

## 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24年 5月31日現在

機関番号：82401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2010～2011

課題番号：22700404

研究課題名(和文) ALS病因タンパク質TDP-43と相互作用するタンパク質p47の病態への関与

研究課題名(英文) The participation of p47, which interacts with TDP-43 as a causative protein of ALS, in ALS pathology.

## 研究代表者

渡辺 祥司 (WATANABE SHOJI)

独立行政法人理化学研究所・運動ニューロン変性研究チーム・研究員

研究者番号：80462745

## 研究成果の概要(和文)：

ALSの原因遺伝子であるTDP-43は、ALSの病態に普遍的に関与していると考えられているが、TDP-43による運動ニューロン変性の分子機構は未だ不明である。

代表者はTDP-43と相互作用する新規タンパク質p47を同定し、ALS疾患由来の変異TDP-43との親和性が低下することを明らかにした。また、野生型TDP-43と疾患由来のTDP-43では、タンパク質の半減期が顕著に異なっており、疾患の発症年齢と負に相関していることを明らかにした。

## 研究成果の概要(英文)：

TDP-43 is one of a causative protein of amyotrophic lateral sclerosis (ALS), and generally related with the ALS pathology. The mechanism of motor neuron degeneration by TDP-43, however, is still unknown.

The representative of this study (I) identified p47 as a novel protein interacted with TDP-43. I elucidated that p47 interacts with not ALS-linked TDP-43 mutant proteins but wild-type. In addition, I clarified that the half-life of ALS-linked mutant TDP-43 protein is longer than that of wild-type. Early onset of ALS correlates with increased stability of familial ALS-linked mutant TDP-43 proteins.

## 交付決定額

(金額単位：円)

|        | 直接経費      | 間接経費    | 合計        |
|--------|-----------|---------|-----------|
| 2010年度 | 1,600,000 | 480,000 | 2,080,000 |
| 2011年度 | 1,400,000 | 420,000 | 1,820,000 |
| 年度     |           |         |           |
| 年度     |           |         |           |
| 年度     |           |         |           |
| 総計     | 3,000,000 | 900,000 | 3,900,000 |

研究分野：生化学

科研費の分科・細目：脳神経科学・神経化学・神経薬理学

キーワード：p47, TDP-43, ALS

## 1. 研究開始当初の背景 (国内外の研究動向)

筋萎縮性側索硬化症 (Amyotrophic Lateral Sclerosis; ALS) は、運動ニューロンの変性による骨格筋の麻痺をきたす致死性の神経変性疾患である。近年、ALS の約 90% をしめる孤発性 ALS および前頭側頭葉変性症 (FTLD) において、病巣である運動ニューロンの細胞質にユビキチン陽性の凝集体を形成しているタンパク質 TDP-43 (TAR-DNA binding protein) が同定された。また、TDP-43 のミスセンス変異が ALS 優性遺伝の家系や ALS 孤発例の一部において同定された。このことから、TDP-43 は遺伝的背景の有無に関わり無く、ALS の病態に普遍的に関与していると考えられている。

ALS における TDP-43 の病巣における異常蓄積の意義は、アルツハイマー病におけるアミロイド  $\beta$  やパーキンソン病における  $\alpha$  シヌクレインの病的蓄積に相当する非常に重要なものであると考えられる。このことから、TDP-43 を手がかりとして、孤発性および家族性 ALS の病態解明に向けた研究が国際的な競争となっている。

### (学術的背景)

TDP-43 は 414 アミノ酸からなり、多くの組織・細胞で恒常的に発現しているタンパク質である (図 1)。

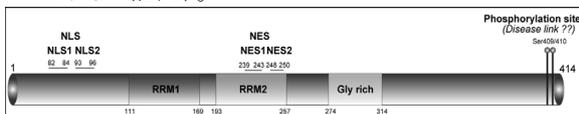


図 1: TDP-43 の二次構造  
2 つの RNA 結合ドメイン (RRM1, 2)、および Gly リッチドメインが存在し、核移行シグナル (NLS) と核外移行シグナル (NES) を有している。

TDP-43 のアミノ酸配列中には核内移行シグナル (NLS) および核外移行シグナル (NES) の両方が存在しており (図 1)、核と細胞質をシャトルしていると考えられている。また、2 つの RNA 結合領域 (RRM1, 2) と 1 つの Gly リッチドメインを有している。細胞内での TDP-43 の機能として、幾つかの遺伝子の exon-skipping や mRNA の代謝に関与していることが報告されているが、詳細な機能は不明である。アルツハイマー病における神経原線維変化で見られる Tau タンパク質の異常リン酸化と同様に、ALS の病巣で蓄積している TDP-43 も異常なリン酸化を受けているが、神経細胞死に与える影響は不明のままである。

TDP-43 の主要な局在場所は核であるのに対し、ALS の病巣では細胞質に蓄積している。このことから、効率よく核と細胞質間をシャトルすることが必須であると考えられる。現在までに、TDP-43 の局在化機構の詳細は明ら

かにされておらず、局在化機構の破綻が細胞質における凝集体形成および細胞毒性に密接に関係しており、ALS の病態へと繋がっているのではないかと考え、研究を開始することにした。

核-細胞質間を効率的にシャトルするためには、TDP-43 の局在を補助・制御する相互作用タンパク質が存在するのではないかと考え、培養細胞を用いて相互作用タンパク質の探索を試みた。しかしながら、TDP-43 は界面活性剤に対する耐性が強く、免疫沈降、クロスリンク等の手法では相互作用タンパク質を同定することが出来なかった。そこで、バイオインフォマティクスに基づいた遺伝学的・生化学的な解析により、候補タンパク質 NSFL1c (p47) に同定し、このタンパク質に着目して研究を進めることにした。

## 2. 研究の目的

p47 は、370 アミノ酸からなるタンパク質で、主に核に局在しているが細胞質にも存在する。神経変性疾患との直接的な関係は報告されていないが、家族性 FTLD の原因タンパク質の 1 つである VCP と相互作用し、膜融合、核膜形成、および ER-ゴルジ体の生合成に関わっており、極めて重要なタンパク質であるといえる。

TDP-43 と p47 との相互作用を確認するために、GST プルダウンアッセイを行ったところ、野生型 TDP-43 と p47 との相互作用が確認することができた (図 2)。一方、ALS 患者由来のミスセンス変異体 TDP-43 (A315T) と p47 の相

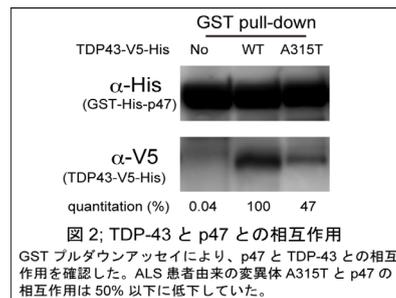


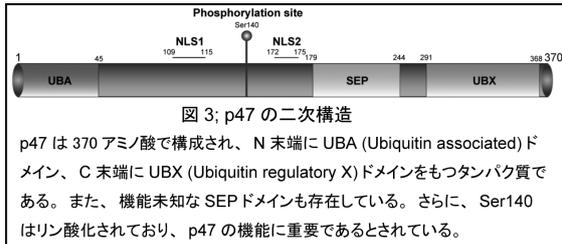
図 2: TDP-43 と p47 との相互作用  
GST プルダウンアッセイにより、p47 と TDP-43 との相互作用を確認した。ALS 患者由来の変異体 A315T と p47 の相互作用は 50% 以下に低下していた。

互作用は、野生型と比較して 50%以上低下していた (図 2)。ALS 患者由来の TDP-43 変異体と p47 の相互作用が弱まっているということは、p47 も TDP-43 と同様に ALS の病態に関わっている可能性を示唆している。そこで、『p47 による TDP-43 の局在化機構を、生化学的手法を用いて詳細に解析し、p47 の ALS 病態への関与を明らかにすること』を本研究の目的とした。

## 3. 研究の方法

(p47 と TDP-43 の相互部位の特定)

p47 は N 末端に UBA (Ubiquitin associated) ドメイン、C 末端に UBX (Ubiquitin regulatory X) ドメインを持つ (図 3)。これ



らのドメインが TDP-43 との相互作用に必要なか否かを検討し、相互作用に必要な領域を検討する。また、p47 と相互作用に必要な TDP-43 の領域を検討する。いずれも GST プルダウンアッセイにより検討を試みる。

(野生型 TDP-43 と ALS 患者由来の変異体との違い)

家族性 ALS および孤発性 ALS の患者から TDP-43 の変異が数多く特定されている。ALS 患者の病巣である運動ニューロンの細胞質に TDP-43 が蓄積して、凝集体を形成しており、リン酸化されていることが明らかにされている。しかしながら、野生型 TDP-43 と比較し、変異体の特異的に有する表現系は明確にされていない。そこで、変異 TDP-43 が特異的に有する表現系を特定し、その表現系と p47 の関わりを明らかにすることを目標とする。

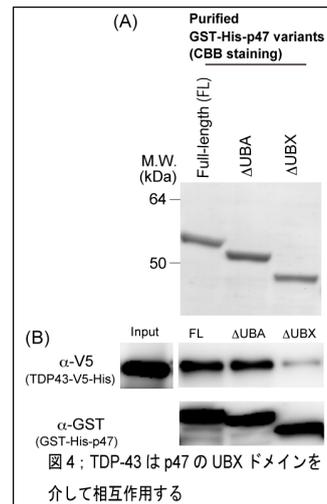
解析には、野生型 TDP-43 または家族性 ALS 患者由来の変異体 18 種を発現する発現ベクターとマウス神経芽腫細胞株 Neuro2a を用い、網羅的に解析することで、変異体特異的な表現系を特定することを試みる。

#### 4. 研究成果

(相互作用部位の特定)

GST および His タグを付加した p47 を大腸菌内で過剰発現し、Triton X-100 を含む緩衝液を用いて大腸菌細胞の抽出液を調整後、Co2+レジンを用いて精製した (図 4 (A))。また、V5 タグを付加した野生型 TDP-43 を一過的に発現させた HEK293 細胞から RIPA バッファを用いて細胞抽出液を調製した。p47 精製標品と細胞抽出液を混合して反応させた後、グルタチオンセファロースを用いてプルダウンアッセイを行ない、抗 V5 および GST 抗体で検出した (図 4 (B))。

その結果、TDP-43 は p47 の UBX ドメインを介して相互作用していることが明らかになった。一方、GST および His タグを付加させた全長 TDP-43 および欠失変異体が大腸菌で発現させて精製を試みたが、界面活性剤耐性の封入体を形成し、精製することができなかった。尿素を用いて変性条件下で精製後、リフォールディングさせて使用することを試みたが、リフォールディング後速やかに凝集したため、



解析を行なうことが不可能であった。これらのことから、TDP-43 の p47 結合部位を特定することが出来なかった。GST 融合 TDP-43 の精製条件を更に検討し、p47 との相互作用を決定する必要があると考えている。

P47 の UBX ドメインは主要な cofactor である VCP の結合部位である。VCP はタンパク質分解やオルガネラの膜融合に重要なタンパク質であり、最近、家族性 ALS の新規原因遺伝子であるとの報告がされている。VCP と同じ領域に TDP-43 が相互作用することを考えると、何らかの生理的意義があり、その相互作用の破綻が ALS 病態に影響しているのではないかと推測している。今後、p47 と TDP-43 の相互作用に関して、p47 の cofactor である VCP も併せて詳細に解析することにより、p47 が ALS の病態にどのように関与しているのかを更に検討して行きたいと考えている。

(変異体特異的に見られる表現系の探索)

はじめに、変異の導入により局在とリン酸化修飾などの翻訳後修飾に影響を及ぼすか否かを検討した。次に、凝集体形成能を比較するために、野生型 TDP-43 と変異体の界面活性剤に対する溶解度を検討した。その結果、TDP-43 への変異の導入は、局在や翻訳後修飾に影響を及ぼさないだけでなく、界面活性剤に対する溶解度にも有意な変化は見られなかった。さらに、TDP-43 の機能に着目し、exon-skipping 活性および mRNA 制御活性をモニターできるプラスミドを構築し、野生型との活性を測定した。その結果、exon-skipping 活性は野生型と変異体での差は見られなかったが、全ての変異体で mRNA の制御活性に低下が見られた。

変異 SOD1 において、タンパク質の半減期が短いものほど毒性が高く、疾患の罹病機関が短い。変異 TDP-43 は半減期が長くなっていることを示唆する報告があるが、疾患の発症や罹病機関との相関がとれておらず、TDP-43 の

半減期が疾患に関与しているか否かは不明のままである。そこで、新規合成された野生型および変異 TDP-43 を、メチオニンアナログ AHA (L-azidohomoalanine) で標識した後、AHA を Click 反応により PEG-ビオチンで修飾し、ストレプトアビジンで検出するパルス-チェイス実験法を確立させ、TDP-43 の半減期を決定した。興味深いことに、変異 TDP-43 の半減期は野生型よりも長く (図 5)、ALS の発症年

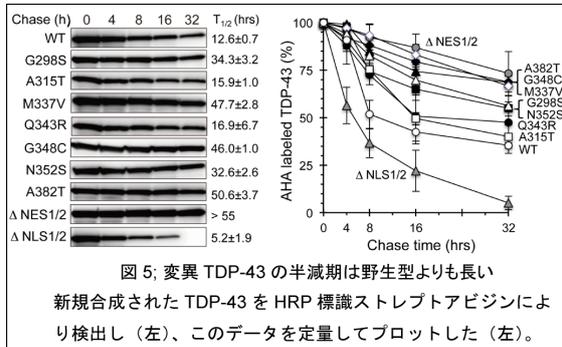


図 5; 変異 TDP-43 の半減期は野生型よりも長い  
新規合成された TDP-43 を HRP 標識ストレプトアビジンにより検出し (左)、このデータを定量してプロットした (右)。

齢と負に相関していた。一方、半減期と罹病期間には相関は見られなかった (図 6)。

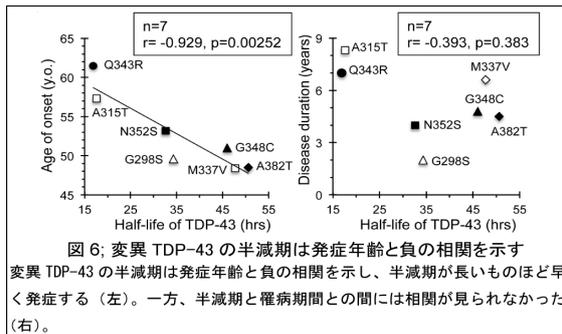


図 6; 変異 TDP-43 の半減期は発症年齢と負の相関を示す  
変異 TDP-43 の半減期は発症年齢と負の相関を示し、半減期が長いものほど早く発症する (左)。一方、半減期と罹病期間との間には相関は見られなかった (右)。

野生型 TDP-43 と変異体では、タンパク質の半減期に顕著な差が見られたことから、タンパク質の安定性が疾患の発症の鍵であると考えられる。そこで、低分子化合物 (Shield1) の添加により、タンパク質の安定性を制御できる FK binding protein の不安定化ドメインの変異体をタグ (DD tag) として TDP-43 に融合させた発現ベクターを構築した (図 7)。

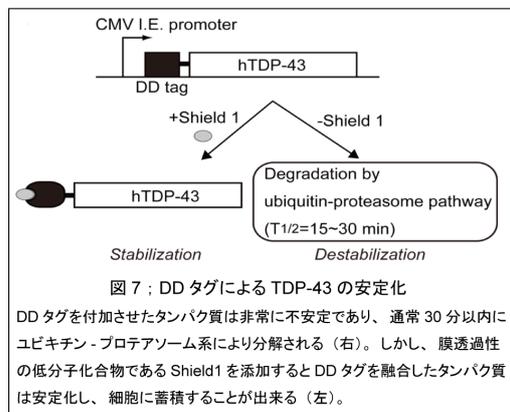


図 7; DD タグによる TDP-43 の安定化  
DD タグを付加させたタンパク質は非常に不安定であり、通常 30 分以内にユビキチン-プロテアソーム系により分解される (右)。しかし、膜透過性の低分子化合物である Shield1 を添加すると DD タグを融合したタンパク質は安定化し、細胞に蓄積することが出来る (左)。

このベクターを利用し、Shield1 の添加により細胞内で TDP-43 を特異的に安定化させ、蓄積させることを試みた。その結果、TDP-43 の切断、界面活性剤に対する溶解性の低下、および mRNA 制御活性の低下が見られた。また、TDP-43 の蓄積により、細胞内のプロテアソーム活性の低下と、細胞死が認められた。TDP-43 の安定化により惹起される生化学的異常は、ALS 病巣における TDP-43 の生化学的特性と一致する点が多く、TDP-43 の安定化が ALS 発症の最も重要な要因であることを示唆している。以上一連の解析成果を論文としてまとめ、現在、投稿している所である。

本研究により、新規性のある以下二つのことを明らかにした。

- 1) TDP-43 に変異が導入されると p47 との相互作用能が低下する。
  - 2) 変異 TDP-43 は細胞内でのタンパク質半減期が長く、ALS の発症年齢と負に相関している。
- p47 は野生型 TDP-43 との親和性が高いことから、TDP-43 の安定性に関与している可能性が考えられる。半減期の長い変異 TDP-43 ほど疾患の発症が高いことから、p47 が TDP-43 との相互作用することで、TDP-43 の安定性を制御しているのであれば疾患の発症に影響を及ぼしているということが出来る。しかしながら、p47 が TDP-43 と相互作用の分子機構および生理的意義を検討することができず、p47 の ALS 病態への関与を結論づけることが出来なかった。

p47 と TDP-43 の相互作用が TDP-43 の半減期に与える影響を検討した上で、相互作用の分子機構と生理的意義を明らかにすることが、今後の課題であると考えている。

## 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 1 件)

① Furukawa, Y., Kaneko, K., Watanabe, S., Yamanaka, K., Nukina, N.

“A seeding reaction recapitulates intracellular formation of Sarkosyl-insoluble transactivation response element (TAR) DNA-binding protein-43 inclusions.”

*Journal of Biological Chemistry.*, vol. 286(21), p.18664-72, 2011(査読あり)

[学会発表] (計 5 件)

① Shoji Watanabe., Kumi Kaneko., Koji Yamanaka.

“Familial ALS-linked TDP-43 mutations cause their protein stabilization and dysregulate mRNA metabolism.”

**22th International symposium on ALS/MND**  
Sydney (Australia), 1 December, 2011, ポスター発表

② Furukawa, Y., Kaneko, K., Watanabe, S., Yamanaka, K., Nukina, N.

“A seeding reaction recapitulates intracellular formation of Sarkosyl-insoluble transactivation response element (TAR) DNA-binding protein-43 inclusions.”

**22th International symposium on ALS/MND**  
Sydney (Australia), 1 December, 2011

③ 渡辺祥司、金子貢巳、山中宏二

“ALS病因タンパク質TDP-43変異体はmRNAの品質管理に影響を及ぼす”

**第84回日本生化学会大会**

国立京都国際会館(京都府)、2011年9月22日、ポスター発表

④ 渡辺祥司、金子貢巳、山中宏二

“ALS病因タンパク質TDP-43変異体による細胞毒性の機序”

**第83回日本生化学会・第33回日本分子生物学会年会 合同大会**

神戸ポートアイランド(兵庫県)、2010年12月8日、ポスター発表

⑤ 古川良明、金子貢巳、渡辺祥司、山中宏二、貫名信行

筋萎縮性側索硬化症に見られるTDP-43の細胞内凝集モデル構築

**第10回日本蛋白質科学会年会**

札幌コンベンションセンター(北海道)、2010年6月18日

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

出願年月日:

国内外の別:

○取得状況 (計 0 件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

取得年月日:

国内外の別:

[その他]

ホームページ等

## 6. 研究組織

(1) 研究代表者

渡辺 祥司 (WATANABE SHOJI)

独立行政法人理化学研究所・運動ニューロン変性研究チーム・研究員

研究者番号: 80462745