

令和 2 年 7 月 10 日現在

機関番号：32684

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2019

課題番号：16K09683

研究課題名(和文) ALS/FTDとポリグルタミン病をモデルとした疾患横断的病態関連因子の探索

研究課題名(英文) A common interactor of protein aggregates associated with ALS/FTD and polyglutamine diseases

研究代表者

紀 嘉浩 (Kino, Yoshihiro)

明治薬科大学・薬学部・准教授

研究者番号：80415140

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：神経変性疾患の多くでは、神経細胞内にタンパク質凝集物が蓄積する。この凝集物には、疾患発症を仲介するタンパク質や、逆に進行を食い止めるために働くタンパク質が集積している可能性がある。本研究では、ポリグルタミン凝集体とC9orf72遺伝子変異による筋萎縮性側索硬化症で生じるGly-Alaリピート凝集体に共通して含まれるタンパク質として、MLF2に注目した。このタンパク質は疾患モデルマウス脳で局在が変化しており、異常タンパク質の影響を受けることが示唆された。MLF2の機能解明の手がかりとして複数の結合タンパク質を見出した。これらの知見は、今後、複数の神経疾患間の共通病態の理解に繋がると考えられる。

研究成果の学術的意義や社会的意義

神経難病と呼ばれる疾患は数多く存在し、治療法が確立されていないものも多い。そのような疾患の一つ、筋萎縮性側索硬化症(ALS)は発症後わずか数年で寝たきりになり、治療薬も限られている。C9orf72遺伝子に存在するGGGGCCリピート配列の異常伸長はALSで最も頻度の高い変異であり、そこから異常なリピートタンパク質が発現する。同様の疾患として、CAGリピート配列の伸長によるポリグルタミン病が以前から知られている。本課題では両疾患群に共通して関わるタンパク質を探索し、複数の神経疾患に関わる重要因子の特定を目指した。そのような因子の候補としてMLF2を見出し、その性状について明らかにした。

研究成果の概要(英文)：GGGGCC hexanucleotide repeat expansion in the C9orf72 gene is a major genetic cause of amyotrophic lateral sclerosis (ALS) and frontotemporal dementia (FTD). Repeat expansion of C9orf72 leads to the production of dipeptide repeats from the expanded RNA. Here, we searched for proteins that co-aggregate with Gly-Ala (GA) dipeptide repeat as well as polyglutamine (polyQ) in order to identify common interactors of different types of protein aggregates. We screened proteins that colocalized with aggregates of GA repeat and polyQ in Neuro2a cells and found Mlf2 as a common interactor. We found the binding proteins of Mlf2, including some cytoskeletal or nuclear proteins. In the brain, endogenous Mlf2 was localized in the nucleus and the neurites in wild-type mice. However, in a polyQ disease model mice, Mlf2 was observed in the aggregates and its distribution in the neurites was weakened. Thus, it is likely that the function of Mlf2 may be compromised by the pathogenic repeat proteins.

研究分野：分子細胞生物学

キーワード：ポリグルタミン ALS FTD C9orf72 凝集 MLF2

## 1. 研究開始当初の背景

ALS と FTD は異なる表現型の疾患であるが、近年、TDP43 陽性封入体の存在に代表される幾つかの関連性が発見されている。その一つが、両疾患共通の原因遺伝子としての C9orf72 遺伝子 GGGGCC リピート伸長変異である。この変異は異常な伸長 RNA の発現とジペプチドリピート (DPR) タンパク質の発現をもたらす。C9orf72 変異による ALS/FTD (C9-ALS/FTD) では TDP43、DPR、リピート RNA の封入体がそれぞれ別個に確認される。

ALS/FTD とポリグルタミン病には奇妙な関係がある。私は以前の所属研究室において神経変性疾患の凝集体構成タンパク質を主題として研究してきた。興味深いことに、ハンチントン病封入体の構成タンパク質として同定されたタンパク質が、その後 ALS/FTD の原因遺伝子として見つかる例を繰り返し経験した。ハンチントン病の細胞内封入体には、UBQLN2、FUS、EWS、TAF15、p62 など、ALS/FTD 関連のタンパク質が含まれる。私は、このようなタンパク質が実際に疾患の進行に寄与するかについて FUS をモデルに検討した。その結果、ハンチントン病変異タンパク質による FUS との共凝集がモデルマウスの症状を促進する可能性が示唆された (Kino et al. 2016, Scientific Reports)。即ち、封入体構成タンパク質の少なくとも一部は、実際に病態修飾因子(modifier)として働き得る。

多くの神経疾患で見られる細胞内封入体には、p62、UBQLN2、OPTN など、細胞内不要成分のクリアランスに働くタンパク質が選択的に集積する凝集体の存在により、FUS のプリオン様領域のように元々凝集性の高いタンパク質の共凝集が促される、という要因が考えられる。

## 2. 研究の目的

本研究では、「神経疾患に見られる凝集体・封入体には、複数の疾患に共通して関わる重要因子が集積し易い」との仮説を立てた。そして、凝集体・封入体に注目することで、効率的に新規の重要因子を同定できるのではないかと考えた。上述の C9-ALS/FTD とポリグルタミン病は共にリピート伸長疾患であり、反復配列構造を持つ RNA・タンパク質に感受性の高い何らかの因子を病態修飾因子として共有することが期待できる。そこで、本研究課題では、C9-ALS/FTD とポリグルタミン病に関連するタンパク質凝集体に共通して存在するタンパク質を特定し、その役割の解明を目指した。

## 3. 研究の方法

C9orf72 の GGGGCC リピート伸長の結果として、GA、GR、GP ジペプチドリピートが生じる。このうち GA リピートは細胞内で高い凝集性を示し、GA リピートを発現するトランジェニックマウスでは神経変性が認められる (Zhang et al. 2016 Nature Neuroscience)。そこで、赤色蛍光タンパク質 (RFP) を付加した GA リピートを発現するコンストラクトおよびポリグルタミンを発現するコンストラクトを作製した。緑色蛍光タンパク質 (EGFP) と融合したリピート結合候補タンパク質 (Fus などの polyQ 凝集体と結合するものを多く含む約 50 種) とこれらのコンストラクトをマウス神経芽細胞腫 Neuro2a (N2a) に共発現させ、凝集体に共同在するかを調べた。また、リピートコンストラクトを単独で発現させ、候補タンパク質の抗体で免疫染色することで、内在性のタンパク質がリピート凝集体と共同在するかを検討した。注目したタンパク質 Mif2 に関して、欠失コンストラクトを作製し、GA および polyQ との結合部位を調べた。また、mCherry と 3xFlag タグを付加した Mif2 の安定発現細胞株と、対照として mCherry-3xFlag のみの安定発現細胞株を樹立した。これらの破砕液を用いて、抗 Flag タグ抗体により免疫沈降を行い、結合タンパク質を質量分析により同定した。このうち、細胞骨格タンパク質との結合に関して、特異的抗体を用いた免疫沈降により確認した。また、野生型およびハンチントン病モデルマウスの脳切片において、Mif2 の免疫染色を行い、組織内分布を確認した。

## 4. 研究成果

作製した GA リピート (GA52) および polyQ (Q78) を N2a に発現させたところ、細胞質に凝集体を形成した。これらと各種の EGFP 融合タンパク質を共発現させたところ、polyQ との共同在は見られるものが多く得られたが、GA52 と共同在をするものはわずかであった。このうち、Mif2 に注目した。MLF2 (Myeloid leukemia factor 2) は骨髄性白血病において転座の生じる遺伝子 MLF1 の相同遺伝子として同定されたが、機能に関しては不明な点が多い。乳がん幹細胞の自己複製と肺転移を促進する遺伝子としての報告がある。また、ショウジョウバエにおいては、ポリグルタミンの毒性に対する修飾因子として働く。また、内在性 Mif2 とこれらの凝集体との共同在も確認された。Mif2 は核に強く局在するが、GA52 または polyQ の細胞質凝集体が存在する細胞では、核局在が弱まり、凝集体に強く分布した。これらの共凝集は、マウスの初代培養神経細胞でも確認された。また、Mif2 単独の強制発現では、核内に点状の局在も見られた。Mif2 の欠失変異体を作製し、GA52 および polyQ との結合部位を調べたところ、複数の結合部位があることが示唆された。次に mCherry-3xFlag-Mif2 の安定発現細胞株を作製し、抗 Flag 抗体を用いた免疫沈降で結合タンパク質を共沈降し、質量分析を同定した。複数のタンパク質が同定され、幾

つかの細胞骨格タンパク質や核タンパク質が確認された。そのうち、細胞骨格タンパク質の一つに注目し、特異的抗体を用いて、免疫沈降により結合を確認した。Mlf2 のノックダウンにより、このタンパク質の細胞質内での局在の変化が見られた。また、この Mlf2 結合タンパク質は p53 との関係が報告されていたため、Mlf2 と p53 の関係についても検討した。しかし、p53 の発現量や細胞生存率、DNA 損傷における Mlf2 の効果は不明瞭であった。野生型およびハンチントン病モデルマウスの脳切片において Mlf2 の分布を免疫染色で確認した。野生型マウスにおいては神経突起での Mlf2 の局在が確認されたが、ハンチントン病モデルマウスでは Mlf2 が凝集体に局在し、神経突起での局在は減弱した。以上より、Mlf2 が凝集体結合タンパク質であること、疾患モデルマウス脳内で異常局在することが確認されたが、機能解析および疾患での役割には、追加の実験が必要である。なお、これらの研究の途上で、他のグループからも Mlf2 が GA リピートと共局在することが報告された (Schludi et al. 2017, *Acta Neuropathologica*)。

上記の研究と並行して、GGGGCC リピートの細胞内挙動を可視化し、RNA 凝集体の形成およびジペプチドリピートの発現の関係を調べるために、蛍光性 RNA アプタマー dBroccoli をリピート配列に付加して培養細胞に発現させた。その結果、dBroccoli による可視化には、8 または 16 個のアプタマーをタンデムに連結が必要であること、細胞種により蛍光性が異なることが明らかとなった。さらに、アプタマーの一部は核内に局在しつつ蛍光を発していないという予想外の結果も示唆された。そのため、リピート配列の可視化において連結した dBroccoli 配列を用いる際には注意が必要であることが判明した。

また、本研究の派生的な成果として、ロングリードシークエンスデータから反復配列伸長変異を同定できるソフトウェア Tandem-genotypes の開発に際し、本研究で作製したリピート含有コンストラクトを検証用に提供することで貢献した (Mitsuhashi et al. 2019, *Genome Biology*)。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計11件（うち査読付論文 11件／うち国際共著 2件／うちオープンアクセス 9件）

1. 著者名 Sato Jun-ichi, Kino Yoshihiro, Yanaizu Motoaki, Ishida Tsuyoshi, Saito Yuko	4. 巻 8
2. 論文標題 Microglia express GPNMB in the brains of Alzheimer's disease and Nasu-Hakola disease	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Intractable & Rare Diseases Research	6. 最初と最後の頁 120 ~ 128
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.5582/iridr.2019.01049	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 -
1. 著者名 Sato Jun-ichi, Kino Yoshihiro, Yanaizu Motoaki, Ishida Tsuyoshi, Saito Yuko	4. 巻 8
2. 論文標題 Microglia express TMEM119 in the brains of Nasu-Hakola disease	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Intractable & Rare Diseases Research	6. 最初と最後の頁 260 ~ 265
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.5582/iridr.2019.01123	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 -
1. 著者名 Sone J, Mitsuhashi S, Fujita A, Mizuguchi T, (20名省略), Kino Y, Katsuno M, Iwasaki Y, Yoshida M, Tanaka F, Suzuki I K., Frith M C., Matsumoto N, Sobue G	4. 巻 51
2. 論文標題 Long-read sequencing identifies GGC repeat expansions in NOTCH2NLC associated with neuronal intranuclear inclusion disease	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Nature Genetics	6. 最初と最後の頁 1215 ~ 1221
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41588-019-0459-y	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 Yatsu Genki, Kino Yoshihiro, Sasaki Hiroaki, Sato Jun-ichi, Kinoshita Kaoru, Koyama Kiyotaka	4. 巻 82
2. 論文標題 Meroterpenoids with BACE1 Inhibitory Activity from the Fruiting Body of Boletinus asiaticus	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of Natural Products	6. 最初と最後の頁 1797 ~ 1801
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/acs.jnatprod.8b01092	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 Yanaizu Motoaki, Sakai Kenji, Tosaki Youhei, Kino Yoshihiro, Satoh Jun-ichi	4. 巻 8
2. 論文標題 Small nuclear RNA-mediated modulation of splicing reveals a therapeutic strategy for a TREM2 mutation and its post-transcriptional regulation	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 6937
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-018-25204-2	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 -

1. 著者名 Satoh Jun-ichi, Kino Yoshihiro, Yanaizu Motoaki, Ishida Tsuyoshi, Saito Yuko	4. 巻 7
2. 論文標題 Microglia express gamma-interferon-inducible lysosomal thiol reductase in the brains of Alzheimer's disease and Nasu-Hakola disease	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Intractable & Rare Diseases Research	6. 最初と最後の頁 251 ~ 257
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.5582/iridr.2018.01119	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 -

1. 著者名 Satomi Mitsuhashi, Martin C. Frith, Takeshi Mizuguchi, Satoko Miyatake, Tomoko Toyota, Hiroaki Adachi, Yoko Oma, Yoshihiro Kino, Hiroaki Mitsuhashi, Naomichi Matsumoto	4. 巻 20
2. 論文標題 Tandem-genotypes: robust detection of tandem repeat expansions from long DNA reads	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Genome Biology	6. 最初と最後の頁 58
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1186/s13059-019-1667-6	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 -

1. 著者名 Satoh J, Kino Y, Yanaizu M, Tosaki Y, Sakai K, Ishida T, Saito Y	4. 巻 6
2. 論文標題 Microglia express ABI3 in the brains of Alzheimer's disease and Nasu-Hakola disease.	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Intractable & Rare Diseases Research	6. 最初と最後の頁 262-268
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.5582/iridr.2017.01073	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 -

1. 著者名 Tabata E, Kashimura A, Wakita S, Ohno M, Sakaguchi M, Sugahara Y, Kino Y, Matoska V, Bauer PO, Oyama F	4. 巻 7
2. 論文標題 Gastric and intestinal proteases resistance of chicken acidic chitinase nominates chitin-containing organisms for alternative whole edible diets for poultry.	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 6662
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-017-07146-3	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 Sato H, Kino Y, Yanaizu M, Saito Y.	4. 巻 7
2. 論文標題 Alzheimer's disease pathology in Nasu-Hakola disease brains.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Intractable & Rare Diseases Research	6. 最初と最後の頁 32-36
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.5582/iridr.2017.01088	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 -

1. 著者名 Kino Y, Washizu C, Kurosawa M, Yamada M, Doi H, Takumi T, Adachi H, Katsuno M, Sobue G, Geoffrey G. Hicks GG, Hattori N, Shimogori T, and Nukina N.	4. 巻 6
2. 論文標題 FUS/TLS acts as an aggregation-dependent modifier of polyglutamine disease model mice.	5. 発行年 2016年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 35236
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/srep35236	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

〔学会発表〕 計6件 (うち招待講演 2件 / うち国際学会 1件)

1. 発表者名 紀嘉浩、河合美南、正木泰行、佐藤準一
2. 発表標題 GGGGCCリピート由来細胞内凝集物の相互作用分子
3. 学会等名 第41回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Yoshihiro Kino
2. 発表標題 RNA biology of neurodegenerative diseases: Repeat expansion, splicing, and Alzheimer's risk factors
3. 学会等名 35th International Annual Meeting in Pharmaceutical Sciences and CU-MPU International Collaborative Research Conference (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 紀嘉浩、正木泰行、滝谷美香、佐藤準一
2. 発表標題 7. 蛍光性アプタマーを用いた神経疾患関連リベートRNAの可視化
3. 学会等名 第40回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 紀嘉浩、柳津茂慧、佐藤準一
2. 発表標題 6. 那須ハコラ病の原因となるTREM2スプライス部位変異に対する治療分子
3. 学会等名 第40回日本神経科学大会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 紀嘉浩
2. 発表標題 RNA結合タンパク質FUS/TLSの機能低下と神経疾患
3. 学会等名 第19回応用薬理シンポジウム (招待講演)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Kino Y, Takitani M, Miyoshi J, Satoh J
2. 発表標題 Identification of proteins sequestered by dipeptide repeat aggregates associated with ALS/FTD
3. 学会等名 第39回日本神経科学大会
4. 発表年 2016年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 Kino Y, Satoh J, Ishiura S	4. 発行年 2018年
2. 出版社 Springer, Singapore	5. 総ページ数 19-43
3. 書名 Myotonic Dystrophy (edited by ed by Takahashi MP, Matsumura T)	

〔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
---------	---------------------------	-----------------------	----