

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 3 日現在

機関番号：32607

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25461271

研究課題名(和文)人工制限酵素による内在性TDP-43遺伝子改変と筋萎縮性側索硬化症モデルへの応用

研究課題名(英文) Establishment of TDP-43 C-terminal deficient mice using zinc finger nuclease and application to the model for amyotrophic lateral sclerosis

研究代表者

佐藤 俊哉 (SATO, TOSHIYA)

北里大学・医学部・教授

研究者番号：90359703

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：Zinc-Finger Nucleaseを用いてTDP-43 C末領域の部分欠損マウス8系統を樹立し、この領域の生理的機能を検討した。150アミノ酸残基からなるC末領域の中央部6アミノ酸までの欠損(A)では、ホモマウスにおいても明らかな異常を指摘できなかったが、C末領域の約半分程度を欠損(B・C)させると致死となった。後半部分欠損(C)と異なり、前半部分欠損(B)では明瞭な変異蛋白を認めたと、核から細胞質に局在が変化し、核蛋白としての機能は失われた。これらの結果から、TDP-43 C末領域の前半部分は機能維持に重要であり、後半部分は蛋白の安定性維持に重要な領域であることが明らかとなった。

研究成果の概要(英文)：To investigate the physiological functions of the C-terminal region (CTR) of TDP-43, we established eight lines of CTR deficient mice using zinc finger nuclease. Mutant TDP-43 mice carrying a deletion within 6 amino acids in the middle of CTR (A) appeared normal even in the homozygote, whereas homozygous mice carrying a large deletion of the N- (B; 262-348) or C-terminal (C; 345-414) half of CTR showed embryonic lethality. In the brains of heterozygous B or C mice, a comparable level of the truncated protein corresponding to the large deletion was observed only in B mice. The truncated TDP-43 was exclusively in the cytoplasm fraction, thus it could not show physiological function in the nucleus. These results show N-terminal half of CTR is essential for maintaining nuclear function of TDP-43, whereas C-terminal half of CTR is important for the protein stability.

研究分野：医歯薬学

キーワード：ALS TDP-43 疾患モデル

1. 研究開始当初の背景

筋萎縮性側索硬化症 (ALS) は、運動神経特異的な変性を特徴とする神経難病である。2006 年秋、孤発性 ALS に認められるユビキチン陽性封入体 (skein-like inclusion) の主要な構成蛋白として TAR DNA-binding protein 43 kDa (TDP-43) が発見された (Neumann et al. Science 2006 314: 130-133, Arai et al. BBRC 2006 351: 602-611)。さらに連携研究者の小野寺らは、常染色体性優性遺伝形式を示す家族性 ALS の原因遺伝子として TDP-43 を再発見し、ALS の発症機序において TDP-43 が一次的な役割を担うことを明らかにした (Yokoseki et al. Ann Neurol 2008 63: 538-542)。

TDP-43 変異を有する家族性 ALS (ALS10) 患者の病理像は、大多数を占める孤発性 ALS と極めて類似していることから、ALS の全体像を理解し、その発症機序を解明するためには、ALS10 の病態を忠実に反映した病態モデルの確立が必要である。そこで我々は、変異型 TDP-43 (Q343R) ノックインマウス、TDP-43 コンディショナルノックアウトマウスを作成した。しかし前者では明らかな表現型が認められず、ノックアウトマウスは致死となり、ALS の病態を忠実に反映するモデルには至らなかった。成功しなかった理由の一つとして、TDP-43 の生理的機能の理解が不足していることが挙げられる。TDP-43 は RNA 代謝に関与する遺伝子であるが、FUS (Fused in sarcoma)、C9ORF72 (Chromosome 9 open reading frame 72) など、TDP-43 と共通した生理的機能を有する遺伝子が、ALS の新しい原因遺伝子として続々と発見されたことから、TDP-43 の生理的機能、特に RNA 代謝の観点から ALS 研究を再構築する必要が生じてきた。

2. 研究の目的

TDP-43 は、二つの RNA 認識モチーフ (RRM1、RRM2) を有する不均一核内リボ核酸蛋白 (hnRNP) であり、転写制御、選択的スプライシング、mRNA の安定化、mRNA の輸送などに関与するタンパク質である。ALS10 では、変異が TDP-43 の C 末領域に集中し、機能的に重要な RRM1 領域等には認められない。この現象は、ALS10 の発症機構が単純な機能喪失性変異によるものではないことを示唆している。また、我々が作成した TDP-43 ホモ欠損マウスが着床早期に死亡すること、ヘテロ欠損マウスが正常に発達することからも、単純な機能喪失性仮説では説明できない。このような結果から、TDP-43 の C 末領域が有する生理的機能の理解が必須であると考えられた。そこで人工制限酵素技術の先駆けとなった Zinc-Finger Nuclease (ZFN) を使い、内在性 TDP-43 C 末領域欠損マウスの作成を計画した。この研究により、C 末領域の生理的機能を理解するとともに、その理解に基づき、全く新しい ALS モデルの開発を進めることを目的とした。

3. 研究の方法

(1) TDP-43 C 末領域欠損マウスの作成

TDP-43 遺伝子 (*Tardbp*) の最終第 6 エクソンは、ALS 変異が集中する C 末領域をコードする。この C 末領域の中央部にある Q/N 領域を標的とする ZFN を設計し、これをコードする mRNA を B6C3F1 マウスの受精卵にマイクロインジェクションすることにより、内在性 TDP-43 C 末領域欠損マウスを作成した。

(2) 表現型及び生化学的解析

作成された系統は、ダイレクトシーケンスにより変異を確認後、その変異の効果を検討した。TDP-43 の残存活性に関しては、既に TDP-43 ノックアウトマウスが着床早期に死亡することが確認されていることから、各系統のホモ欠損個体を作成し、その死亡時期により評価した。次にヘテロ欠損個体の大脳から mRNA を抽出し、qPCR 法を用いて TDP-43 mRNA 発現量を測定することにより、オートレギュレーション機構の関与を検討した。また変異 TDP-43 蛋白の細胞内局在変化などを検討するため、細胞分画とウェスタンブロット、あるいは病理学的解析により解析した。

(3) 内在性 TDP-43 C 末領域の欠損長を変化させた新規遺伝子改変マウスの作成

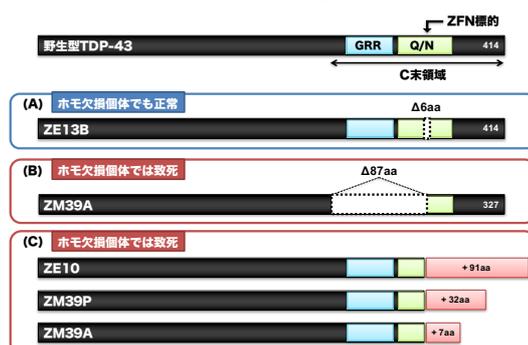
ZFN に続いて開発された技術である TAL Effector Nucleases (TALEN) あるいは CRISPR/Cas9 を利用し、C 末領域の欠損長が異なる新しい遺伝子改変マウスの作成を試みた。

4. 研究成果

(1) TDP-43 C 末領域欠損マウスの樹立

648 個の前核期胚に ZFN をマイクロインジェクションし、2 細胞期胚まで発生した 431 個の正常胚を仮親の卵管内に移植した。離乳に至った 131 匹の仔から、モザイク状態になった 6 匹のファウンダーを同定、C57BL/6N マウスとの交配によりヘテロ欠損個体とし、最終的に内在性 TDP-43 C 末領域の部分欠損マウス 8 系統を樹立した。この 8 系統を塩基配列から推定される蛋白構造により分類すると、150 アミノ酸残基からなる TDP-43 C 末領域の (A) 6 アミノ酸までの欠損、(B) 前半部分欠損、(C) 後半部分欠損の 3 グループに大別された (図 1)。

図 1: TDP-43 C 末領域欠損マウスの分類



(2) TDP-43 C 末領域欠損と残存活性

各系統のヘテロ欠損個体同士を自然交配し、その分離比を検討したところ、6 アミノ酸までの欠損(グループ A)では、ホモ欠損個体は正常に生まれ、明らかな表現型の異常も認められなかったが、C 末領域の約半分程度を欠損(グループ B・C)させると、ホモ欠損個体は主に着床前後に致死となり(ZM87 系統を除く)、TDP-43 機能が失われた。この ZM87 系統は、3 系統からなるグループ C に属するが、TDP-43 に由来しない余剰アミノ酸付加が7 アミノ酸と最も少ない系統である。ZM87 ホモ欠損個体は、着床期ではなく出生直前まで生存すること、さらに脳における *Tbc1d1* mRNA 発現の低下を認めたことから、TDP-43 の部分的な機能喪失を示すことが明らかとなった。

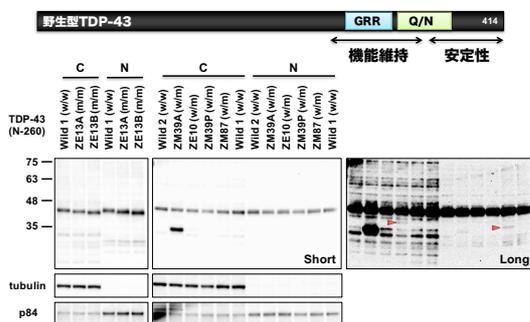
(3) 残存活性とオートレギュレーション

ヘテロ欠損個体の大脳における TDP-43 mRNA 発現量について、野生型+変異型 mRNA (Total)、野生型 mRNA のみ (Wild) に分けて解析した。グループ A 系統では、野生型および変異型 mRNA が約半量ずつ発現し、総量 (Total) としては野生型マウスと同程度の発現レベルであった。一方、機能喪失性アリルを有するグループ B 系統では、Total が約2倍 (1.926) の発現を示し、グループ C 系統では中間的な発現上昇 (1.253-1.348) を認めた。この結果は、TDP-43 自身が本来有するオートレギュレーション機構が働き、野生型蛋白の発現を維持するように、代償的に mRNA 発現が上昇しているものと推察された。

(4) TDP-43 の安定性と機能

グループ A 系統のホモマウス (m/m、左側パネル)、グループ B・C 系統のヘテロマウス (w/m、中央・右側パネル) の大脳を用い、細胞質 (C)、核 (N) に分画してウェスタンブロット法にて検討した (図 2)。

図 2: ウェスタンブロット解析 (大脳)



グループ A 系統のホモマウスでは、TDP-43 のアミノ酸欠損に依存したバンドシフトが認められたが、蛋白の細胞内局在や発現量は野生型と変わらず、上述した mRNA 量にも変化がなかったことから、TDP-43 機能には著明な変化は無いものと推定された。

前半部分欠損(グループ B 系統、ZM39A)で

は、変異蛋白と考えられる 36 kDa のバンドが明瞭に確認されたが、核から細胞質に局在が変化し、核蛋白としての TDP-43 機能が失われていた。一方、後半部分欠損(グループ C 系統)では、長時間露光 (Long、右側パネル) にて僅かなバンドが確認されるのみであり、変異蛋白が何らかの品質管理を受けている可能性が高いと考えられた。この僅かなバンドは、ZM39P 系統では細胞質、ZM87 系統では核に局在していた。これは ZM87 系統の変異蛋白が、僅かながら機能を有していたことに符合すると考えられた。

最後に、ZM39A 系統に認められた 36 kDa の変異蛋白の挙動を病理学的に解析したが、変異蛋白は細胞質内に比較的均一に分布し、明らかな凝集体形成は認められなかった。

(5) 新規遺伝子改変マウスの作成

TDP-43 C 末領域の全欠損マウスを作成するため、ZFN の制限を克服した TALEN を用いて合計 7 回のマイクロインジェクションをおこない、140 匹の産仔が生まれたが、遺伝子改変動物は得られなかった。また CRISPR/Cas システムの導入も進め、胚盤胞レベルでの遺伝子改変は認められたが、個体として得られる段階までは進まなかった。

(6) TDP-43 の機能領域と今後

TDP-43 C 末領域は、グリシンリッチ領域 (GRR)、Q/N 領域、C 末の終端領域に分類することができるが、その 3 領域全てに ALS 変異が認められる。しかし、この 3 領域の機能的差異は明らかではなく、領域内に生じた変異による機能的変化を推定することも難しい。そこで本研究を立案したが、その成果として GRR と Q/N 領域の約半分を含む TDP-43 C 末領域の前半部分が機能維持に重要であること、Q/N 領域の残り と C 末の終端領域を含む後半部分が蛋白の安定性維持に重要であることが明らかにされた。特に強調すべきは、36 kDa の前半部分欠損蛋白の挙動で、核移行シグナルが残っているにも関わらず核内に移行しない現象があり、この原因を検索することが、TDP-43 の核内外シャトル機構の解明、さらに細胞質内での凝集体形成機構の究明につながる可能性があるため、研究分担者の小寺らと共同で、結合タンパクの同定を進めている。

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 1 件)

(1) 佐藤俊哉, TDP-43 の生理的機能と ALS 病態における意義, 北里医学, 査読無, 45 巻, 2015, 79-85

<http://mlib.kitasato->

[u.ac.jp/homepage/ktms/kaishi/pdf/KI45-2/KI45-2p079-085.pdf](http://mlib.kitasato-u.ac.jp/homepage/ktms/kaishi/pdf/KI45-2/KI45-2p079-085.pdf)

[学会発表] (計10件)

- (1) 佐藤俊哉、小田佳奈子、酒井清子、西澤正豊、笹岡俊邦、小野寺理、横山峯介、TDP-43 C-terminal deficient mice exhibit a loss-of-function phenotype with up-regulated *Tardbp* mRNA、第5回新潟大学脳研究所共同研究拠点国際シンポジウム、2015年3月5日、新潟大学脳研究所(新潟県・新潟市)
- (2) 佐藤俊哉、神経変性疾患モデルの開発を成功に導くために、東海医学会例会、2015年2月12日、東海大学医学部(神奈川県・伊勢原市)
- (3) 佐藤俊哉、神経変性疾患モデルの開発を志して、第31回動物生殖工学研究会、2014年12月6日、北里本館(東京都・港区)
- (4) 佐藤俊哉、小田佳奈子、酒井清子、西澤正豊、小野寺理、横山峯介、笹岡俊邦、人工ヌクレアーゼ技術による内在性TDP-43 遺伝子改変と筋萎縮性側索硬化症モデルへの応用、第44回新潟神経学夏期セミナー、2014年8月1日、新潟大学脳研究所(新潟県・新潟市)
- (5) 佐藤俊哉、小田佳奈子、酒井清子、西澤正豊、小野寺理、横山峯介、笹岡俊邦、人工ヌクレアーゼ技術による内在性TDP-43 遺伝子改変と筋萎縮性側索硬化症モデルへの応用、第55回新潟生化学懇話会、2014年6月28日、長岡技術科学大学(新潟県・長岡市)
- (6) 佐藤俊哉、小田佳奈子、酒井清子、西澤正豊、笹岡俊邦、小野寺理、横山峯介、Analysis of the physiological function of TDP-43 using the C-terminal deficient mice established by zinc finger nuclease、第36回日本分子生物学会年会、2013年12月4日、神戸国際展示場(兵庫県・神戸市)
- (7) 佐藤俊哉、小田佳奈子、酒井清子、笹岡俊邦、横山峯介、人工制限酵素による内在性TDP-43 遺伝子改変と筋萎縮性側索硬化症モデルへの応用、第2回新潟大学医学系基礎・臨床研究交流会、2013年9月4日、新潟大学医学部大講義室(新潟県・新潟市)
- (8) 佐藤俊哉、小田佳奈子、酒井清子、笹岡俊邦、西澤正豊、小野寺理、横山峯介、人工制限酵素による内在性TDP-43 遺伝子改変と筋萎縮性側索硬化症モデルへの応用、第4回新潟大学脳研究所共同研究拠点国際シンポジウム、2013年7月27日、新潟大学脳研究所統合脳機能研究センター(新潟県・新潟市)
- (9) 佐藤俊哉、小田佳奈子、酒井清子、笹岡俊邦、西澤正豊、小野寺理、横山峯介、人工制限酵素による内在性TDP-43 遺伝子改変と筋萎縮性側索硬化症モデルへの応用、第43回新潟神経学夏期セミナー、2013年7月26日、新潟大学脳研究所統

合脳機能研究センター(新潟県・新潟市)

- (10) 佐藤俊哉、小田佳奈子、酒井清子、廣川祥子、永田史也、前田宜俊、藤澤信義、西澤正豊、小野寺理、横山峯介、人工制限酵素による内在性TDP-43 遺伝子改変と筋萎縮性側索硬化症モデルへの応用、第54回日本神経学会学術大会、2013年5月30日、東京国際フォーラム(東京都・千代田区)

[図書] (計0件)

[産業財産権]

なし

[その他]

なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

佐藤 俊哉 (SATO TOSHIYA)
北里大学・医学部・教授
研究者番号：90359703

(2) 研究分担者

小寺 義男 (KODERA YOSHIO)
北里大学・理学部・准教授
研究者番号：60265733

(3) 連携研究者

小野寺 理 (OSAMU ONODERA)
新潟大学・脳研究所・教授
研究者番号：20303167