

令和 6 年 6 月 11 日現在

機関番号：13101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2021～2023

課題番号：21K07291

研究課題名(和文) 異常なストレス顆粒によるTDP-43凝集体の誘導機構の解明

研究課題名(英文) Exploratiion of mechanisms for formation of aberrant stress granules and TDP-43 aggregates

研究代表者

垣花 太一 (Kakihana, Taichi)

新潟大学・医歯学系・助教

研究者番号：60746907

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)：筋萎縮性側索硬化症(amyotrophic lateral sclerosis:ALS)は、運動障害を特徴とする神経変性疾患である。ALSの運動神経細胞では、ユビキチン化したTDP-43が細胞質に凝集体を形成し、この凝集体が神経細胞の機能不全と細胞死を誘導し、ALSを発症する。最近ユビキチン化TDP-43の凝集体形成にストレス顆粒が関与することがわかってきた。本研究では、ストレス顆粒形成の品質管理機構を明らかにし、ALSにおけるTDP-43凝集体形成のメカニズムを明らかにすることを研究目的とした。研究成果として、ストレス顆粒形成異常に関与するタンパク質やパスウェイを複数同定することができた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ストレス顆粒の形成異常が、神経変性疾患やがん、糖尿病などの原因として示唆されている。代表者らは、ストレス顆粒の形成異常を引き起こす複数の細胞内経路を同定することができた。同定された細胞内経路は、ALSやパーキンソン病などの原因となるタンパク質やストレス因子の毒性を緩和することが判明した。これらの研究成果を発展させることで、新たな治療、創薬標的を創出することが期待できる。

研究成果の概要(英文)：Amyotrophic lateral sclerosis (ALS) is a neurodegenerative disease characterized by dysfunction and cell death of motor neurons in the brainstem and spinal cord and the resulting motor deficits. TDP-43 is the causative protein in familial and arcuate ALS; in ALS motor neurons, ubiquitinated TDP-43 forms aggregates in the cytoplasm, which induce neuronal dysfunction and cell death, resulting in ALS. Stress granules are non-membrane organelles that form transiently under stress. Stress granules have recently been shown to be involved in the formation of ubiquitinated TDP-43 aggregates. We have elucidated the quality control mechanism of stress granule formation and the mechanism of TDP-43 aggregate formation in ALS(Kakihana, iScience, 2021; Takahashi, Mol Cell Biol, 2022; Sango, J Biol Chem, 2022), and have opened up a new research area.

研究分野：ウイルス学

キーワード：筋萎縮性側索硬化症 ストレス顆粒

様式 C-19、F-19-1、Z-19（共通）

1. 研究開始当初の背景

筋萎縮側索硬化症(ALS)は、運動神経細胞死を特徴とする致死性の神経変性疾患である。90%以上のALS患者の運動神経細胞質には、ユビキチン化されたTDP-43蛋白質の凝集体が形成される。しかしながら、TDP-43の凝集体形成メカニズムは不明のままであった。最近の研究から、TDP-43凝集体形成にストレス顆粒形成異常が関与することが示唆された。20以上の家族性ALS原因遺伝子が同定されており、TDP-43、TIA1などストレス顆粒形成に関与するタンパク質が複数含まれることが知られていた。

ストレス顆粒は、ストレス下で細胞質に一過的に形成される構造体で、RNAとRNA結合蛋白質が多価に結合することで、液-液相分離(liquid-liquid phase separation, LLPS)を起こすことで生じる。さまざまなALS原因遺伝子変異をもつ細胞内では、ストレス顆粒の可逆性が低下し、持続的に形成したストレス顆粒にユビキチン化タンパク質が集積した、異常なストレス顆粒を形成することが多数報告されていた。異常なストレス顆粒形成が、ALSの原因となる、ユビキチン化TDP-43凝集体形成に関与すると考えられているが、その分子メカニズムは不明であった。

ストレス顆粒形成異常は、筋萎縮性側索硬化症(ALS)以外にもさまざまな神経変性疾患の原因と考えられている。神経変性疾患の新たな治療標的として、ストレス顆粒形成異常の分子メカニズムを明らかにする必要がある。

2. 研究の目的

ALS原因遺伝子OPTN、および脱ユビキチン化酵素USP10に着目し、ストレス顆粒を含む細胞内非膜オルガネラ形成やタンパク質凝集体形成における分子メカニズムを明らかにするため、下記の研究を行った。

- A) ALS原因遺伝子変異OPTNによるユビキチン化TDP-43のタンパク質凝集体形成メカニズムの解明
- B) ドパミン誘導性ストレス顆粒へのUSP10の機能解明
- C) プロテアソーム阻害薬誘導性ストレス顆粒形成へのUSP10の機能解明

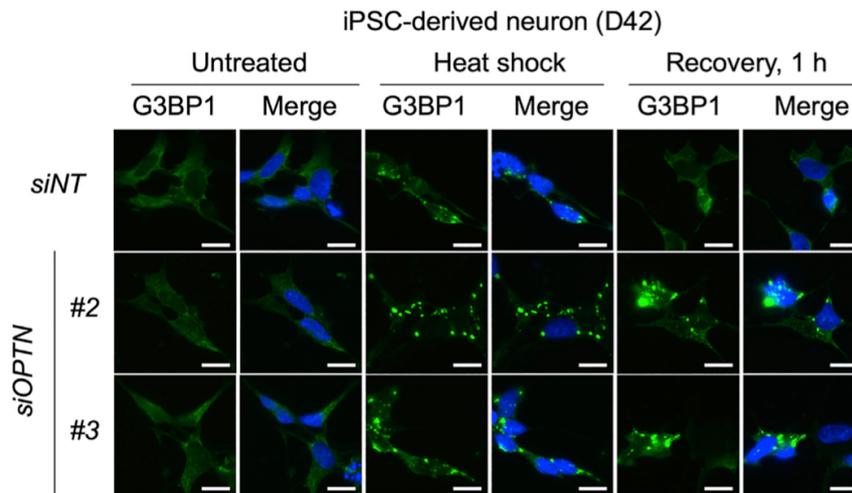
3. 研究の方法

- A) OPTNはALS原因遺伝子である。ヒトiPS細胞由来神経細胞でOPTNをノックダウンし、ストレス顆粒形成動態を蛍光顕微鏡を用いて観察した。ストレス顆粒形成異常が、ALSの病的と特徴であるユビキチン化TDP-43凝集体の形成を誘導することが示唆されている。OPTNノックダウン細胞でストレス顆粒を形成させたときの、ユビキチン化TDP-43の発現量や局在を、ユビキチン化タンパク質プルダウン法および蛍光免疫染色法を用いて解析した。
- B) ドパミンをヒト神経細胞株SH-SY5Y細胞に処理し、ドパミンの細胞毒性を抑制する新たな経路の探索を行なった。
- C) HEK293T細胞で、USP10をノックダウンし、プロテアソーム阻害薬誘導性ストレス顆粒形成動態の解析を行なった。

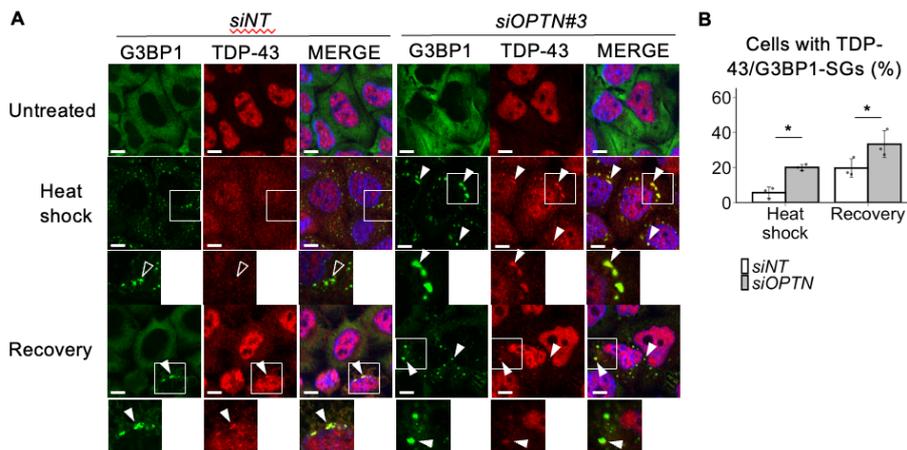
4. 研究成果

- A) OPTNのストレス顆粒形成に対する効果を蛍光免疫染色法により調べた。ヒトiPS細胞由来

神経細胞で siRNA を用いた RNAi 法により OPTN をノックダウンし、熱ショックによりストレス顆粒形成を誘導した。その後通常培養条件で 1 時間培養し、細胞を回復させた。それぞれのタイミングで、ヒト iPS 細胞由来神経細胞を固定しストレス顆粒を蛍光免疫染色し、ストレス顆粒形成を評価した。その結果、OPTN ノックダウン細胞では、肥大化したストレス顆粒が観察され、ストレス顆粒形成が亢進していた。ストレス顆粒消失効率を熱ショック後 1 時間回復させた細胞で調べた。コントロール細胞では、ストレス顆粒が消失が進行し、約 20%の細胞でストレス顆粒形成が観察された。一方で、OPTN ノックダウン細胞では、約 40%の細胞でストレス顆粒形成が観察された。このことから、OPTN はストレス顆粒形成を抑制し、ストレスからの回復に対して、ストレス顆粒消失を促進する働きがあることが判った。

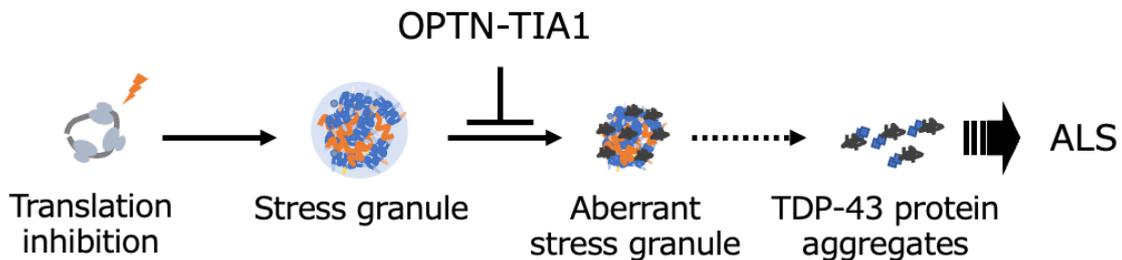


ストレス顆粒の形成異常が TDP-43 の凝集体形成を亢進することが示唆されている。OPTN ノックダウン細胞で熱ショックを与え、回復させ、TDP-43 の局在を確認した。その結果、核タンパク質である TDP-43 が、OPTN ノックダウン細胞において、細胞質のストレス顆粒へより局在することが判明した。

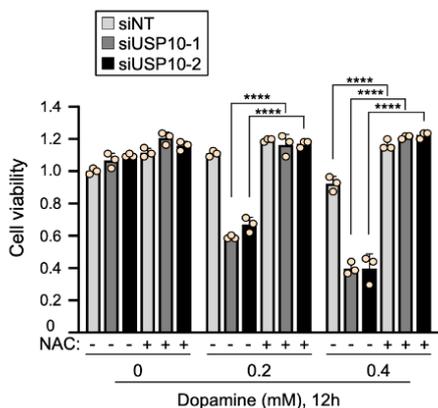


ALS 患者の病変部位において、ユビキチン化された TDP-43 が凝集していることが知られている。OPTN ノックダウン細胞で、ユビキチン化 TDP-43 の発現量を、ユビキチン化タンパク質のプルダウンにより解析した。その結果、OPTN ノックダウン細胞で、ユビキチン化 TDP-35 断片の発現が上昇していることが判った。

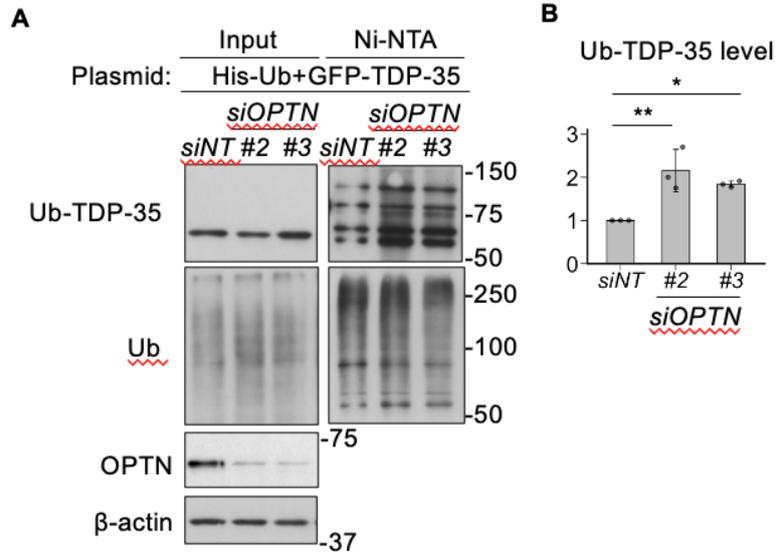
OPTN ノックダウンによる、ストレス顆粒形成異常は、ストレス顆粒タンパク質である TIA1 の発現亢進によることが判った。TIA1 も ALS の原因遺伝子として同定されている。以上のことから、ストレス顆粒形成異常やユビキチン化 TDP-43 凝集体形成に、二つの ALS 原因遺伝子 OPTN と TIA1 を結ぶ経路の機能異常が関与することを明らかにすることができた。本研究成果は、iScience 誌に掲載された (Kakihana et al., *iScience*, 2021)。

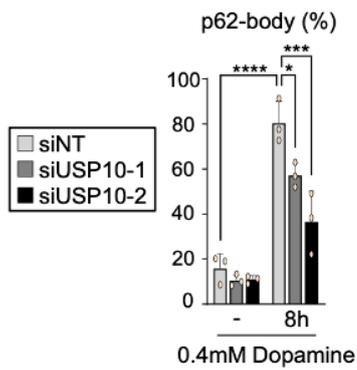


B) 神経伝達物質ドパミンによる酸化ストレスは、パーキンソン病などの神経変性疾患の原因の一つである。ドパミン毒性の神経細胞への影響を明らかにするために、ヒト神経細胞株 SH-SY5Y 細胞を用いて解析を行なった。ドパミンを処理すると、細胞内で、抗酸化ストレス応答と小胞体ストレス応答が惹起され、それぞれの下流で p62 液滴とストレス顆粒という異なる二つの非膜オルガネラが形成されることが判った。代表者らは、USP10 がストレス顆粒に局在するほか、酸化ストレスから細胞を保護することを見出していた。



USP10 をノックダウンした細胞で、ドパミン依存性の細胞死を評価した。その結果、USP10 ノックダウン細胞では、ドパミン誘導性の細胞死が亢進することが判った。この細胞死は、抗酸化剤である N-アセチルシステイン (NAC) を細胞に処理することで抑制された。このことから、USP10 が細胞内の抗酸化活性を亢進することで、ドパミン誘導性の神経細胞死を抑制していることが示唆された。





p62 液滴は、抗酸化ストレス応答の転写因子 NRF2 の発現を誘導する。USP10 は p62 の結合タンパク質である。USP10 の p62 液滴形成に対する機能を、蛍光免疫染色法により解析した。その結果、ドパミン処理によって誘導される p62 液滴形成が USP10 に依存することが判った。これらの研究成果から、USP10 がパーキンソン病の原因となるドパミン毒性に対して、抗酸化ストレス応答を促進することで、神経細胞を保護することが明らかとなった。本研究成果は、Journal of Biological Chemistry 誌に掲載された (Sango et al., *JBC*, 2022)。

- C) USP10 が ALS の原因因子である TDP-43 タンパク質に結合し、TDP-43 の病的な凝集体形成を抑制することを同定することができた。本研究成果は、Molecular and Cellular Biology 誌に掲載された (Takahashi et al., *MCB*, 2022)。

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 2件）

1. 著者名 Takeishi Atsuki, Shaban Amina K., Kakihana Taichi, (ほか23名), Matsumoto Sohkiichi	4. 巻 68
2. 論文標題 Genetic engineering employing MPB70 and its promoter enables efficient secretion and expression of foreign antigen in bacillus Calmette Gu?rin (BCG) Tokyo	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 Microbiology and Immunology	6. 最初と最後の頁 130 ~ 147
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/1348-0421.13116	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 -
1. 著者名 Takahashi Masahiko, Kitaura Hiroki, Kakita Akiyoshi, Kakihana Taichi, Katsuragi Yoshinori, Onodera Osamu, Iwakura Yuriko, Nawa Hiroyuki, Komatsu Masaaki, Fujii Masahiro	4. 巻 42
2. 論文標題 USP10 Inhibits Aberrant Cytoplasmic Aggregation of TDP-43 by Promoting Stress Granule Clearance	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Molecular and Cellular Biology	6. 最初と最後の頁 e00393-21
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1128/MCB.00393-21	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 -
1. 著者名 Sango Junya, Kakihana Taichi, Takahashi Masahiko, Katsuragi Yoshinori, Anisimov Sergei, Komatsu Masaaki, Fujii Masahiro	4. 巻 298
2. 論文標題 USP10 inhibits the dopamine-induced reactive oxygen species?dependent apoptosis of neuronal cells by stimulating the antioxidant Nrf2 activity	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Journal of Biological Chemistry	6. 最初と最後の頁 101448 ~ 101448
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jbc.2021.101448	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 Kakihana Taichi, Takahashi Masahiko, Katsuragi Yoshinori, Yamashita Shun-Ichi, Sango Junya, Kanki Tomotake, Onodera Osamu, Fujii Masahiro	4. 巻 24
2. 論文標題 The optineurin/TIA1 pathway inhibits aberrant stress granule formation and reduces ubiquitinated TDP-43	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 iScience	6. 最初と最後の頁 102733 ~ 102733
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.isci.2021.102733	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5件（うち招待講演 1件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 Taichi Kakihana, Junya Sango, Masahiko Takahashi, Masahiro Fujii
2. 発表標題 p62液滴とストレス顆粒形成制御によるNrf2抗酸化ストレス経路の活性化とドパミン誘導性神経細胞死の抑制
3. 学会等名 第96回日本生化学会大会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Taichi Kakihana, Junya Sango, Masahiko Takahashi, Masahiro Fujii
2. 発表標題 p62-body and stress granule regulate dopamine-induced neuronal cell death through activation of the Nrf2 antioxidant pathway
3. 学会等名 the 24th RNA Society of Japan
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Kakihana T, Takahashi M, Katsuragi Y, Yamashita SH, Kanki T, Onodera O, Fujii M.
2. 発表標題 Optineurin/TIA1 pathway reduces ubiquitinated TDP-43 aggregation by promoting stress granule clearance
3. 学会等名 Neuro2022
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 垣花 太一
2. 発表標題 ストレス顆粒形成異常の分子機構の解明
3. 学会等名 第15回小胞体ストレス研究会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 垣花太一
2. 発表標題 神経変性疾患におけるストレス顆粒形成異常の分子メカニズム
3. 学会等名 東北大学学際科学部フロンティア研究所セミナー（招待講演）
4. 発表年 2023年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

筋萎縮性側索硬化症の原因遺伝子であるTDP-43病的な凝集体の形成を抑制する分子を発見 https://www.niigata-u.ac.jp/wp-content/uploads/2022/01/220117rs.pdf ドーパミン神経細胞の細胞死を抑制する新たな分子を発見 https://www.niigata-u.ac.jp/wp-content/uploads/2021/11/211125rs.pdf 筋萎縮性側索硬化症において異常なTDP-43凝集体の形成を抑制する分子メカニズムを解明 https://www.niigata-u.ac.jp/wp-content/uploads/2021/06/210629rs.pdf

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
---------	---------