

令和 5 年 6 月 5 日現在

機関番号：32607

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2022

課題番号：19K07848

研究課題名(和文) TDP-43の核移行を制御する一次構造変化と翻訳後修飾の探索

研究課題名(英文) Exploring primary amino acid structures and post-translational modifications that regulate nuclear import of TDP-43

研究代表者

佐藤 俊哉 (Sato, Toshiya)

北里大学・医学部・教授

研究者番号：90359703

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：TDP-43 C末に存在する天然変性領域は、筋萎縮性側索硬化症(ALS)変異が集中する領域として重要である。我々は、内在性TDP-43 C末領域の部分欠損マウス12系統を樹立し、C末を構成する4領域(GaroS1、HP、Q/N、GaroS2)の機能的な相違を検討した。その結果、TDP-43の基本的機能(蛋白の安定性・マウスの生存性)には、GaroS1からQ/Nまでが必須で、Q/Nの有無が蛋白としての安定性を劇的に改善させた。一方、C末の前半部分(GaroS1-HP)欠損蛋白が細胞質のみに局在することから、この欠損領域が核移行を制御すると想定していたが、むしろ核内繫留に必要な領域と推察された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ALSは運動神経特異的な変性の特徴とする神経難病である。ALS病態に中心的な役割を持つ核蛋白がTDP-43であり、ALSの残存運動神経内では過剰なリン酸化を受けて凝集する。TDP-43は生体に必須の蛋白であるが、C末の天然変性領域に起因する凝集性のため、ALS発症にも関与するという二面性をもつ。つまり病的な凝集を防ぎながら、TDP-43の量および機能を適切にコントロールすることが、治療法開発に重要である。本研究は、TDP-43 C末を構成する4領域の機能的な相違をマウス個体で解明した初の試みであり、TDP-43の凝集性や機能を制御するための基礎的知見として、学術的および社会的にも意義がある。

研究成果の概要(英文)：The long-disordered C-terminal region (CTR) of TDP-43 is a mutational hotspot and plays an important role in the molecular pathogenesis of amyotrophic lateral sclerosis. To elucidate the physiological function of CTR, we generated 12 mouse lines with various CTR deletions by genome editing and analyzed the functional diversity of the four segments of CTR (GaroS1, HP, Q/N, GaroS2). We found that the GaroS1-HP-Q/N segment is thought to be necessary and sufficient for mouse development and the presence of the Q/N-rich segment greatly restored the protein stability of TDP-43. On the other hand, TDP-43 lacking the GaroS1-HP segment was exclusively detected in the cytoplasmic fraction. Initially, we speculated that CTR contributed to nuclear import, but this cytoplasmic mis-localization was suspected to be due to insufficient nuclear retention.

研究分野：実験動物学

キーワード：TDP-43 筋萎縮性側索硬化症 疾患モデル

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

(1) 筋萎縮性側索硬化症 (ALS) は、運動神経特異的な変性を特徴とする神経難病である。2006 年秋、孤発性 ALS に認められるユビキチン陽性封入体 (skein-like inclusion) の主要な構成蛋白として TAR DNA-binding protein 43 kDa (TDP-43) が発見された。その後、TDP-43 は ALS10 の原因遺伝子になることも報告され、ALS の発症機序において一次的な役割を担うことが明らかとなった。

(2) ALS の最大の病理学的特徴は、TDP-43 の凝集体で、残存運動神経の細胞質に認められる。TDP-43 は核-細胞質間をシャトルする蛋白だが、本来の局在は核である。つまり細胞質の異常集積は、TDP-43 の核移行制御機構の解明が ALS 病態の真の理解に必要なことを意味する。TDP-43 は古典的核移行シグナル (NLS) を有し、インポーチン分子群の結合を介して核膜孔を通過する。しかし申請者は、NLS が存在するにも拘わらず核移行しない変異型 TDP-43 を発現するマウスを偶然発見した。この変異は ALS 変異が集中する TDP-43 C 末領域内に存在することから、C 末領域の生理的機能、特に TDP-43 の核移行制御機構に着目し、ゲノム編集技術を用いた遺伝子改変マウス作成とプロテオミクス技術を融合させた計画を立案した。

(3) TDP-43 C 末領域には、凝集性に関与するプリオン様ドメイン (PLD) が存在する。PLD は、それ自身では特定の構造を取らない天然変性領域であるが、一般的に天然変性蛋白は、細胞内ネットワークにおけるハブ蛋白として働き、翻訳後修飾により制御され、様々な立体構造をとる。TDP-43 も例外ではなく、凝集した TDP-43 において、多くの翻訳後修飾 (リン酸化、脱アミド、酸化) が認められる。しかし核移行制御等の生理的機能と明確に関連付けられた翻訳後修飾の報告がないことから、高感度質量分析技術を用いた翻訳後修飾の探索を一つのテーマとした。

(4) 研究開始直後の 2019 年 7 月、TDP-43 C 末領域の全欠損 (TDP- Δ C) マウスが報告された¹。TDP- Δ C は不安定な蛋白となって分解され、ホモマウスは胎生致死となる。この結果は、C 末領域が TDP-43 の核移行制御機構に加え、蛋白としての安定性にも関与することを意味する。C 末領域は、そのアミノ酸配列特性から 4 つの領域 (GaroS1、HP、Q/N、GaroS2) に分けられる。そこで各領域を欠損させたマウスを作成し、C 末領域の機能的多様性を明らかにする計画も加えた。

2. 研究の目的

本研究の目的は、TDP-43 C 末領域の生理的機能の解明を介して ALS 病態に迫ることである。生理的機能としては、TDP-43 の核移行制御機構に加え、蛋白としての安定性にも着目し、内在性 TDP-43 C 末領域を標的とした部分欠損マウスの特性を比較することにより、上記 4 領域の機能を明確にする。さらに高感度質量分析技術を用い、翻訳後修飾による制御機構を探索する。

3. 研究の方法

(1) TDP-43 C 末領域の部分欠損マウスの作成と解析

研究開始前に作成し、本研究の端緒となった遺伝子改変マウスは、第 1 世代のゲノム編集技術である Zinc-Finger Nuclease (ZFN) を用いたもので、TDP-43 C 末領域の中央部 (N345-Q346) を標的とした部分欠損マウスである。この結果を発展させるため、CRISPR/Cas9 を用い、C 末領域の欠損長が異なる新しいマウスを作成した。C 末を構成する 4 領域、GaroS1 (S273-S317)、HP (I318-L340)、Q/N (A341-A366)、GaroS2 (F367-M414) の領域間近傍を標的とし、CRISPR/Cas9 に必要な gRNA を 5 種類作成した。本研究では、Q/N-GaroS2 間 (Y374) を標的とした gRNA および Cas9 蛋白をエレクトロポレーション法にて受精卵へ導入し、これにより新たに樹立した系統を用いた。各マウス系統は、ホモマウスの生存性、TDP-43 の安定性と細胞内局在、TDP-43 mRNA 発現量を解析し、その特性を比較した。

(2) ヒト TDP-43 欠損コンストラクトを用いた解析

マウス個体から得られた結果を補完するため、EGFP 融合ヒト TDP-43 と HeLa 細胞を用いた解析を加えた。pEGFP-C3 ベクターのクローニングサイト (XhoI/PstI) に野生型 *TARDBP* cDNA をつないだクローンの提供を受け (新潟大学脳研究所・小野寺理教授)、これを PCR により改変してコンストラクトを作成し、HeLa 細胞への一過性発現後、ウェスタンブロットにて TDP-43 の細胞内局在を確認した。

(3) 高感度質量分析技術を用いた翻訳後修飾の探索

野生型マウスの大脳を用い、EzSubcell Extract (ATTO) により細胞質と核に分画後、ゲル内消化とナノ液体クロマトグラフィー・質量分析計 (Q-Exactive) により TDP-43 由来のペプチド断片を同定した。ゲル内消化以外に、TDP-43 特異抗体による免疫沈降法、天然変性蛋白を特異的に沈殿させる Biotinylated isoxazole (b-isox) 分画法を用いた濃縮もおこなった。

4. 研究成果

(1) TDP-43 が蛋白として安定に発現・機能するために必要な領域の決定

ZFN および CRISPR/Cas9 を用い、内在性 TDP-43 C 末領域の部分欠損マウス 12 系統を樹立し、各系統の特性を比較した。TDP-43 C 末領域の後半部分 (Q/N-GaroS2 の大部分) を欠損させると、Q/N-GaroS2 欠損蛋白は不安定となり、ホモマウスが胎生致死となることから、TDP-43 の機能も喪失したと考えられた。一方、GaroS2 のみを欠損させたマウスは正常に発育し、野生型と GaroS2 欠損蛋白の発現レベルに差がなかった。この結果から、TDP-43 の基本的機能 (蛋白の安定性・マウスの生存性) には、GaroS1 から Q/N 領域までが必須であり、Q/N の有無が蛋白としての安定性を劇的に改善させることが証明された (図 1)。これは GaroS2 領域が非必須領域であることを示す結果でもあるが、GaroS2 欠損マウスでは、TDP-43 mRNA 量が低下していることから、TDP-43 の生理的機能の一つである量の自己調節機構に変化があると考えられた。

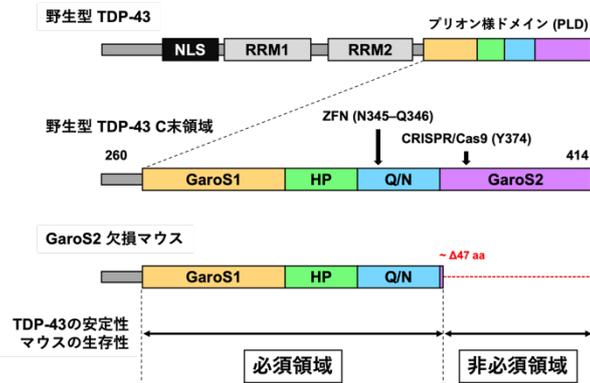


図 1 TDP-43 C 末領域の機能的多様性

(2) TDP-43 の細胞内局在を制御する領域の確認

TDP-43 C 末領域の前半部分 (GaroS1-HP の全領域) を欠損させると、GaroS1-HP 欠損蛋白は安定に発現するものの、生化学的解析では細胞質画分のみに集積し、TDP-43 の機能も喪失していた。この GaroS1-HP 欠損蛋白が、NLS が存在するにも拘わらず核移行しないと想定した TDP-43 である。この結果の再現性を確認するとともに、核移行制御の候補領域を狭めるため、欠損長が異なる 3 種のコストラクト (dGaroS1, d261CTR, dCTR) を作成し、HeLa 細胞に導入した。ウェスタンブロットでは、マウスの結果と同様に 3 種の変異型蛋白は細胞質画分に集積したが、生細胞では核内に存在した (図 2)。この結果は、細胞分画などの生化学的処理中に急速に細胞質に移行する可能性を示す。近年、TDP-43 が核内でも集積してアニソソーム等の膜のない構造体を形成すること²、さらに TDP-43 の核外移行が受動拡散によることが報告された^{3,4}。これらの報告を加味すると、TDP-43 C 末領域の欠損により核内での集積すなわち核内繫留が不良になるため、生化学的処理過程に伴い細胞質に移行する可能性があると考えた。以上の結果から、TDP-43 C 末領域は蛋白としての安定性に加え、核内繫留に必要な領域であると推察され、研究の方向性も核移行から核内繫留へと変更した。

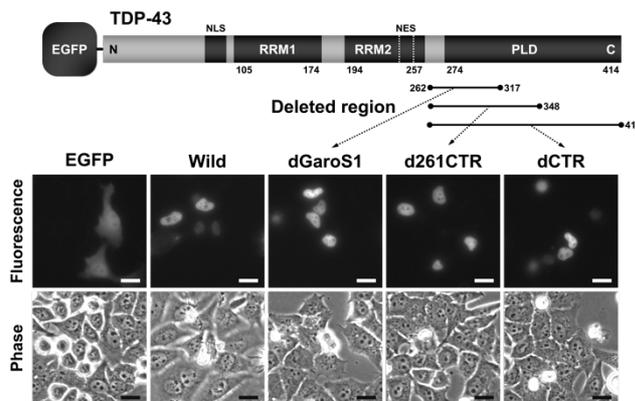


図 2 生細胞における TDP-43 の細胞内局在

(3) TDP-43 の翻訳後修飾の探索

野生型マウス大脳の細胞質および核分画を、10%ポリアクリルアミドゲルを用いて分離し、トリプシンを用いたゲル内消化と質量分析にてペプチド断片を同定したところ、TDP-43 のカバー率は 41%と低かった。TDP-43 特異抗体による免疫沈降法を用いてもカバー率は 42%に止まり、両者を合わせても 44%であった。天然変性蛋白を特異的に沈殿させる b-isox 分画法を用いて TDP-43 の濃縮を試みたが、回収率は~1%程度、濃縮率は~10 倍程度と充分ではなかった。同定された翻訳後修飾は、脱アミドと酸化が中心で、蛋白老化という観点からは興味を持っているが、細胞内局在と一致する翻訳後修飾は同定できなかった。さらにカバー率の向上を目指してキモトリプシンなどの蛋白分解酵素も試みたが、上記(2)の結果から、翻訳後修飾が核移行を制御するという仮説の誤りに気付く、研究の方向性を変更した。

<引用文献>

- ① Nishino K. et al. *Acta Neuropathol Commun* 2019 7: 118.
- ② Yu H. et al. *Science* 2021 371: 4309.
- ③ Pinarbasi E. S. et al. *Sci Rep* 2018 8: 7083.
- ④ Ederle H. et al. *Sci Rep* 2018 8: 7084.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 5件）

1. 著者名 Nakamura Masaaki, Mizutani Kazuhiro, Kato Rika, Konno Ryo, Itakura Makoto, Kodera Yoshio, Nishiyama Kazutoshi, Sato Toshiya	4. 巻 51
2. 論文標題 Quantitative proteomic analysis and single-protein-derived tryptic peptide profiling indicate qualitative alterations of annexin A6 in the brain of wobbler mice	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 The Kitasato Medical Journal	6. 最初と最後の頁 76～83
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Sato Toshiya, Oda Kanako, Sakai Seiko, Kato Rika, Yamamori Saori, Itakura Makoto, Kodera Yoshio, Nishizawa Masatoyo, Sasaoka Toshikuni, Onodera Osamu, Yokoyama Minesuke	4. 巻 12
2. 論文標題 Importance of the Q/N-rich segment for protein stability of endogenous mouse TDP-43	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 14923
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-022-19153-0	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 佐藤俊哉
2. 発表標題 ALS原因遺伝子産物TDP-43の解析
3. 学会等名 2021年度脳研究所共同利用共同研究（笹岡班）合同セミナー
4. 発表年 2021年～2022年

1. 発表者名 佐藤俊哉
2. 発表標題 筋萎縮性側索硬化症モデルの作成と解析
3. 学会等名 2020年度脳研究所共同利用共同研究（笹岡班）合同セミナー
4. 発表年 2020年～2021年

1. 発表者名 佐藤俊哉
2. 発表標題 TDP-43細胞内局在スイッチ制御による筋萎縮性側索硬化症モデルの作成
3. 学会等名 2019年度脳研究所共同利用共同研究（笹岡班）合同セミナー
4. 発表年 2019年～2020年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

新潟大学脳研究所ホームページ（研究成果・実績） https://www.bri.niigata-u.ac.jp/research/result/001807.html
--

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
研究分担者	小寺 義男 (Kodera Yoshio) (60265733)	北里大学・理学部・教授 (32607)	
研究分担者	板倉 誠 (Itakura Makoto) (30398581)	北里大学・医学部・准教授 (32607)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------