

令和 6 年 5 月 21 日現在

機関番号：82610

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2023

課題番号：20K07439

研究課題名(和文) ALS発症機序におけるTDP-43と酸化型RNAの分子動態

研究課題名(英文) Molecular dynamics of TDP-43 and oxidized RNA in ALS pathogenesis

研究代表者

呂 軍 (LU, JUN)

国立研究開発法人国立国際医療研究センター・その他部局等・研究員

研究者番号：40507498

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：筋萎縮性側索硬化症(ALS)は、運動ニューロンにおけるタンパク質凝集体の蓄積を特徴とする神経変性疾患である。しかし、家族性及び孤発生ALS変異の多くはグアニン四重鎖RNAとの相互作用が低下していると推定される一方で、何故若年では発症に至らず、加齢によりリスクが高まるかは解っていない。そこで、酸化ストレスを与えた初代培養神経細胞の次世代シーケンシング(NGS)を実施した。この加齢因子(酸化ストレス)によって遺伝子発現が2倍以上有意に変動するのは191個あった。これら遺伝子とこれまでにALS発症に関与する様々な因子(TDP-43、FUSなど)との関連をさらに解析する必要がある。

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)の発症機序を解明するため、ALS関連RNA結合タンパク質の一つ、FUS(fused in sarcoma)がグアニン四重鎖との相互作用に重要な役割を示された。2021年11月に本研究の成果として発表した。しかし、家族性及び孤発生ALS変異の多くはグアニン四重鎖RNAとの相互作用が低下していると推定される一方で、何故若年では発症に至らず、加齢によりリスクが高まるかは解っていない。そこで、加齢因子(酸化ストレス)によって発現が2倍以上有意に変動する遺伝子191個判明できた。全体を理解するには更なる解析が必要。

研究成果の概要(英文)：Amyotrophic lateral sclerosis (ALS) is a neurodegenerative disease characterized by the accumulation of protein aggregates in motor neurons. Like TDP-43, FUS (fused in sarcoma), an ALS-associated RNA-binding protein, was also shown to play an important role in interacting with guanine quadruplexes. However, while many familial and sporadic ALS mutations are presumed to have reduced interaction with guanine quadruplex RNA, it is unclear why symptoms do not occur at a young age and the risk increases with age not yet. Therefore, we conducted next-generation sequencing (NGS) of primary cultured neurons subjected to oxidative stress. There were 191 genes whose gene expression significantly changed by a factor of two or more due to this aging factor (oxidative stress). It is necessary to further analyze the relationship between these genes and various factors (TDP-43, FUS, etc.) that have been involved in the development of ALS.

研究分野：基礎研究

キーワード：筋萎縮性側索硬化症(ALS) 加齢因子 酸化ストレス

1. 研究開始当初の背景

未だ有効な治療薬や治療法の無い神経変性疾患、ALS はこれまでに 30 種類以上の責任遺伝子が報告されている。その中の 1 つ、TDP-43 タンパク質がグアニン四重鎖を持つ mRNA と特異的に結合して神経突起に輸送し、局所翻訳に寄与する事が報告された (Subramanian et al. 2011. Ishiguro et al. 2016)。つまり、神経突起など核から遠く離れた領域で作られるタンパク質の mRNA にはグアニン四重鎖という“局所移行指示シグナル”が付いており、この輸送と局所翻訳システムの破綻が ALS 発症の一因と考えられる。グアニン四重鎖とは 4 つのグアニンが、水素結合によりコンパクトな四角形に折り畳まれた特殊な立体構造で、内部に一価の金属イオンを取り込むことで非常に安定化する。本研究の先行研究で 10 種類の ALS 由来変異を持つ TDP-43 タンパク質を精製し、分子間相互作用を解析した結果、全ての変異はグアニン四重鎖との相互作用を阻害。発症との直接の関連を強く示唆する結果が得られた。

しかしながらほとんどの場合、家族性や孤発性変異があっても ALS の発症は若年では観られず、加齢により発症リスクが上昇する。その根本的なメカニズムについては全く解っておらず、故に加齢に伴うリスク因子も不明である。従って本研究が目指す分子レベルでの新規機能解析は、mRNA 輸送と局所翻訳の破綻を一因とする ALS 発症機序解明に重要な意味を持つと考えられる。

2. 研究の目的

本研究は、TDP-43 が持つ RNA 立体構造認識の分子機構と加齢によるリスク上昇のメカニズム解明を目的とする。グアニン四重鎖の特異的な認識が ALS 由来の点突然変異で阻害されるといふ先行研究結果は、病態形成と mRNA 輸送との関わりを強く示唆していた。ヒトや ALS モデル動物では加齢に伴い脳で 8-oxoguanin の増加が知られ、酸化ストレスマーカーとしても用いられている。それ自体、多数のグアニンで形成されるグアニン四重鎖は 8-oxoguanin に対して非常に感受性が高いと考えられる。

これまで ALS 発症の原因は TDP-43 や FUS/TLS (fused in sarcoma/ translated in liposarcoma) などの変性タンパク質に起因する毒性が引き金になっているという考え方が支配的であった(タンパク質毒性仮説)。その後、実験的に TDP-43 や FUS/TLS など原因タンパク質の突然変異による機能不全が確認され、本来備わっている機能を理解する事の重要性が浮き彫りとなってきた。申請者は「グアニン四重鎖を持つ mRNA の輸送異常による局所翻訳システムの破綻」が ALS 発症の一因となるという独自の仮説を提唱した。驚くべき事に、これまでに報告された 20 種類以上の ALS 責任遺伝子うち少なくとも 9 遺伝子産物で、グアニン四重鎖と直接・間接的な関連が見いだされている(グアニン四重鎖結合タンパク質 6 種、グアニン四重鎖リピート変異 1 種、ヘリカーゼ 2 種)。

本研究では加齢による酸化ストレスで上昇する 8-oxoguanin を含んだ“酸化型 RNA”の増加に着目。mRNA 輸送と局所翻訳のメカニズムを分子間相互作用の観点から詳細に検討する。ALS は加齢に伴う発症リスクの上昇が知られており、TDP-43 をコードする遺伝子に変異があっても多くは若年では発症しない。申請者は、加齢によりグアニン四重鎖に取り込まれる 8-oxoguanin が立体構造を歪め、TDP-43 との相互作用に影響すると考えた。

本研究では歪んだ RNA 構造と TDP-43 のシャペロン機能に関してもさらに詳細な解析を進める。先行研究で解析した 10 種類の ALS 由来突然変異タンパク質は全てグアニン四重鎖との相互作用が低下し、グリシンリッチ領域が相互作用に影響することを示唆していた。8-oxoguanin がグアニン四重鎖の立体構造と輸送及び局所翻訳に及ぼす影響が明らかになれば、発症機序解明や医薬シーズの開発にも繋がる。本研究は 8-oxoguanin が取り込まれた場合の TDP-43 依存

的制御を 初代培養の神経細胞を用いて mRNA 輸送・局所翻訳解析 加齢による酸化ストレスとシャペロン機能、の2つに絞って考察する。

3. 研究の方法

(1) 初代培養神経細胞を用いた mRNA 輸送・局所翻訳解析

8-oxoguanin がグアニン四重鎖の立体構造と輸送及び局所翻訳にどの様に関与するのか、神経細胞内で確認する。酸化ストレスを与えた際の mRNA の移動を初代培養の神経細胞で観察し、局所翻訳されるタンパク質の発現や局在も、蛍光イメージングで解析、グアニン四重鎖への 8-oxoguanin 取り込み効率と mRNA 輸送・局所翻訳効率を比較解析する。酸化ストレスは H₂O₂ 及び Menadione を一定時間、培地に添加する事によって付与する。mRNA の局在は *in situ* ハイブリダイゼーション法のみでなく、生きたままで微速度撮影 (タイムラプス) 解析する場合は、mRNA に特異的な検出タグとして、MS2 結合配列を挿入し、特異的に結合する MS2 タンパク質に融合させた蛍光タンパク質を使用する。また、グアニン四重鎖の検出には特異的抗体 (GB4) を用いる。加えて局所翻訳された分子やシグナルの変化も主に蛍光イメージングで観察する。具体的にはシナプス後肥厚部 PSD における CaMKII の局在やリン酸化、PSD-95 を介した AMPA 受容体と NMDA 受容体の局在変化を比較検討する (CaMKII、PSD-95 は共に mRNA の 3'-UTR にグアニン四重鎖構造を持つ TDP-43 依存的被制御遺伝子である)。もし蛍光イメージングのみで特定できない場合、内在性の mRNA を不活化できる修飾オリゴを利用したアンチセンス核酸を用い、TDP-43 mRNA のノックダウンを実施する。神経細胞など、長期の培養や観察が必要な場合、siRNA よりも長時間、細胞内で標的 mRNA を不活化できる修飾オリゴを利用したアンチセンス核酸でのノックダウン手法を検討する。

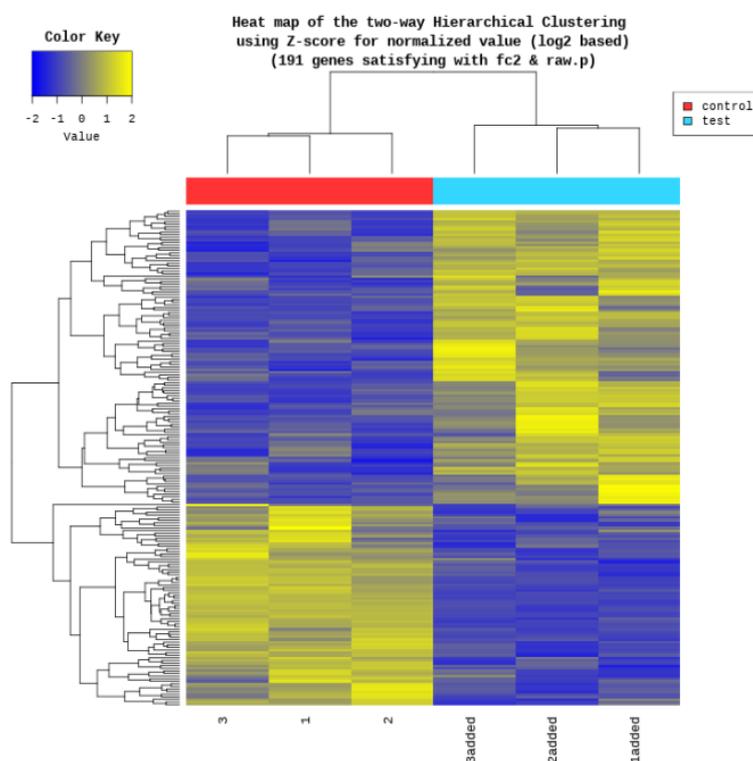
(2) 加齢と TDP-43 の RNA シャペロン機能

なぜ TDP-43 をコードする遺伝子に変異のある家族性及び孤発生 ALS でも若年では発症しないのか? これまで多くの環境因子が調査されているが、明白な答えはなかった。本研究の1年次~2年次で TDP-43 依存的な mRNA 輸送及び局所翻訳への 8-oxoguanin による影響を確認次第、TDP-43 の ALS 変異を用いた解析に移行する。ALS 変異を持つ TDP-43 タンパク質は *in vitro* の相互作用解析で、野生型より 8-oxoguanin への感受性が高い事を先行研究で確認しており、初代培養神経細胞でも同じく 10 種の ALS 変異遺伝子を発現する事で mRNA 輸送や局所翻訳に顕著な差となって現れる可能性が高い。TDP-43 の ALS 変異のほとんどは RNA シャペロン機能を持つと考えられるグリシンリッチ領域に集中しており、初代培養神経細胞で顕著な差が確認できれば、*in vitro* の結果を相補するものと考えられる。実験に際しては比較対照として、フリーラジカルスカベンジャーであるエダラボン (Edarabone) などを H₂O₂ 及び Menadione と共に培地に添加する群を設け、酸化ストレスによる影響がエダラボンにより抑制できるかを確認する。また、変異が RNA シャペロン機能に与える影響は、精製タンパク質を用い、円偏光二色性 (CD) スペクトルにより比較解析する。

4. 研究成果

筋萎縮性側索硬化症 (ALS) は、運動ニューロンにおけるタンパク質凝集体の蓄積を特徴とする神経変性疾患である。TDP-43 同様、ALS 関連 RNA 結合タンパク質 (RBP) の一つ、FUS (fused in sarcoma) も、グアニン四重鎖 (G4) -DNA / RNA の特異的認識活性を持つ代表的なタンパク質である。精製された全長 FUS タンパク質を用いて、複数の機能性モジュールで構成されるマルチドメイン構造の分子メカニズムを分析した。そこで、FUS 凝縮液形成の液液相分離 (LLPS) と、それに続く FUS 凝集体の形成につながる液相固相転移 (LST) の観察に成功した。このブ

ロセスは、FUS とグアニン四重鎖 RNA の相互作用によって著しく促進された。さらにグアニン四重鎖 RNA 依存性 LLPS および LST 経路の調節は、G4-RNA 認識に欠陥のある 8 つの ALS 関連 FUS 変異体すべてで失われ、このプロセスにおける G4-RNA の重要な役割を示された。上記の内容を 2021 年 11 月に発表した。しかし、家族性及び孤発生 ALS 変異の多くはグアニン四重鎖 RNA との相互作用が低下していると推定される一方で、何故若年では発症に至らず、加齢によりリスクが高まるかは解っていない。そこで、この素朴な疑問に対して、加齢シミュレーションの一つ、酸化ストレスは一体初代培養神経細胞にどんな影響を与えるかを調査した。まず、酸化ストレスを与えた初代培養神経細胞の次世代シーケンシング (NGS) を実施した。酸化ストレスは H₂O₂ を一定時間 (最初は 24 時間) 培地に添加する事によって付与した。この加齢因子 (酸化ストレス) によって遺伝子発現が 2 倍以上有意に変動するのは 191 個あった。これら遺伝子とこれまでに ALS 発症に関与する様々な因子 (TDP-43、FUS、PSD、CaMKII、PSD-95 など) との関連をさらに解析する必要がある。



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 2件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Jun Lu, Sachiko Kubo, Makiko Hashimoto, Yuko Hayashi, Hiroshi Kajio	4. 巻 2(1)
2. 論文標題 The state of foreigners living in Japan as gauged by people undergoing a comprehensive health checkup (Ningen Dock)	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 GHM Open	6. 最初と最後の頁 63-64
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.35772/ghmo.2022.01004	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する
1. 著者名 Jun Lu, Dong Van Hoang, Yuko Hayashi, Makiko Hashimoto, Sachiko Kubo, Hiroshi Kajio, Tetsuya Mizoue	4. 巻 2022
2. 論文標題 Negative-High Titer of Helicobacter pylori Antibody and Lipid Profiles	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Biomed Res Int.	6. 最初と最後の頁 9984255
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1155/2022/9984255	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する
1. 著者名 Lu Jun	4. 巻 4
2. 論文標題 Ningen Dock: Japan's unique comprehensive health checkup system for early detection of disease	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Global Health & Medicine	6. 最初と最後の頁 9~13
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.35772/ghm.2021.01109	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Ishiguro Akira, Lu Jun, Ozawa Daisaku, Nagai Yoshitaka, Ishihama Akira	4. 巻 297
2. 論文標題 ALS-linked FUS mutations dysregulate G-quadruplex-dependent liquid?liquid phase separation and liquid-to-solid transition	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Biological Chemistry	6. 最初と最後の頁 101284~101284
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jbc.2021.101284	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計6件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 呂軍、橋本真紀子、林裕子、久保幸子、梶尾裕
2. 発表標題 空白の2年間インバウンド関係の現状
3. 学会等名 第63回日本人間ドック学会学術大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 橋本真紀子、呂軍、林裕子、久保幸子、梶尾裕
2. 発表標題 閉経後女性における甲状腺機能異常と二重エネルギー X 線吸収装置（DXA）を用いた骨密度の検討
3. 学会等名 第63回日本人間ドック学会学術大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 (1)Akira Ishiguro, Jun Lu, Daisaku Ozawa, Yoshitaka Nagai, Akira Ishihama
2. 発表標題 ALS-Linked FUS mutations dysregulate G-quadruplex-dependent liquid-liquid phase separation and liquid-to-solid transition
3. 学会等名 第44回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 (2)久保幸子、呂軍、林裕子、橋本真紀子、梶尾裕
2. 発表標題 改訂長谷川式簡易認知機能評価スケールとVSRADによる軽度認知機能障害の評価
3. 学会等名 第62回日本人間ドック学会学術大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 呂軍、林裕子、橋本真紀子、久保幸子、梶尾裕
2. 発表標題 国際的人間ドックを目指した取り込みと課題・2017年～2019年の総括
3. 学会等名 第61回日本人間ドック学会学術大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 林裕子、呂軍、橋本真紀子、久保幸子、梶尾裕
2. 発表標題 人間ドックにおける非アルコール性脂肪肝炎のスクリーニング
3. 学会等名 第61回日本人間ドック学会学術大会
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関