

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 10 日現在

機関番号：10101

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2011～2014

課題番号：23770215

研究課題名(和文) ALS関連タンパク質凝集体によるRNAメタボリズム変調と神経細胞死機構解析

研究課題名(英文) Analysis of neuronal cell death by ALS-associated misfolded protein aggregation with modulation of cellular RNA homeostasis

研究代表者

北村 朗 (Kitamura, Akira)

北海道大学・先端生命科学研究科(研究院)・助教

研究者番号：10580152

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：神経変性疾患の一種である筋萎縮性側索硬化症(ALS)の責任遺伝子産物としてTDP43タンパク質が知られている。本研究では、TDP43タンパク質のカルボキシル末端側断片であるTDP25からRNAが解離することにより凝集し始めることを、蛍光相関分光法を用いることで明らかにした。次に、このTDP25が全長のTDP43タンパク質を巻き込むことで、細胞内で封入体を形成することを、共焦点レーザー顕微鏡観察により明らかにした。また、TDP25を発現させた神経細胞では、全長のTDP43を発現した時よりも、細胞死が高頻度で引き起こされることがわかった。

研究成果の概要(英文)： TAR-RNA/DNA binding protein 43 kDa is a disease gene product associated with amyotrophic lateral sclerosis (ALS), a motor neuron disease. In this research, fluorescence correlation spectroscopy (FCS) measurement in cell lysate revealed that a 25 kDa carboxyl-terminal fragment of TDP43 (TDP25) formed aggregation after dissociation of RNA. Next, TDP43 was sequestered into cytoplasmic inclusion bodies of TDP25 in living cells. Neuronal cells expressing TDP25 showed higher cell death efficiency than that of TDP43. These results suggest that TDP25 may be an aggregation-causative and toxic seed, and RNA may play an important role for inhibition of aggregation-formation of TDP25.

研究分野：細胞生物学・生物物理学

キーワード：ALS タンパク質凝集体 神経変性疾患 細胞内封入体 RNA TDP43 蛍光相関分光法

1. 研究開始当初の背景

アルツハイマー病, プリオン病, ポリグルタミン病などに代表される神経変性疾患は, 神経細胞が変性することで, 運動障害, 呼吸困難, 認知症などを引き起こすと考えられており, 社会的にもきわめて影響のある疾患である [Ross C.A. & Poirier M.A. *Nat. Med.* 10, S10-17 (2004)]. なかでも, 筋萎縮性側索硬化症 (Amyotrophic lateral sclerosis; ALS) は, 筋肉と脳の情報伝達を担う神経細胞である運動ニューロンが変性することで, 重篤な運動障害, 呼吸困難を引き起こし, 死に至ることが知られている難病である [Cleveland D.W. & Rothstein J.D., *Nat. Rev. Neurosci.*, 2, 806-819 (2001), Bruijn L.I. *et al.*, *Annu. Rev. Neurosci.*, 27, 723-749 (2004)]. しかしながら現在のところ有用な治療法は存在していない.

これまでに, ALS における神経細胞死の原因として, 細胞内におけるミスフォールドタンパク質の異常凝集が着目されてきた. これまでに ALS における異常凝集を起こす原因タンパク質として SOD1 (Superoxide dismutase 1) が広く研究されてきたが [Rosen D.R. *et al.*, *Nature*, 362, 59-62 (1993), Bruijn L.I. *et al.*, *Annu. Rev. Neurosci.*, 27, 723-749 (2004)], すべての ALS が SOD1 によって引き起こされるのではないことも分かっている [Ilieva H. *et al.*, *J. Cell Biol.* 187, 761-772 (2009)]. ALS 患者の運動ニューロン内封入体から, 責任遺伝子産物として TDP43 (TAR-DNA binding protein 43-kDa) が同定された [Neumann M. *et al.*, *Science*, 314, 130-133 (2006)]. TDP43 タンパク質は, ALS 患者の運動ニューロン内でユビキチン陽性の封入体を構成する成分であり [Arai T. *et al.*, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 351, 602-611 (2006)], 核酸に結合し, なかでも mRNA のスプライシングに関与することが知られている. さらに, 家系解析により, 家族性および孤発性 ALS 患者の TDP43 遺伝子にアミノ酸置換を引き起こす変異が発見されている [Sreedharan J. *et al.*, *Science*, 319, 1668-1672 (2008)]. さらに, これらの TDP43 の変異体は SOD1 の変異体とは異なり, タンパク質の安定性が増していることが示唆されている [Ling S.C. *et al.*, *PNAS*, 107, 13318-13323 (2010)]. 以上のことから, TDP43 による ALS の原因が単純な異常凝集によることだけでなく, ささまざまな細胞内メタボリズムの変化や破たんを伴う可能性が予想されている.

2. 研究の目的

本研究の目的は, TDP43 タンパク質が細胞内の RNA を介して神経細胞毒性に与える影響を明らかにすることである. このような核酸の関与に対し, 下記の二点の仮説を考えている.

1. TDP43 タンパク質またはその C 末断片が, RNA を介して凝集し, 他の機能性タンパク質や機能性 RNA を巻き込むことで神経細胞死を引き起こす可能性 (核酸を介した TDP43 凝集の毒性獲得).

2. TDP43 の変異体が特定の細胞内 RNA メタボリズムに対し変化をもたらし, 神経細胞死を引き起こす可能性 (変異型 TDP43 タンパク質の RNA を介した神経細胞毒性発現のメカニズム).

これらの仮説を分子細胞生物学的手法ならびに蛍光イメージング手法を用いて解析することで, ALS における TDP43 を介した神経細胞死の機構を詳細に解明する.

3. 研究の方法

(1) TDP43 またはその C 末断片の細胞内封入体形成を調べるために, 蛍光イメージングを行った. GFP または RFP と融合した形で TDP43, TDP35, TDP25 をマウス神経芽細胞腫 Neuro2A において発現させた. 蛍光イメージングは, 共焦点レーザー顕微鏡を用いて行った. プロテアソーム阻害剤としては, MG-132 を終濃度 2 μ M で細胞に処理させた.

(2) TDP43 またはその C 末断片の凝集形成状態を解析するために, 蛍光相関分光法測定を行った. 上述の Neuro2A 細胞の抽出液を得た後, RNase, DNase または NaCl を添加し, 反応させて測定を行った.

(3) 細胞内に発現するマイクロ RNA 量を調べるために, TDP43-GFP または GFP-TDP25 を過剰発現させた細胞抽出液中の RNA を逆転写し鋳型とした半定量的 PCR またはリアルタイム PCR を行った.

(4) TDP25 の封入体形成と細胞死を明らかにするために, Neuro2A 細胞に GFP 融合型 TDP43 またはその C 末断片を発現させ, ヨウ化プロピジウム染色を行った後, 蛍光顕微鏡下で観察した.

4. 研究成果

(1) TDP43-GFP, GFP-TDP25 を効率よく発現できる細胞株の選定

Neuro2A 細胞に TDP43-GFP または GFP-TDP25 を一過性発現させたところ, 蛍光顕微鏡下において, GFP 由来の蛍光が観察された. このとき, TDP43-GFP の発現効率は高く, GFP-TDP25 の発現効率は低かった. これらの発現効率の違いが細胞株に依存するかどうかを調べるために, HeLa 細胞, HEK293 細胞, PC12 細胞において同様の実験を行ったところ, TDP43-GFP は全ての細胞において

効率よく発現していたものの、HEK293 細胞の発現効率が最も高く、HeLa 細胞と PC12 細胞では、GFP-TDP25 の発現効率が極めて低いことがわかった。このことより、GFP-TDP25 の発現安定性は、その細胞が持つ発現能力が関与していることが示唆された。また、これらの結果により、以降の一過性発現による実験では、Neuro2A 細胞を用いて行うこととした。また、HEK293 細胞も高い発現能力を有していたことから、GFP-TDP25 をゲノム中に 1 コピーのみ組み換え、ドキシサイクリンによって発現を誘導できる Flp-In TRex HEK293/GFP-TDP25 株を樹立した。

(2) TDP43 ならびに TDP25 の細胞内封入体形成成功率

TDP43 は ALS の運動ニューロンにおいてユビキチン陽性の封入体を形成する。これが TDP43 タンパク質のミスフォールドしやすい性質によるものかを確かめるために、Neuro2A 細胞に、TDP43-GFP を過剰発現させて、GFP の蛍光を顕微鏡観察することにより、細胞質封入体の有無を調べた。結果、TDP43-GFP は細胞質封入体をまったく形成しなかった。次に、プロテアソーム阻害剤を TDP43-GFP を発現する細胞に処理したが、アグレソーム様の封入体構造は形成されなかった。次に、TDP43 のカルボキシル末端側断片である TDP35 または TDP25 を発現させたところ、GFP-TDP25 を発現する細胞のうち、一部が細胞質封入体を形成した。一方、GFP-TDP35 は封入体を形成しなかった。これらの細胞にプロテアソーム阻害剤を処理したところ、GFP-TDP35、GFP-TDP25 共に、極めて高効率にアグレソーム様の封入体形成を認めた。また、これらの封入体構造に、ユビキチンが含まれているかを調べるために、赤色蛍光タンパク質で標識した RFP-Ubiquitin を共発現させたところ、GFP-TDP25 の封入体は、ユビキチン陽性であることがわかった。またプロテアソーム活性を阻害したときに形成されたアグレソーム様封入体は、GFP-TDP35、GFP-TDP25 共に、ユビキチン陽性であった。これらのことから、TDP43 は通常、細胞内で安定的に存在できるが、その C 末側断片である TDP35 および TDP25 はミスフォールドしやすい構造を取り、ユビキチン化されて封入体に隔離されることが明らかとなった。

次に、安定な TDP43 がどうして封入体を形成するのかを調べるために、GFP-TDP25 と TDP43-RFP を共発現させたところ、TDP25 の封入体の一部に TDP43 が共局在した。ところが、これら共発現している細胞に対しプロテアソーム阻害剤を処理すると、TDP25 封入体形成細胞の割合は増えるが、TDP43 と共局在する割合に変化は見られなかった。このことは、細胞内で封入体を形成する核となるのは TDP25 などのミスフォールディングしや

すい C 末断片であり、これらが全長の TDP43 のうち何らかの構造異常を持った一部のものだけを共に封入体へ隔離する性質があることが明らかになった。

(3) TDP25 が凝集する分子メカニズムの解析

TDP25 の凝集状態を明らかにするために、GFP-TDP25 を発現する Neuro2A 細胞を破砕し、その上清画分を蛍光相関分光法 (FCS) によって解析した。その結果、TDP25 は一部が可溶性凝集体として存在することがわかった。さらに、これらの凝集体が静電相互作用により形成されているのかを確かめるために、0.5 M NaCl 溶液を添加したところ、凝集形成率に変化は見られなかった。このことは、NaCl の濃度が少なくとも 0.5 M 程度では、凝集形成の促進も解離も起こらないことがわかった。次に、TDP25 の凝集体が DNA/RNA のような核酸と結合して形成されているのではないかと考え、上述の細胞抽出液に対し、DNase または RNase を処理した。DNase 処理では凝集性の変化は起こらなかったのに対し、驚くべきことに、RNase 処理では TDP25 が極めて高効率に凝集形成することが明らかとなった。TDP43-GFP を同様に測定したが、各処理において変化は見られなかった。このことは、TDP25 には何らかの RNA が結合しており、この RNA が TDP25 の凝集開始を抑制していることが示唆された。さらに、Neuro2A における一過性発現と共に、安定遺伝子保持株である HEK293 株でも同様の結果が得られた。

次に、これらの凝集性に対し、ALS 関連変異が影響するのかを調べるために、A315T または Q331K の ALS 関連変異を持つ TDP25 を発現させ、同様の解析を行ったところ、RNase 添加による凝集性に変化は見られなかった。このことは、ALS 関連変異の導入は、TDP25 の凝集形成能に大きな影響を与えないことが示唆された。

(4) TDP25 に結合する RNA の候補

TDP25 に結合し、凝集を抑制する RNA を探索するために、UV 架橋後の免疫沈降法について検討を行った。細胞に対し UV を照射し、細胞抽出液を得た後、ウェスタンブロットを行ったところ、TDP43-GFP は単量体のバンドよりも高分子量の位置にバンドが確認された。一方、GFP-TDP25 では、高分子量のバンド形成は見られなかった。このことから、TDP25 に結合している RNA は、他の内在性タンパク質を介して結合しているか、あるいはマイクロ RNA のような低分子量の RNA ではないかと考えられた。

次に、TDP43 に結合する RNA を模倣した (TG)₁₂ 一本鎖オリゴ DNA に AlexaFluor 647 標識したものを用意し、TDP43-GFP または

GFP-TDP25 を発現する細胞抽出液中で蛍光相互相関分光法 (FCCS)解析を行ったところ、TDP43-GFP と上述の一本鎖 DNA は結合が見られたのに対し、GFP-TDP25 では結合は見られなかった。このことは、TDP43 が認識する配列とは異なる配列を持つ RNA が TDP25 の凝集抑制に寄与している可能性が考えられる。

(5) TDP43/TDP25 とマイクロ RNA の関係性

TDP25 の封入体形成が、細胞内の RNA 恒常性に対しどのような変調を与えるのかを調べるために、TDP43-GFP または GFP-TDP43 を過剰発現させた Neuro2A 細胞におけるマイクロ RNA の発現量変化を調べた。Neuro2A 細胞の抽出液中で 4 種類のマイクロ RNA に対して、半定量的 PCR 法において増幅が得られるかを確かめたところ、miR-467d は増幅効率が良いことがわかった。そこで、この miR-467d の発現量が、TDP43-GFP または GFP-TDP25 の過剰発現により変化するのについて、リアルタイム PCR を用いて解析したところ、発現量に変化は見られなかった。その他のマイクロ RNA に対する解析も必要ではあるが、TDP25 の封入体形成による細胞内 RNA 恒常性の変化は、特異的なマイクロ RNA を介して生じているのかもしれない。

(6) TDP25 が持つ細胞毒性

TDP43-GFP、GFP-TDP35、GFP-TDP25 を発現させた Neuro2A の死細胞率をヨウ化プロピジウム染色により観察したところ、GFP-TDP25 を発現する細胞の細胞死が最も顕著に起こることがわかった。このことは、TDP43 よりも TDP25 のほうが毒性を持つことを意味しており、顕著な封入体形成効率と密接な関係があるものと考えられる。

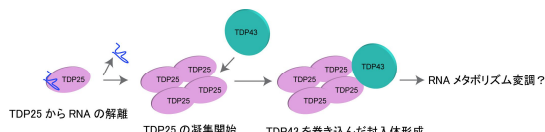


図 . TDP43 の封入体が形成される機構モデル

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 11 件)

Kitamura A., Nagata K., Kinjo M. Conformational analysis of misfolded protein aggregation by FRET and live-cell imaging techniques. *International Journal of Molecular Science*, 査読有, 16 巻, 2015, 6076-6092
DOI: 10.3390/ijms16036076

北村朗, 蛍光相関分光法と FRET を用いた細胞内タンパク質品質管理機構の解析. *バイオイメージング*, 査読有, 23 巻, 2014, 12-17

Morito D., Nishikawa K., Hoseki J., Kitamura A., Kotani Y., Kiso K., Kinjo M., Fujiyoshi Y., Nagata K., Moyamoya disease-associated protein mysterin/RNF213 is a novel AAA+ ATPase, which dynamically changes its oligomeric state. *Scientific Reports*, 査読有, 24 巻, 2014, 4442
DOI: 10.1038/srep04442

Kitamura A., Inada N., Kubota H., Matsumoto G., Kinjo M., Morimoto R.I., Nagata K., Dysregulation of the proteasome increases the toxicity of ALS-linked mutant SOD1. *Genes to Cells*, 査読有, 19 巻, 2014, 209-224
DOI: 10.1111/gtc.12125

Takano M., Tashiro E., Kitamura A., Maita H., Iguchi-Arigo M.M.S., Kinjo M., Ariga H., Prefoldin prevents aggregation of alpha-synuclein. *Brain Research*, 査読有, 1542 巻, 2014, 186-194
DOI: 10.1016/j.brainres.2013.10.034

Ohta S., Kawai-Noma S., Kitamura A., Pack C.G., Kinjo M., Taguchi H., The interaction of Hsp104 with yeast prion Sup35 as analyzed by fluorescence cross-correlation spectroscopy. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 査読有, 44 巻, 2013, 28-32
DOI: 10.1016/j.bbrc.2013.10.147

Tashiro E., Zako T., Muto H., Ito Y., Sorgjerd K., Terada N., Miyazawa M., Kitamura A., Kitaura H., Kubota H., Maeda M., Momoi T., Iguchi-Arigo M.M.S., Kinjo M., Ariga H., Prefoldin protects neuronal cells from polyglutamine toxicity by preventing aggregation formation. *Journal of Biological Chemistry*, 査読有, 288 巻, 2013, 19958-19972
DOI: 10.1074/jbc.M113.477984

Kiboku T., Katoh T., Nakamura A., Kitamura A., Kinjo M., Murakami Y., Takahashi M., Nonmuscle myosin II folds into a 10S form via two portions of tail for dynamic subcellular localization. *Genes to Cells*, 査読有, 18 巻, 2013, 90-109
DOI: 10.1111/gtc.12021

Oikawa D., Kitamura A., Kinjo M., Iwawaki T., Direct association of unfolded proteins with mammalian ER stress sensor,

IRE1beta. *PLoS One*, 査読有, 7 巻, 2012, e51290

DOI: 10.1371/journal.pone.0051290

Yamamoto H., Kakuta S., Watanabe T.M., Kitamura A., Sekito T., Kondo-Kakuta C., Ichikawa R., Kinjo M., Ohsumi Y., Atg9 vesicles are an important membrane source during early steps of autophagosome formation. *Journal of Cell Biology*, 査読有, 198 巻, 2012, 219-233

DOI: 10.1083/jcb.201202061

Kubota H., Kitamura A., and Nagata K. Analyzing the aggregation of polyglutamine-expansion proteins and its modulation by molecular chaperones. *Methods*, 査読有, 53 巻, 2011, 267-274

DOI: 10.1016/j.jymeth.2010.12.035

〔学会発表〕(計 15 件)

北村朗, ALS 関連変異型 TDP43 に見られる構造変化と核 - 細胞質輸送変調の解析, 北大細胞生物研究集会, 2015 年 3 月 3 日, 北海道大学 (北海道・札幌市)

北村朗, ALS 関連変異型 TDP43 に見られる異常切断と核 - 細胞質輸送変調の解析, 第 37 回 日本分子生物学会年会, 2015 年 3 月 3 日, 2014 年 11 月 26 日, パシフィコ横浜 (神奈川県・横浜市)

北村朗, ALS 関連 TDP43 タンパク質の細胞内構造推定, 第 6 回 光塾, 2014 年 9 月 6 日, 独立行政法人情報通信研究機構 未来 ICT 研究センター (兵庫県・神戸市)

北村朗, 生細胞蛍光イメージング法を用いた細胞生物学研究, 第 81 回 日本細菌学会・北海道支部総会, 2014 年 8 月 30 日, 札幌医科大学 (北海道・札幌市)

北村朗, 蛍光相関分光法と FRET を用いた細胞内タンパク質恒常性維持機構の解明, 第 55 回 日本植物生理学会年会, 2014 年 3 月 20 日, 富山大学 (富山県・富山市)

北村朗, プロテアソーム活性阻害からの回復過程における細胞毒性発現機構の解明, 第 36 回 日本分子生物学会年会, 2013 年 12 月 5 日, 神戸国際会議場 (兵庫県・神戸市)

北村朗, プロテアソーム活性阻害からの回復過程における細胞毒性発現機構の解明, 若手イメージング研究会, 2013 年 9 月 7 日, 東京理科大学 (千葉県・野

田市)

Akira Kitamura, RNA protects toxic aggregate-formation of a carboxyl-terminal fragment of ALS-linked TDP43 in the cytoplasm., 第 35 回 日本分子生物学会年会, 2012 年 12 月 12 日, 福岡国際会議場 (福岡県・博多市)

北村朗, ALS 関連 TDP43 タンパク質のカルボキシル末端断片の凝集体形成と毒性は RNA によって防御されている, 第 5 回 タンパク質の異常凝集とその防御・修復機構に関する研究会, 2012 年 11 月 1 日, 京都大学 (大阪府・熊取市)

北村朗, 神経変性メカニズムの統一論的解明は可能か? - SOD1, TDP43, OPTN の解析から -, 第 4 回 光塾, 2012 年 8 月 25 日, 北海道大学 (北海道・札幌市)

Akira Kitamura, Increased toxicity and aggregate formation of carboxyl-terminal fragments of ALS-linked TDP43 protein in cytoplasm, FASEB SRC "Protein Folding in the Cell" 2012 年 7 月 30 日, 「Saxtons River (アメリカ)」

北村朗, RNA protects neuronal cell death by inhibition of aggregate-formation of ALS-linked C-terminal fragment of TDP43, 第 3 回 光塾 2011 年 10 月 22 日, 「東京大学 (東京都・文京区)」

Akira Kitamura, RNA inhibits the toxicity of carboxyl-terminal fragments of ALS-causative TDP43 protein, Cold Spring Harbor Asia Meeting "Protein Homeostasis in Health and Disease", 2011 年 9 月 28 日 「蘇州 (中国)」

Akira Kitamura, Characterization of cytoplasmic and nuclear inclusion of ALS-causative TDP43 protein, 第 63 回 日本細胞生物学会大会, 2011 年 6 月 27 日, 「北海道大学 (北海道・札幌市)」

Akira Kitamura, Aggregation and disaggregation of aggregate-prone proteins: Which is toxic?, 奈良先端未来開拓コロキウム 「Protein and Organelle Dynamics under Cellular Stress Conditions」, 2011 年 5 月 30 日, 「奈良先端科学技術大学院大学 (奈良県・生駒市)」

〔図書〕(計 1 件)

北村朗, 金城政孝, エヌ・ティー・エス, FCS(蛍光相関分光法) 4 頁, 2012 年 第 4 章・5 節

〔産業財産権〕

○出願状況（計 0 件）

○取得状況（計 0 件）

〔その他〕

なし

6．研究組織

(1)研究代表者

北村 朗 (KITAMURA, Akira)

北海道大学大学院先端生命科学研究院

細胞機能科学分野・助教

研究者番号：10580152