

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成25年 6月10日現在

機関番号：82611

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2010～2012

課題番号：22590932

研究課題名（和文） 核—細胞質間シャトル機能障害に立脚したTDP-43神経細胞毒性機構の解明

研究課題名（英文） Elucidation of the neuronal toxicity mechanism by TDP-43 based on dysfunction of the nucleocytoplasmic shuttling

研究代表者

長野 清一（NAGANO SEIICHI）

独立行政法人国立精神・神経医療研究センター・神経研究所疾病研究第五部・室長

研究者番号：40362727

研究成果の概要（和文）：

筋萎縮性側索硬化症（ALS）および前頭側頭葉変性症（FTLD）の神経細胞ではRNA結合核蛋白質であるTDP-43の細胞質への局在変化・異常沈着がみられる。我々はTDP-43が持つ神経突起へのmRNA輸送機能がその沈着により障害され、特定のmRNAの神経突起での供給不足を通じてALS/FTLDを発症するのではないかと考え、我々独自の脳皮質神経細胞区画培養法を用いた解析によりTDP-43が神経突起へ輸送する標的としてリボソーム蛋白質などの蛋白質翻訳機能関連mRNAを同定した。これらの標的mRNAはTDP-43と結合して神経突起でTDP-43と共局在し、かつ両者は同部位で同じ動きを示した。またこれらの標的mRNAはBDNFによる神経突起での局所蛋白質翻訳の刺激によりその翻訳が上昇した。さらにこれら標的mRNAの神経突起での翻訳はTDP-43の発現低下に伴い減少し、それにより同部位での全般的な蛋白質翻訳能の低下が起こって突起伸長が抑制された。これよりALS/FTLDでは神経突起でのTDP-43の機能低下により局所蛋白質翻訳能の障害が起こり、このことが同疾患における神経変性発症の要因となっている可能性が示唆された。

研究成果の概要（英文）：

Altered localization and abnormal deposition of TDP-43, a nuclear RNA-binding protein, into the cytoplasm of neurons are hallmarks of amyotrophic lateral sclerosis (ALS) and frontotemporal lobar degeneration (FTLD). We hypothesized that deposition of TDP-43 may disturb the particular mRNA transport by the protein to neurites to develop ALS/FTLD, and identified mRNA associated with protein translation including that of ribosomal proteins as candidate targets transported to neurites by TDP-43 using our compartment culture system of cortical neurons. The target mRNA and TDP-43 co-localized and showed the same movement in neurites. Translation of the target mRNA was increased by stimulation with a local protein translation stimulator, BDNF, in neurites. Moreover, translation of the target mRNA in neurites was decreased by down-regulation of TDP-43 expression, which caused the decrease of overall protein translation at the site and the inhibition of neurite outgrowth. It indicates that the failure of local protein translation may occur by loss-of-function of TDP-43 in neurites, which may be a factor of the neurodegeneration in ALS/FTLD.

交付決定額

（金額単位：円）

|        | 直接経費      | 間接経費      | 合計        |
|--------|-----------|-----------|-----------|
| 2010年度 | 1,200,000 | 360,000   | 1,560,000 |
| 2011年度 | 1,300,000 | 390,000   | 1,690,000 |
| 2012年度 | 900,000   | 270,000   | 1,170,000 |
| 年度     | 0         | 0         | 0         |
| 年度     | 0         | 0         | 0         |
| 総計     | 3,400,000 | 1,020,000 | 4,420,000 |

研究分野：神経内科学、分子生物学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・神経内科学

キーワード：筋萎縮性側索硬化症、TDP-43、RNA、神経突起

### 1. 研究開始当初の背景

筋萎縮性側索硬化症 (ALS) およびユビキチン陽性封入体を伴う前頭側頭葉変性症 (FTLD-U) の神経細胞では RNA 結合蛋白質である TAR DNA-binding protein 43 (TDP-43) の核からの消失と細胞質への局在変化・異常沈着がみられる。同様の病理変化を示す ALS/FTLD-U 例の一部で TDP-43 遺伝子の変異が報告されたこと、また VCP、ubiquilin 2 といった他の ALS/FTLD-U 原因遺伝子変異例でも TDP-43 陽性細胞質内封入体が見られることより、神経細胞での局在変化・沈着に伴う TDP-43 の何らかの機能異常が ALS/FTLD-U における神経変性の重要な規定因子になっていることが示唆される。

TDP-43 の生理的機能としては、核内での遺伝子の転写や未成熟 mRNA の選択的スプライシング、核外への mRNA の輸送や細胞質での翻訳の調節が推測されている。現在までに TDP-43 により発現やスプライシングが制御される標的 mRNA は数多く探索されているが、このうち特定の mRNA に対する調節異常が ALS/FTLD-U の発症に関与するのかは未だ明らかになっていない。

### 2. 研究の目的

神経細胞は軸索・樹状突起といった神経突起を持ちそれらが互いにシナプスを形成してネットワークを構築している。これら神経突起やシナプスの形態・機能の維持にはそこへの種々の物質輸送が不可欠であり、特に軸索傷害後の再生や記憶・学習時のシナプスの可塑的な変化に即時に対応するには、mRNA をそこへ直接供給し局所で蛋白質合成 (翻訳) する必要がある。神経突起への mRNA の輸送は特定の RNA 結合蛋白質と複合体を形成して行われるため、RNA 結合蛋白質が適切に機能しないと標的 mRNA の供給ができず神経細胞機能に障害が起こる。実際に脆弱 X 症候群、脊髄性筋萎縮症といった神経疾患では、それぞれ FMRP や SMN といった RNA 結合蛋白質の減少によりその標的 mRNA の神経突起への輸送が障害され発症することが知られている。

我々は、TDP-43 も同様に mRNA の神経突起への輸送機能を持ち、ALS/FTLD-U では異常沈着によりその機能が障害されて特定の mRNA の神経突起での減少をきたして神経変性が生じるのではないかと考え、TDP-43 が神経突起へ輸送する標的 mRNA 候補の同定を行った。

### 3. 研究の方法

まず 2 層式ウェルプレートを用いたマウス大脳皮質神経培養細胞からの純度の高い神経突起分画の調製法を確立した。マウス胎児より大脳皮質を取り出して細胞を分離し、底部に小孔を持つチャンバーインサート上に播種して培養、チャンバーインサート底部下面より神経突起を回収して total RNA を精製した。この神経細胞区画培養系で 2 種類の異なる TDP-43 shRNA 配列を挿入したレンチウイルスベクターを用いて TDP-43 の発現を抑制した上で神経突起分画を回収し、対照と比較して 2 種類の TDP-43 発現低下神経突起分画の両者で減少している mRNA をマイクロアレイ解析により同定し、TDP-43 により神経突起へ輸送される標的 mRNA 候補とした。これらの mRNA の減少につき、同分画を用いた定量的 PCR により再現性を確認した。

これら標的 mRNA が TDP-43 と結合するかどうかをマウス大脳組織を用いた RNA pull-down 法および Neuro2a 細胞を用いた RNA 免疫沈降法により確認した。次にマウス大脳皮質培養神経突起における内在性の標的 mRNA および TDP-43 の局在につき、それぞれ in situ hybridization 法および免疫染色法により確認した。さらにバクテリオファージコート蛋白質である MS2 蛋白質とこれにより認識される MS2 結合 RNA 配列を用いた生細胞での外来性 mRNA 可視化システムにより培養神経突起における標的 mRNA の挙動を観察するとともに、その蛍光蛋白質融合 TDP-43 の局在・挙動との相違を確認した。

またこれらの標的 mRNA が神経突起で局所翻訳されているかどうかを同分画の選択的な BDNF 刺激による蛋白質量の増加の有無により解析した。さらに TDP-43 による輸送の低下に伴う標的 mRNA の翻訳低下が神経突起での全般的な蛋白質翻訳機能に影響するかどうかをみるため、蛋白質翻訳時にピューロマイシンを取り込ませた神経突起分画を用いた抗ピューロマイシン抗体でのウェスタンブロットを行い、TDP-43 発現低下の有無による同部位での蛋白質翻訳能の差異を検出した。

### 4. 研究成果

前述のチャンバーインサートを用いて得られたマウス大脳皮質神経細胞の神経突起分画では、RT-PCR およびウェスタンブロットにより種々の細胞骨格の mRNA、蛋白質はみられるものの核蛋白質の mRNA、蛋白質は検出されず、

核成分の混入はみられないものと考えられた。マイクロアレイ解析の結果TDP-43の発現低下により神経突起で減少するmRNAとしてリボソーム蛋白質mRNAを含む複数の蛋白質翻訳機能関連遺伝子mRNAが同定された。定量的PCRによりこれらmRNAは神経突起分画では減少がみられたが細胞体分画では明らかな減少はなく、転写レベルではなく輸送の障害による減少であることが示唆された。

RNA pull-down法およびRNA免疫沈降法の両者によりこれら標的mRNAはTDP-43と結合することが示された。in situ hybridization法により大脳皮質培養神経突起で標的mRNAは顆粒状の分布を示し、その局在は免疫染色法によるTDP-43の分布とほぼ一致し、共局在しているものと考えられた。生細胞での神経突起内標的mRNA・TDP-43可視化法によっても両者は顆粒状に分布して共局在を示し、かつ両者は同部位で同じ動きを示し、標的mRNAがTDP-43依存性に神経突起内を輸送されることが示唆された。

BDNFによる神経突起分画での局所蛋白質翻訳の刺激により標的mRNAからの蛋白質量の増加が見られ、同部位で標的mRNAの局所翻訳が起こっているものと考えられた。さらにこれら標的mRNAの神経突起分画での翻訳はTDP-43の発現低下に伴い減少し、それにより同部位での全般的な蛋白質翻訳能の低下が起こって突起伸長が抑制されることを見出した。これよりALS/FTLD-Uでは神経突起でのTDP-43の機能低下により局所蛋白質翻訳能の障害が起こり、このことが同疾患における神経変性発症の要因となっている可能性が示唆された。

## 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計3件)

①藤掛伸宏, 長野清一, 永井義隆. ショウジョウバエなど小動物を用いた筋萎縮性側索硬化症モデル. 神経内科. 査読無. 76, 2012, 266-274.

②Araki T, Nagano S, Tateno M, Kaido M, Ogata K, Arima K. Misfolded SOD1 forms high-density molecular complexes with synaptic molecules in mutant SOD1-linked familial amyotrophic lateral sclerosis cases. Journal of the Neurological Sciences. 査読有. 314, 2012, 92-96.

DOI: 10.1016/j.jns.2011.10.017

③Kishigami H, Nagano S, Bush AI, Sakoda S. Monomerized Cu, Zn-superoxide dismutase induces oxidative stress through aberrant Cu binding. Free Radical Biology and Medicine. 査読有. 48, 2010, 945-952.

DOI: 10.1016/j.freeradbiomed.2010.01.008

[学会発表] (計6件)

①長野清一. TDP-43により神経突起へ輸送される標的mRNAの探索. 日本神経学会学術大会. 2012年05月23日. 東京, 東京国際フォーラム.

②長野清一. 筋萎縮性側索硬化症における銅の役割. 日本微量元素学会学術集会. 2012年07月06日. 東京, シェーンバッハ・サボーン.

③長野清一. TDP-43により神経突起へ輸送される標的mRNAの同定. 日本分子生物学会年会. 2012年12月13日. 福岡, 福岡国際会議場・マリメッセ福岡.

④長野清一. FALS患者検体から示唆される変異型SOD1毒性: シナプス構造緻密化の可能性. 日本人類遺伝学会. 2011年11月10日. 千葉, 幕張メッセ.

⑤長野清一. メタロチオネイン、亜鉛、銅と神経変性疾患. メタロチオネインおよびメタルバイオサイエンス研究会. 2011年12月8日. 名古屋, 中電ホール.

⑥長野清一. なぜ銅キレート剤はALSモデルマウスに効果があるのか?-翻訳後修飾とモノマー化-. 日本神経学会総会. 2010年05月20日. 東京, 東京国際フォーラム.

[図書] (計1件)

Nagano S. InTech Publisher. Oxidative modifications of Cu, Zn-superoxide dismutase (SOD1)-the relevance to amyotrophic lateral sclerosis (ALS), in "Amyotrophic Lateral Sclerosis." 2012, 301-312.

[その他]

ホームページ等

<http://www.ncnp.go.jp/nin/guide/r5/member/s-nagano.html>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

長野 清一 (NAGANO SEIICHI)

(独) 国立精神・神経医療研究センター・  
神経研究所疾病研究第五部・室長  
研究者番号: 40362727

### (2) 研究分担者

( )

研究者番号:

### (3) 連携研究者

永井 義隆 (NAGAI YOSHITAKA)

(独) 国立精神・神経医療研究センター・  
神経研究所疾病研究第四部・室長

研究者番号：60335354

隅 寿恵 (SUMI HISAE)  
大阪大学・大学院医学系研究科・助教  
研究者番号：30403059