 は、細胞内において、細胞質凝集体形成効率が顕著に減少している。

RNA 分解酵素 RNaseA を融合させ、自身に結合する RNA を分解させた TDP-43(TDP-43-RNaseA)も、細胞内において、細胞質凝集体形成効率が顕著に減少している。

以上の結果から、TDP-43 に結合する RNA は細胞質凝集体形成を促進することが示唆された。しかし、TDP-43 に結合する RNA が TDP-43 の細胞質凝集体の形成過程のみならず、すでに形成された TDP-43 の細胞質凝集体の維持においても関与するか不明であった。

2. 研究の目的

以上の研究成果を踏まえ、本研究では、TDP-43 に結合する RNA が、すでに形成された TDP-43 の細胞質凝集体の維持においても関与するか明らかし、TDP-43 に結合する RNA が ALS 治療法としてのターゲットとなりうるか検討することを目的とした。

3. 研究の方法

(1) TDP-43 細胞質凝集体に関する実験には、ストレス顆粒の研究で汎用されているヒト骨肉腫由来 U2OS 細胞、およびヒト神経芽細胞腫由来 SH-SY5Y 細胞を用いた。このうち、SH-SY5Y 細胞は TDP-43 細胞質凝集体が観察しにくく、また過酸化水素刺激による細胞死が多く観察されたため、実験条件の検討には U2OS 細胞を用いた。当初、マウス神経芽細胞腫脊髄細胞由来 NSC34 細胞も使用する予定であったが、細胞形質が不安定であることが判明したため、本研究では使用しなかった。タンパク質間の相互作用を調べる実験には、導入した遺伝子由来のタンパク質の発現効率がよいヒト胎児腎臓由来 HEK293T 細胞を用いた。

(2) TDP-43 結合 RNA の定量には cross-linking immunoprecipitation (CLIP) - qPCR 法により行った。

(3) TDP-43 細胞質凝集体形成の誘導には、過酸化水素処理 (1 mM, 2 時間) を用いた。

(4) TDP-43 細胞質凝集体の単離は、以前報告されていたストレス顆粒を単離するプロトコールに準じて遠心法により行った。

(5) TDP-43 の細胞内局在の観察には、FLAG タグまたは HA タグを付加した TDP-43 を細胞に発現させ、これらのタグに対する抗体を用いた免疫染色法により行った。この方法により、TDP-43 の検出効率を増加させた。

(6) タンパク質間の相互作用の検出には、タグ抗体を用いた免疫沈降とウェスタンブロット法により行った。

4. 研究成果

(1) TDP-43 結合 RNA を分解するための至適 RNA 分解酵素 (RNase) の探索。

はじめに、TDP-43 に結合する RNA を分解する至適 RNase の検討を行った。RNase は細胞質で機能するもの、核で機能するもの、および細胞外で機能するものが知られていたが、機能する環境によって至適反応条件が異なることが報告されていた。以前の研究では RNA を非特異的に分解する RNaseA を TDP-43 に融合させ、この TDP-43 の細胞質凝集体形成効率が減少することを見出したが、RNaseA は本来細胞外分泌タンパク質であるため、細胞内でより高い RNA 分解能を有する RNase を求めて、細胞質で機能することが報告されていた RNaseL に着目した。野生型の RNaseL は通常不活性な状態で細胞内に存在しており、細菌感染などによって誘導される 2',5'-linked oligoadenylates (2-5A) 存在化においてのみ活性を有することが知られていた。そのため 2-5A 非依存的に活性を有することが報告されていた N 末端欠損型の RNaseL を用いて実験を行ったところ、生理的環境を模した (pH7.4) 試験管内において TDP-43 凝集体分解活性が認められなかった。同様の実験を至適 pH が 7.5 と報告されている RNase4 (RNaseA ファ

ミリーの一員)で行ったところ、TDP-43の凝集体の減少効果が確認された。

このことから TDP-43 に結合する RNA を細胞質で分解する RNase として RNase4 を使用することとした。

(2) TDP-43 結合 RNA に対する RNase4 の細胞内での機能評価。

次に RNase4 の細胞内での機能評価を行った。RNase4 は本来細胞外分泌タンパク質であるため、以降の実験では RNase4 を細胞内に留めるために、細胞外分泌に必要なシグナルペプチドを欠損させた RNase4 を用いた。

RNase4 を細胞内に過剰発現させたものの、TDP-43 の細胞質凝集体形成効率には影響しなかった。この原因を調べるために RNase4 の細胞内局在を調べたところ、TDP-43 の細胞質凝集体と共局在しないことが明らかとなった。TDP-43 は自己二量体化することが知られていたため、RNase4 を TDP-43 と融合させ TDP-43-RNase4 を作成し、TDP-43 との共局在化を試みた。TDP-43-RNase4 を細胞に発現させ過酸化水素刺激を行ったところ、TDP-43-RNase4 は細胞質凝集体形成能がないことが確認された。同様の実験を RNase4 の RNase 活性欠失変異体 K40A で行ったところ、この TDP-43-RNase4 (K40A) は TDP-43 と同程度、細胞質凝集体形成効率を示した。次に CLIP-qPCR 法により TDP-43 に結合するターゲット RNA を定量したところ、TDP-43-RNase4 はターゲット RNA との結合が優位に減少していることが明らかとなった。最後に免疫染色を行い、TDP-43-RNase4 (K40A) は一部 TDP-43 の細胞質凝集体と共局在することを見出した。

このことから TDP-43 に融合させた RNase4 は細胞内において RNase 活性を有し、TDP-43 結合 RNA の分解作用により、TDP-43-RNase4 の細胞質凝集体形成能を減少させることが示唆された。

(3) TDP-43-RNase4 と TDP-43 の結合確認。

次に細胞内において TDP-43-RNase4 が TDP-43 と結合するか調べるために、FLAG タグを付加した TDP-43-RNase4 を細胞内に発現させ、FLAG 抗体を用いて免疫沈降を行ったところ、この免疫沈降物に内在性の TDP-43 が含まれていることが明らかとなった。このことから TDP-43-RNase4 は細胞内において TDP-43 と結合することが明らかとなった。野生型 TDP-43 は通常核内において RNA 結合活性に依存的な機能を有することが報告されているため、TDP-43-RNase4 がこの機能を阻害しないために TDP-43 の核移行シグナル (NLS) を変異させた TDP-43(NLSmt)-RNase4 を作成し、その細胞内局在を確認したところ、予想通り細胞質に局在することが明らかとなった。また TDP-43(NLSmt)-RNase4 は TDP-43 と結合することを免疫沈降法によって確認した。この実験では細胞質画分、核画分に分離せずに行ったため、細胞質に局在する TDP-43(NLSmt)-RNase4 と核に局在する TDP-43 の結合が検出されたと思われる。最後に CLIP-qPCR 法により TDP-43 に結合するターゲット RNA を定量したところ、TDP-43(NLSmt)-RNase4 はターゲット RNA との結合が優位に減少していることが明らかとなった。

以上の結果から、細胞内において TDP-43(NLSmt)-RNase4 は細胞質に局在し、TDP-43 に結合する能力があることが示唆された。

(4) TDP-43 細胞質凝集体に対する TDP-43(NLSmt)-RNase4 の機能評価。

最後に TDP-43(NLSmt)-RNase4 がすでに形成された TDP-43 細胞質凝集体に作用してこれを減少させることができるか検討することを試みた。細胞を各時間で固定して個別に観察する通常の免疫染色法では、TDP-43(NLSmt)-RNase4 による TDP-43 細胞質凝集体の形成阻害と分解促進を区別することができないと考えられたため、これらをリアルタイムで観察する系の構築を試みた。TDP-43 細胞質凝集体の挙動をリアルタイムで観察するため、EGFP を付加した TDP-43 (EGFP-TDP-43) を細胞に発現させたところ、過酸化水素未処理の状態ですでに細胞質凝集体を形成することが明らかとなった。次に、TDP-43(NLSmt)-RNase4 の挙動をリアルタイムで観察するため DsRed を付加した TDP-43(NLSmt)-RNase4 (DsRed-TDP-43(NLSmt)-RNase4) の発現ベクターを作成した。EGFP-TDP-43 と DsRed-TDP-43(NLSmt)-RNase4 を細胞内に共発現させ、DsRed-TDP-43(NLSmt)-RNase4 が EGFP-TDP-43 の細胞質凝集体の減少させる効果があるかリアルタイムで観察することまでは至らなかった。

(5) まとめ

以上の結果から、TDP-43(NLSmt)-RNase4 が通常細胞質に局在すること、過酸化水素処理時には TDP-43 細胞質凝集体と共局在すること、TDP-43 と結合すること、TDP-43 結合 RNA 分解活性を有することが明らかとなった。しかし、TDP-43(NLSmt)-RNase4 がすでに形成された TDP-43 細胞質凝集体を減少させることができるか検討するには至らなかった。今後は EGFP-TDP-43 の細胞質凝集体形成後に DsRed-TDP-43(NLSmt)-RNase4 を発現させ、これらの分子の挙動をリアルタイムに観察する予定である。また DsRed-TDP-43(NLSmt)-RNase4 の細胞毒性についても検討する必要があると思われる。

近年 TDP-43 細胞質凝集体の形成過程に対する研究が活発に行われおり、そのメカニズムは徐々に明らかになってきているものの、維持・分解過程における研究はほとんど進んでいない。本研究で作成された TDP-43(NLSmt)-RNase4 はこれらの研究のツールとして有用であり、治療に向けた ALS 研究に寄与できるものと考えられる。

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計4件)

Morohoshi A, Nakagawa T, Nakano S, Nagasawa Y, Nakayama K. The ubiquitin ligase subunit -TrCP in Sertoli cells is essential for spermatogenesis in mice. Dev Biol 445,178-188,2019. doi: 10.1016/j.ydbio.2018.10.023. 査読有

Lv L, Wang Q, Xu Y, Tsao LC, Nakagawa T, Guo H, Su L, Xiong Y. Vpr Targets TET2 for Degradation by CRL4VprBP E3 Ligase to Sustain IL-6 Expression and Enhance HIV-1 Replication. Mol Cell 70, 961-970.e5,2018. doi: 10.1016/j.molcel.2018.05.007. 査読有

Nakagawa T, Hosogane M, Nakagawa M, Morohoshi A, Funayama R, Nakayama K. Transforming Growth Factor -Induced Proliferative Arrest Mediated by TRIM26-Dependent TAF7 Degradation and Its Antagonism by MYC. Mol Cell Biol 38, e00449-17, 2018. doi: 10.1128/MCB.00449-17. 査読有

Nakagawa T, Zhang T, Kushi R, Nakano S, Endo T, Nakagawa M, Yanagihara N, Zarkower D, Nakayama K. Regulation of mitosis-meiosis transition by the ubiquitin ligase -TrCP in male germ cells. Development 144, 4137-4147, 2017. doi: 10.1242/dev.158485. 査読有

〔学会発表〕(計3件)

中川直、諸星茜、中山啓子. ユビキチン化による FACT 複合体の機能制御. 第41回日本分子生物学会. 2018年.

Yujao Yu, Akane Morohoshi, Tadashi Nakagawa, Keiko Nakayama. Mutation of cyclin F may contribute to Amyotrophic Lateral Sclerosis pathogenesis by affecting VCP ATPase activity. 第41回日本分子生物学会. 2018年

中川直、ユビキチンリガーゼ -TrCPによるオス生殖細胞の減数分裂開始制御. 第40回日本分子生物学会. 2017年

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

取得状況(計0件)

〔その他〕

東北大学大学院医学系研究科細胞増殖制御分野 HP

<http://www.devgen.med.tohoku.ac.jp/>

6 . 研究組織

(1)研究分担者 なし

(2)研究協力者 なし

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。