

平成 30 年 6 月 18 日現在

機関番号：15401

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2016～2017

課題番号：16K15481

研究課題名(和文) ヒト一倍体細胞を用いた遺伝子トラップ法によるTDP-43関連遺伝子の同定

研究課題名(英文) Identification of TDP-43 related genes using gene trap

研究代表者

川上 秀史 (Kawakami, Hideshi)

広島大学・原爆放射線医科学研究所・教授

研究者番号：70253060

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,600,000円

研究成果の概要(和文)：筋萎縮性側索硬化症(ALS)患者の運動ニューロンにはTAR DNA-binding protein of 43 kDa(TDP-43)の過剰な蓄積がある。TDP-43が凝集に関与する遺伝子を同定することを目的に、Haploid cell lineにCRISPRおよび認識配列を含むレンチウイルスライブラリーをを感染させることで遺伝子破壊を行なった。TDP-43のC末にeGFPを融合して発現させ、eGFPのシグナルが増強している細胞をセルソーターで単離し、次世代シーケンサーによりシーケンスを行い、TDP-43凝集に関わる遺伝子として約30個の遺伝子を同定した。

研究成果の概要(英文)：Aggregates of TAR DNA-binding protein of 43 kDa(TDP-43)are characteristic in motoneuron in amyotrophic lateral sclerosis. To identify genes influencing TDP-43 aggregate formation, we infected lentivirus from the library with CRISPR and the recognition sequence and destroy genes. We expressed TDP-43 with eGFP and isolated cells with enhanced signals by cell sorter. We sequenced DNA extracted from cells by next-generation sequencer, and identified 30 genes as TDP-43 aggregate formation related.

研究分野：神経内科学

キーワード：TDP-43 筋萎縮性側索硬化症

## 1. 研究開始当初の背景

神経変性疾患である筋萎縮性側索硬化症 (ALS) 患者の残存した運動ニューロンには TAR DNA-binding protein of 43 kDa (TDP-43) の過剰な蓄積があることが報告されている。また前頭側頭型認知症 (FTLD) においても TDP-43 の蓄積が認められ、現在では ALS-FTLD スペクトラムとして、一連の疾患群として考えられるようになった。TDP-43 遺伝子の変異により、ALS、FTLD またはその合併が起こることが知られている。一方で、孤発性 ALS の 90% 以上が TDP-43 の封入体を持つが、その蓄積のメカニズムに関しては、不明なところが多い。

## 2. 研究の目的

本研究ではヒト一倍体細胞に遺伝子トラップ法を用いて TDP-43 が凝集に関与する遺伝子を検索・同定することで TDP-43 が凝集する過程・メカニズム・病的意義を解明し、未だ解明されていない ALS の病態解明へと展開するための研究盤を確立することを目的とする。

## 3. 研究の方法

蛍光蛋白の付加された TDP-43 発現 Haploid cell line の樹立

細胞内の蛋白質の局在を明らかにする方法としては免疫組織化学で染色して観察する方法や、目的の蛋白質に蛍光蛋白を付加して発現させ蛍光顕微鏡で観察する方法がある。本研究では生きた細胞内での TDP-43 の局在や凝集の変化の観察を目的とするため、蛍光蛋白の付加された TDP-43 発現 Haploid cell line の樹立を行う。Haploid cell は、既にゲノムの殆どの領域で、一倍体になっていることが知られている Hap1 cell を用いる。

遺伝子トラップウイルスベクターの作成  
遺伝子トラップ法は、トラップベクターをランダムにゲノムに挿入することによって、不特定多数の遺伝子の機能を不活化する方法である。本研究では遺伝子トラップカセットが内在性遺伝子内に挿入された場合に、そのポリ A シグナルを利用して、CAG プロモーターにより eGFP を発現すると同時に内在性遺伝子を破壊するジーントラップ用のレトロウイルスベクターを作成する。目的の細胞がウイルスベクターに感染すると、レトロウイルスの逆転写酵素により eGFP とポリ A 付加シグナルをつないだカセットが内在性の遺伝子座にランダムに組み込まれ、内在性のプロモーターにより eGFP が発現する。蛍光蛋白遺伝子を発現している細胞は、すべてレトロウイルスが内因性の遺伝子近傍に挿入され、内因性の遺伝子に変異をおこした細胞となっている。eGFP の発現を見ることで遺伝子トラップカセットが遺伝子に挿入された細胞を鑑別することが可能となる。

遺伝子トラップ法を用いて TDP-43 の凝集した細胞の分離法の確立 樹立した蛍光蛋

白の付加された TDP-43 発現 Haploid cell line に遺伝子トラップウイルスベクターを感染させることでランダムな遺伝子破壊を行う。遺伝子トラップカセットが挿入され、同時にカセット内の eGFP 遺伝子が発現している細胞において TDP-43 の凝集の有無、局在の変化があるかどうかの観察を行う。TDP-43 の凝集が存在する細胞をセルソーターまたは Incell analyzer のような画像解析装置を用いて、分離する。

遺伝子トラップカセットが挿入され破壊された遺伝子の同定 遺伝子トラップカセットの挿入により TDP-43 の凝集、局在の変化が起きた細胞のどこに遺伝子トラップカセットが挿入されているかを検索し、破壊された遺伝子の同定を行う。細胞の遺伝子に挿入された遺伝子トラップ部にプライマーを設計し、次世代シーケンサーを用いてディープシーケンスを行い破壊された遺伝子を同定する。

同定された遺伝子の機能解析 同定された遺伝子が真に TDP-43 凝集に関与しているのか確認を行う。small hairpin RNA を用いて目的の遺伝子をサイレンシングし細胞や、CRISPR-Cas9 等の遺伝子改変技術を用いて目的の遺伝子をノックアウトした細胞を作成する。作成した細胞内で TDP-43 が凝集するかの確認を行い、どのような機序で TDP-43 の凝集が起こるのかを解明する。また、同定された遺伝子は、ALS の原因遺伝子となる可能性が高いので、候補遺伝子として ALS 患者検体をスクリーニングする。

## 4. 研究成果

本研究では生きた細胞内での TDP-43 の局在や凝集の変化の観察を目的とするため、蛍光蛋白の付加された TDP-43 発現 Haploid cell line の樹立を行なった。Haploid cell は、Hap1 cell を用いた。蛍光蛋白は mCherryred を TDP-43 の C 末に付加した。

遺伝子トラップ法は、トラップベクターをランダムにゲノムに挿入することによって、不特定多数の遺伝子の機能を不活化する方法である。本研究では遺伝子トラップカセットが内在性遺伝子内に挿入された場合に、そのポリ A シグナルを利用して、CAG プロモーターにより GFP を発現すると同時に内在性遺伝子を破壊するジーントラップ用のレトロウイルスベクターを用いて実験をおこなったが、効率に問題があることがわかった。そこで、CRISPR ライブラリーによるノックアウトを目指すことにした。

Haploid cell line に CRISPR および認識配列を含むレンチウイルスライブラリーを感染させることでシステムティックに遺伝子破壊を行なった。ライブラリーは、Addgene から購入し、各遺伝子に対して 3 箇所認識配列を含むよう作製されている。TDP-43 の C 末に eGFP を融合して発現させ、eGFP のシグナル

が増強している細胞をセルソーターで単離した。単離した細胞をさらにセルソーターで、再分離後、回収した細胞から DNA を単離し、認識配列部位を増幅後、次世代シーケンサーによりシーケンスを行い、遺伝子の特異的な認識配列を同定した。1つの遺伝子に関して、2つ以上の認識配列を含む遺伝子を TDP-43 凝集に関わる遺伝子として、選別したところ、約30個の遺伝子を同定した。

#### 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 6 件)

1. Multiple Proteinopathies in Familial ALS Cases With Optineurin Mutations.

Ayaki T, Ito H, Komure O, Kamada M, Nakamura M, Wate R, Kusaka H, Yamaguchi Y, Li F, Kawakami H, Urushitani M, Takahashi R.

J Neuropathol Exp Neurol. 2018 Feb 1;77(2) :128-138. doi: 10.1093/jnen/nlx109 査読有り

2. 家族性 ALS の原因遺伝子 update

丸山 博文, 森野 豊之, 川上 秀史  
BRAIN and NERVE - 神経研究の進歩  
68 巻 9 号 pp. 1081-1086 2017

家族性 ALS の原因遺伝子 update  
doi.org/10.11477/mf.1416200555  
査読有り

3. Novel compound heterozygous mutations in the PARK2 gene identified in a Chinese pedigree with early-onset Parkinson's disease. Shi Y, Kawakami H, Zang W, Li G, Zhang J, Xu C.

Brain Behav. 2017 Dec 19;8(1):e00901. doi: 10.1002/brb3.901.  
査読有り

4. RELATIVE BIOLOGICAL EFFECTIVENESS OF NEUTRONS DERIVED FROM THE EXCESS RELATIVE RISK MODEL WITH THE ATOMIC BOMB SURVIVORS DATA MANAGED BY HIROSHIMA UNIVERSITY. Satoh K, Yasuda H, Kawakami H, Tashiro S.

Radiat Prot Dosimetry. 2017 Sep 23:1-5. doi: 10.1093/rpd/ncx173.  
査読有り

5. Second derivative of the finger photoplethysmogram and cardiovascular mortality in middle-aged and elderly

Japanese women.

Inoue N, Kawakami H, Yamamoto H, Ito C, Fujiwara S, Sasaki H, Kihara Y.

Hypertens Res. 2017 Feb;40(2):207-211. doi:10.1038/hr.2016.123. 査読有り

6. Linear ubiquitination is involved in the pathogenesis of optineurin-associated amyotrophic lateral sclerosis.

Nakazawa S, Oikawa D, Ishii R, Ayaki T, Takahashi H, Takeda H, Ishitani R, Kamei K, Takeyoshi I, Kawakami H, Iwai K, Hatada I, Sawasaki T, Ito H, Nureki O, Tokunaga F.

Nat Commun. 2016 Aug 24;7:12547. doi: 10.1038/ncomms12547. 査読有り

[学会発表](計 5 件)

1. 神経内科医が知っておくべきパーキンソン病・パーキンソニズムの遺伝学的知識

森野豊之

第42回症例から学ぶ神経内科 in 広島

広島 2018年2月7日

2. Next-generation Sequencing of RYR1 and CACNA1S in Malignant Hyperthermia

Rieko Kanzaki, Hiroyuki Morino, Ryosuke Ohsawa, Toshimichi Yasuda, Masashi Kawamoto, Hideshi Kawakami

第2回放射線災害医科学研究拠点国際シンポジウム

長崎 2018年2月3日

3. A mutation of the spinocerebellar ataxia gene CACNA1G induces cerebellar Purkinje cell death and ataxia in mice.

Y. Matsuda, H. Morino, T. Kurashige, T. Matsuoka, Y. Sotomaru, K. Hashimoto, H. Kawakami

Neuroscience 2017 Washington 2017年11月12日

4. Identification rate of hereditary neurodegenerative disease by next-generation sequencing

Hiroyuki Morino, Ryosuke Ohsawa, Ryosuke Miyamoto, Yuishin Izumi, Hirofumi Maruyama, Hideshi Kawakami

World Congress of Neurology 2017 京都

2017年9月18日

5. The search for genes associated with malignant hyperthermia

Rieko Kanzaki, Hiroyuki Morino, Hideshi Kawakami

第1回放射線災害医科学研究拠点国際シンポジウム 広島

2017年2月22日

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
国内外の別：

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〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

川上 秀史 (KAWAKAMI, Hideshi)

広島大学・原爆放射線医科学研究所・教授

研究者番号：70253060

(2) 研究分担者

森野 豊之 (MORINO, Hiroyuki)

広島大学・原爆放射線医科学研究所・准教授

研究者番号：10397953