

令和 5 年 6 月 1 日現在

機関番号：13901

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2019～2022

課題番号：19K22275

研究課題名（和文）神経変性過程の抑制を標的としたエンドソーム経路の機能改変

研究課題名（英文）Functional modification of the endosomal pathway to inhibit neurodegenerative processes.

研究代表者

柴田 秀樹（SHIBATA, Hideki）

名古屋大学・生命農学研究科・准教授

研究者番号：30314470

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 4,800,000円

研究成果の概要（和文）：神経変性疾患の特徴的病変として、筋萎縮性側索硬化症（ALS）におけるTDP-43に代表される、異常なアミロイド線維様凝集体が形成される。凝集体は、異常蛋白質がシードとなり、細胞質の正常な蛋白質を巻き込んで形成される。本研究では、ALSに関連するアネキシンA11とTDP-43の異常蛋白質が細胞質で凝集体を形成する過程をモニターできる細胞株を樹立した。そして、これらの異常蛋白質がリソソーム損傷を引き起こして凝集体を形成することを見出した。一方で、これらの異常蛋白質は、凝集体を形成していない細胞では、プロテアソームによって、正常蛋白質と比較して迅速に分解されていることを示した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

神経変性過程で神経細胞内に形成される凝集体は、そのシードとなる異常蛋白質の蓄積量が凝集体の増幅、細胞間伝搬に密接に関連していると考えられる。本研究で樹立した異常蛋白質の発現細胞は、凝集体の形成過程と細胞間伝搬をモニターできることから、神経変性の進行を阻害する薬剤の開発などへの応用が期待される。また、ALS発症に関連するアネキシンA11変異体が、TDP-43の異常蛋白質と同様の分解系と凝集体形成機構を持ち合わせていることが判明した。これらの異常蛋白質を積極的に分解する分子機構を解明し、その機能を維持することで、神経変性疾患の根本治療法の開発につながる可能性がある。

研究成果の概要（英文）：A characteristic lesion of neurodegenerative diseases is the formation of amyloid fiber-like aggregates, exemplified by TDP-43 in amyotrophic lateral sclerosis (ALS). Aggregates are formed when pathological proteins are seeded and sequester normal cytoplasmic proteins. In this study, cell lines were established that can be monitored the formation of aggregates in the cytoplasm by the ALS-associated mutants of annexin A11 and TDP-43 with mutations in its nuclear localization signal and RNA-binding motifs. Using these cells, the mutant proteins were found to form aggregates triggered by lysosomal damage. On the other hand, these mutants were shown to be rapidly degraded by proteasomes in cells where they did not form aggregates.

研究分野：応用分子細胞生物学

キーワード：エンドソーム リソソーム 神経変性疾患 アネキシン

## 1. 研究開始当初の背景

筋萎縮性側索硬化症（amyotrophic lateral sclerosis, ALS）やパーキンソン病などの神経変性疾患の患者数は人口高齢化に伴い増加している。神経変性疾患の特徴的病態であるアミロイド線維様凝集体（凝集体）は、異常蛋白質がシーズとなり細胞質で正常蛋白質を巻き込んで増幅する。凝集体の蓄積により神経細胞死が誘導される一方で、凝集体は細胞間を伝搬することが知られている。しかし、異常凝集体の形成と細胞間伝搬の分子機構の詳細は不明である。TAR DNA-binding protein 43（TDP-43）は、ALS 患者の神経細胞の凝集体の構成成分として同定された RNA 結合蛋白質であり<sup>(1, 2)</sup>、その遺伝子 *TARDBP* の複数の変異が ALS 発症に関連している。研究代表者らは、Ca<sup>2+</sup>依存性リン脂質結合蛋白質アネキシン A11 の遺伝子 *ANXA11* に ALS の発症に関連するミスセンス変異を同定し報告した<sup>(3)</sup>。アネキシン A11 とその相互作用蛋白質である apoptosis-linked gene 2（ALG-2）が限界膜に損傷を受けたエンドソーム系オルガネラに動員されること、また神経変性疾患に関わる遺伝子変異にはエンドソーム経路を制御する蛋白質をコードする遺伝子が複数含まれていることから、凝集体の形成と伝搬には、エンドソーム系オルガネラが何らかの役割を担っていると考えられる。

## 2. 研究の目的

本研究では、神経変性過程で形成されるアミロイド線維様凝集体の細胞内蓄積と細胞間伝搬におけるエンドソーム経路の役割を解明することを目的とした。凝集体の形成過程をモニターできる細胞株を樹立することで、エンドソーム経路の機能変化が神経変性過程の進行抑制に寄与する可能性を示すことを目指した。

## 3. 研究の方法

### (1) ALS 関連アネキシン A11 変異体の発現誘導細胞の樹立と解析

ヒト神経芽細胞腫 SH-SY5Y を用いて、Tet-On システムにより ALS 関連アネキシン A11 の変異体および野生型アネキシン A11 の GFP 融合蛋白質を、テトラサイクリン誘導体であるドキシサイクリン（doxycycline, DOX）の添加により発現誘導可能な細胞株を樹立した。様々な DOX 濃度で GFP 融合蛋白質を発現させ、その細胞溶解液を SDS-PAGE で展開し、抗 GFP 抗体および抗アネキシン A11 抗体を用いたウエスタンブロット解析により、その発現量を検討した。GFP 融合蛋白質の分解は、DOX による発現誘導後に、DOX を含まない培地に交換して細胞を培養し、経時的に回収した細胞の細胞溶解液を調製し解析した。また、GFP 融合蛋白質の分布画像は共焦点レーザー顕微鏡によって取得した。抗 LAMP1 抗体および抗ユビキチン鎖抗体（マウスモノクローナル抗体クローン FK2）を用いた間接蛍光抗体法により、GFP 融合蛋白質のドット状の分布との共局在を検討した。

### (2) GFP を融合した TDP-43 と HiBiT タグを付加した TDP-43 を恒常発現する細胞の樹立と解析

ヒト胎児腎由来細胞株 HEK293 を用いて、GFP を融合した野生型 TDP-43 および核移行シグナルと RNA 認識モチーフに変異をもつ TDP-43（TDP-43<sup>mNLS/mRRM</sup>）を恒常発現する細胞株を樹立した。なお、これらの蛋白質は、赤色蛍光蛋白質 FusionRed と 2A ペプチドの C 末端にインフレームで発現させた。また、深海エビ由来発光酵素 Nano Luciferase (NLuc)

の 11 アミノ酸からなる小断片 HiBiT と TDP-43 及びその変異体を恒常発現する細胞株を樹立した。HiBiT タグが付加した蛋白質は、ホタル由来発光酵素 Firefly Luciferase (FLuc) と 2A ペプチドの C 末端にインフレームで発現させた。それぞれの蛋白質の発現量は、ウエスタンブロット解析により検討した。また、HiBiT タグ付き蛋白質の発現量は、細胞溶解液あるいは細胞培養液に、NLuc の大断片 LgBiT の組換え体蛋白質を添加し、発光量を定量し比較した。その際に、FLuc の発光量を内部標準として用いた。GFP 融合蛋白質の分布画像は共焦点レーザー顕微鏡を用いて取得した。

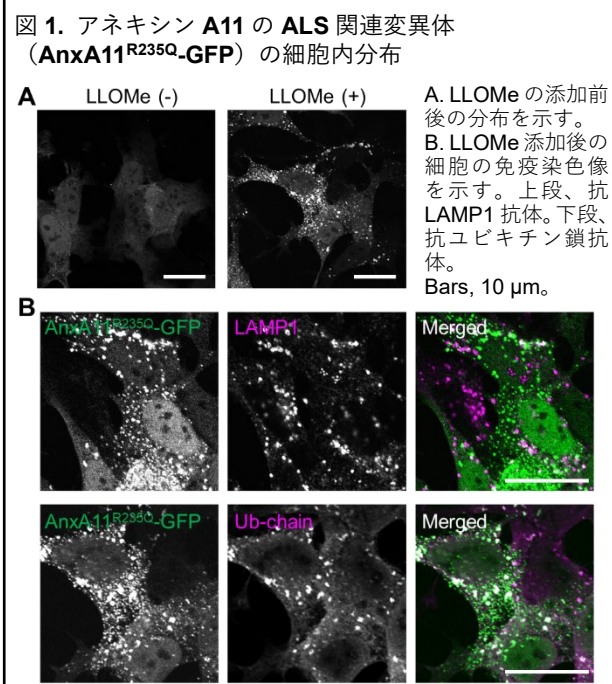
### (3) 後期エンドソーム/リソソーム局在蛋白質 CDIP1 の結合蛋白質と細胞死の解析

HEK293 由来 ALG-2 ノックアウト細胞<sup>(4)</sup> に GFP を融合させた CDIP1、Myc タグを付加した ESCRT-I 構成蛋白質、および ALG-2 を発現させ、抗 GFP 抗体を用いて免疫沈降し、CDIP1 と ESCRT-I の結合とその ALG-2 要求性を解析した。また、発現細胞の細胞死を細胞外に放出された Lactate Dehydrogenase (LDH) の活性を測定し、評価した。さらに、Tet-On システムを用いて CDIP1 を発現誘導可能なヒト乳がん細胞株 MCF-7 を作出した。CDIP1 の発現誘導細胞の細胞溶解液から抗 CDIP1 抗体によって共免疫沈降される蛋白質を、免疫沈降産物を質量分析で解析し同定した。

## 4. 研究成果

### (1) ALS 関連アネキシン A11 変異体の異常凝集体形成機構の解析

アネキシン A11 の ALS 関連変異体 (40 番目のアミノ酸残基 Asp を Gly に置換した変異体、D40G 変異体と R235Q 変異体) および野生型アネキシン A11 の GFP 融合蛋白質を DOX の添加により発現誘導可能な SH-SY5Y 細胞を樹立した。DOX 濃度を調整し、内在性のアネキシン A11 と同程度の発現量の細胞を蛍光観察したところ、変異体アネキシン A11 は細胞質と核に散在し、野生型の分布と大きな違いは観察されなかった (図 1)。これらの細胞に、リソソームの損傷誘発試薬 L-leucyl-leucine methyl ester (LLOme) を添加し、アネキシン A11 の GFP 融合蛋白質の分布を経時的に観察した。その結果、R235Q 変異体の蛍光シグナルが、細胞質に複数のドットとして観察された。間接蛍光抗体法により解析した結果、このドット状の蛍光シグナルは、後期エンドソーム/リソソームの膜蛋白質 LAMP1 の特異抗体による染色像と一部一致し、また、ユビキチン化された蛋白質を特異的に認識する抗体の染色像とよく一致した。これらの結果から、アネキシン A11 の R235Q 変異体が、リソソームの損傷が引き金となって、何らかのユビキチン陽性の凝集体をリソソーム上、あるいはその近傍で形成すると考えられた。また、アネキシン A11 の R235Q 変異体を野生型アネキシン A11 と同程度に発現させるには、より高濃度の DOX が必要であった。このことから、R235Q 変異体の分解速度が野生型に比べて早いことが予想された。実際に、DOX を培地から除去した後、経時的に細胞を



回収し、その発現量をウエスタンブロットで解析したところ、野生型は DOX 除去後 24 時間では、ほとんど分解されなかったのに対し、R235Q 変異体は 10%以下に減少していた。リソソーム損傷によって、R235Q 変異体の凝集体が形成されることから、R235Q 変異体がリソソームで分解されていることが予想されたが、リソソーム阻害剤およびプロテアソーム阻害剤を用いて R235Q 変異体の分解経路を検討すると、予想に反して、プロテアソーム阻害剤の添加で R235Q 変異体の分解が抑制された。よって、R235Q 変異体の分解はプロテアソームが担っていると考えられた。

## (2) TDP-43 変異体の異常凝集体形成機構の解析

TDP-43 は正常細胞ではそのほとんどが核に存在するが、ALS 患者では細胞質に凝集体を形成する。TDP-43 の ALS 関連変異の解析などから、TDP-43 の異常な細胞質の分布と RNA 結合能の欠失が TDP-43 の凝集体形成に関わっているとされている。TDP-43 の核移行シグナルと RNA 認識モチーフに変異をもつ変異体 (TDP-43<sup>mNLS/mRRM</sup>) の GFP 融合蛋白質を恒常的に発現する HEK293 細胞を作出し、その分布を観察すると細胞質に散在していた。この細胞に LLOMe を添加すると、アネキシン A11 の R235Q 変異体と同様に、細胞質にドット状の蛍光シグナルが観察された。また、TDP-43<sup>mNLS/mRRM</sup> の細胞外分泌と細胞間伝搬を定量する目的で、深海エビ由来の発光蛋白質 NLuc を 2 つに断片化した小断片ペプチド HiBiT を付加した TDP-43<sup>mNLS/mRRM</sup> (HiBiT-TDP-43<sup>mNLS/mRRM</sup>) を発現する HEK293 細胞を作出した。細胞溶解液中、あるいは細胞外の培養液中の HiBiT-TDP-43<sup>mNLS/mRRM</sup> を、NLuc の大断片 LgBiT の組換え体蛋白質を添加し、発光反応を起こさせることでその発光量から定量した。細胞培養液に蛋白質合成阻害剤を添加し、経時的に細胞を回収して、HiBiT-TDP-43<sup>mNLS/mRRM</sup> の分解速度を検討したところ、野生型 TDP-43 (HiBiT-TDP-43) に比べ分解が早かった。また、その分解はアネキシン A11 の R235Q 変異体と同様に、プロテアソームが担っていることを明らかにした。

## (3) 後期エンドソーム/リソソームに局在するアポトーシス促進性蛋白質 CDIP1 の細胞死誘導機構の解析

損傷リソソームに動員される Ca<sup>2+</sup>結合蛋白質 ALG-2 が相互作用する蛋白質として cell death-inducing p53 target 1 (CDIP1) を同定した。さらに、損傷リソソームの修復に関わる endosomal sorting complex required for transport-I (ESCRT-I) と CDIP1 の会合を ALG-2 が橋渡しすることを見出した。HEK293 由来の ALG-2 ノックアウト細胞を用いた解析から、CDIP1 と ALG-2 及び ESCRT-I の共発現が有意に細胞死を誘発することを見出した。また、CDIP1 の相互作用蛋白質として小胞体蛋白質 VAPA/B を同定した。VAPA/B との結合能を失った変異体 CDIP1 は細胞死を誘導しないことから、CDIP1 と VAPA/B によるエンドソーム経路と小胞体の接触が細胞死に必要である可能性が考えられる。神経変性過程における CDIP1 の発現量の検討や神経細胞死への関与などの解析が待たれる。

<引用文献>

- ① Arai T. et al. *Biochem Biophys Res Commun.* 2006, 351: 602-611
- ② Neumann M. et al. *Science* 2006, 314: 130-133
- ③ Smith B. N. et al. *Sci Transl Med.* 2017, 9: eaad9157
- ④ Takahara T. et al. *Biochem Biophys Res Commun.* 2018, 497: 492-498

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Inukai Ryuta, Mori Kanako, Kuwata Keiko, Suzuki Chihiro, Maki Masatoshi, Takahara Terunao, Shibata Hideki	4. 巻 22
2. 論文標題 The Novel ALG-2 Target Protein CDIP1 Promotes Cell Death by Interacting with ESCRT-I and VAPA/B	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences	6. 最初と最後の頁 1175 (pp 1~27)
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/ijms22031175	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6件（うち招待講演 0件／うち国際学会 0件）

1. 発表者名 天野柊吾、林本敬大、船戸聖音、牧正敏、高原照直、柴田秀樹
2. 発表標題 ALSに関連するアネキシンA11変異体の細胞内動態の解析
3. 学会等名 日本農芸化学会2023年度（令和5年度）大会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 舟橋里帆、高原照直、牧正敏、柴田秀樹
2. 発表標題 ALS原因遺伝子産物TDP-43の定量的解析を目的としたモデル培養細胞の開発
3. 学会等名 日本農芸化学会2022年度（令和4年度）大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 川野琢己、舟橋里帆、高原照直、牧正敏、柴田秀樹
2. 発表標題 Ca <sup>2+</sup> 結合タンパク質ALG-2の損傷リソソーム動員機構の解析
3. 学会等名 第72回日本細胞生物学会大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 川野琢己、舟橋里帆、森花菜子、桑田啓子、牧正敏、高原照直、柴田秀樹
2. 発表標題 損傷リソソームへのCa <sup>2+</sup> 結合タンパク質ALG-2動員の分子機構解析
3. 学会等名 第43回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 川野琢己、林本敬大、高原照直、牧正敏、柴田秀樹
2. 発表標題 損傷リソソームへのカルシウム結合タンパク質の動員とその役割の解析
3. 学会等名 第19回 日本蛋白質化学会年会 第71回 日本細胞生物学会大会 合同年次大会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

名古屋大学大学院生命農学研究科分子細胞制御学研究室ホームページ <a href="https://molcellreg.wixsite.com/website">https://molcellreg.wixsite.com/website</a>
--

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
研究協力者	牧 正敏  (MAKI Masatoshi)		

6. 研究組織（つづき）

	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
研究協力者	高原 照直  (TAKAHARA Terunao)		

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		
英国	University College London	King ' s College London	