

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 24 日現在

機関番号：82611

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25461302

研究課題名(和文)mRNA輸送障害に基づくTDP-43関連疾患発症機序の解明

研究課題名(英文)Pathogenesis of TDP-43 proteinopathy based on the transport defect of target mRNA

研究代表者

長野 清一(Nagano, Seiichi)

国立研究開発法人国立精神・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

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：筋萎縮性側索硬化症、前頭側頭葉変性症の神経細胞ではRNA結合蛋白質TDP-43の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の供給不足を通じて同疾患を発症すると考え、TDP-43の輸送標的としてリボソーム蛋白質(Rp)mRNAを同定した。本研究ではRp mRNAが非翻訳領域を介してTDP-43と結合し両者は神経突起内で共局在すること、TDP-43の発現低下により神経突起の伸長が阻害されその際神経突起でのリボソーム機能の低下がみられること、神経突起内へ移入されたRpは内在性リボソームにアセンブリされることを検証した。

研究成果の概要(英文)：Abnormal deposition of an RNA-binding protein TDP-43 is a hallmark in neurons of amyotrophic lateral sclerosis (ALS) and frontotemporal lobar degeneration (FTLD-U). We hypothesized that mRNA transport to neurites by TDP-43 is disturbed by deposition of the protein and failure of a specific mRNA transport is associated with ALS/FTLD-U pathogenesis, and identified mRNA of ribosomal proteins (Rp) as targets for TDP-43-mediated transport. We have proven in this study that Rp mRNA binds TDP-43 through its untranslated region and co-localizes with the protein in neurites. Down-regulation of TDP-43 expression disrupted neuritic extension and local ribosomal function. Moreover, exogenously introduced Rp was assembled into endogenous ribosomes.

研究分野：神経内科学

キーワード：TDP-43 mRNA 神経突起輸送 筋萎縮性側索硬化症 前頭側頭葉変性症

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) では RNA 結合蛋白質である TAR-DNA binding protein (TDP) -43 が病変部位の神経細胞内に異常凝集、沈着することが知られている。TDP-43 は核内での遺伝子の転写や pre-mRNA のスプライシングの制御に加え、核外での mRNA の輸送に関与することが推測されている。我々は TDP-43 の異常沈着によりその軸索への特定の mRNA の輸送機能が障害され ALS/FTLD-U における神経変性が生じる可能性を考え、培養神経細胞を用いた検討により TDP-43 の輸送標的 mRNA 候補としてリボソーム蛋白質 (Rp) mRNA を同定した。このことは ALS/FTLD-U では TDP-43 の機能障害により Rp mRNA の軸索への輸送が障害され、それにより軸索でのリボソームによる全般的な蛋白質合成能が低下して神経変性が生じる可能性を示唆している。

2. 研究の目的

そこで本研究では TDP-43 が軸索への Rp mRNA の輸送と軸索局所でのリボソームによる蛋白質合成能の制御に関与しているか、TDP-43 の発現低下によりリボソーム機能を介した軸索の形成に障害が生じるか、これらの障害が Rp の発現上昇により軽減されるか、を初代神経培養細胞、神経特異的 TDP-43 遺伝子欠損マウスを用いた解析により検証した。

3. 研究の方法

マウス大脳皮質神経細胞を培養し、軸索での Rp mRNA および TDP-43 蛋白質の局在をそれぞれ in situ hybridization、免疫染色により観察した。また同神経細胞に対してファージ蛋白質 MS2 と Venus との融合蛋白質および MS2 により認識される RNA 配列を組み込んだリボソーム蛋白質 cDNA の発現プラスミド

を共発現させ、Rp mRNA の軸索での局在を可視化した。また Neuro2a 細胞に対して Myc タグを融合したヒト TDP-43 cDNA および Rp cDNA の発現プラスミドを共発現させ、抗 Myc 抗体を用いて TDP-43 を免疫沈降した上で沈降物中の Rp mRNA 量を PCR により定量し、TDP-43 蛋白質と Rp mRNA との結合を解析した。

次にマウス大脳皮質培養神経細胞に対し shRNA レンチウイルスベクターを用いて TDP-43 の発現を低下させ、その際の神経突起伸長の程度を定量するとともに、神経突起区画のみをピューロマイシン標識し、そこでの新規の蛋白質合成能を検出した。さらに大脳皮質培養神経細胞の神経突起区画のみに TAT 配列を付加した Rp を加えて同部位での内在性リボソームとのアセンブリの有無を検証した。

また TDP-43 flox マウスと Enolase2-Cre マウスとの交配により神経細胞特異的に TDP-43 を欠損したマウスを作成し、その大脳白質をレーザーマイクロダイセクションにより採取し、RNA を抽出して Rp mRNA の定量 PCR を行い、対照マウスと比較した。さらに同マウス由来の大脳皮質神経細胞を培養し、神経突起伸長の程度や新規蛋白質合成能を前述と同様の方法により解析した。

4. 研究成果

マウス大脳皮質神経細胞において Rp mRNA は神経突起内で TDP-43 と共局在して移動していた。Rp mRNA は TDP-43 と結合するがその非翻訳領域の欠失により TDP-43 との結合は減少しその神経突起内での量も減少した。このことより Rp mRNA の神経突起への輸送に TDP-43 が重要な働きを果たしていることが推測された。

TDP-43 の発現を低下させた大脳皮質神経細胞では神経突起伸長が阻害され、その際神経突起での局所蛋白質合成能の低下がみられ、神経突起におけるリボソームの機能障害

が起きていることが示唆された。

大脳皮質神経細胞の神経突起区画に TAT 配列を付加した Rp を加えたところ、TAT-Rp は神経突起へ取り込まれて内在するリボソームと共局在した。TAT 配列のみではこのような神経突起への取り込みは起こらず、神経突起に存在する Rp は内在性リボソームへアセンブリされることが確認された。

神経細胞特異的 TDP-43 欠損マウスの大脳白質は対照マウスと比較して形成が不良でそこでの Rp mRNA 量は低下傾向であった。さらに同マウス由来の大脳皮質神経細胞は神経突起の伸長が悪く、神経突起でのリボソームによる局所蛋白質合成能も低下していた。

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1件)

Nagano S, Takahashi Y, Yamamoto K, Masutani H, Fujiwara N, Urushitani M, Araki T. A cysteine residue affects the conformational state and neuronal toxicity of mutant SOD1 in mice - Relevance to the pathogenesis of ALS. *Hum Mol Genet* 24, 3427-3439, 2015. 査読有. DOI: 10.1093/hmg/ddv093

[学会発表](計12件)

Nagano S, Hirokawa S, Nishizawa M, Sakimura K, Onodera O, Araki T. TDP-43 transports mRNA of ribosomal proteins. 第38回日本分子生物学会年会、第88回日本生化学会大会合同大会. 2015年12月1日~12月4日. 神戸ポートアイランド. 神戸.

長野清一、高橋陽子、山本和弘、増谷 弘、藤原範子、漆谷 真、荒木敏之. 銅を介した変異 SOD1 の運動神経変性はシステイン残基に依存する. メタルバイオサイエンス研究会

2015(招待講演). 2015年8月27日~8月28日. 名古屋国際センター. 名古屋.

Nagano S, Takahashi Y, Yamamoto K, Masutani H, Fujiwara N, Urushitani M, Araki T. Role of cysteine residue of mutant SOD1 in the pathogenesis of ALS. 第38回日本神経科学大会. 2015年7月28日~7月31日. 神戸国際会議場・神戸国際展示場. 神戸.

Nagano S, Hirokawa S, Nishizawa M, Sakimura K, Onodera O, Araki T. TDP-43 transports mRNA of ribosomal proteins. 第56回日本神経学会学術大会. 2015年5月20日~5月23日. 新潟コンベンションセンター. 新潟.

Nagano S, Yamamoto K, Urushitani M, Fujiwara N, Araki T. Role of cysteine residue of mutant SOD1 in the pathogenesis of ALS. 25th International Symposium on ALS/MND. 2014年12月5日~12月7日. Square Brussels Meeting Centre, Brussels, Belgium.

Nagano S, Araki T. Identification of target mRNA transported to axons by TDP-43. 国立精神・神経医療研究センター マックスプランク合同シンポジウム(招待講演). 2014年11月5日~11月7日. ザ・プリンス箱根. 箱根.

Nagano S, Hirokawa S, Nishizawa M, Sakimura K, Onodera O, Araki T. Identification of target mRNA transported to axons by TDP-43. 第37回日本神経科学大会. 2014年9月11日~9月13日. パシフィコ横浜. 横浜.

長野清一、山本和弘、漆谷 真、荒木敏之. 変異型 SOD1 の運動神経変性におけるシステイン残基の役割. 第55回日本神経学会学術大会. 2014年5月21日~5月24日. 福岡国際会議場・福岡サンパレス・福岡国際センター. 福岡.

長野清一、荒木敏之 . TDP-43 による翻訳関連遺伝子 mRNA の神経突起への輸送 . 第 32 回日本認知症学会学術集会 . 2013 年 11 月 8 日～11 月 10 日 . キッセイ文化ホール . 松本 .

Nagano S, Araki T. Identification of mRNA transported to axons by TDP-43. 第 4 回新潟大学脳研究所共同研究拠点国際シンポジウム . 2013 年 7 月 27 日～7 月 28 日 . 新潟大学脳研究所 . 新潟 .

Nagano S. Identification of mRNA targeted to axons by TDP-43. 新潟脳神経研究会特別例会 (招待講演) . 2013 年 6 月 3 日 . 新潟大学脳研究所 . 新潟 .

長野清一、荒木敏之 . TDP-43 による翻訳関連遺伝子 mRNA の神経突起への輸送 . 第 54 回日本神経学会学術大会 . 2013 年 5 月 29 日～6 月 1 日 . 東京国際フォーラム . 東京 .

〔図書〕(計 1 件)

Nagano S, Araki T. Novel aspects of amyotrophic lateral sclerosis. InTech in press, 2016.

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

取得状況 (計 0 件)

〔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)

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 : 4 0 3 6 2 7 2 7

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者

永井 義隆 (NAGAI, Yoshitaka)

大阪大学大学院・医学系研究科神経難病認知症探索治療学寄附講座・教授

研究者番号 : 6 0 3 3 5 3 5 4