

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 18 日現在

機関番号：10101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26440090

研究課題名(和文) ミスフォールドタンパク質細胞内封入体の統一的命名理論の構築

研究課題名(英文) Establishment of unified theory of cellular inclusion bodies including misfolded protein

研究代表者

北村 朗 (Kitamura, Akira)

北海道大学・先端生命科学研究院・助教

研究者番号：10580152

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：ポリペプチドが正しく折りたたまれないことにより生ずるミスフォールドタンパク質の蓄積は、細胞の生存にとってさまざまな悪影響を与え、筋萎縮性側索硬化症(ALS)のような神経変性疾患の原因ともなり得る。本研究では、ALS原因タンパク質TDP43のカルボキシル末端断片であるTDP35またはTDP25の凝集構造の違いを、蛍光共鳴エネルギー移動(FRET)法などを初めとする蛍光イメージング手法を用いて明らかにした。さらに、核局在化シグナルを付加したTDP25(NLS-TDP25)が持つ秩序ある会合構造が封入体の性質を決め、細胞毒性を回避できることがわかった。

研究成果の概要(英文)：Accumulation of misfolded proteins due to inappropriate stabilization results in neurodegenerative diseases including amyotrophic lateral sclerosis (ALS). In this study, we clarify structural differences of carboxyl terminal fragments of ALS-causative TDP43 (TDP35 or TDP25) by using fluorescence resonance energy transfer (FRET) or related procedure. We elucidate that nuclear localization signal sequence (NLS)-tagged TDP25 can reduce cytotoxicity through the structural change.

研究分野：細胞生物学・生物物理学

キーワード：細胞質封入体 筋萎縮性側索硬化症 FRET 蛍光相関分光法 FRAP TDP-43

## 1. 研究開始当初の背景

ポリペプチドが正しく折りたたまれないことにより生ずるミスフォールドタンパク質の蓄積は、細胞の生存にとってさまざまな悪影響を与えると考えられている。具体的には「神経変性疾患」や「白内障」などはタンパク質の恒常性破綻により引き起こされると考えられている。細胞内でミスフォールドしたタンパク質が分解・除去されれば、細胞に毒性を与えないと考えられているが、分解されず細胞内に蓄積した場合、ミスフォールディングしたタンパク質同士が会合し、凝集する。凝集という分子状態は細胞内のある場所における分子会合の一形態であり、可溶性の閾値を超えると、細胞内封入体を形成すると考えられてきた。神経変性疾患患者の脳内にはこのような封入体が高頻度で観察されることから、封入体形成が神経変性の原因であるという仮説が提唱されている。

封入体の構造については、神経病理学的な形態による分類は古くから行われていた。神経病理所見により観察される封入体にはガラス様封入体、スケイン様封入体など形状に多様性があることがわかっている。また、これらの封入体はユビキチン陽性であることが多いことから、ミスフォールドタンパク質がポリユビキチン化された後、分解されずに蓄積したものであると考えられてきた。凝集タンパク質は拡散できず、不溶性に相転移した場所で沈着し、細胞内で動かなくなってしまうはずである。しかしながら、細胞内では特定の区画に凝集タンパク質を隔離する機構が存在する。この隔離作用によって形成されたものが封入体であると考えられている。また、培養細胞を用いた実験から、一度封入体に隔離されたタンパク質であっても、細胞内の分解活性が回復すると封入体から脱離することも知られている。

一方、細胞質に形成された封入体について、培養細胞または酵母を用いた分子細胞生物学的な解析から、さまざまな多様な性質をもつことが示唆されてきた。例えば、プロテアソーム活性を阻害したときに形成される中心体近傍の封入体は「アグリソーム」と呼ばれる。核近傍に存在する可逆的な形成をする封入体は「JUNQ (品質管理コンパートメント)」不可逆的な封入体は「IPOD (終末構造)」と呼ばれている。また、最近、小胞体表面に形成される品質管理のための区画である「Q-Body」の存在が提唱された。しかしながら、これらの名称は、形態観察によって定性的に名付けられたもので、性質を表した統一性のある定義が存在しないことから、それぞれの種類の違いを明確に述べられなかった。

## 2. 研究の目的

本研究では、神経変性疾患に関連した封入体構成成分として知られている筋萎縮性側

索硬化症 (ALS) の責任遺伝子産物である TDP43 およびそのカルボキシル末端断片である TDP35、TDP25 が培養神経細胞内に形成する封入体構造を、同一細胞株において規格化された実験系で評価できる系を確立する。次に、超解像蛍光顕微鏡観察や蛍光相関分光法 (FCS)、蛍光共鳴エネルギー移動 (FRET) 法、FRAP 法を用いることで、封入体の性質を時空間的に比較する。これにより、これまで定性的であった封入体構造について、定量的に評価する。これにより、ALS に関連した封入体構造を物理化学的かつ生理的な性質に基づいた分類ができる理論を構築する。

## 3. 研究の方法

## 3 - 1. 細胞培養とトランスフェクション

培養細胞はマウス神経芽細胞腫 Neuro2A 細胞を用いた。プラスミド DNA は、3.5 cm ディッシュ一枚当たり 1.0  $\mu$ g) を用いて細胞へ導入した。

## 3 - 2. 蛍光顕微鏡観察

蛍光顕微鏡法には、全て Carl Zeiss 社製レーザー共焦点顕微鏡 (LSM 510 META) を用いた。対物レンズは、C-Apochromat 40 $\times$ /1.2NA W Korr UV-VIS-IR (Carl Zeiss) を用いた。超解像顕微鏡としては Structured illumination microscopy (SIM) を使用した。SIM のシステムとしては、Nikon 社製 N-SIM を使用した。対物レンズとしては、Apo TIRF 100 $\times$ /1.49NA Oil (Nikon) を使用した。共焦点超解像蛍光顕微鏡システムとして、LSM880 + Airyscan (Carl Zeiss) を用いた。このための対物レンズには、Plan-Apochromat 63 $\times$ /1.4NA 油浸 (Carl Zeiss) を用いた。

## 3 - 3. FRET

FRET 効率を計測するためのアクセプターフォトブリーチング法は、全て Carl Zeiss 社製レーザー共焦点顕微鏡 (LSM 510 META) を用いて行った。対物レンズは、C-Apochromat 40 $\times$ /1.2NA W Korr UV-VIS-IR (Carl Zeiss) を用いた。ドナーまたはアクセプター蛍光分子を励起するためには 458 nm または 514 nm のレーザーをそれぞれ利用した。アクセプターのフォトブリーチングには、514 nm の光を照射した。FRET 効率  $E_{\text{FRET}}$  は下記の式により求めた。

$$E_{\text{FRET}} = 1 - \frac{I_{\text{DA}}}{I_{\text{D}}}$$

ここで  $I_{\text{DA}}$  はアクセプターをフォトブリーチする前のドナーの蛍光強度、 $I_{\text{D}}$  はアクセプターをフォトブリーチした後のドナーの蛍光強度である。

## 3 - 4. 蛍光相関分光法 (FCS)

蛍光相関分光法は LSM 510 META + ConfoCor2 (Carl Zeiss) を用いて行った。より

一般的な物理量である拡散係数を算出するために下記のように計算した。拡散係数が既知の基準物質として Rhodamine 6G (拡散係数  $D_{Rh6G} = 414 \mu\text{m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$ ) を同条件で測定し、下記の関係式によって目的試料の拡散係数 ( $D_{\text{sample}}$ ) を得た。

$$D_{\text{sample}} = \left( \frac{\tau_{Rh6G}}{\tau_{\text{sample}}} \right) \cdot D_{Rh6G}$$

また、拡散係数から試料の分子量 ( $M_{\text{Sample}}$ ) を計算するために、Stokes-Einstein 関係式から下記の改変式を得、さらに単量体 GFP の測定された拡散係数とそのアミノ酸組成から計算された理論分子量 ( $M_{\text{GFP}} = 27 \text{ kDa}$ ) を用いてこれに従って計算した。

$$M_{\text{Sample}} = \left( \frac{D_{\text{Sample}}}{D_{\text{GFP}}} \right)^3 \cdot M_{\text{GFP}}$$

### 3 - 5 . 免疫沈降

Neuro2A 細胞の細胞抽出液を得るために、培地を除去した後、室温の PBS を用いて洗浄した。次に、細胞破碎緩衝液 (50 mM HEPES/KOH (pH 7.5), 150 mM NaCl, 1% TritonX-100, プロテアーゼ阻害剤) 中で細胞を破碎し、20,400 g で 10 分遠心した後、溶解液を得た。この溶解液に抗 GFP 抗体結合型アガロースビーズ (MBL) を加え、4 時間混和した。プロテアーゼ阻害剤を含まない破碎液中でビーズを三回洗浄した後、ビーズに結合したタンパク質を回収するために、DTT を含まない Laemmli サンプル緩衝液を加え、室温で 5 分静置した。液体成分を回収した後、終濃度 100 mM となるよう DTT を加え、98 °C で 2 分処理し、SDS-PAGE とそれに続くウェスタンブロットを行った。

### 3 - 6 . FRAP

FRAP は、LSM 510 META (Carl Zeiss) を用いて行った。対物レンズは、C-Apochromat 40x/1.2NA W Korr UV-VIS-IR (Carl Zeiss) を用いた。GFP の褪色には 488 nm のレーザー光を用いた。

## 4 . 研究成果

### ( 1 ) TDP43 の切断と細胞質封入体形成のタイムラプス観察

TDP43 はカスパーゼ 3 によって切断されることにより生じた C 末端断片が細胞質封入体を形成することが知られている。この切断過程を実時間で解析するために、TDP43 の N 末端側に赤色蛍光タンパク質 (RFP)、C 末端側に緑色蛍光タンパク質 (GFP) を付加したタンパク質 (R-TDP43-G) を細胞に発現させた。この細胞に、カスパーゼ 3 の活性化を誘導するためのスタウロスポリンを処理し、それ以降の RFP および GFP の局在を蛍光タイムラプス顕微鏡観察した。その結果、スタウロスポリン添加後およそ六時間後に、TDP43 の

N 末および C 末が核から細胞質へと漏れ出てきた、さらにその一時間程度後、C 末端側のみが細胞質で封入体構造を形成した。

次に、TDP43 の局在が核から細胞質へと変化するのは、カスパーゼ 3 による切断が起こるためかどうかを検証するために、蛍光タンパク質の波長をシアン色と黄色に変えた T-TDP43-Y を用意し、カスパーゼ 3 の活性化センサーである LSSmOrange-DEVD-TagRFP と共に同様にタイムラプス観察したところ、カスパーゼ 3 の活性化と TDP43 の切断時間には平均 3 分の差しかないことから、細胞内でカスパーゼ 3 が活性化されると速やかに TDP43 は切断を受け、この切断が起こると同時に N または C 末断片は細胞質へ移行することがわかった。

### ( 2 ) TDP43 のカルボキシル末端断片の細胞内局在と不溶性

TDP43 がカスパーゼ 3 により切断され生ずる C 末断片として、90-414 残基の 35 kDa 断片 (TDP35) と、220-414 残基の 25 kDa 断片 (TDP25) が知られている。そこで、これらの各断片を GFP 融合型で細胞内に発現し、ユビキチンとの共局在について共焦点蛍光顕微鏡を用いて調べた。その結果、TDP35 は細胞質に低頻度で封入体を形成するものの、この封入体はユビキチン陰性であった。一方、TDP25 の細胞質封入体は 25% 程度の細胞で形成され、この封入体はユビキチン陽性であった。

次に、このような封入体形成がプロテアソーム活性とするかを調べるために、プロテアソーム阻害時の封入体形成率を求めたところ、TDP35、TDP25 共に 70% 程度の細胞で細胞質封入体を形成した。ここで形成された細胞質封入体は核近傍に局在することから、アグリソームと呼ばれる封入体であると考えられる。また、プロテアソーム阻害前後における封入体系成功率の増大比率は、TDP35 の方が高かった。また、これらのタンパク質の 0.1% SDS 不溶性度を調べたところ、TDP25 の不溶性度が高く、かつプロテアソーム阻害により TDP35、TDP25 共に不溶性画分に存在する量が増大することが確かめられた。これらのことにより、TDP35、TDP25 は共にプロテアソームにより分解されており、この分解活性は封入体形成を抑制するために重要な経路であることがわかった。

### ( 3 ) NLS-TDP25 の局在観察と細胞毒性

TDP25 は主に核に局在する TDP43 から切断生成するが、配列中に典型的な NLS 配列を持たず、封入体を形成しない細胞では核及び細胞質に分布して局在することが蛍光顕微鏡観察により確認されている。そこで、TDP25 に NLS 配列と GFP を付加 (NLS-TDP25) することで、核局在を促進させ、細胞質封入体形

成効率や細胞死の割合が変化するかを調べた。

まず、NLS-TDP25 は極めて高効率に核へ局在していた。さらに、この NLS の特徴として、RNA と結合することで核質のみならず核小体にも局在していたものの、FRAP を用いて核小体と核質の間の半交換時間を調べたところ、NLS-TDP25 はタグのみの GFP-NLS に比べ、動的な分子の割合は約 50%程度へと低下し、さらに半交換時間も長くなっていることがわかった。このことは、NLS-TDP25 が何らかの核小体因子と強く結合することで、核小体へ留まるものと考えられた。

また、NLS-TDP25 は TDP25 に比べて細胞質封入体を全く形成せず、かつ細胞死の割合を低減できることがわかった。このことは、核ではなく細胞質に存在する TDP25 が細胞死の原因となっていることを示唆する。

#### (4) FRET による TDP25 の凝集状態の解析

TDP25 の細胞質封入体内部での会合状態と核小体に局在した NLS-TDP25 の会合状態を比較するために、FRET を用いて解析した。ただし、FRET は蛍光分子間の距離のみならず角度にも依存してその効率が変化するため、FRET アクセプターとして、黄色蛍光タンパク質の Venus と、この Venus に対し円順列変位 (circular permutation; cp) を導入し、蛍光発色団の向きを変えた cpVenus を用いた。

TDP25 の細胞質封入体の場合、高い FRET 効率は測定されたものの、cp の導入に伴う FRET 効率の有意な変化は見られなかった。一方、NLS-TDP25 の場合、核小体で高い FRET 効率が見られたことに加え、cp の導入に伴う FRET 効率の変化が見られた。これらのことから、NLS-TDP25 は、秩序を持った状態で核小体に集積するのに対し、TDP25 は無秩序な会合状態で細胞質封入体へ集積していることが示唆された。

また、核質、細胞質における TDP25 の FRET 効率および核質における NLS-TDP25 の FRET 効率を比較したところ、TDP25 は FRET が起きていないのに対し、NLS-TDP25 は核質に分布した状態でも低い効率ではあるものの有意に FRET が起きていることがわかった。さらに、細胞内における拡散状態を調べるために FCS 測定を行ったところ、NLS-TDP25、TDP25 共に、核小体または封入体に集積していない状態では拡散していることがわかった。これらのことから、NLS-TDP25 はオリゴマーとなって核質を拡散し、一部が核小体へと集積していることが考えられた。一方、TDP25 の顕著なオリゴマー形成は検出されなかったものの、拡散係数から求めた分子量は単量体よりもはるかに大きな値であったことから、他のタンパク質などと複合体を形成した状態で拡散していることがわかった。

#### (5) TDP25 に対する HSP70 の結合状態

TDP25 と結合するパートナー分子を見つけるために、TDP25 を免疫沈降した後、共沈降したタンパク質についてマスペクトル解析を行い同定したところ、分子シャペロン HSP70 が見つかった。TDP25 と NLS-TDP25 と HSP70 との結合を比較するために、TDP25 と NLS-TDP25 をそれぞれ免疫沈降した後、共沈降した HSP70 の量を、ウェスタンブロットにして比較した。この結果、共沈降した HSP70 の量に変化は見られなかったものの、TDP25、NLS-TDP25 共に、有意に HSP70 と結合することがわかった。

次に、HSP70 の RFP 体と、TDP25 または NLS-TDP25 の共局在を調べたところ、TDP25 の細胞質封入体は高効率に HSP70 と共局在するのにに対し、核小体に局在した NLS-TDP25 に HSP70 と共局在するもの、HSP70 の集積度は低いことがわかった。これらのことは、HSP70 が TDP25 凝集の構造を区別して結合していると考えられる。

#### (6) まとめ

以上の研究から、TDP43 から C 末断片である TDP35 または TDP25 が生じる過程と、その中でも TDP25 の凝集状態に関する性質が明らかとなった。これらのことは、ALS における封入体の性質を解明するために一般的に応用可能な手法であり、種々の凝集性タンパク質の解析にも応用できるものである。

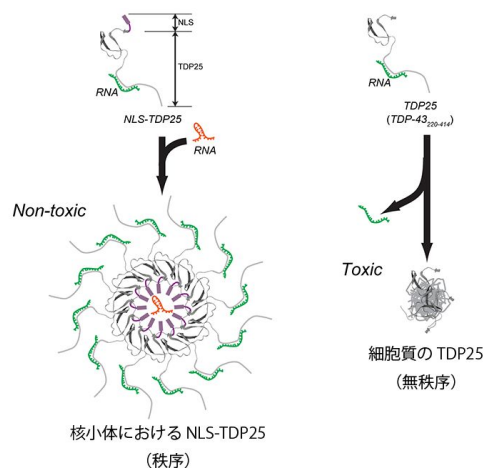


図 TDP25 の会合モデル

#### 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 7 件)

Akira Kitamura, Sachiko Yuno, Hideki Muto, Masataka Kinjo, Different aggregation states of a nuclear localization signal-tagged 25 kDa C-terminal fragment of TAR RNA/DNA-binding protein 43 kDa, *Genes to Cells*, 査読有, 印刷中

DOI: 10.1111/gtc.12495

Tomoyo Ochiishi, Motomichi Doi, Kazuhiko Yamasaki, Keiko Hirose, Akira Kitamura, Takao Urabe, Nobutaka Hattori, Masataka Kinjo, Tatsuhiko Ebihara, Hideki Shimura, Development of new fusion proteins for visualizing amyloid-beta oligomers in vivo, *Scientific Reports*, 査読有, 6, 2016, 22712  
DOI: 10.1038/srep22712

Takamitsu J. Morikawa, Hideaki Fujita, Akira Kitamura, Takashi Horio, Johtaro Yamamoto, Masataka Kinjo, Akira Sasaki, Hiroaki Machiyama, Keiko Yoshizawa, Taro Ichimura, Katsumi Imada, Takeharu Nagai, Tomonobu M. Watanabe, Dependence of fluorescent protein brightness on protein concentration in solution and enhancement of it, *Scientific Reports*, 査読有, 6, 2016, 22342  
DOI: 10.1038/srep22342

Akira Kitamura, Yusaku Nakayama, Ai Shibasaki, Ayami Taki, Sachiko Yuno, Kayo Takeda, Masao Yahara, Naoki Tanabe, Masataka Kinjo, Interaction of RNA with a C-terminal fragment of the amyotrophic lateral sclerosis-associated TDP43 reduces cytotoxicity, *Scientific Reports*, 査読有, 6, 2016, 19230  
DOI: 10.1038/srep19230

Motosuke Tsutsumi, Hideki Muto, Shohei Myoba, Mai Kimoto, Akira Kitamura, Masakatsu Kamiya, Takashi Kikukawa, Shigeharu Takiya, Makoto Demura, Keiichi Kawano, Masataka Kinjo, Tomoyasu Aizawa, In vivo fluorescence-correlation spectroscopy analyses of FMBP-1, a silkworm transcription factor, *FEBS Open Bio*, 査読有, 6, 2016, 106-125  
DOI: 10.1002/2211-5463.12026

Akira Kitamura, Yusaku Nakayama, Masataka Kinjo, Efficient and dynamic nuclear localization of green fluorescent protein via RNA binding, *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 査読有, 463, 2015, 401-406  
DOI: 10.1016/j.bbrc.2015.05.084

Akira Kitamura, Kazuhiro Nagata, Masataka Kinjo, Conformational analysis of misfolded protein aggregation by FRET and live-cell imaging techniques, *International Journal of Molecular Science*, 査読有, 16, 2015, 6076-6092  
DOI: 10.3390/ijms1603607

〔学会発表〕(計 13 件)

北村 朗 他, Wide-field 光学系 FRAP を用いた生細胞内拡散係数の測定検討, 第 8 回・光塾, 2016 年 12 月 17 日, 東京工業大学(神奈川県横浜市).

北村 朗 他, 天然変性領域に保存された ALS 関連変異を持つ TDP-43 の生細胞内構造変化と凝集性の解析, 第 39 回 日本分子生物学会年会, 2016 年 11 月 30 日, パシフィコ横浜(神奈川県横浜市).

北村 朗 他, ALS 関連変異型 TDP-43 の生細胞内構造変化と凝集性の解析, RNA フロンティアミーティング 2016, 2016 年 9 月 2 日, いこいの湯宿いろは(北海道二セコ町).

北村 朗, 蛍光イメージング手法を用いた ALS 関連 TDP43 凝集形成機構の解析, 第 7 回 ALS フォーラム, 2016 年 7 月 30 日, シェラトン都ホテル東京(東京都港区).

北村 朗, 蛍光イメージング法による神経変性疾患関連ミスフォールドタンパク質の凝集形成機構解析, 生化学若手の会・生物物理若手の会合同企画「蛍光イメージングセミナー～基礎から応用まで～」, 2016 年 7 月 1 日, 北海道大学理学部(北海道札幌市).

北村 朗, ALS 関連 TDP43 の構造および凝集性と神経細胞死機構の解析, IGM RNA Biofunction セミナー, 2016 年 2 月 29 日, 北海道大学遺伝子病制御研究所(北海道札幌市).

北村 朗 他, RNA と核小体局在は ALS 関連 TDP43 のカルボキシル末端断片に存在するプリオン様ドメインの構造変化を妨げることで凝集形成と毒性を低減させる, BMB2015, 2015 年 12 月 3 日, ポートアイランド(兵庫県神戸市).

北村 朗, ALS 関連 TDP43 C 末端断片の RNA 結合と核局在は凝集性と共に神経細胞毒性を低減する, 第 7 回・光塾, 2015 年 9 月 6 日, 広島大学(広島県東広島市).

北村 朗 他, ALS 関連変異型 TDP43 に見られる核 - 細胞質輸送と構造変調, 第 17 回・日本 RNA 学会年会, 2015 年 7 月 16 日, 札幌パークホテル(北海道札幌市).

北村 朗 他, ALS 関連変異型 TDP43 に見られる構造変化と核 - 細胞質輸送変調の解析, 北大細胞生物研究集会, 2015 年 3 月 3 日, 北海道大学(北海道札幌市).

北村 朗 他, ALS 関連変異型 TDP43 に見られる異常切断と核 - 細胞質輸送変調の解析, 第 37 回・日本分子生物学会年会, 2014 年 11 月 26 日, パシフィコ横浜 (神奈川県横浜市).

北村 朗 他, ALS 関連 TDP43 タンパク質の細胞内構造推定, 第 6 回・光塾, 2014 年 9 月 2 日, 独立行政法人情報通信研究機構 未来 ICT 研究センター (神戸市西区).

北村 朗, 生細胞蛍光イメージング法を用いた細胞生物学研究, 第 81 回・日本細菌学会・北海道支部総会, 2014 年 8 月 30 日 札幌医科大学 (北海道札幌市).

〔図書〕(計 1 件)

北村 朗 他, 共立出版, 阪大・北大コースブック「生細胞蛍光イメージング」, 2015, 340 (202-212, 314-317)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 1 件)

名称: ヘモシアニン会合体を用いた包摂体の製造方法

発明者: 田中良和、松野明日香、北村朗、金城政孝、姚閑、上野隆史、安部聡

権利者: 北海道大学, 東京工業大学

種類: 特許

番号: 特許願 2016-110309

出願年月日: 2016 年 6 月 1 日

国内外の別: 国内

取得状況 (計 0 件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

取得年月日:

国内外の別:

〔その他〕

研究代表者ホームページ

<http://altair.sci.hokudai.ac.jp/infmcd/member/kitamura/Kitamura.htm>

発表論文に関するプレスリリース

[http://www.hokudai.ac.jp/news/160114\\_als\\_pr.pdf](http://www.hokudai.ac.jp/news/160114_als_pr.pdf)

<https://www.hokudai.ac.jp/news/1603>

17\_alzheimer.pdf

[http://www.hokudai.ac.jp/news/160310\\_gimret\\_pr.pdf](http://www.hokudai.ac.jp/news/160310_gimret_pr.pdf)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

北村 朗 (KITAMURA, Akira)

北海道大学・大学院先端生命科学研究院・助教

研究者番号: 10580152