

令和元年6月18日現在

機関番号：82609

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K21650

研究課題名(和文)核タンパク質TDP-43が細胞質に凝集体を形成する機序

研究課題名(英文)The aggregation mechanism of TDP-43 protein

研究代表者

鈴木 元治郎(SUZUKI, Genjiro)

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・主席研究員

研究者番号：60466034

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)：認知症などの神経変性疾患において、脳内の細胞における異常タンパク質の蓄積は広くみられる現象であることから、神経細胞変性の原因ではないかと考えられる。TDP-43は筋萎縮性側索硬化症(ALS)や前頭側頭葉変性症(FTLD)などで神経細胞において異常凝集が観察されており、これらの疾患の原因と思われる。本研究では試験管内で合成したTDP-43タンパク質から異常凝集体を形成し、ヒト神経線維芽細胞SH-SY5Y細胞株において異常TDP-43凝集体の蓄積過程を詳細に観察することができた。また、蓄積したTDP-43が患者脳と同様に異常リン酸化されていることを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

筋萎縮性側索硬化症(ALS)や前頭側頭葉変性症(FTLD)などの神経変性疾患ではTDP-43というタンパク質が神経細胞において異常に凝集していることが観察されており、これらの疾患の原因であると考えられる。本研究により試験管内で合成したTDP-43タンパク質の異常凝集によりヒト神経線維芽細胞において異常TDP-43凝集体の蓄積を誘導することができた点は、これらの疾患の細胞モデルの確立へとつながり、学術的かつ社会的に意義が高いものであると考えられる。今後、マウスなどの動物モデルに応用することにより、有効な動物モデルの確立や、治療薬の開発への応用も期待できる。

研究成果の概要(英文)：In neurodegenerative diseases, accumulation of abnormal proteins in cells in the brain is a widespread phenomenon and is considered to be the cause of neuronal degeneration. Abnormal aggregations of TDP-43 are observed in neurons of amyotrophic lateral sclerosis (ALS) patients and frontotemporal lobar degeneration (FTLD) patients, thus, these aggregations may be the cause of these diseases. In this study, abnormal aggregates were made from TDP-43 monomer synthesized in vitro, and the accumulation process of abnormal TDP-43 aggregates could be observed in detail in the human neurofibroblast SH-SY5Y cell line. We also found that accumulated TDP-43 is aberrantly phosphorylated in the same way as the patient's brain.

研究分野：分子生物学

キーワード：ALS TDP-43 プリオン 神経変性疾患

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

1. 研究開始当初の背景

孤発性および家族性の筋萎縮性側索硬化症(ALS)では、神経細胞の細胞質における異常リン酸化 TDP-43 タンパク質の凝集体形成は広くみられる病変である。このことから、細胞質における TDP-43 タンパク質の凝集体形成は、ALS でみられる神経変性の原因である可能性が高いと考えられる。しかし、本来核に局在するタンパク質である TDP-43 がどのようなきっかけで細胞質へと移行するか？細胞質でどのようにして凝集体を形成するか？凝集体の除去は行われているのか？など多くの疑問点が残されている。

2. 研究の目的

本来核内に局在する TDP-43 の細胞内挙動を詳細に解析し、どのようなきっかけで細胞質へと移行し、凝集体を形成するのか？を明らかにすることを本研究の目的とした。

3. 研究の方法

- (1) 大腸菌を利用して全長のTDP-43タンパク質を非変性条件で発現・精製する。精製したTDP-43タンパク質から線維状凝集体を形成する。
- (2) ヒト神経線維芽細胞SH-SY5Y細胞株において、N末端側にGFPを融合したTDP-43タンパク質を発現するノックイン細胞株をゲノム編集技術を利用して作製する。また、N末端側にGFPを融合したTDP-43タンパク質を安定的に高発現するSH-SY5Y細胞株を作成する。
- (3) 作成したTDP-43タンパク質凝集体を様々な細胞株に添加し、細胞内へ取り込ませることにより、シードとなりうるかを検討する。

4. 研究成果

- (1) 大腸菌で TDP-43 タンパク質を過剰発現するプラスミドを作成した。作成したプラスミドを大腸菌 BL21(DE3)に導入し、タンパク質発現の条件を検討したところ、非変性条件下において大量の TDP-43 タンパク質を発現する条件を見出した。TDP-43 タンパク質を大量発現している大腸菌を溶解し、カラムを利用して高純度の TDP-43 タンパク質を大量に精製することができた。精製した TDP-43 タンパク質を、さまざまな条件下で凝集体の形成を促進させることにより、様々な構造をもった TDP-43 タンパク質凝集体を形成することに成功した。
- (2) ヒト神経線維芽細胞 SH-SY5Y 細胞株において N 末端側に GFP を融合した TDP-43 タンパク質を発現するノックイン細胞株を CRISPR/Cas9 のシステムを利用してゲノム編集により作成した。作成した細胞株を蛍光観察することにより、GFP-TDP-43 タンパク質の細胞内での挙動を追跡できることを確認した。また、N 末端側に GFP を融合した TDP-43 タンパク質を安定的に高発現する SH-SY5Y 細胞株を、TALEN システムを利用したゲノム編集技術により作成した。
- (3) (1) で形成した TDP-43 タンパク質凝集体を蛍光色素によって標識し、(2) で作成した GFP-TDP-43 ノックイン細胞株および GFP-TDP-43 高発現株に導入し、細胞内の GFP-TDP-43 の挙動をタイムラプス顕微鏡を利用して継時的に解析したところ、導入した TDP-43 凝集体がシードとなり、細胞で発現している核内の TDP-43 タンパク質が細胞質へと移行し、凝集体を形成する過程を経時的に観察することができた。免疫蛍光観察およびウエスタンブロッティングにより解析したところ、この時、蓄積した TDP-43 は ALS 患者脳と同様に異常リン酸化されていることが明らかになった。また、ゲノム編集をしていない SH-SY5Y 細胞株に野生型 TDP-43 を発現するプラスミドを導入し、(1)で形成した TDP-43 タンパク質凝集体を導入したところ、不溶性 TDP-43 の蓄積が誘導されることが明らかとなった。また、この時蓄積した TDP-43 も異常リン酸化が起

きていることが明らかになった。この時、構造の異なる TDP-43 凝集体は異なる程度の不溶性 TDP-43 の蓄積を誘導することも明らかとなった。これらのことから、大腸菌から精製した TDP-43 タンパク質がシードとなり細胞内に不溶性 TDP-43 の蓄積を誘導すること、また、その時の TDP-43 が異常リン酸化されていることが明らかとなった。以上の結果から、TDP-43 が凝集体を形成する機序は以下のように考察される。何らかの理由で細胞内に TDP-43 の凝集体を形成した異常細胞から細胞外へと TDP-43 の凝集体が放出される。周辺の細胞が TDP-43 の凝集体を細胞内へと取り込む。取り込まれた TDP-43 が細胞質においてシードとなり、核内にあった正常な TDP-43 が細胞質に存在するシードへ取り込まれる。取り込まれた TDP-43 が細胞質において凝集体を形成し、異常リン酸化がされる。

本研究により試験管内で合成した TDP-43 タンパク質の凝集体によりヒト神経線維芽細胞に異常 TDP-43 凝集体の蓄積を誘導することができ、その凝集過程を詳細に観察することができた。これらの結果は、TDP-43 の異常凝集を伴う神経変性疾患の細胞モデルの確立へとつながり、学術的かつ社会的に意義が高いものであると考えられる。今後、マウスなどの動物モデルに応用することにより、有効な動物モデルの確立や、治療薬の開発への応用も期待できると考えられる。

5 . 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 9 件)

Terada M, Suzuki G, Nonaka T, Kametani F, Tamaoka A, Hasegawa M.
The effect of truncation on prion-like properties of α -synuclein.
J Biol Chem. 査読有 293:13910-13920. (2018) doi: 10.1074/jbc.RA118.001862.

Tanaka Y, Suzuki G, Matsuwaki T, Hosokawa M, Serrano G, Beach TG, Yamanouchi K, Hasegawa M, Nishihara M. Progranulin regulates lysosomal function and biogenesis through acidification of lysosomes. Hum Mol Genet. 査読有 26(5):969-988. (2017) doi: 10.1093/hmg/ddx011.

Hasegawa M, Suzuki G Following the fate of endocytosed fibrils.
J Biol Chem. 査読有 292:13498-13499. (2017) doi: 10.1074/jbc.H117.780296.

Tarutani A, Suzuki G, Shimozawa A, Nonaka T, Akiyama H, Hisanaga S, Hasegawa M.
The Effect of Fragmented Pathogenic α -Synuclein Seeds on Prion-like Propagation.
J Biol Chem. 査読有 291(36):18675-88 (2016) doi: 10.1074/jbc.M116.734707.

Nonaka T, Suzuki G, Tanaka Y, Kametani F, Hirai S, Okado H, Miyashita T, Saitoe M, Akiyama H, Masai H, Hasegawa M.
Phosphorylation of TAR DNA-binding Protein of 43 kDa (TDP-43) by Truncated Casein Kinase 1 Triggers Mislocalization and Accumulation of TDP-43. J Biol Chem. 査読有 291(11):5473-83. (2016) doi: 10.1074/jbc.M115.695379.

Tanaka Y, Nonaka T, Suzuki G, Kametani F, Hasegawa M.

Gain-of-function profilin 1 mutations linked to familial amyotrophic lateral sclerosis cause seed-dependent intracellular TDP-43 aggregation. Hum Mol Genet. 査読有 25(7):1420-33. (2016) doi: 10.1093/hmg/ddw024.

Shimonaka S, Nonaka T, Suzuki G, Hisanaga S, Hasegawa M. Templated Aggregation of TAR DNA-binding Protein of 43 kDa (TDP-43) by Seeding with TDP-43 Peptide Fibrils. J Biol Chem. 査読有 291(17):8896-907. (2016) doi: 10.1074/jbc.M115.713552.

Davidson Y, Robinson AC, Liu X, Wu D, Troakes C, Rollinson S, Masuda-Suzukake M, Suzuki G, Nonaka T, Shi J, Tian J, Hamdalla H, Ealing J, Richardson A, Jones M, Pickering-Brown S, Snowden JS, Hasegawa M, Mann D. Neurodegeneration in Frontotemporal Lobar Degeneration and Motor Neurone Disease associated with expansions in C9orf72 is linked to TDP-43 pathology and not associated with aggregated forms of dipeptide repeat proteins. Neuropathol Appl Neurobiol. 査読有 42(3):242-54 (2016) doi: 10.1111/nan.12292.

Suzuki G, Hasegawa M. The proceeding of drug development based on the propagation of tau protein. Nihon Rinsho. 査読有 74(3):432-7. (2016) <https://mol.medicalonline.jp/archive/search?jo=ag6niria&ye=2016&vo=74&issue=3>

〔学会発表〕(計2件)

Genjiro Suzuki, Masato Hasegawa Different properties of α -synuclein conformational strains the 14th International Conference on Alzheimer's and Parkinson's Diseases 2019年

Genjiro Suzuki, Masato Hasegawa Different properties of α -synuclein conformational strains 日本神経科学大会シンポジウム 2018年

〔図書〕(計1件)

鈴木元治郎, 田中元雅 プリオン様のタンパク質凝集体による抗ウイルス機能 感染・炎症・免疫 46: 82-83 (2016)

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.igakuken.or.jp/project/detail/dementia.html>

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。