

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 19 日現在

機関番号：11301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2016

課題番号：15K18365

研究課題名(和文)細胞質RNAによるタンパク質分解制御が果たすALS発症機構の解明

研究課題名(英文)Elucidation of the molecular mechanism of ALS pathogenesis mediated by cytoplasmic RNA.

研究代表者

中川 直(NAKAGAWA, Tadashi)

東北大学・医学系研究科・助教

研究者番号：30707013

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、筋萎縮性側索硬化症(ALS)の発症過程において必須な役割を果たすと考えられているTDP-43タンパク質の、細胞内凝集体形成メカニズムを解析した。RNA結合能を欠失させたTDP-43の細胞質凝集体形成効率は、野生型と比較して顕著に減弱していた。また、TDP-43にRNA分解酵素を融合させたタンパク質(TDP-43-RNase)は、RNA結合能および細胞質凝集体形成効率がいずれも減少していた。以上の結果から、TDP-43に結合するRNAは、細胞質凝集体形成を促進することが示唆された。

研究成果の概要(英文)：Nearly all of the amyotrophic lateral sclerosis (ALS) patients contain cytoplasmic aggregation of TDP-43 in their neuronal tissues. Although aggregated TDP-43 was shown to contribute to the ALS pathogenesis, the molecular mechanism by which TDP-43 forms cytoplasmic aggregation are not fully understood. We found that the mutation of TDP-43 which disrupted the association with RNA significantly reduced cytoplasmic aggregation. Furthermore, TDP-43 fused with RNase exhibited the resistance to aggregation formation. These results revealed that RNA is critical for TDP-43 to form cytoplasmic aggregation and offered the novel therapeutic strategy for the treatment of ALS.

研究分野：ユビキチン化を介したタンパク質および核酸制御

キーワード：筋萎縮性側索硬化症(ALS) TDP-43 細胞内凝集体形成 RNA RNA分解酵素

1. 研究開始当初の背景

(1)ALS (筋萎縮性側索硬化症) は運動神経の変性と筋肉の萎縮により発症後数年で死に至る重篤な疾患であるが、発症の詳細なメカニズムおよび治療法が確立されていない。

(2)ALS 患者の約 9 割において、通常核に存在する TDP-43 タンパク質の細胞質凝集体が観察されること、および、この細胞質凝集体はストレス顆粒と呼ばれる構造体に形成されることが報告されていた。この細胞質凝集体は ALS の発症過程において必須な役割を果たすと予想されていたものの、TDP-43 のストレス顆粒への移行メカニズムは不明であった。

(3)TDP-43 遺伝子の変異が一部の ALS 患者において同定されていたが、これらの変異が ALS の発症にどのように寄与するかも不明であった。

2. 研究の目的

ストレス顆粒は RNA を核として形成されること、および TDP-43 は RNA 結合タンパク質であることから、RNA が TDP-43 とストレス顆粒の結合を仲介し、TDP-43 の細胞質凝集体形成に寄与する可能性が考えられた。また、ALS 患者で認められる TDP-43 の遺伝子変異は、TDP-43 と RNA との結合を増加させることで、細胞質凝集体の形成に寄与する可能性が考えられた。本研究では、これらの仮説を検証することを目的とした。

3. 研究の方法

(1)TDP-43 細胞質凝集体形成を調べる実験に、ストレス顆粒の研究で汎用されている骨肉腫由来 U2OS 細胞と神経芽細胞腫由来 SH-SY5Y 細胞を用いた。当初、運動神経由来 NSC34 細胞を使用する予定であったが、細胞形質が不安定であることが判明したため、本研究では使用しなかった。

(2)過酸化水素処理により、ストレス顆粒の形成と、それに伴う TDP-43 細胞質凝集体形成を誘導した。

(3)タグを付加した TDP-43 を細胞に発現させ、タグに対する抗体を用いて、TDP-43 の細胞内局在を観察した、この方法により、TDP-43 の検出効率を増加させた。

(4)UV 架橋免疫沈降法 (CLIP) により TDP-43 タンパク質に結合する RNA を回収し、標的 RNA である TDP-43 RNA の量を定量的 PCR 法 (qPCR) により定量した。

4. 研究成果

(1)TDP-43 の細胞質凝集体形成を培養細胞で誘導できる実験条件を検討した。その結果、過酸化水素処理による酸化ストレス依存的に、TDP-43 細胞質凝集体形成を再現性良く誘

導できる実験条件の確立に成功した。予想通り、この TDP-43 細胞質凝集体はストレス顆粒と共存していた。この実験系を用いて以下の実験を行った。

骨肉腫由来 U2OS 細胞と神経芽細胞腫由来 SH-SY5Y 細胞を比較したところ、TDP-43 細胞質凝集体形成能は両細胞間で有意な差が認められなかったものの、SH-SY5Y 細胞では細胞死が起こりやすいことを見出した。このことから、神経細胞は、TDP-43 細胞質凝集体形成に関わらず、酸化ストレスに対する耐性が低いことが示唆された。

ALS 患者で同定されていた、いくつかの変異型 TDP-43 (90 番目のアラニン、169 番目のアスパラギン酸、337 番目のメチオニン、343 番目のグルタミンをそれぞれバリン、グリシン、バリン、アルギニンに置換した変異体) と野生型 TDP-43 を比較したところ、TDP-43 細胞質凝集体形成能および細胞死誘導能に有意な差は認められなかった。この結果から、これらの TDP-43 の遺伝子変異は、凝集体形成以外のメカニズムで ALS の発症に寄与していることが示唆された。

TDP-43 は核移行シグナル (NLS) を有し、通常核に存在するタンパク質である。最後に、NLS を変異させ、核移行を阻害した変異型 TDP-43 (NLSmt) と野生型 TDP-43 を比較したところ、細胞質凝集体形成効率は NLSmt の方が大きかった (図 1)。

(2) TDP-43 の RNA 結合能と細胞質凝集体形成効率の関係を検討した。TDP-43 の RNA 結合能を欠失させるため、TDP-43 の RNA 結合領域に存在するアミノ酸に変異を導入し (147 番目のフェニルアラニンと 149 番目のフェニルアラニンと共にイソロイシンに置換、RRM1mt) 標的 RNA との結合を検出したところ、野生型 TDP-43 と比較して、その結合が約 8 割減弱していた。この微弱な結合は、変異型 TDP-43 が内在性の野生型 TDP-43 と結合し、野生型 TDP-43 を介して標的 RNA と結合することに由来することが疑われた。次に、RNA 結合能を欠失させた TDP-43 (RRM1mt) の細胞質凝集体形成効率を調べたところ、野生型と比較して約 8 割減弱していることが明らかになった (図 1)。

(3) TDP-43 に結合する RNA を分解させるため、TDP-43 に活性のある RNA 分解酵素 (RNase) を融合させることを試みた。TDP-43 に結合する RNA は複数あることが知られているため、RNA の構造非特異的に RNA を分解する RNaseA を選択した。RNaseA は細胞外に分泌されるタンパク質であるため、初めに細胞内環境下 (pH 7.4) で活性があることを、試験管内で確認した。次にこの RNaseA を TDP-43 に融合し、このタンパク質 (TDP-43-RNase) が RNase

活性を有することを試験管内で検査した。その結果、TDP-43 と RNase の間に 120 アミノ酸の長いリンカーを導入することで、活性を有することが明らかとなった。最後にこの TDP-43-RNase の TDP-43 標的 RNA 結合能、細胞質凝集体形成効率、および細胞死誘導能を調べたところ、いずれも減少していた(図 1)。

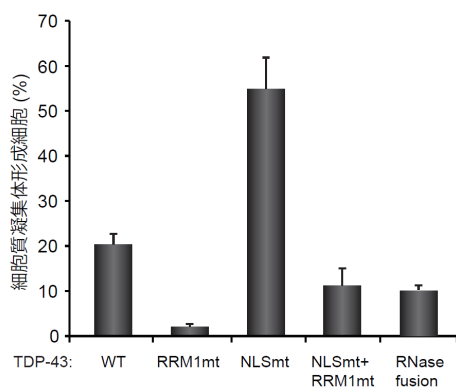


図 1: TDP-43 細胞質凝集体形成効率 (WT は野生型、RRM1mt は RNA 結合能欠失変異型、NLSmt は核移行シグナル変異型を示す)

(4) まとめ

以上の結果から、TDP-43 に結合する RNA は、細胞質凝集体形成を促進することが示唆された。今後は、TDP-43 に結合する RNA が、細胞質凝集体の維持にも必須の役割を果たしているか、またその場合、RNA を分解することで TDP-43 の細胞質凝集体を減少させることができるのか調べる必要があると思われる。

今回の実験から、TDP-43-RNase は TDP-43 標的 RNA 結合能、細胞質凝集体形成効率、および細胞死誘導能のいずれも低いことが示された。TDP-43 はホモオリゴマーを形成することが知られているため、TDP-43-RNase は内在性の TDP-43 と結合し、その結合 RNA を分解できる可能性がある。今後の更なる解析によって、RNA が ALS 治療のターゲットとなり得るか、とくに TDP-43-RNase が、すでに形成された TDP-43 の細胞質凝集体を減少させ、細胞死を減少させることができるのか、明らかにされることが期待される。

これまで、一部の ALS 患者において同定されていた TDP-43 遺伝子の変異が、ALS の発症にどのように寄与するか不明であった。本研究では、これらの TDP-43 遺伝子変異のうち 4 つを選んで解析したが、いずれも野生型と比較して、TDP-43 標的 RNA 結合能、細胞質凝集体形成効率、および細胞死誘導能に有意な差が認められなかった、今後はこれらの遺伝子変異がどのように発症に寄与するのか明らかにする必要があると思われる。また、TDP-43 の遺伝子変異は今回解析したもの以外に 30 ほど報告されているため、これらの

変異型 TDP-43 についても解析する必要があると思われる。

5. 主な発表論文等

(雑誌論文)(計 4 件)

Ishida, N., Nakagawa, T., Iemura, S.I., Yasui, A., Shima, H., Katoh, Y., Nagasawa, Y., Natsume, T., Igarashi, K., Nakayama, K.: Ubiquitylation of Ku80 by RNF126 Promotes Completion of Nonhomologous End Joining-Mediated DNA Repair. *Mol Cell Biol* 37, e00347-16 2017.

doi: 10.1128/MCB.00347-16. 査読有

Shimizu, K., Fukushima, H., Ogura, K., Lien, E.C., Nihira, N.T., Zhang, J., North, B.J., Guo, A., Nagashima, K., Nakagawa, T., Hoshikawa, S., Watahiki, A., Okabe, K., Yamada, A., Toker, A., Asara, J.M., Fukumoto, S., Nakayama, K.I., Nakayama, K., Inuzuka, H., Wei, W.: The SCFbeta-TRCP E3 ubiquitin ligase complex targets Lipin1 for ubiquitination and degradation to promote hepatic lipogenesis. *Sci Signal* 10, eaah4117, 2017.

doi: 10.1126/scisignal. eaah4117. 査読有

Nakagawa, T., Nakayama, K.: Protein monoubiquitylation: targets and diverse functions. *Genes Cells* 20, 543-562, 2015.

doi: 10.1111/gtc. 12250. 査読有

Nakagawa, T., Araki, T., Nakagawa, M., Hirao, A., Unno, M., Nakayama, K.: S6 Kinase- and beta-TrCP2-Dependent Degradation of p19Arf Is Required for Cell Proliferation. *Mol Cell Biol* 35, 3517-3527, 2015.

doi:10.1128/MCB.00343-15. 査読有

〔学会発表〕(計6件)

Tadashi Nakagawa, Masaki Hosogane, Ryo Funayama, Keiko Nakayama. Interplay of MYC oncogene and ubiquitin-proteasomal degradation of a TFIIID component in proliferation switch. NIH-Tohoku University -International Symposium 2017 年 2 月 17 日. 東北大学 (宮城県仙台市)

Yujiao Yu, Akane Morohoshi, Tadashi Nakagawa, Keiko Nakayama. Molecular analysis of Amyotrophic Lateral Sclerosis associated Cyclin F mutants. 第 39 回日本分子生物学会年会 2016 年 12 月 1 日 パシフィコ横浜(神奈川県横浜市)

諸星茜、中川直、中山啓子. ユビキチン化による FACT 複合体の機能制御. 第 39 回日本分子生物学会年会. 2016 年 12 月 1 日. パシフィコ横浜(神奈川県横浜市)

Tadashi Nakagawa, Masaki Hosogane, Ryo Funayama, Keiko Nakayama. Reactivation of cell proliferation by continuous TGF- treatment. 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)

中川直、細金正樹、舟山亮、中山啓子. TGF- 刺激による TFIIID 構成因子 TAF7 の分解とその役割の解明. 第 38 回日本分子生物学会年会. 2015 年 12 月 4 日. 神戸コンベンションセンター(兵庫県神戸市)

諸星茜、中川直、中野星児、中山啓子. セルトリ細胞特異的 -TrCP ノックアウトマウスの解析. 第 38 回日本分子生物学会年会. 2015 年 12 月 1 日. 神戸コンベンションセンター(兵庫県神戸市)

〔その他〕

ホームページ等

東北大学・大学院医学系研究科・細胞増殖制御分野

<http://www.devgen.med.tohoku.ac.jp/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

中川 直 (NAKAGAWA, Tadashi)

東北大学・大学院医学系研究科・助教

研究者番号：30707013

(2) 研究分担者 該当なし

(3) 連携研究者 該当なし