

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 3 日現在

機関番号：17401

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2013

課題番号：24659432

研究課題名(和文) ヒト疾患関連アミロイド線維とAAA型シャペロンの相互作用

研究課題名(英文) Interaction of AAA chaperones with amyloid fibrils related to human diseases

研究代表者

小椋 光 (OGURA, Teru)

熊本大学・発生医学研究所・教授

研究者番号：00158825

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円、(間接経費) 840,000円

研究成果の概要(和文)：AAA型シャペロンVCPの変異により発症する神経変性疾患では、TDP-43の凝集体が蓄積する。VCPのTDP-43アミロイド線維への特異的結合を生化学的解析及び高速原子間力顕微鏡観察で証明した。疾患関連変異はTDP-43アミロイド線維との結合能を低下させた。ATP存在下で、VCPはTDP-43凝集体を有意に脱凝集した。線虫のVCPホモログCDC-48のN-D1リングが、ATP存在下でD2リングに対してぶるぶると震えるような回転運動をすることを高速AFMで解析し、その後、ヒトVCPについても同様の結果を得た。VCPの運動が脱凝集に働くモデルについて論じた。

研究成果の概要(英文)：Amyloid fibrils of TDP-43 accumulate in patients of neurodegenerative diseases caused by mutations in the AAA chaperone VCP. Specific interaction of VCP with TDP-43 amyloid fibrils was demonstrated biochemically and by high-speed atomic force microscopy. Disease-related mutations reduced interaction between VCP and TDP-43 amyloid fibrils. VCP showed a significant disaggregation activity of TDP-43 amyloid fibrils in the presence of ATP. High-speed AFM analysis revealed that the N-D1 ring of CDC-48, a *C. elegans* VCP homolog, repeatedly rotates clockwise and resets against the D2 ring. A similar result was obtained with human VCP. Based on these observations, we have proposed that repeated back and forward rotations of VCP may account for mechanical force in disaggregation.

研究分野：医歯薬学

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：AAA型シャペロン VCP 神経変性疾患 TDP-43 アミロイド線維 高速原子間力顕微鏡

1. 研究開始当初の背景

近年、異常タンパク質が蓄積して発症する神経変性疾患が多数同定され、タンパク質のコンフォメーション病あるいはフォールディング病という一般概念が確立しつつある。しかしながら、個々の疾患で蓄積している異常タンパク質やそれを引き起こす原因因子についての知見にもかかわらず、それらの疾患を予防・治療する戦略はまだ極めて乏しい。神経変性疾患との関係が注目されている因子として、タンパク質の一生に深く関わる分子シャペロンがある。私たちは AAA 型シャペロン p97 (ヒトでは VCP) に着目し、これがポリグルタミンの凝集抑制に働くことを明らかにしてきた。VCP は、骨パジェット病と前頭側頭葉型認知症を伴う封入体筋炎 (IBMPFD) 及び筋萎縮性側索硬化症 (ALS) の原因因子として同定され、いずれの疾患においても RNA 結合タンパク質 TDP-43 が蓄積することから、その関連性が注目される。VCP は、その他の神経変性疾患において蓄積している異常タンパク質とも共局在することが報告され、多くの神経変性疾患と関わる可能性がある。

2. 研究の目的

異常タンパク質が蓄積して発症する神経変性疾患のうち、ともに RNA 結合タンパク質 TDP-43 の蓄積が認められる筋萎縮性側索硬化症及び骨パジェット病と前頭側頭葉型認知症を伴う封入体筋炎の原因因子として AAA 型シャペロン VCP が同定されている。VCP が TDP-43 アミロイド線維を脱凝集する活性をもつという仮説を検証する。また、A や -シヌクレインなど他の種々のアミロイド線維との相互作用も解析する。

3. 研究の方法

VCPがTDP-43アミロイド線維を脱凝集するという仮説を検証するため、以下の解析を行う。

(1) VCPのTDP-43凝集体との相互作用：

種々のTDP-43を調製し、それらの凝集体形成について、in vitroで凝集の経時変化等を解析し、凝集体の形状を電子顕微鏡 (TEMとSEM) やAFMで観察する。種々のTDP-43凝集体について、VCPが結合するかどうかをin vitroの系で解析し、結合の様子を高速AFMで観察する。VCPがTDP-43アミロイド線維の何を認識して結合しているのかについて明らかにするため、欠失変異や部位特異的変異体を用いた解析を行う。

(2) VCPによるTDP-43凝集体の脱凝集の解析：VCPがATP依存的にTDP-43アミロイド線維を脱凝集するという仮説を検証する。

TDP-43アミロイド線維に及ぼすVCPの効果のアミロイド線維特異的蛍光色素の蛍光強度の経時変化を測定して、解析する。

VCPによるTDP-43アミロイド線維の脱凝集過程の詳細を高速AFMにより観察する。これにより、VCPの脱凝集反応が、線維の末端など特定の部位から起こるのか、あるいはランダムに起こるのか等について明らかにする。VCPについてTDP-43アミロイド線維の脱凝集作用が認められない場合には、種々のアダプタータンパク質、HSP70シャペロン系の共同作用、VCPとHsp104/C1pBのキメラの脱凝集活性等について検討を行う。

(3) 種々のアミロイド線維とVCPの相互作用：

VCPはTDP-43以外にもA や -シヌクレイン、Sup35などのアミロイド線維に結合する。しかし、これらのアミロイド線維との相互作用はTDP-43アミロイド線維との相互作用とは性質が異なる。この違いが何に依るのかを明らかにする。高速AFMでATP存在下でのアミロイド線維とVCPの構造変化を観察する。

4. 研究成果

AAA 型シャペロン VCP の変異により、筋萎縮性側索硬化症や前頭側頭葉変性症を発症することが分かっており、患者では RNA 結合タンパク質 TDP-43 の凝集体の蓄積が認められる。TDP-43 アミロイド線維に VCP が特異的に結合することを生化学的解析で証明し、その様子を高速原子間力顕微鏡で観察した (図 1)。筋萎縮性側索硬化症や前頭側頭葉変性症を発症する VCP 変異体について TDP-43 アミロイド線維との結合を調べたところ、これらの変異体では結合能が大幅に低下することが分かった (図 2)。これらの変異 VCP を高速 AFM で観察したところ、野生型に比べイメージが不鮮明であることが分かった。おそらく N ドメイン等が不安定で揺らぎが大きいものと推察される。また、VCP の N 末端ドメインは多くの基質に対する基質結合ドメインと考えられている

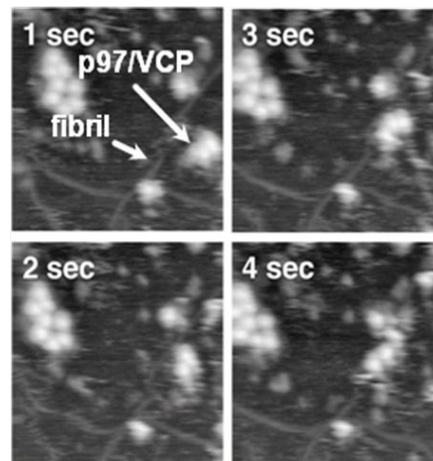


図 1 .VCP の TDP-43 線維への結合過程の連続 AFM 画像

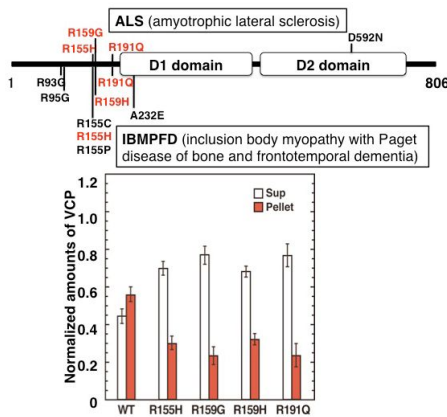


図 2 . 疾患関連変異の位置 (上) と変異体の TDP-43 アミロイド線維への結合活性 (下)

るが、N ドメイン欠失変異体は予想したように結合能が低下した。

次に、VCP が TDP-43 アミロイド線維を脱凝集するかどうかについて検討した。その結果、ATP 存在下で、VCP による TDP-43 凝集体の有意な脱凝集を認めた (図 3)。また、ATP S でも ATP よりは弱いながら、脱凝集活性を認めた。脱凝集活性については再現性のある結果を得ているが、現在のところ活性は弱く、その効率を上げる条件 (アダプターの探索) や活性を精度よく測定する条件を検討している。これらの結果から、VCP は TDP-43 アミロイド線維に結合し、ATP 依存的に脱凝集する可能性が示唆された。

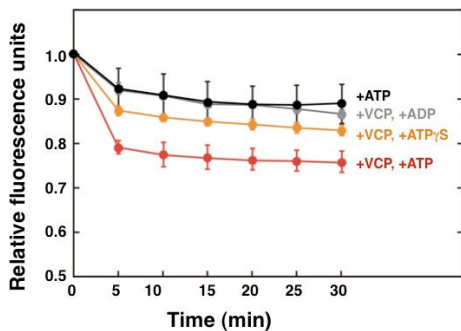


図 3 . VCP による TDP-43 アミロイド線維の脱凝集

線虫由来の VCP ホモログ CDC-48 について ATP 存在下で N-D1 リングの D2 リングに対する回転運動を高速 AFM で解析し、その結果を Structure 誌に発表した (図 4)。その後、ヒト VCP についても同様の結果を得た。Structure 誌の論文の中で、VCP のぶるぶると震えるような運動がアミロイド線維等凝集体の脱凝集に働くモデルについて論じた。脱凝集反応の高速 AFM による可視化にはまだ成功していない。

以上の結果より、筋萎縮性側索硬化症や前頭側頭葉変性症を発症する VCP 変異体は、TDP-43 アミロイド線維への結合能が低下し、これらの疾患を発症する可能

性が示唆された。

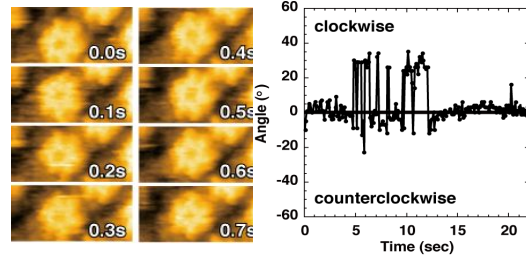


図 4 . AAA 型シャペロン p97/CDC-48 の連続 AFM 画像 (左) と対称軸の継時的角度変化 (右)

## 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)

Noi, K., Yamamoto, D., Nishikori, S., Arita-Morioka, K., Kato, T., Ando, T., and Ogura, T. High-speed atomic force microscopic observation of ATP-dependent rotation of the AAA+ chaperone p97. Structure 21, 2013 査読有、1992-2002, 10.1016/j.str.2013.08.017. Epub 2013 Sep 19.

[学会発表](計 10 件)

Ogura, T., Noi, K., Okuno, T., Arita-Morioka, K., Yamamoto, D., Okawa, A., Tsuchiya, H., Saeki, Y., Ando, T., Esaki, M., and Yamanaka, K. Dynamics of p97 and the 26S proteasome in action revealed by high-speed atomic force microscopy. EMBO Workshop on AAA+ Proteins: from mechanism and disease to targets, 15-19 September, 2013, Neuss, Germany.

Yamanaka, K., Murayama, Y., and Ogura, T. Functional analysis of disease-associated mutant CDC-48/p97/VCP in *C. elegans*. EMBO Workshop on AAA+ Proteins: from mechanism and disease to targets, 15-19 September, 2013, Neuss, Germany.

Noi, K., Arita-Morioka, K., Ogi, H., Hirao, M., and Ogura, T. Biochemical analysis of molecular mechanisms of the interaction between VCP/p97 and amyloid fibrils of TDP-43. EMBO Workshop on AAA+

Proteins: from mechanism and disease to targets, 15-19 September, 2013, Neuss, Germany.

野井 健太郎, 有田-森岡 健一, 小椋光 : 分子シャペロン VCP/p97 と TDP-43 アミロイド線維の相互作用の分子機構の解析. 第 13 回日本蛋白質科学会年会, 6月12日-14日 2013、鳥取市、とりぎん文化会館.

Ogura, T., Noi, K., Arita-Morioka, K., Yamamoto, D., Ando, T., Nishikori, S., Esaki, M., and Yamanaka, K. AAA chaperones, focusing on the molecular mechanism of p97. EMBO Conference The biology of molecular chaperones: From molecules, organelles and cells to misfolding diseases, 17-22 May, 2013, Santa Margherita de Pula, Italy.

野井 健太郎, 有田-森岡 健一, 小椋光 : 分子シャペロン VCP/p97 と TDP-43 アミロイド線維の相互作用の分子機構の解析. 第 85 回日本生化学会大会, 12月14日-16日 2012、福岡, マリンメッセ福岡.

Noi, K., Yamamoto, D., Arita-Morioka, K., Nishikori, S., Ando, T., and Ogura, T. High-speed atomic force microscopy of ATP-dependent rotational movements of p97/VCP and its interaction with amyloid fibrils of TDP-43. 3rd Kanazawa Bio-AFM Workshop, 11月05日-11月08日 2012年、金沢、KKR Hotel Kanazawa.

〔図書〕(計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等

熊本大学発生医学研究所分子細胞制御分野のホームページ

<http://mukb.medic.kumamoto-u.ac.jp/fukusei/index.html>

熊本大学発生医学研究所分子細胞制御分野 AAA ホームページ

<http://mukb.medic.kumamoto-u.ac.jp/AAA/aaainfo.html>

熊本大学発生医学研究所のホームページ

<http://www.imeg.kumamoto-u.ac.jp/index.html>

6 . 研究組織

(1)研究代表者

小椋 光 (OGURA, Teru)

熊本大学・発生医学研究所・教授  
研究者番号 : 00158825