

令和 6 年 6 月 7 日現在

機関番号：13301

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2022～2023

課題番号：22K19398

研究課題名（和文）個体老化・加齢関連疾患の理解を目指した変性タンパク質アトラスマップの構築

研究課題名（英文）Constructing the denatured protein atlas map aimed at understanding individual aging and age-related diseases

研究代表者

城村 由和（Johmura, Yoshikazu）

金沢大学・がん進展制御研究所・教授

研究者番号：40616322

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 5,000,000円

研究成果の概要（和文）：プロテオスタシス破綻に伴う変性した異常タンパク質の蓄積が個体老化・加齢関連疾患発症の鍵の一つであることは間違いないが、なぜ加齢に伴いプロテオスタシス機能が低下するのかについては不明な点が多い。さらに重要なことに、一部の遺伝子変異に伴う神経変性疾患等を除いて、どのようなタンパク質が個体老化・加齢性疾患発症に伴い変性して異常に蓄積しているかに関する網羅的・統合的な解析は全く行われていない。

本研究では、応募者らが見出したLONRF2の多様な変性タンパク質を認識する個性的なタンパク質特性を利用することで、個体老化・加齢関連疾患において蓄積する変性した異常タンパク質群をすることに成功した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究により、変性タンパク質を網羅的に同定するためのプラットフォームを構築することができたことにより、神経変性疾患を含めた加齢性関連疾患に関与する新しい原因遺伝子の同定につながる可能性も考えられる。また、将来的には構築したプラットフォームを基に作製する変性タンパク質アトラスマップと一細胞マウスアトラスなどの網羅的遺伝子発現データを組み合わせた機械学習などの生物計算学的解析により、各臓器・細胞種ごとの加齢に伴うプロテオスタシス破綻の遷移状態を描写することも可能となり、これまでになくプロテオスタシスを標的とした老化制御法の考案につながる。

研究成果の概要（英文）：Accumulation of denatured abnormal proteins due to proteostasis collapse is undoubtedly one of the keys to individual aging and age-related disease onset. However, there are many uncertainties as to why proteostasis function declines with aging. Moreover, critically, comprehensive and integrated analyses regarding which proteins become denatured and abnormally accumulate during individual aging and age-related disease onset have not been conducted, except for neurodegenerative diseases associated with certain genetic mutations.

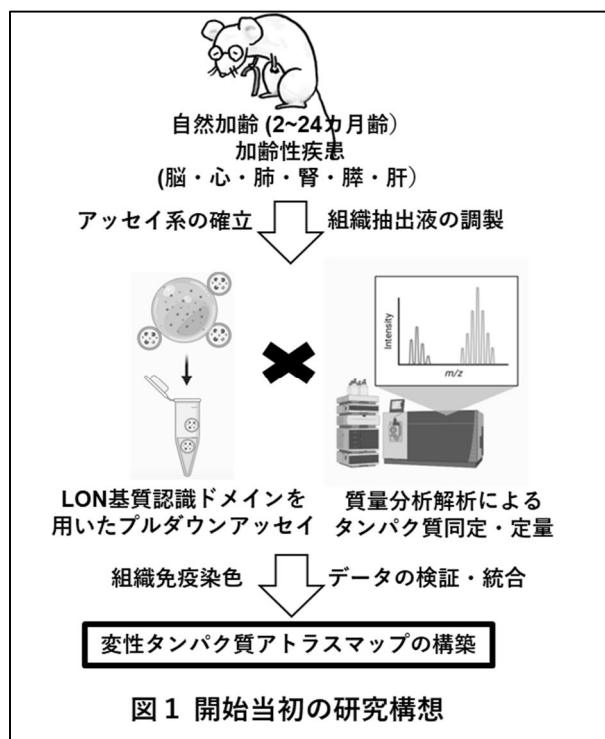
In this study, by utilizing the unique protein characteristics that recognize a variety of denatured proteins of LONRF2 discovered by the applicants, we succeeded in identifying a group of denatured abnormal proteins that accumulate in individual aging and age-related diseases.

研究分野：老化生物学

キーワード：細胞老化 個体老化 プロテオスタシス 神経変性疾患

1. 研究開始当初の背景

有史以来、人類は『ヒトはなぜ老いるのか?』という生物学的命題に対して、飽くなき探求を続けてきたが、未だ明快な回答はもちろんのこと、その手がかりすらほとんど得られていない。しかし、我々の研究を含めた最新のモデルマウスを用いた遺伝学的解析や薬理的解析から、ストレス応答の一つである細胞老化によって生じた細胞、いわゆる『老化細胞』を老齢個体から除去すると、加齢に伴う機能低下が軽減され、かつ寿命の延長も認められたことから、個体老化における老化細胞の蓄積が加齢性変化や寿命の決定、さらには動脈硬化症等の加齢関連疾患の原因に重要な役割を担っていることが明らかになりつつある。興味深いことに、研究代表者らは老化細胞特有の代謝リモデリングや炎症機能の発現には、プロテオスタシス破綻によるタンパク質凝集体の形成が鍵となることを見出した。さらに、老化細胞のタンパク質凝集体蓄積機構の解析から、機能未知であった LONRF2 がこれまでに報告がないレベルで多様な変性タンパク質を特異的に認識・分解するユビキチンリガーゼであることが分かった。



これまでプロテオスタシス破綻と個体老化に関する研究はなされていたが、個体老化・加齢性疾患に伴うプロテオスタシス機能低下メカニズムの解明や変性したタンパク質の種類の網羅的同定・定量的解析はあまり進んでいない。これらの現状と LONRF2 が有する多様な変性タンパク質を認識できる特性を踏まえて、個体老化・加齢関連疾患における各臓器の変性タンパク質アトラスマップの構築が可能であり、それによってプロテオスタシス破綻メカニズムの解明やそれを標的とした新たな創薬開発への足掛かりとなると考え、本研究構想に至った (図1)。

2. 研究の目的

近年、タンパク質の品質管理・恒常性維持機構、いわゆる『プロテオスタシス』の破綻が個体老化や様々な疾患の原因となっていることが明らかになりつつある。例えば、アルツハイマー病や加齢に伴う神経変性症の一部は、脳内の異常なタンパク質の蓄積が原因であると考えられている。また、我々の研究から個体老化の原因の一端であると考えられている細胞老化においても、タンパク質の凝集体がリソソーム内に蓄積していることを明らかにしている。このように、プロテオスタシス破綻に伴う変性した異常タンパク質の蓄積が個体老化・加齢関連疾患発症の鍵の一つであることは間違いないが、なぜ加齢に伴いプロテオスタシス機能が低下するのかについては不明な点が多い。さらに重要なことに、一部の遺伝子変異に伴う神経変性疾患等を除いて、どのようなタンパク質が個体老化・加齢性疾患発症に伴い変性して異常に蓄積しているかに関する網羅的・統合的な解析は全く行われていないのが現状である。最近になり、研究代表者らは細胞老化過程で顕著に発現が増加する新規ユビキチンリガーゼ LONRF2 を同定した。この LONRF2 は主に細胞核内に局在し、これまでに報告がないレベルで多様なモデル変性タンパク質と特異的に結合・分解できることを見出している。さらに、LONRF2 ノックアウトマウスは加齢に伴い様々な部位で神経変性が認められることから、LONRF2 ファミリーを介したプロテオスタシス制御が個体老化に大きく貢献していることが示唆された。

そこで本研究は、研究代表者らが見出した LONRF2 の多様な変性タンパク質を認識する個性的なタンパク質特性を利用することで、個体老化・加齢関連疾患において蓄積する変性した異常タンパク質群を網羅的に同定・定量し、各臓器の変性タンパク質アトラスマップを構築することを目的とした。

3. 研究の方法

LONRF2 は LON 基質結合ドメインを介してミスフォールドタンパク質を選択的に認識して、RING フィンガードメインによりユビキチン化することで、プロテアソーム依存的な分解を促進することから、非増殖性細胞のタンパク質品質管理を担う新規の E3 ユビキチンリガーゼとして機能することから、昆虫細胞 SF9 細胞から精製した FLAG-LONRF2 タンパク質 (野生型、

LON 基質結合ドメイン変異、RING フィンガードメイン変異) と多様なモデル変性タンパク質を発現する培養細胞から調製したタンパク質抽出液を用いて、プルダウンアッセイの最適化を行った。

次に、LONRF2 の基質候補を探索するために、組織発現や公表されている scRNA-seq データを再解析した。これらの解析から LONRF2 の発現が神経細胞で高いことが分かったことから、神経変性に関わるタンパク質の分解に関わるのではないかと考え、様々な神経変性関連因子を発現させた培養細胞から調製したタンパク質抽出液を用いてプルダウンアッセイを行った。

上記の検討で結合が確認された候補因子について実際に細胞内においても相互作用が認められるかを検討するために、免疫沈降法による解析も行うとともに、ユビキチン化アッセイで真の基質であるか確認した。さらに、LONRF2 ノックアウトマウスを用いて、神経変性疾患との関連性についても解析した。

さらに、LONRF2 を高発現している複数の培養細胞から調製したタンパク質抽出液を用いてプルダウンアッセイを行い、変性した異常タンパク質群の同定を試みた。

4. 研究成果

昆虫細胞 SF9 細胞から精製した FLAG-LONRF2 タンパク質(野生型、LON 基質結合ドメイン変異、RING フィンガードメイン変異) と人工変性タンパク質である FLuc-DM や AgDD を発現させた細胞から調製した細胞抽出液を用いて、様々な条件下でプルダウンアッセイを行ったところ、LON 基質結合ドメイン変異を有する FLAG-LONRF2 タンパク質においてのみ、これら人工変性タンパク質と結合できない条件を見出すことに成功した。

そこで、LONRF2 の内在性基質を探索するために、マウス組織由来のサンプルを用いて定量 PCR の解析を行ったところ、Lonrf2 は主に脳で発現していた。また、既に公表されている老化したマウスの脳から得られたデータセットの単一細胞解析では、Lonrf2 は主に成熟神経細胞で発現することも分かった(図2)。

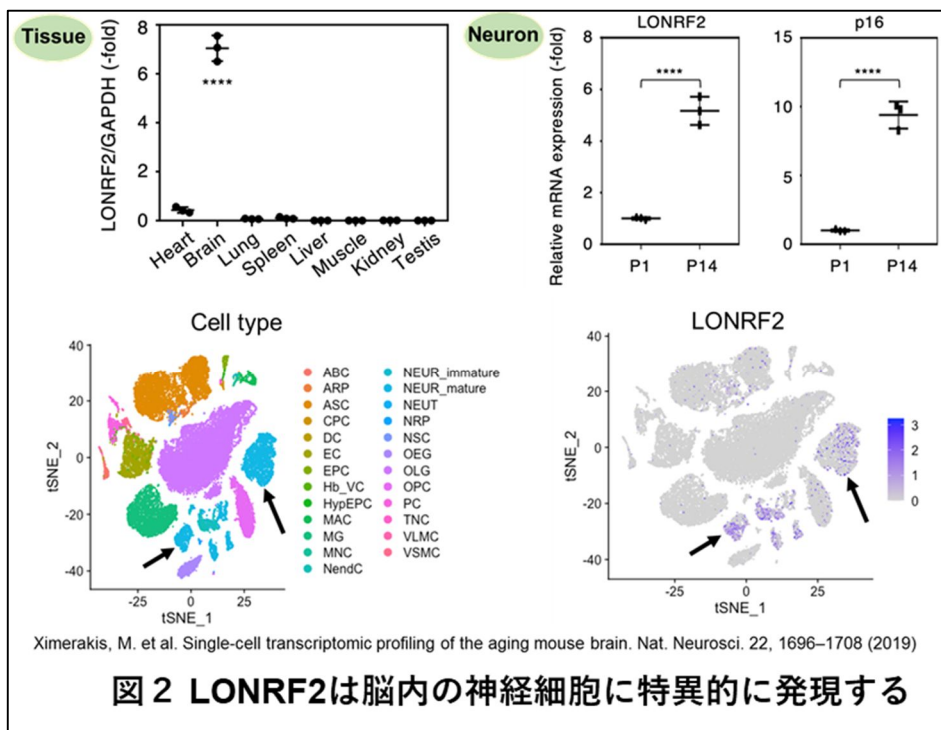


図2 LONRF2は脳内の神経細胞に特異的に発現する

TDP-43 や hnRNP M1 を含む神経細胞内のミスフォールディングタンパク質は、ALS や FTLD2 のような多くの神経変性疾患と関連していることが知られている。そこで、人工基質を用いた時と同様に様々な生化学的解析を行ったところ、LONRF2 は酸化ストレスや熱処理などのタンパク質変性条件下においてのみ TDP-43 や hnRNP M1 のユビキチン・分解を促進することが明らかになった(図3)。これに関連して、生体内における Lonrf2 の役割を明らかにするために、CRISPR/Cas9 システムにより Lonrf2 ノックアウトマウス(Lonrf2^{-/-})を作製して解析を行った。Lonrf2^{-/-}マウスは、正常なメンデル比で明らかな発育異常なしに生まれ、体重は野生型同腹子と同程度であり、18 ヶ月齢まで特に目立った表現型は確認できなかった。しかし、Lonrf2^{-/-}マウスは雌雄ともに21 ヶ月齢までに野生型と比較して年齢依存性の握力・腕力の低下とともに、ロータロッド試験解析から協調運動能や運動学習能力の低下なども認められ、短い寿命を示すことが分かった。運動ニューロン疾患である ALS は大脳の第一次(上位)運動ニューロンと脳幹の障害のみならず、脊髄の第二次(下位)運動ニューロンが障害される。そこで脊髄の免疫組織化学的解析を行ったところ、Lonrf2^{-/-}マウスの運動ニューロンの数は、生後21 ヶ月では野生型と比較して有意に減少するとともに、TDP43 凝集体陽性の運動ニューロン数も増加した。筋萎縮と神経筋接合部の欠損は ALS の典型的な特徴の一つとして知られているが、Lonrf2^{-/-}マウスの筋線維径の分布は、野生型と比較して小径にシフトしており、脱神経したアセチルコリン受容体クラスターの数が増加することが明らかになった。さらに、Lonrf2 ノックアウトマウス由来の iPS 細胞から分化誘導した運動ニューロンにアデノ随伴ウイルスベクターを

用いて Lonrf2 を過剰発現させたところ、TDP43 凝集体の減少し、細胞の生存率の増加や神経突起の伸長が認められた。これらの結果は、LONRF2 が生体内で TDP-43 のようなミスフォールディングタンパク質

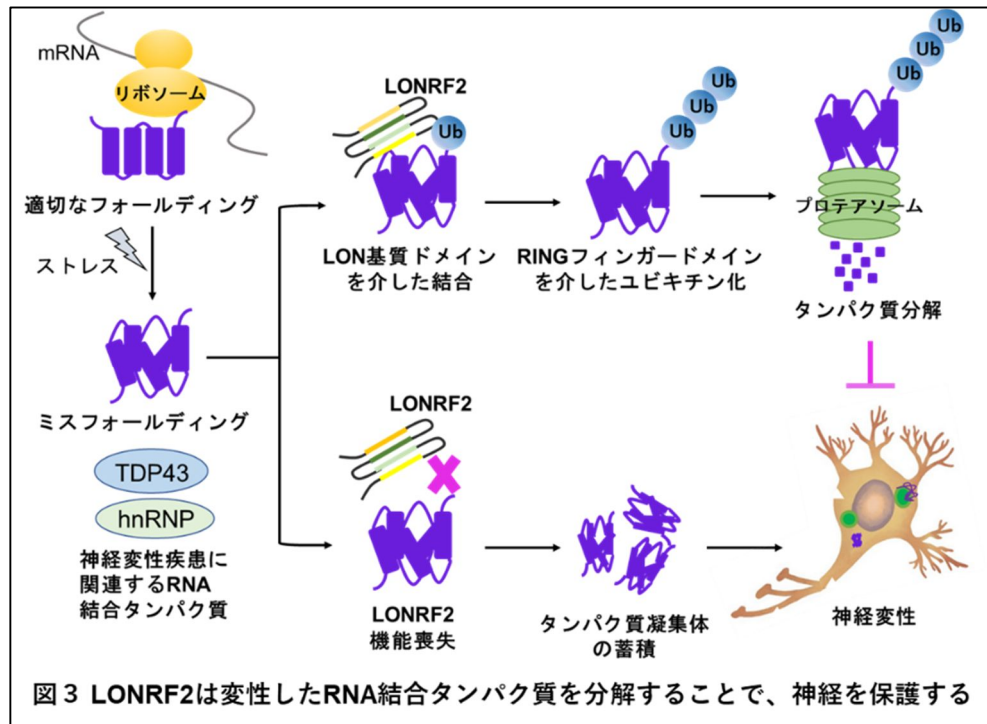


図3 LONRF2は変性したRNA結合タンパク質を分解することで、神経を保護する

を分解することがその病態発症に深く関与することを示唆している(図3)。

さらに、LONRF2を高発現している複数の培養細胞から調製したタンパク質抽出液を用いてブルダウンアッセイを行い、変性した異常タンパク質群の同定を試みたところ、遺伝子変異によって変性することが知られているいくつかのがん関連因子が見出された(未発表データ)。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

| | |
|--|---------------------------|
| 1. 著者名 Li Dan, Johmura Yoshikazu et al | 4. 巻 3 |
| 2. 論文標題 LONRF2 is a protein quality control ubiquitin ligase whose deficiency causes late-onset neurological deficits | 5. 発行年 2023年 |
| 3. 雑誌名 Nature Aging | 6. 最初と最後の頁 1001 ~ 1019 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s43587-023-00464-4 | 査読の有無 無 |
| 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 Li Dan, Wang Teh-Wei, Aratani Sae, Omori Satotaka, Tamatani Maho, Johmura Yoshikazu, Nakanishi Makoto | 4. 巻 - |
| 2. 論文標題 Transcriptomic characterization of Lonrf1 at the single-cell level under pathophysiological conditions | 5. 発行年 2023年 |
| 3. 雑誌名 The Journal of Biochemistry | 6. 最初と最後の頁 - |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1093/jb/mvad021 | 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3件（うち招待講演 3件/うち国際学会 3件）

| |
|--|
| 1. 発表者名 城村 由和 |
| 2. 発表標題 ユビキチンリガーゼLONRF2による変性タンパク質分解を介したプロテオスタシス制御 |
| 3. 学会等名 第75回日本細胞生物学会シンポジウム（招待講演）（国際学会） |
| 4. 発表年 2023年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 城村 由和 |
| 2. 発表標題 性タンパク質選択的ユビキチンリガーゼLONRF2の欠損は加齢性神経変性を引き起こす |
| 3. 学会等名 第23回日本抗加齢医学会総会（招待講演）（国際学会） |
| 4. 発表年 2023年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 城村 由和 |
| 2. 発表標題 ユビキチンリガーゼLONRF2による変性タンパク質分解を介したプロテオスタシス制御 |
| 3. 学会等名 日本生化学会北陸支部第41回大会（招待講演）（国際学会） |
| 4. 発表年 2023年 |

〔図書〕 計1件

| | |
|----------------------|-----------------|
| 1. 著者名 大森徳貴、城村由和 | 4. 発行年 2023年 |
| 2. 出版社 羊土社 | 5. 総ページ数 7 |
| 3. 書名 実験医学 41(15) | |

〔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 |
|---------|---------|
|---------|---------|