

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成25年 6月6日現在

機関番号：82609

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2011～2012

課題番号：23791008

研究課題名（和文） TDP-43の凝集体形成が与える転写後制御への影響の解析

研究課題名（英文） Investigation of effect of TDP-43 aggregation on translational control

研究代表者

東 晋二 (HIGASHI SHINJI)

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：30365647

研究成果の概要（和文）：TDP-43は筋委縮側索硬化症や前頭側頭葉変性症の患者脳で不溶化・リン酸化し、凝集体を形成して発症に寄与すると考えられている。今回我々は細胞障害を引き起こす強度の酸化ストレスはTDP-43を不可逆的に不溶化・リン酸化し、翻訳停止したリボソームとの mRNA を介した結合にも変化をもたらすことを見いだした。また、今回の結果では TDP-43 はストレス環境下で mRNA 安定化や細胞生存に関与していた。これらの結果より TDP-43 はストレス下で転写後の mRNA や翻訳機構の機能に関与していることが示唆された。

研究成果の概要（英文）：TDP-43 has emerged as an important contributor to amyotrophic lateral sclerosis and frontotemporal lobar degeneration. Polysome profiling analysis revealed that oxidative stress caused the association of TDP-43 with stalled ribosomes via binding to mRNA. When the cells were exposed to short-term/non-lethal stress, TDP-43 associating with ribosomes localized to stress granules (SGs) and this association was transient. In contrast, when the cells were exposed to long-term/sublethal stress, TDP-43 was excluded from SGs and shifted to the heavy fractions independent of any binding to mRNA. In these severely stressed cells, TDP-43 was insolubilized and phosphorylated. In TDP-43-silenced cells, stalled mRNA and poly (A)⁺ RNA stability was disturbed and cytotoxicity increased under sublethal stress.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	2,900,000	870,000	3,770,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・神経内科学

キーワード：神経科学・神経変性疾患・筋萎縮性側索硬化症・前頭側頭型認知症・TDP-43・ストレス顆粒・酸化ストレス・細胞死

1. 研究開始当初の背景

TDP-43 (TAR DNA binding protein) は2006年に筋委縮性側索硬化症 (Amyotrophic lateral sclerosis; ALS) や前頭側頭葉変性症 (Frontotemporal lobar degeneration; FTL) の患者脳内の凝集体の主要構成タンパク質として同定された。さらに TDP-43 の遺伝子変異により家族性の遺伝型 ALS が引き起こされることがわかり、TDP-43 がこれらの

疾患の病態機序に関与していることが明らかとなった。TDP-43 は患者脳内で不溶化・リン酸化・断片化・ユビキチン化されている。また、TDP-43 は DNA/RNA と結合するドメイン構造を有しており、転写・翻訳に関する機能をもつと考えられているが、昨年、ALS や FTL の別の原因遺伝子かつ凝集体の構成成分として、転写・翻訳に関わりあう FUS/TLS (fused in sarcoma) が同定された。このことから、

転写・翻訳機構とそれに関連するタンパク質の不溶化/機能不全が ALS や FTLD の病態機序において重要であることを示していると言える。しかし現在その詳細は不明であり、神経疾患領域において最も解明が待たれる研究主題の 1 つである。

2. 研究の目的

以上の背景を踏まえ、本研究では TDP-43 の不溶性変化・断片化といった疾患特異的な変化の背景にある分子生物学的な機序を明らかにすることが目的である。今回は、ストレス刺激によって TDP-43 の不溶化・断片化が観察されることに注目した。ヒトの細胞は環境変化に適応するために、ストレス刺激に対して様々な適応能力を有している。その中でも、特に ALS などの神経変性疾患の発症に関与していると考えられている酸化ストレス下の細胞では、RNA 代謝の動的变化がみられる。この変化は回復期における細胞の末端における局所翻訳 (local translation) を調整させている。今回の研究目標は、ストレス刺激などの環境変化によって細胞内でおきる TDP-43 の生化学的変化の詳細とそれに伴う RNA 動態への影響を調べることである。ショ糖勾配法を用いた polysome profile 法や、fluorescent *in situ* hybridization 法などを行うことにより、TDP-43 の proteolytic な変化が細胞質内での RNA 代謝にどのような影響を与えるのかを明らかにする。

3. 研究の方法

(1) ストレス刺激としては亜ヒ酸ナトリウム (HeLa 細胞で 0.5mM、SH-SY5Y 細胞で 0.25mM となるように培地に溶解) を使用し、30 分-2 時間この培地で培養した後に直接採取、もしくはさらに亜ヒ酸ナトリウムを含まない培地で培養後に採取した細胞を用いた。

(2) polysome profile 法を行い、TDP-43 がストレス環境下でどのように翻訳調整と関わり合っているかを調べた。ポリソームはタンパク質合成を行っているリボソームの集合体である。ポリソームを安定化させるバッファーでストレス下の細胞を破碎し、上清画分を超速心にてショ糖勾配溶液に沈降させる。この密度勾配遠心法により得られたポリソームの勾配を UV モニターで調査し、各画分に含まれる TDP-43 やストレス顆粒関連タンパク質をウエスタンブロット法にて解析した。

(3) 条件の異なったストレス環境下の細胞内で、TDP-43 がどのようにストレス顆粒関連タンパク質や mRNA と関与しているかを調べるために、免疫染色法やウエスタンブロット法、fluorescent *in situ* hybridization 法

などを用いてその詳細を調べた。詳細を得るために、必要に応じて mutant TDP-43 の強発現細胞や TDP-43 のノックダウン細胞などを使用した。

(4) TDP-43 がストレス環境下で細胞生存に寄与しているかを調べるために、TDP-43 のノックダウン細胞を用いて LDH アッセイを行った。

4. 研究成果

(1) TDP-43 はストレス刺激により細胞質内のストレス顆粒に局在することが知られている。細胞内にストレス顆粒が形成されるとリボソームや mRNA、RNA 結合タンパク質などが顆粒内に取り込まれ、多くのタンパク質の翻訳が一時的に停止する。我々は polysome profile 法を用いて酸化ストレス下での HeLa 細胞内の TDP-43 とリボソーム/ポリソームの結合について調べた。

ストレス刺激を与えていない定常状態の細胞内では TDP-43 とポリソームの結合は認められない。軽度のストレス刺激 (0.5mM 亜ヒ酸ナトリウム 30 分) を細胞に与えるとポリソームは離散してリボソーム分画へと移動した。この軽度のストレス刺激で TDP-43 もリボソーム分画へ移動した。この移動の多くは RNase A 処理により消失したことから、TDP-43 は mRNA を介してストレス顆粒内のリボソームと結合していると考えられた。細胞からこの軽度のストレス刺激を除去すると、再度ポリソーム形成がおり、タンパク質の翻訳が再開されるが、それに伴い TDP-43 とリボソームとの結合も消失した。

しかしストレス刺激時間を延長すると (0.5mM 亜ヒ酸ナトリウム 2 時間) TDP-43 はリボソームを含む分画から他の分画へと移動し、RNase A 処理の影響を受けなくなった。

このように TDP-43 はストレス刺激により翻訳が一時停止されたリボソームと結合するようであるが、これは一時的なものであり、ストレス強度によって変化するものであった。

(2) TDP-43 はストレス刺激によって 1% Triton X-100 不溶性画分に含まれるようになる。ストレス刺激 (0.5mM 亜ヒ酸ナトリウム) が 30 分と短い段階で刺激を除去すると TDP-43 は再度可溶性画分に移行することから、ストレスによる TDP-43 の不溶性変化は一時的なものであることがわかった。しかしストレス刺激を 2 時間に延長すると、刺激を除去しても再度可溶性画分に戻ることがなかった。この 1% Triton X-100 不溶性 TDP-43 は 1% Sarkosyl バッファーにも不溶性であり、この長期のストレス刺激によって TDP-43 は凝集体を形成していることが疑われた。

次に各ドメイン領域を削除した TDP-43 の変異体を発現させた細胞を使用して、ストレス刺激による TDP-43 の不溶性変化に関与しているタンパク質内領域を同定することを試みた。N 末端領域や C 末端領域の削除変異体はストレス刺激 (0.5mM 亜ヒ酸ナトリウム 2 時間) により不溶化したが、N 末端領域と RRM (RNA recognition motif) 領域の削除変異体はストレス刺激による不溶化が生じなかった。上述より TDP-43 がストレス刺激によって不溶化するには RRM 領域が必須であり、RNA との結合が不溶化の始まりに関与していることが疑われた。

(3) TDP-43 は ALS や FTLD 患者剖検脳内ではリン酸化されている。最近の研究で TDP-43 はストレス刺激によってリン酸化されることが報告されている。事実我々の実験系でも、上述の 30 分のストレス刺激ではリン酸化はおこらないが、2 時間のストレス刺激を与えるとその後 TDP-43 のリン酸化が観察された。そこで何種類かのキナーゼ阻害薬を使用して TDP-43 のリン酸化を引き起こす上流のシグナル伝達系を同定することを試みた。我々の実験では JNK (α -jun N-terminal kinase) 阻害薬である SP600125 (40 μ M) のみが TDP-43 のリン酸化を阻害した。この結果より、TDP-43 はストレス刺激によって惹起された JNK 伝達系によりリン酸化されていることが考えられた。

また、リン酸化 TDP-43 は ALS や FTLD 患者剖検脳内でタンパク質分解経路と関わり合うユビキチンや p62 などと共局在している。我々の実験系では、リン酸化 TDP-43 はユビキチン化されていなかったが、p62 とは共局在していた。

(4) siRNA を使用した TDP-43 ノックダウン細胞を用いて、TDP-43 のストレス下における機能を調べた。

コントロールの対象 HeLa 細胞と TDP-43 のノックダウン HeLa 細胞を用いて polysome profile 法を行ったところ、ストレス刺激を与えていない定常状態と 30 分の軽度ストレス刺激を与えた状態で両群の polysome profile に差異は認められなかった。しかし 2 時間のストレス刺激では TDP-43 のノックダウン細胞で UV peak の減少が認められ、翻訳停止中の RNA 量の低下が示唆された。次にコントロールの対象 SH-SY5Y 細胞と TDP-43 のノックダウン SH-SY5Y 細胞を用いた fluorescent *in situ* hybridization 法を行った。ストレスを与えていない定常状態で両群の細胞を比較すると、TDP-43 ノックダウン細胞で有意に poly A+ RNA を示す各細胞の fluorescent intensity が低下していた。ストレス刺激を与えた状態で両群を比較する

と、さらに有意に TDP-43 ノックダウン細胞での poly A+ RNA 量の低下が認められた。両結果をみると、TDP-43 は RNA 安定化、特にストレス環境下での RNA 安定化に寄与していることが考えられた。

さらに TDP-43 の細胞死との関係を見るために、HeLa 細胞と SH-SY5Y 細胞の両細胞で、コントロールの対象細胞と TDP-43 のノックダウン細胞を作成して LDH アッセイを行った。両細胞共に TDP-43 のノックダウン細胞で有意にストレス刺激による LDH release の増加が認められた。このように TDP-43 はストレス環境下における細胞生存に寄与していることが考えられた。

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 2 件)

1. Shinji Higashi, Tomohiro Kabuta, Yoshitaka Nagai, Yukihiro Tsuchiya, Haruhiko Akiyama, Keiji Wada. TDP-43 associates with stalled ribosomes and contributes to cell survival during cellular stress. J Neurochem. 査読有印刷中
2. Naoya Aoki, Shinji Higashi, Ito Kawakami, Zen Kobayashi, Masato Hosokawa, Omi Katsuse, Takashi Togo, Yoshio Hirayasu, Haruhiko Akiyama. Localization of fused in sarcoma (FUS) protein to the post-synaptic density in the brain. Acta Neuropathol. 124. 2012. 383-94

[学会発表] (計 1 件)

Shinji Higashi, et al. TDP-43 associates with stalled ribosomes and contributes to cell survival during cellular stress. The 8th International Conference on Frontotemporal Dementias. 2012 年 9 月 5 日 - 7 日 イギリス マンチェスター Manchester Central

6. 研究組織

(1) 研究代表者

東 晋二 (HIGASHI SHINJI)

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：30365647

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

秋山 治彦 (AKIYAMA HARUHIKO)
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・参事研究員
研究者番号：20231839

和田 圭司 (WADA KEIJI)
独立行政法人国立精神・神経医療センター・
疾病研究第4部・部長
研究者番号：70250222

株田 智弘 (KABUTA TOMOHIRO)
独立行政法人国立精神・神経医療センター・
疾病研究第4部・室長
研究者番号：70535765

永井 義隆 (NAGAI YOSHITAKA)
独立行政法人国立精神・神経医療センター・
疾病研究第4部・室長
研究者番号：60335354