

令和 2 年 7 月 3 日現在

機関番号：13101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K09749

研究課題名(和文)ジペプチドリピート蛋白による核内小体の異常に着目した運動神経細胞死の解明

研究課題名(英文) Analysis of motor neuron death focusing on nuclear body abnormality by dipeptide repeat protein

研究代表者

横関 明男 (Yokoseki, Akio)

新潟大学・医歯学総合研究科・特任准教授

研究者番号：90515719

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：筋萎縮性側索硬化症(ALS)の病態解明のため、今回は、家族性ALSの中で最も頻度の高い第9染色体上のC9orf72遺伝子内のGGGGCC配列の異常伸長と核内小体の異常との関連を研究した。GGGGCC配列の異常伸長から転写されるジペプチドリピート蛋白のうち核内に局在を示すglycine-arginine(GR)を用いて実験を行った。Cajal小体の構成蛋白であるCoiled-Body Phosphoprotein 1 (NOLC1)の蛋白量の低下を認めた。またGR異常伸長発現細胞では、NOLC1が核小体でやや大きめの凝集を認めた。GRの異常伸長は、核内小体の機能異常を誘発する可能性がある。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ALSは、致死性で治療法がない神経変性疾患であり、いまだに病態についても不明な点が多く、病態解明は極めて重要な医学領域の課題である。今回申請者が解明したGGGGCC配列の異常伸長により転写されるdipeptide repeat proteinによる細胞障害のメカニズムに、核内小体であるCajal小体の機能異常の関与が示された点は、これまで十分に研究されてこなかった知見であり、注目すべき成果であるといえる。また核内小体の機能異常の知見は、ALSだけでなく他の神経変性疾患の解明や神経細胞の正常機能の解明にも応用できる可能性があり、重要な研究結果である。

研究成果の概要(英文)：Amyotrophic lateral sclerosis (ALS) is a fatal neurodegenerative motor neuron disease characterized by systemic muscle atrophy and weakness. The cause of motor neuron death in ALS patients has been unclear. Approximately 10% of ALS patients is familial. The abnormal extension of the GGGGCC sequence in the C9orf72 gene on chromosome9 is the most common cause of familial ALS. To elucidate the pathophysiology of ALS, I studied the relationship between abnormal extension of the GGGGCC sequence and Cajal bodies, which is important intranuclear bodies. We used dipeptide repeat protein, glycine-arginine (GR), which was localized in the nucleus. The protein level of Coiled-Body Phosphoprotein 1 (NOLC1), which is a constituent protein of Cajal bodies, was decreased. In the cells with abnormal GR extension, NOLC1 was found to aggregate slightly in the nucleolus. Abnormal extension of GR may induce dysfunction of Cajal bodies.

研究分野：神経内科学

キーワード：ALS Cajal小体 GGGGCC TDP-43 ジペプチドリピート蛋白

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

筋萎縮性側索硬化症(amyotrophic lateral sclerosis, ALS)は、運動神経の変性により全身の筋萎縮、筋力低下を来し、進行期には呼吸不全を起こす致死性の神経変性疾患である。未だ有効な治療法が確立されておらず、病因究明、治療方法の開発は重要な課題である。ALSの病理学的特徴は、残存する運動神経の細胞質内にエオジン好性のプニナ正体や、ユビキチン陽性の封入体を認めることが特徴である。このユビキチン陽性封入体の構成蛋白のひとつが、TAR DNA binding protein of 43 kDa(TDP-43)であることが、2006年に報告された(Arai *et al.*, 2006; Neumann *et al.*, 2006)。また、TDP-43陽性封入体を形成した細胞では、正常では核内に局在するTDP-43が消失することも報告された。さらに、2008年以降、申請者のグループを始め、各国からTDP-43をコードする*TARDBP*遺伝子異常を伴うALS症例が相次いで報告された(Yokoseki *et al.*, 2008)。これらの発見によりALS発症にTDP-43が大きく関与していることが示唆され、TDP-43の生理機能や、ALSにおけるTDP-43の機能異常の視点からALS研究が進められている。

核内に局在する正常のTDP-43の機能は、mRNAのスプライシングへの関与(Ayala *et al.*, 2006)、各種核内小体(PML小体、GEM小体、Cajal小体)との関与(Wang *et al.*, 2002)が報告されている。申請者は、TDP-43とALS発症メカニズムについては、TDP-43の機能喪失の視点で研究を進めている。特に、TDP-43の機能喪失が、TDP-43と関連する核内小体の機能異常を引き起こす可能性について、解明を行っている。孤発性ALSおよび家族性ALS(*TARDBP* p.Gln343Arg)剖検脊髄前角細胞では、正常脊髄と比較してCajal小体数が減少していることを発見した(若手研究(B)主任研究者 横関明男)。その後の解析では、ALS脊髄前角細胞内のCajal小体の容積も減少していることを見いだしている。さらに、孤発性ALSのCajal小体の容積を、Cajal小体内のTDP-43の有無と比較すると、TDP-43を含有しないCajal小体は、TDP-43を有するものと比較して容積が減少していることも明らかにしている。つまり、TDP-43が核内から消失することは、主要な核内小体のひとつであるCajal小体の機能異常を起こしている可能性を示している。

ALS研究において、家族性ALSの原因遺伝子の機能解析も様々な視点で行われている。家族性ALSのうち、最も頻度が高い遺伝子異常は、第9染色体上のC9orf72遺伝子内イントロンのGGGGCC配列の異常伸長であり、Frontotemporal dementia and/or amyotrophic lateral sclerosis 1 (FTDALS1)と分類されている(DeJesus-Hernandez *et al.*, 2011; Renton *et al.*, 2011)。申請者のグループも同遺伝子異常を有する家族性ALSの1家系を報告した(Konno *et al.*, 2013)。この家族性ALSは、孤発性ALSと同様のTDP-43病理所見を示すことから、本遺伝子によるALS病態は、孤発性ALSの病態解明にも繋がる可能性が高い。このGGGGCC配列の異常伸長は、repeat-associated non-ATG dependent translationにより、glycine-proline(GP)またはglycine-alanine(GA)、またはglycine-arginine(GR)のdipeptideの反復配列に翻訳される。FTDALS1病理検体でもdipeptide repeat protein(DRP)の沈着が確認されている(Mori *et al.*, 2013)。さらにDRPには、核蛋白など多くの蛋白が吸着することが報告されている(Mori *et al.*, 2013)。興味深い事にDRPは核小体の構成蛋白質であるfibrillarinと結合し、細胞死を引き起こすことが報告された(Kwon *et al.*, 2014)。しかし、他の核内小体との関連は明らかではない。近年これらのALS関連蛋白や、核内小体構成蛋白は液相粒状構造という共通した特性を持つといわれている。この特性が、膜を有さない蛋白集合体の形成に寄与している。この事から、DRPが核小体のみならずCajal小体等、他の核内小体にも影響を及ぼす可能性を考えた。

2. 研究の目的

GGGGCC 配列の異常伸長による細胞毒性のメカニズムが, Cajal 小体の機能障害を起こしているか否かを明らかにする

3. 研究の方法

(1) GGGGCC 配列ベクターの発現

GGGCC 配列ベクターは, 5'に BamHI, 3'に XhoI の制限酵素サイトを入れ, GENEWIZ 社に人工遺伝子の作成を依頼した. 同遺伝子を, pEGFP-C3 vector(Clontech)に挿入し, lipofectamine3000(Thermofisher scientific)を用いて HEK293 細胞に transfection を行った. 24 時間後に細胞を固定し, 蛍光顕微鏡で観察した.

(2) DRP 安定発現細胞の作成

人工遺伝子で作成した GGGGCC 配列を pcDNA™5/FRT/TO vector(Thermofisher scientific)に挿入した. このベクターと Flp-Recombinase Expression Vector である pOG44(Thermofisher scientific)とともに, Flp-In™-293 Cell Line に co-transfection した. Hygromycin B(Thermofisher scientific)で 200ug/mL で選択し, DRP 安定発現細胞を作成した.

(3) DRP 安定発現細胞での TDP-43 発現量, 機能解析

DRP 安定発現細胞は, 1 µg/ml doxycycline で DRP を誘導し, 48 時間後に細胞を回収し RIPA buffer(25 mM Tris-HCl, pH 7.6, 150 mM NaCl, 1% NP-40, 1% sodium deoxycholate and 0.1% sodium dodecyl sulphate)で蛋白を回収した. また一部は 4%パラホルムアルデヒドで固定し, 蛍光顕微鏡で観察した. ウェスタンブロットでは, 抗 TDP-43 抗体(rabbit polyclonal, proteintech)を使用した. TDP-43 発現の autoregulation の機能については, 申請者の施設が報告した研究方法で解析した(Koyama *et al.*, 2016).

(4) DRP 発現細胞での Cajal 小体関連蛋白の発現

Cajal 小体関連蛋白である, coilin(COIL), Nucleolar And Coiled-Body Phosphoprotein 1 (NOLC1), WD Repeat Containing Antisense To TP53 (WRAP53)の発現量をウェスタンブロットで, 形態は免疫染色で解析した. 使用した抗体は, anti-Coilin 抗体(Pdelta, mouse monoclonal, abcam), anti-WRAP53 抗体 (rabbit polyclonal, proteintech), Anti-NOLC1 抗体 (EPR14896, rabbit monoclonal, abcam)をそれぞれ使用した. また mRNA の定量は Integrated DNA Technologies 社 (IDT)の premade の primer を使用した. COIL は, Assay Name Hs.PT.58.14977139, NOLC1 は Assay Name HS.PT.58.4232463, WRAP53 は Assay Name HS.PT.58.38417550 を使用した. リファレンスは, <https://heartcure.com.au/wp-login.php> で検索し, Human Housekeeping Gene Primer Set を用いて 15 種類の遺伝子を検討し, 最終的に RPLP2, RPS18 を使用した.

4. 研究成果

(1) DRP の一過性発現

HEK293 細胞に, DRP30 リピートの GP, GA, GR をそれぞれ一過性に発現させた. GA と GP は, GFP 単独で発現させたように, 細胞全体に diffuse に局在した. 一方, GR は核内に局在した. このことから, 3種の DRPのうち GRが病態に關与する蛋白の可能性が高いと判断した. 次に GR50, 100 リピートを HEK293 細胞に一過性発現させると, 50 リピートでは核内に局在するが一部は核内で凝集傾向を認め, 100 リピートでは 30 リピートで認めた核内の局在は完全に消失し, 細胞質のみの局在となった. GR はリピート数に応じて, DRP の局在が変化することが明らかとなった.

(2) GR 安定発現細胞での解析

HEK293 細胞の DPR の一過性発現の系では, 細胞ごとに発現量に差があり, 今後の研究結果の再現性が不安定となる可能性があったため, Flip-In system を用いて, 安定発現細胞を作成することとし, 一過性発現の結果から GR が核内に局在することから GR の 10 リピートを対象コントロール, 100 リピートを disease model としてそれぞれの安定発現細胞を作成した. GR10 リピートの細胞では, GR 蛋白は核内に局在し, 一部は核内で凝集体を形成した. GR100 リピートを安定発現させると, 一過性発現時と同様に核内の発現は消失し, 細胞質にびまん性に発現した(図 1).

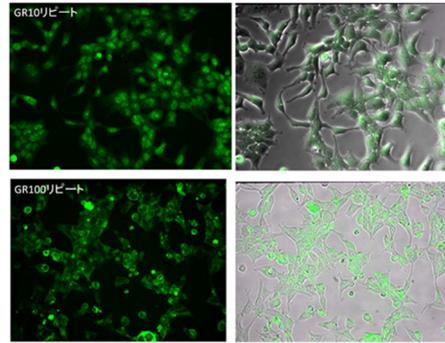


図 1 GR10 リピートと 100 リピートの細胞内局在

次に GR10 リピート, 100 リピートに GR 蛋白による TDP-43 への影響を確認した. 最初に TDP-43 の発現量をウエスタンブロットで確認したが, TDP-43 の発現量は, 10 リピート, 100 リピートで変化は認められなかった. TDP-43 は, 申請者らのグループにより, TDP-43 をコードする *TARDBP* 遺伝子の mRNA のスプライシングを行う autoregulation により発現が調節されていることを報告している(Koyama *et al.*, 2016). そのため, GR10 リピート, 100 リピートにより TDP-43 の autoregulation に変化があるか否かを確認した. GR100 リピートを発現させると, 特異的なスプライシングの増加により nonsense mediated mRNA decay がおこり, *TARDBP* の mRNA が低下することが明らかとなった(図 2).

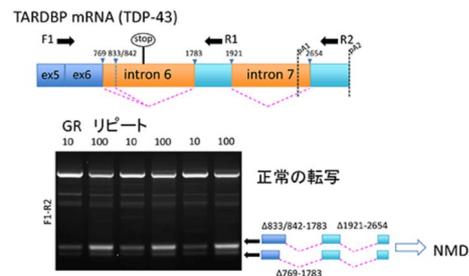


図 2 GR10 リピートと 100 リピートと TARDBP 遺伝子の autoregulation

(3) GR 安定発現細胞での Cajal 小体関連蛋白の解析

GR 蛋白による Cajal 小体への影響を確認するため, Cajal 小体の足場蛋白である coilin, および Cajal 小体の重要構成蛋白である Nucleolar And Coiled-Body Phosphoprotein 1 (NOLC1), WD Repeat Containing Antisense To TP53 (WRAP53) の発現量の変化を, 定量 PCR で比較した. すると, coilin と NOCL1 では 10 リピートと比較していずれも約 1.5 発現量の増加を認めた. WRAP53 は増加傾向を認めたが, 有意な差はなかった(図 3). 次に coilin, NOCL1, WRAP53 の形態変化を, 蛍光顕微鏡で確認した. NOLC1 では, 100 リピートの GR を発現させると 10 リピートと比較して, 核小体内の NOLC1 の凝集体が大きくなる傾向を認めた. 一方, WRAP53 には 100 リピートと 10 リピートで違いはなかった. 最後に, Cajal 小体関連蛋白の蛋白量

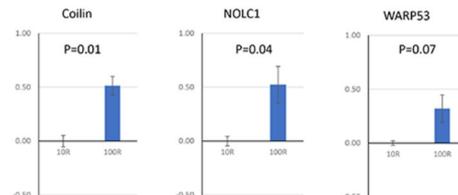


図 3 GR10 リピートと 100 リピートと Cajal 小体関連蛋白の mRNA 発現量

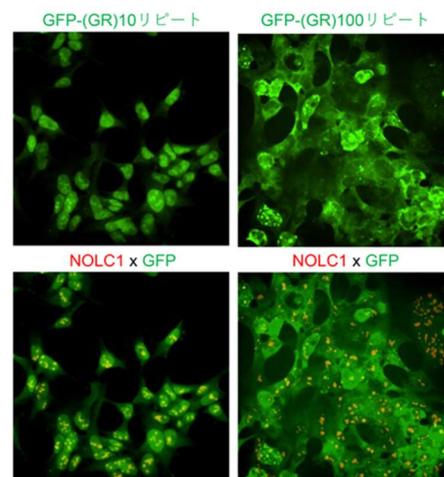


図 4 GR10or100 リピート NOLC1 の局在の変化

の変化を確認するために、ウエスタンブロットを行った。GR100 リピートを発現させると定量 PCR の結果と異なり、NOLC1 では、100 リピートで有意に蛋白量の低下を認めた。一方 WRAP53 は、GR100 リピートと 100 リピートで蛋白量に変化を認めなかった。

<参考文献>

Arai T, Hasegawa M, Akiyama H, Ikeda K, Nonaka T, Mori H, *et al.* TDP-43 is a component of ubiquitin-positive tau-negative inclusions in frontotemporal lobar degeneration and amyotrophic lateral sclerosis. *Biochem Biophys Res Commun* 2006; 351(3): 602-11.

Ayala YM, Pagani F, Baralle FE. TDP43 depletion rescues aberrant CFTR exon 9 skipping. *FEBS Lett* 2006; 580(5): 1339-44.

DeJesus-Hernandez M, Mackenzie IR, Boeve BF, Boxer AL, Baker M, Rutherford NJ, *et al.* Expanded GGGGCC hexanucleotide repeat in noncoding region of C9ORF72 causes chromosome 9p-linked FTD and ALS. *Neuron* 2011; 72(2): 245-56.

Konno T, Shiga A, Tsujino A, Sugai A, Kato T, Kanai K, *et al.* Japanese amyotrophic lateral sclerosis patients with GGGGCC hexanucleotide repeat expansion in C9ORF72. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 2013; 84(4): 398-401.

Koyama A, Sugai A, Kato T, Ishihara T, Shiga A, Toyoshima Y, *et al.* Increased cytoplasmic TARDBP mRNA in affected spinal motor neurons in ALS caused by abnormal autoregulation of TDP-43. *Nucleic Acids Res* 2016; 44(12): 5820-36.

Kwon I, Xiang S, Kato M, Wu L, Theodoropoulos P, Wang T, *et al.* Poly-dipeptides encoded by the C9orf72 repeats bind nucleoli, impede RNA biogenesis, and kill cells. *Science* 2014; 345(6201): 1139-45.

Mori K, Weng SM, Arzberger T, May S, Rentzsch K, Kremmer E, *et al.* The C9orf72 GGGGCC repeat is translated into aggregating dipeptide-repeat proteins in FTL/ALS. *Science* 2013; 339(6125): 1335-8.

Neumann M, Sampathu DM, Kwong LK, Truax AC, Micsenyi MC, Chou TT, *et al.* Ubiquitinated TDP-43 in frontotemporal lobar degeneration and amyotrophic lateral sclerosis. *Science* 2006; 314(5796): 130-3.

Renton AE, Majounie E, Waite A, Simón-Sánchez J, Rollinson S, Gibbs JR, *et al.* A hexanucleotide repeat expansion in C9ORF72 is the cause of chromosome 9p21-linked ALS-FTD. *Neuron* 2011; 72(2): 257-68.

Wang IF, Reddy NM, Shen CK. Higher order arrangement of the eukaryotic nuclear bodies. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002; 99(21): 13583-8.

Yokoseki A, Shiga A, Tan CF, Tagawa A, Kaneko H, Koyama A, *et al.* TDP-43 mutation in familial amyotrophic lateral sclerosis. *Ann Neurol* 2008; 63(4): 538-42.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 2件）

1. 発表者名 Yuka Koike, Akihiro Sugai, Akio Yokoseki, Osamu Onodera
2. 発表標題 The alternative splicing of TARDBP mRNA is affected by the methylation status.
3. 学会等名 Keystone symposia (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Yuka Koike, Akihiro Sugai, Akio Yokoseki, Osamu Onodera
2. 発表標題 The alternative splicing of TARDBP mRNA is affected by the methylation status.
3. 学会等名 International symposium on ALS/MND (国際学会)
4. 発表年 2017年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----