



RNA がタンパク質の凝集を抑制し神経細胞毒性を低減する —筋萎縮性側索硬化症（ALS）の神経細胞死機構を解明—

研究成果のポイント

- ・核タンパク質 TDP43 が切断された直後に細胞質へと移行することを直接的に見いだした。
- ・RNA 分子によってタンパク質の凝集形成が抑制されていることを発見。
- ・核内ではなく細胞質に存在するタンパク質の凝集が神経細胞死を誘導することを発見。

研究成果の概要

筋萎縮性側索硬化症（ALS）は、進行性の神経変性疾患であり、筋肉に指令を与える運動神経細胞が特異的に変性・脱落します。ALS において、細胞内におけるタンパク質封入体を形成する原因遺伝子産物として TDP43 というタンパク質が知られています。また ALS 患者の運動ニューロン内にあるタンパク質封入体には、この TDP43 のカルボキシル末端断片が含まれることも知られています。本研究では、蛍光イメージング法及び単一分子感度を有する蛍光相関分光法を用いることで、TDP43 が切断されると速やかに核から細胞質へ移行することに加え、TDP43 のカルボキシル末端断片の一つである TDP25 の毒性を持つ凝集体形成が RNA により抑制されていることを発見しました。さらに、この TDP25 の凝集体は細胞質において細胞毒性を持つことが示唆されました。この成果は、ALS 病態におけるタンパク質の新たな凝集体及び封入体形成経路を見いだしたものです。また、RNA が ALS 病態解明並びに進行抑制治療における重要なターゲットであると考えられます。

本研究の全ての成果は、北海道大学大学院先端生命科学研究所細胞機能科学分野（金城政孝教授）において、北村 朗助教を中心として、当該研究室において行われたものであり、Scientific Reports 誌に掲載されました。

なお、本研究は、日本学術振興会科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）基盤研究 C、若手研究 B、及び国立研究開発法人日本医療研究開発機構（AMED）医療分野研究成果展開事業先端計測分析技術・機器開発プログラムの助成により行われました。

論文発表の概要

研究論文名：Interaction of RNA with a C-terminal fragment of the amyotrophic lateral sclerosis-associated TDP43 reduces cytotoxicity（筋萎縮性側索硬化症関連 TDP43 タンパク質の C 末端断片と相互作用する RNA が細胞毒性を減少させる）

著者：北村 朗⁽¹⁾，中山祐作⁽²⁾，柴崎 愛⁽²⁾，滝 彩実⁽²⁾，油野祥子⁽²⁾，竹田佳世⁽³⁾，矢原真郎⁽²⁾，田辺尚貴⁽³⁾，金城政孝⁽¹⁾

1) 北海道大学大学院先端生命科学研究所細胞機能科学分野

2) 北海道大学大学院生命科学院生命融合科学コース

3) 北海道大学理学部生物科学科（高分子機能学専修）

公表雑誌：*Scientific Reports*（Nature Publishing Group によるオープンアクセス誌）

公表日：日本時間（現地時間）2016 年 1 月 13 日（水）午後 7 時（英国時間 2016 年 1 月 13 日（水）午前 10 時）（オンライン公開）

研究成果の概要

（背景）

筋萎縮性側索硬化症（ALS）を含む神経変性疾患は、ヒトの体内に存在する神経細胞が変性・脱落することにより生じる病気です。神経細胞が変性・脱落するとその神経が担っていた恒常的な機能に変調をきたすことから、認知症や筋肉制御機能の低下・消失などの症状が見られるようになります。アルツハイマー病、パーキンソン病など様々な神経変性疾患が知られている中で、ALS は筋肉に対して指令を与える役割を担う運動神経細胞が特異的に変性・脱落することにより、歩行や呼吸が困難となる病気です。ALS における原因遺伝子産物^{注1}として、TDP43^{注2}が知られていますが、この TDP43 及びそのカルボキシル末端断片は ALS 患者の運動神経内におけるタンパク質の封入体^{注3}を構成する成分として同定されています。また、TDP43 は主に核に局在していますが、メッセンジャーRNA^{注4}や低分子 RNA^{注5}などの細胞内で重要な働きを持つ RNA 分子と結合し、それらを成熟させるのに必須のタンパク質であることが知られています。そこで我々は、TDP43 からそのカルボキシル末端断片を生成した後、細胞内で封入体を形成する過程を可視化することに加え、一分子感度を持つ蛍光測定技術である蛍光相関分光法^{注6}を用いることで、細胞内における封入体形成と共に神経細胞を死に至らしめる機構を調べることにしました。

（研究手法）

蛍光タンパク質を融合した TDP43 を発現させたマウス神経芽細胞腫（Neuro2A）に対して、TDP43 を切断することが知られているカスパーゼ 3 の活性化処理を行った上で、蛍光タイムラプスイメージング法^{注7}を用いて TDP43 の切断と細胞内局在変化を観察しました。次に、TDP43 のカルボキシル末端断片の一つである TDP25 に蛍光タンパク質を融合した形で発現させた Neuro2A の細胞抽出液に RNA 分解酵素（RNase）を処理した後、蛍光相関分光法または蛍光相互相関分光法^{注8}を用いてそれらのタンパク質の凝集形成状態を解析しました。さらに、TDP43 が核において切断された直後の状態を作り出すために、核局在化シグナル配列^{注9}を付加した TDP25 を発現する Neuro2A 細胞において、TDP25 と死細胞率を比較しました。

（研究成果）

蛍光タイムラプスイメージングの結果、TDP43 はカスパーゼ 3 の活性化が起こると平均 3 分以内に切断され、核から細胞質への移行が始まることがわかりました。また、この細胞質への移行の後、

TDP43 のカルボキシル末端断片のみが細胞質で封入体を形成しやすい性質を持つことが確認されました。次に、TDP25 に結合する RNA が細胞内に存在しており、この RNA が TDP25 の凝集体形成を抑制していることを世界で初めて見いだしました。また、この RNA の種類は未特定ではあるものの、TDP43 が認識する RNA とは異なる配列を持つものであることが示唆されました。さらに、この RNA により凝集体形成が抑制される効果は、他の ALS 原因遺伝子産物である SOD1^{注10} や FUS/TLS^{注11} では見られず、TDP25 特異的な現象であることを見いだしました。さらに、核局在化シグナル配列を付加した TDP25 は TDP25 よりも低い死細胞率を示すことを明らかにしました。このことは、タンパク質凝集体が細胞質に存在することが神経細胞死につながることを示すと共に、TDP43 が切断されたとしても核内に留め置くことにより、神経細胞死を回避できる可能性を示しました。

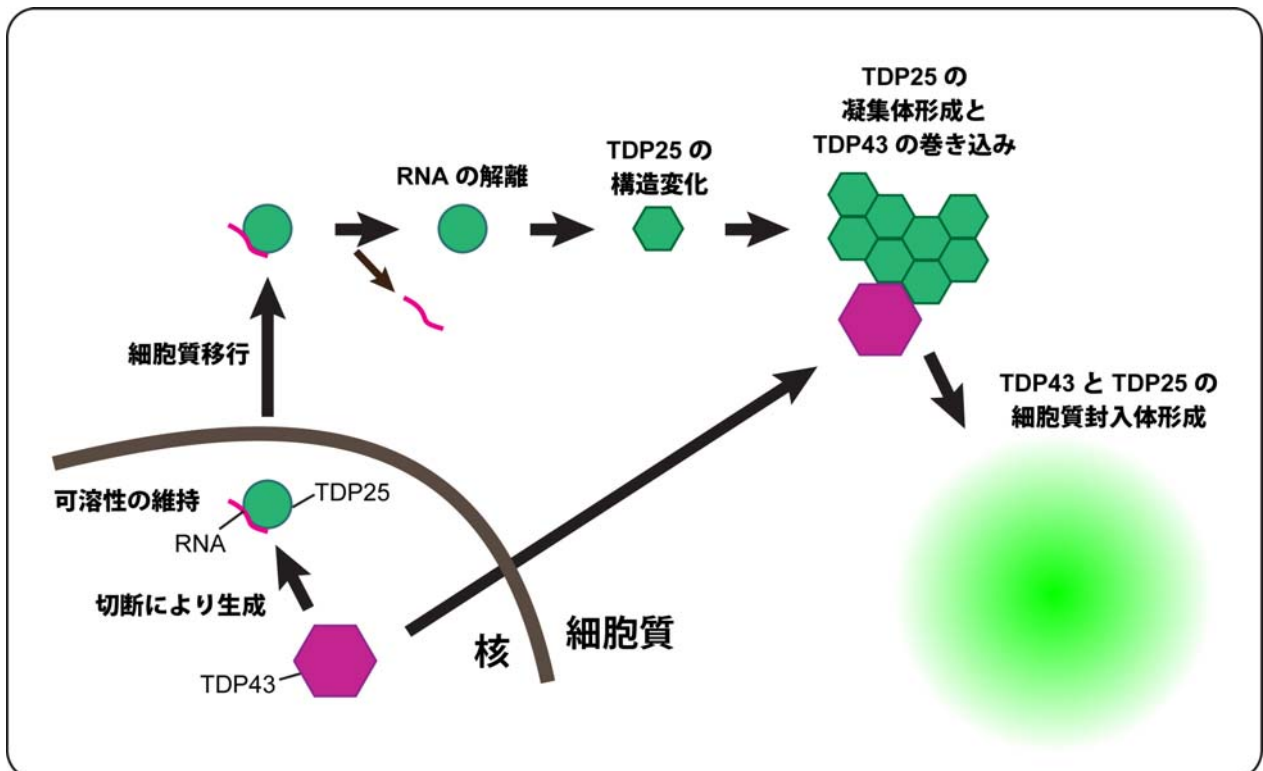


図. TDP43 から TDP25 が生成し細胞質封入体を形成する機構

(今後への期待)

本成果は、ALS の原因遺伝子産物である TDP43 の RNA を介した凝集体及び封入体形成機構を明らかにしたものです。これまでタンパク質の凝集体形成は単独に起こるものと考えられてきましたが、本研究の成果により RNA が積極的に凝集体形成に関わることが示されたことで、凝集体形成と神経細胞死の関係をより詳細に明らかにするための布石となると考えられます。また、ALS 原因タンパク質の凝集体形成を抑制する RNA を今後見つけることができれば、細胞内におけるタンパク質凝集体の生理的抑制機構を明らかにできると共に、当該配列を持つ RNA 分子が新たな ALS 進行抑制薬となる可能性が考えられます。

お問い合わせ先

北海道大学大学院先端生命科学研究所細胞機能科学分野 教授 金城 政孝（きんじょう まさたか）

TEL : 011-706-9005 FAX : 011-706-9045 E-mail : kinjo@sci.hokudai.ac.jp

北海道大学大学院先端生命科学研究所細胞機能科学分野 助教 北村 朗（きたむら あきら）

TEL : 011-706-9542 FAX : 011-706-9045 E-mail : akita@sci.hokudai.ac.jp

[用語解説]

注1) 原因遺伝子産物

ある遺伝性疾患（本研究内容ではALS）の原因となる遺伝子（原因遺伝子）から転写・翻訳され生成されたタンパク質のこと。

注2) TDP43 (TAR RNA/DNA-binding protein 43 kDa)

ALSの原因遺伝子産物であり、主に核内に局在するタンパク質。TDP43はRNA/DNAに結合するモチーフに加え、核局在化シグナル配列、核排出シグナル配列を持つことから、核と細胞質を行き来しながらRNAと結合する機能を持つと考えられている。ALS患者の運動神経内におけるタンパク質凝集体を構成するタンパク質として同定されたが、凝集体を構成するのは全長のTDP43のみならず、様々な大きさの断片も含まれる。TDP43はカルボキシル末端側にプリオン様ドメインと呼ばれるタンパク質同士の会合・凝集を促進するドメインを含んでいることから、TDP43の凝集形成と共にその機能損失が起こることがALS発症の原因ではないかという仮説が提唱されている。

注3) タンパク質の封入体

多くのタンパク質分子は、一本のポリペプチド鎖から折り畳まれる（フォールディングする）ことで機能を持つが、構造が崩れると共に複数の分子が絡み合い、機能を持たず水に溶けにくい性質に変化することがある。このように複数分子のタンパク質が絡み合い、機能を失った状態はタンパク質の凝集体と呼ばれる。また、細胞内において形成したタンパク質の凝集体はアミノ酸へ分解することができれば、新しいポリペプチド合成へと再利用されるが、凝集体が分解されずに残存すると、決められた区画に寄せ集められる。この凝集体が寄せ集められた細胞内構造をタンパク質の封入体という。

注4) メッセンジャーRNA

遺伝子（DNA）に保存された遺伝情報からタンパク質（アミノ酸の配列）を作り出す際に、遺伝子の配列情報を伝令する役割を持つRNA分子。伝令RNAとも呼ばれる。

注5) 低分子RNA

細胞内に存在する分子量の小さいRNA分子の総称。低分子RNAは遺伝子から読み取られて作られるメッセンジャーRNAの発現量を調節する機能を持つものや、RNAとタンパク質複合体の土台のような役割を持つものも存在する。

注6) 蛍光相関分光法

単一分子感度で溶液中の蛍光分子の動態（拡散係数）と1粒子あたりの平均蛍光強度を測定することができる手法。計測された拡散係数の値を基準物質と比較することで、分子量の変化を短時間に高感度で計測できる。特に1粒子あたりの蛍光強度変化が計測できることは、凝集体形成の判定に極めて有効な方法である。

注7) 蛍光タイムラプスイメージング

蛍光顕微鏡下で細胞を生きたまま培養しながら、細胞及び細胞内に発現した蛍光分子をある時間間隔で観察し続ける手法のこと。細胞の形状や細胞内の目的タンパク質の局在などの時間変化を解析することができる。

注8) 蛍光相互相関分光法

蛍光相関分光法を拡張したもので、多色蛍光分子間の相互作用を計測する方法。蛍光相関分光法の利点を含有する。例えば緑色蛍光分子と赤色蛍光分子間の測定では、蛍光相関分光法解析で得られる情報に加えて、緑色または赤色蛍光分子それぞれの濃度と共に、両者が相互作用する割合を求めることができる。

注9) 核局在化シグナル配列

真核生物では、細胞質で合成されたタンパク質を必要に応じて核へ運ぶ必要がある。この時、核へ運ぶための「荷札」の役割を担うアミノ酸配列のことを核局在化シグナル配列という。

注10) SOD1 (Superoxide dismutase 1)

ALSの原因遺伝子として最初に発見された。活性酸素種を分解する酵素であり、ALS関連変異体では凝集性が上がる。

注11) FUS (Fused in Sarcoma) /TLS

ALSの原因遺伝子の一つであり、TDP43と同様にRNA結合タンパク質である。ただし、認識するRNA配列はTDP43と異なる。TLS (Translocated in Sarcoma) という名称も持っている。このタンパク質も凝集体を形成することが知られている。