

令和 4 年 6 月 27 日現在

機関番号：37111

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2020～2021

課題番号：20K22663

研究課題名（和文）Perry症候群におけるダイニン-ダイナクチン系とTDP-43間の相互作用の破綻

研究課題名（英文）DCTN1 binds to TDP-43 and regulates TDP-43 aggregation

研究代表者

河田 純一（Kawada, Junichi）

福岡大学・医学部・助教

研究者番号：00312207

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,200,000円

研究成果の概要（和文）：TDP-43は、複数の神経変性疾患で見られる凝集体の主成分である。本来は核に存在するTDP-43を細胞質内で凝集させる病的仕組みは、未解明のままである。我々は、DCTN1（微小管モーターダイニンのアダプター、ダイナクチン複合体の最大サブユニットであり、Perry病の原因遺伝子産物）が、TDP-43に結合することを見出した。更に、DCTN1-TDP-43結合の特性とPerry病発症における役割に関し、解析を行った。Perry病等の病的条件下では、この結合が異常レベルにまで強化され、微小管結合とのバランスを取る制御系が破綻することで、TDP-43輸送が抑制され、凝集体形成を促進する仮説を提唱した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

TDP-43は、ALSをはじめとする複数の神経変性疾患で見られる異常凝集体の主成分である。本来は核に存在するべきTDP-43を細胞質内で凝集させる病的仕組みは、未解明のままである。我々は、DCTN1（ダイニンと呼ばれるモータータンパク質の運動性を制御するアダプター分子であり、Perry病の原因遺伝子産物）が、TDP-43に結合することを見出した。更に、DCTN1-TDP-43結合の制御異常により、細胞質内凝集体が形成される仕組みの一端を明らかにした。この仕組みが、ALSなどの発症に広く関与する可能性がある。

研究成果の概要（英文）：A major hallmark of several neurodegenerative diseases, including ALS, is cytoplasmic aggregation of TDP-43. Perry disease is a type of TDP-43 proteinopathy. The causative gene DCTN1 encodes the largest subunit of the dynactin complex. Dynactin binds to cytoplasmic dynein and regulates dynein-mediated retrograde transport. Perry disease-linked missense mutations (e.g. p.G71A) impair microtubule-binding abilities of DCTN1. However, how DCTN1 mutations cause TDP-43 proteinopathy remains unclear. We found that DCTN1 bound to TDP-43. Biochemical analysis using DCTN1 mutants revealed that the DCTN1 CAP-Gly-basic domain, dynactin domain, and C-terminal region bound to TDP-43. Remarkably, the p.G71A mutation affected TDP-43-interacting ability of DCTN1. Overexpression of DCTN1G71A induced cytoplasmic aggregation of TDP-43. We thus identified DCTN1 as a new player in TDP-43 transport, providing insights into the pathological mechanisms of Perry disease and other TDP-43 proteinopathies.

研究分野：神経科学

キーワード：ダイナクチン ダイニン TDP-43 Perry病 細胞内輸送 タンパク質凝集体 モデルマウス

1. 研究開始当初の背景

代表者は、神経回路形成の分子機構に関して、神経発生期に発現する軸索ガイダンス受容体 Roundabout (Robo)の細胞内輸送系に関する研究を行ってきた。それらの一連の研究で、軸索先端から細胞内への逆行性輸送の重要性を認識し、その要となる dynein-dynactin 系に関連する希少性神経難病、Perry 病 (Perry 症候群) に興味を持った。Perry 病は、パーキンソニズム、抑うつ、呼吸障害等を特徴とする常染色体性優性の希少疾患である(現時点では、世界で 22 家系)。致死率は事実上 100%で、有効な治療法はまだない。ほぼ全ての剖検脳で、中脳黒質を中心に、TDP-43 異常凝集体が見られる。代表者のグループを含めた国際共同研究チームにより、原因遺伝子が dynactin subunit 1 (DCTN1)と特定された(2009)。

主要 RNA 結合タンパク質の 1 つである TDP-43 は、正常下では細胞質-核間を往復しながらも、大多数の分子が核内で機能するが、病的ストレス下では、核外に凝集体を形成する。TDP-43 が筋萎縮性側索硬化症 (ALS)、前頭側頭葉変性症 (FTLD) 等の神経変性疾患の病巣で見られるタンパク質性凝集体の主成分として同定されて(2006)以降、tau や α -synuclein と並ぶ代表的な病原性タンパク質として、国際的な規模で研究が続けられている。しかしながら、本来、主に核に存在すべき TDP-43 を細胞質内で凝集させる病的仕組みは、未解明のままである。異常凝集体形成を抑制、また、発症後であっても進行を阻止する、新たな治療戦略の開発に際しては、この病的機構の解明が国際的急務と認識されてきた。

2. 研究の目的

予備的実験から、DCTN1 (逆行性微小管モーター-dynein の必須アダプター、dynactin 複合体の最大サブユニットであり、遺伝性パーキンソニズムを示す Perry 病の原因遺伝子産物)が、TDP-43 に結合することを見出した。本研究では、内在性の DCTN1 と TDP-43、更には、タグ付き DCTN1 と TDP-43、あるいは一連の欠損変異体と、Perry 病発症性ミスセンス変異を有する DCTN1 変異体を用いて、DCTN1-TDP-43 結合の更なる確認を行った。次に、DCTN1-TDP-43 結合の特性と Perry 病発症における意義に迫るため、生化学的、細胞生物学的、ライブイメージング解析を行った。

また、Perry 病のモデルマウス樹立を目指して、我々は長らく、研究努力を続けてきたが、今回、DCTN1 (G71A)ノックインマウス系統を作成し、その神経病理と動物行動学的特性を調べた。

3. 研究の方法

モデル細胞であるヒト骨肉腫 U2OS 細胞とサル線維芽細胞 COS7、更に人工多能性幹細胞 (iPS 細胞)への遺伝子導入実験を行い、DCTN1-TDP-43 結合の生化学的、細胞生物学的、ライブイメージング解析を行った。また、世界的に約 20 家系しか存在しない Perry 病の発症機構の解明には、マウスモデルの確立が急務とされてきた。先行研究では、ヒト DCTN1(G71A)遺伝子を導入したトランスジェニックマウスを作成していたが、動物モデルとしての有効性は不完全なものであった。本研究では、Perry 病患者の gene dose により近い DCTN1 (G71A)ノックインマウス系統を作成し、モデル動物としての特性を検討した。

4. 研究成果

DCTN1 が TDP-43 に直接的に結合し、TDP-43 細胞質-核輸送と凝集（細胞質内、及び核内）を制御することを証明した（図 1）。また、DCTN1-TDP-43 結合の証明を多角度から行う一方、Perry 病等の病的条件下では、この結合が異常レベルまで強化され、微小管結合とのバランスを取る制御系が破綻することで、TDP-43 細胞質-核内輸送が抑制され、TDP-43 異常凝集体の形成を促進する結果を得た。興味深いことに、DCTN1 (G71A)変異体あるいは複数の欠損変異体を培養細胞に導入するだけで、TDP-43 の細胞内への異所的分布と凝集体形成を誘導することが出来た。

また、iPS 細胞から人為的に分化させて得たニューロンにおいても、DCTN1 (G71A)変異体あるいは複数の欠損変異体と野生型 TDP-43 の共発現により、TDP-43 の細胞内への異所的分布と凝集体形成を再現することに成功した。

従って、本研究により、Perry 病患者脳で見られる DCTN1 凝集体と TDP-43 凝集体の形成は、長らく予想された独立現象でなく、連動しており、DCTN1 変異体タンパク質により惹起されることが今回初めて判った。また、DCTN1 凝集体形成の後、長時間をかけて、いわば 2 次的に TDP-43 凝集が生じるとされた従来の仮説を否定することが出来た。

以上の成果は、International Journal of Molecular Sciences 誌上で発表した。発表後 1 年間で、約 4000 views を達成し、これまで漠然とした傍証しかなかったが、神経変性疾患における DCTN1 の重要性をようやく理解出来たとのコメントも頂戴した。

並行して、DCTN1 (G71A)ノックインマウス（ヘテロ接合体）の神経病理学的、行動解析学的解析を進め、我々のマウスモデルが、Perry 病の初期過程を再現していることが判った。まず、行動解析により、ヘテロ接合体マウスモデルが抑うつと運動障害を示すことを示した。更に、神経病理解析の一環で、免疫組織化学実験の結果、中脳黒質におけるチロシンヒドロキシラーゼ免疫反応性が減少しており、ドパミンニューロンの機能低下、もしくはドパミンニューロン数の減少が生じていると考えられる。一方で、Perry 病患者でしばしば起こる呼吸障害からの突然死と体重減少は全く認められず、残念ながら、トランスジェニックマウスと同様に、ノックインマウスのヘテロ接合体においても、後期過程を再現していないと考えられる。

これらの成果は Neuroscience Letters 誌上で発表することが出来た。これらの 2 方向の研究から、DCTN1 と TDP-43 の生物学的、更に生物物理学特性を in vitro, in vivo レベルで今後更に調べる土台を作ることが出来た。

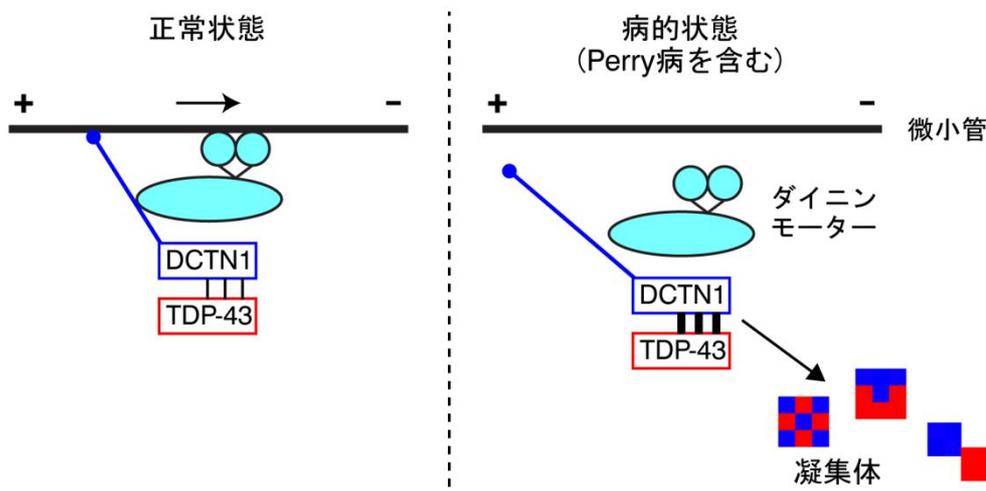


図1 DCTN1がTDP-43の細胞内局在と凝集状態を制御する分子機構のモデル

生理的状況下においては、dynein-dynactin系により、TDP-43が微小管に沿って逆行性輸送される。ところが、Perry病を含む病的状況下では、DCTN1-TDP-43結合の強化に伴いTDP-43輸送効率が低下し、TDP-43異常凝集体形成が促進される。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Deshimaru, M., Kinoshita-Kawada, M. Kubota, K., Watanabe, T., Tanaka, Y., Hirano, S., Ishidate, F., Hiramoto, M., Ishikawa, M., Uehara, Y., Okano, H., Hirose, S., Fujioka, S., Iwasaki, K., Yuasa-Kawada, J., Mishima, T. and Tsuboi, Y.	4. 巻 22
2. 論文標題 DCTN1 binds to TDP-43 and regulates TDP-43 aggregation	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences	6. 最初と最後の頁 3985
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/ijms22083985	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 該当する

1. 著者名 Deshimaru M, Mishima T, Watanabe T, Kubota K, Hosoi M, Kinoshita-Kawada M, Yuasa-Kawada J, Ikeda M, Mori M, Murata Y, Abe T, Enjoji M, Kiyonari H, Kodama S, Fujioka S, Iwasaki K, Tsuboi Y.	4. 巻 764
2. 論文標題 Behavioral profile in a Dctn1G71A knock-in mouse model of Perry disease.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Neurosci Lett	6. 最初と最後の頁 136234
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.neulet.2021.136234.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 1件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 Yoshio Tsuboi, Takayasu Mishima, Junichi Kawada
2. 発表標題 Unveiling link between TDP-43 and dynactin: lessons from Perry disease
3. 学会等名 第63回日本神経学会学術大会（招待講演）
4. 発表年 2021年～2022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
---------------------------	-----------------------	----

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			
米国	The Scripps Research Institute			