

平成 30 年 6 月 19 日現在

機関番号：12102

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K09822

研究課題名(和文) タンパク質-RNA相互作用が及ぼす神経変性疾患の病態機序の解明

研究課題名(英文) Investigation of protein-RNA interaction implicated in neurodegeneration

研究代表者

東 晋二(Higashi, Shinji)

筑波大学・医学医療系・講師

研究者番号：30365647

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)：TDP-43の断片化がポリ(A)+RNAの発現に与える影響について調査した。内在性もしくは強発現されたTDP-43はポリ(A)+RNAに隣接するペリクロマチン領域やクロマチン間領域に局在した。RNA認識モチーフ1を含み、かつN末端領域を削除されたTDP-43削除体は細胞質内の顆粒状構造体に局在し、ポリ(A)+RNAも共局在した。C末端領域のTDP-43削除体は細胞質内に点状に局在し、疾患脳で出現するアミノ酸残基218での削除体は約24%までポリ(A)+RNAの発現を減少させた。以上より、TDP-43削除体のタンパク質-RNA相互作用は病気の病態機序と関わっていることが示唆されるだろう。

研究成果の概要(英文)：We investigated the effect of truncation of TDP-43 on the expression of poly(A)+RNA by fluorescence in situ hybridization using HeLa cells transfected with a series of deleted TDP-43 constructs. Endogenous and overexpressed full-length TDP-43 localized to the perichromatin region and interchromatin space adjacent to poly(A)+RNA. Deleted variants of TDP-43 containing RNA recognition motif 1 and truncating N-terminal region induced cytoplasmic inclusions in which poly(A)+RNA was recruited. C-terminal TDP-43 truncated at residue 202 or 218 was distributed in the cytoplasm as punctate structures. C-terminal TDP-43 truncated at residue 218 but not at 202 significantly decreased poly(A)+RNA expression by approximately 24% compared with the level in control cells. Thus, a disturbance of the RNA metabolism in which TDP-43 is involved may be central to the pathogenesis of amyotrophic lateral sclerosis (ALS) and frontotemporal lobar degeneration (FTLD).

研究分野：神経変性疾患

キーワード：筋萎縮性側索硬化症 前頭側頭葉変性症 TDP-43 RNA metabolism 凝集体 神経変性

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

近年、筋萎縮側索硬化症 (Amyotrophic lateral sclerosis: ALS) や前頭側頭葉変性症 (Frontotemporal lobar degeneration: FTLD) の患者脳内の凝集体の主要構成成分として RNA 結合タンパク質である TDP-43 (TAR DNA binding protein) や FUS/TLS (fused in sarcoma) が同定された。またこれらのタンパク質の遺伝子に変異が生じると家族性の ALS や FTLD が発症することが遺伝研究より明らかになり、これらのタンパク質は ALS/FTLD の神経変性過程の病態機序に関与していると考えられるに至った。

TDP-43 と FUS は DNA/RNA と結合するドメイン構造を有しており、転写、スプライシング、翻訳などの過程に関わり合い、遺伝子発現の調節に関与する。以上のことから、ALS と FTLD の病態機序には RNA 動態の病的変化が存在すると考えられている。

### 2. 研究の目的

先述のように ALS/FTLD 関連タンパク質である TDP-43 は患者脳内では異常な凝集体を形成するが、さらに不溶化・リン酸化・断片化・ユビキチン化などの翻訳後修飾、生化学的変化をきたしており、これらの変化は神経変性過程に関与していると考えられている。ALS/FTLD の病態機序に RNA の病的変化が関与しているとする、これらの翻訳後修飾が異常な RNA 動態を引き起こしている可能性がある。

今回の研究ではこれらの知見を基に、断片化された TDP-43 の削除体を作成し、各ドメインにおける RNA 局在/発現への影響を調べ、疾患脳内に出現するカルボキシル末端(C末端)の削除体が細胞の RNA にどのような影響を与えうるかについて考察することを目的とする。これらの調査により、タンパク質-RNA 相互作用が及ぼす神経変性疾患の病態機序の解明を行う。

### 3. 研究の方法

(1) TDP-43 タンパク質は、核移行シグナルをもつアミノ末端(N末端)領域、2つの RNA 認識モチーフ(RRM1、RRM2)、Glycine-rich ドメインを含む C 末端領域をもつ。これらのドメイン構造を元に、野生型 FLAG タグ融合 TDP-43 に加えて、幾つかの FLAG タグ融合 TDP-43 削除体のプラスミドを作成した。

N 末端領域のみのアミノ酸残基 2-104 の削除体(TDP2-104)、RRM1 と RRM2 からなるアミノ酸残基 101-272 の削除体(TDP101-272)、RRM1 のみからなるアミノ酸残基 101-190 の削除体(TDP101-190)、RRM1、RRM2、C 末端領域からなるアミノ酸残基 101-414 の削除体 (TDP101-414)、部分的に削除された RRM2 と C 末端領域か

らなるアミノ酸残基 202-414 の削除体 (TDP202-414)、TDP202-414 からさらに RRM2 を削除したアミノ酸残基 218-414 の削除体 (TDP218-414) を作成した。TDP202-414 と TDP218-414 は、それぞれの FLAG タグ融合の塩基配列を持った PCR 産物を制限酵素 XhoI、NotI によって pCI-neo ベクターにライゲーションし、その他の削除体の PCR 産物は制限酵素 NotI、BamHI によって pFLAG-CMV-6c ベクターにライゲーションして作成した。

(2) 上記プラスミドを発現させた細胞のポリ(A)+RNA の局在・発現強度は蛍光 in situ ハイブリダイゼーション法により調査した。HeLa 細胞にプラスミドを形質導入した 24 時間後に 4%パラフォルムアルデヒドにて固定、透過処理・再水和処理などを行い、Cy3<sup>TM</sup>-oligo-dT(30)でハイブリダイゼーションを行なった。その後、抗体による蛍光免疫染色を施行し、洗浄、封入を行い、共焦点レーザー顕微鏡にて解析を行なった。

### 4. 研究成果

(1) 内在性の TDP-43 の局在を蛍光 in situ ハイブリダイゼーション法にて観察した。内在性 TDP-43 は主に細胞核内に局在するが、DAPI 染色やポリ(A)+RNA とは共局在せず、しかしポリ(A)+RNA に隣接するように局在した。DAPI は主に DNA を染色しており、ポリ(A)+RNA は凝集クロマチンとの境界領域で緩んだクロマチンやリボタンパク質のある perichromatin fibrils や非クロマチン領域である interchromatin granule clusters に局在すると考えられている。TDP-43 がポリ(A)+RNA の隣接に存在することから核内の非 DNA 領域の Nascent RNA に関与していると考えられた。

またごく一部の内在性 TDP-43 は細胞質内にも局在するが、ここでもポリ(A)+RNA とは共局在しなかった。

(2) 野生株の FLAG タグ融合 TDP-43 も細胞核内、細胞質内で内在性 TDP-43 と同様の局在を示し、DAPI 染色やポリ(A)+RNA とは共局在しなかった。

(3) N 末端領域のみからなる TDP2-104 削除体は主に細胞核内に局在し、内在性 TDP-43 と同様 DAPI 染色やポリ(A)+RNA とは共局在しなかった。このことから野生株 TDP-43 の細胞核内局在の多くは N 末端領域によって規定されていると考えられた。

(4) RRM1 と RRM2 からなる TDP101-272 削除体、RRM1 のみからなる TDP101-190 削除体、RRM1、RRM2、C 末端領域からなる TDP101-414 削除体はそれぞれ細胞質内で粒状の封入体を作り、ここにはポリ

(A)+RNA が共局在した。この細胞質内のポリ(A)+RNA の粒状の局在は正常局在とは明らかに異なるものであり、これらの削除体によって誘導されたものと考えられた。

(5) 部分的に削除された RRM2 と C 末端領域からなる TDP202-414 削除体、TDP202-414 からさらに RRM2 を削除した TDP218-414 削除体は、それぞれ細胞核内には局在せず、細胞質内に細粒状の局在を示した。疾患脳で見られる凝集体とは異なり、びまん性の細かい細粒状の局在であった。

(6) 空ベクター、野生株 TDP-43、TDP202-414 削除体、TDP218-414 削除体を発現させた HeLa 細胞のポリ(A)+RNA の発現強度を細胞ごとの蛍光強度から測定し、比較した。野生株の TDP-43 はコントロール細胞と比較して約 43%まで発現強度が低下していた (Paired Student's t-test  $p < 0.05$ )。TDP-43 の機能として転写抑制が報告されているが、この機能によるものと考えられた。

一方 TDP202-414 削除体は細胞のポリ(A)+RNA の発現強度に影響を与えなかったが、TDP218-414 削除体では約 24%まで発現強度の低下がみられた (Paired Student's t-test  $p < 0.05$ )。つまりこの 2 つの削除体はアミノ酸配列に大きな差がないように思えるものの、RNA 発現に対する影響には大きな差が存在することになる。患者の剖検脳を使用したこれまでの研究では、患者脳内に出現する C 末端領域の断片化 TDP-43 の断片化されるアミノ酸残基は 208, 218-219, 246-247 などが報告されている。つまり今回ポリ(A)+RNA の発現強度の低下を引き起こした TDP218-414 削除体は疾患脳に出現する病的な削除体に非常に近い構造をしており、一方 TDP202-414 削除体はそれよりもアミノ酸配列が長い削除体であると考えられる。そのため、TDP218-414 タンパクが引き起こした RNA 発現の変化は ALS/FTLD の病態機序と関連する可能性があると考えられた。

## 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 12 件)

Higashi S, Watanabe R, Arai T. Fluorescence in situ hybridization method reveals that carboxyl-terminal fragments of TDP-43 truncated at amino acid residue 218 reduce poly(A)<sup>+</sup> RNA expression. NeuroReport. 査読有, 29. 2018. 846-51.

doi:

10.1097/WNR.0000000000001042.

Watanabe R, Kawakami I, Onaya M, Higashi S, Arai N, Akiyama H, Hasegawa M, Arai T. (2017) Frontotemporal dementia with trans-activation response DNA-binding protein 13 presenting with cartatonic syndrome. Neuropathology. 査読有, 38. 2018. 281-7.

doi: 10.1111/neup.12442.

東 晋二.【特集 ニューロジェネティクス新時代 次世代シークエンサーが拓く新しい世界】14. ピック病・前頭側頭葉変性症. Clinical Neuroscience. 査読無, 36 巻 2 号 2018. 230-2.

東 晋二, 新井 哲明.【高齢者のための精神科医療】(第 1 章)心理社会的背景 高齢者の脳にみられる生理的变化. 精神科治療学. 査読無, 32 巻増刊 2017. 15-18

渡辺亮平, 東 晋二, 新井 哲明. 老年精神科専門医のための臨床神経病理学 FTD と MND の臨床病理. 老年精神医学雑誌 査読無, 28(9) 2017. 1033-8.

東 晋二, 新井 哲明. 認知症の生物学的研究 -Update シヌクレイノパチー, TDP-43 プロテノパチー, およびポリグルタミン病. 老年精神医学雑誌 査読無, 28. 2017. 123-8.

Kawakami I, Iseki E, Kasanuki K, Minegishi M, Sato K, Hino H, Shibuya K, Fujisawa K, Higashi S, Akiyama H, Furuta A, Takanashi M, Li Y, Hattori N, Mitsuyama Y, Arai H. A family with hereditary diffuse leukoencephalopathy with spheroids caused by a novel c.2442+2T>C mutation in the CSF1R gene. J Neurol Sci. 査読有, 15. 2016. 346-55. doi: 10.1016/j.jns.2016.06.013.

東 晋二, 越部裕子, 江湖山さおり, 野尻美流, 根本清貴, 新井 哲明. 原発性進行性失語症をとりまく現状と課題: 家族会活動を通じて. 精神医学 査読有, 58. 2016. 847-54.

DOI: <https://doi.org/10.11477/mf.1405205249>

Kawakami I, Kobayashi Z, Arai T, Yokota O, Nonaka T, Aoki N, Niizato K, Oshima K, Higashi S, Katsuse O, Hosokawa M, Hasegawa M, Akiyama H. Chorea as a clinical feature of the basophilic inclusion body disease subtype of fused-in-sarcoma-associated frontotemporal lobar degeneration.

Acta Neuropathol Commun. 査読有,  
4. 2016. 36

doi: 10.1186/s40478-016-0304-9.

東 晋二、新井哲明. 前頭側頭葉変性症  
(FTLD-tau, FTLD-TDP, FTLD-FUS).  
診断と治療. 査読無, 27. 2016. 36-41

東 晋二、新井哲明. 新しい異常蛋白蓄  
積症 TDP-43 proteinopathy. 査読無,  
精神医学 57. 2015. 833-838

東 晋二、新井哲明. 前頭側頭葉変性症.  
老年精神医学雑誌. 査読無, 103. 2015.  
935-8

〔学会発表〕(計 13 件)

東 晋二, シンポジウム 25 前頭側頭  
葉変性症の分子病態と診断・治療・原  
発性進行性失語症の診断と治療. 第 36  
回日本認知症学会学術集会 石川  
2017. 11

塚田恵鯉子, 渡辺亮平, 東 晋二, 根  
本清貴, 新井哲明: DLB に対する脳血  
流 SPECT での CIS 評価と MIBG,  
DaTscan との比較. 第 36 回日本認知  
症学会学術集会 石川 2017. 11

東 晋二、越部裕子、江湖山さおり、  
塚田恵鯉子、野尻美流、関根 彩, 根  
本清貴, 新井哲明: 原発性進行性失語  
症の家族会活動報告. 第 36 回日本認  
知症学会学術集会 石川 2017. 11

渡部衣美、根本清貴、小島真奈、村田  
彩貴子、塚田恵鯉子、井出政行、松崎  
朝樹、東 晋二、鈴木利人、濱田洋実、  
佐藤豊実、新井哲明: 精神疾患合併妊  
婦の周産期における病状悪化リスクの  
検討. 第 113 回日本精神神経学会学術  
総会. 愛知県 2017.6

越部裕子、江湖山さおり、東 晋二、  
塚田恵鯉子、新井哲明: 文章模写課題  
の「ルーティーン化」が有効であった  
FTD の 1 例. 第 18 回日本認知症ケア  
学会. 沖縄県 2017.5

江湖山さおり、東 晋二、安部秀三、  
岡田正樹、須磨崎加壽子、高濱浩輔、  
田中芳郎、山田 武、高橋 晶、新井  
哲明: 平成 27 年関東・東北豪雨にお  
ける茨城県認知症疾患医療センター被  
災地支援活動 - 認知症疾患医療センタ  
ーによる訪問活動報告 -. 第 18 回日  
本認知症ケア学会. 沖縄県 2017.5

東 晋二、野尻美流、越部裕子、塚田恵  
鯉子、根本清貴、新井哲明. 原発性進  
行性失語症の障害脳領域における標準  
失語症検査の比較検討. 第 35 回日本認  
知症学会学術集会 東京 2016.12

新井哲明、高橋 晶、太刀川和弘、根本  
清貴、東 晋二、塚田恵鯉子、江湖山  
さおり、堀 孝文. 茨城県認知症疾患医  
療センターによる災害時高齢者宅訪問  
活動. 第 35 回日本認知症学会学術集会  
東京 2016. 12

渡部 衣美、根本 清貴、小島 真奈、早  
川 絢子、塚田 恵鯉子、井出 政行、松  
崎 朝樹、東 晋二、鈴木 利人、新井  
哲明. 精神疾患合併妊婦の周産期にお  
ける病状悪化リスクの検討. 第 112 回  
日本精神神経学会学術総会 千葉  
2016. 6

新井 哲明、安部 秀三、岡田 正樹、須  
磨崎 加壽子、高濱 浩輔、田中 芳郎、  
山田 武、高橋 晶、根本 清貴、太刀川  
和弘、河合 伸念、東 晋二、塚田 恵鯉  
子、江湖山 さおり、堀 孝文. 平成 27  
年関東・東北豪雨における常総市水害  
支援(3)茨城県認知症疾患医療センタ  
ーの訪問活動. 第 112 回日本精神神経  
学会学術総会 千葉 2016.6

渡辺亮平、河上緒、朝岡俊泰、大島健  
一、新里和弘、東 晋二、女屋光基、新  
井信隆、長谷川成人、秋山治彦、新井  
哲明 初診時に緊張病症候群と診断さ  
れた FTLD-TDP の一例. 第 57 回日本  
神経病理学会総会学術研究会, 青森  
2016.6

渡辺 理沙、東 晋二、渡部 衣美、日高  
響子、大戸 達之、根本 清貴、新井 哲  
明. 上腸間膜動脈症候群を合併した  
回避/制限性食物摂食障害の 11 歳女  
児例 東京精神医学会第 107 回学術集  
会 東京 2016.7

塚田恵鯉子、越部裕子、東 晋二、根本  
清貴、朝田隆、新井哲明 標準失語症検  
査を用いた原発性進行性失語症の比較  
検討 第 34 回日本認知症学会学術集会  
青森 2015.10

〔図書〕(計 8 件)

東 晋二、MC メディカ出版、診断・  
治療・手術に使える臨床医・RI 技師の  
ための脳 SPECT パーフェクトガイド  
2 章疾患別: SPECT の特徴と使い方  
B 認知症 前頭側頭型認知症 意味  
性認知症. 2018. 141-7

東 晋二、新井哲明、日本医事新報社、  
1336 専門家による 私の治療  
2017-18 年度版 第 1 版 8 神経・筋疾  
患 2 認知症 8-15 前頭側頭型認知症  
(Pick 病). 2017. 597-598

東 晋二、今林悦子、ぱーそん書房、  
認知症 原因診断のための脳画像 -  
Alzheimer 病による軽度認知障害、  
2015、74-76

東 晋二、櫻井圭太、ぱーそん書房、  
認知症 原因診断のための脳画像 - 脳  
アミロイドアンギオパチー、2015、  
84-86

東 晋二、櫻井圭太、ぱーそん書房、  
認知症 原因診断のための脳画像 - プ  
リオン病(Creutzfeldt-Jakob 病)、  
2015、178-180

東 晋二、今林悦子、ぱーそん書房、  
認知症 原因診断のための脳画像－  
Huntington 病、2015、197-199  
東 晋二、櫻井圭太、ぱーそん書房、  
認知症 原因診断のための脳画像－  
CADASIL、CARASIL、2015、264-265  
東 晋二、徳丸阿耶、村上繁雄、齋藤  
祐子、ぱーそん書房、認知症 原因診断  
のための脳画像－海馬硬化性認知症、  
2015、272-274

〔産業財産権〕

出願状況（計 0 件）

取得状況（計 0 件）

〔その他〕

ホームページ等

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

東 晋二 (HIGASHI, Shinji)  
筑波大学・医学医療系・講師  
研究者番号：30365647

### (2) 研究協力者

新井 哲明 (ARAI, Tetsuaki)  
筑波大学・医学医療系・教授  
研究者番号：90291145

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・研究員  
研究者番号：20231839

井関 栄三 (ISEKI, Eizo)  
順天堂大学・医学部  
研究者番号：30203061