

## ALS/FTD の原因となる凝集体形成機構を解明

～神経細胞の毒となるタンパク質凝集を抑制する薬剤などの研究発展に期待～

### ポイント

- ・筋萎縮性側索硬化症（ALS）や前頭側頭型認知症（FTD）の原因となる機構を解明。
- ・モデル生物である線虫を用いて TDP-43 カルボキシ末端断片凝集による毒性を実証。
- ・ALS や FTD など神経変性疾患においてタンパク質凝集を抑制する薬剤評価に期待。

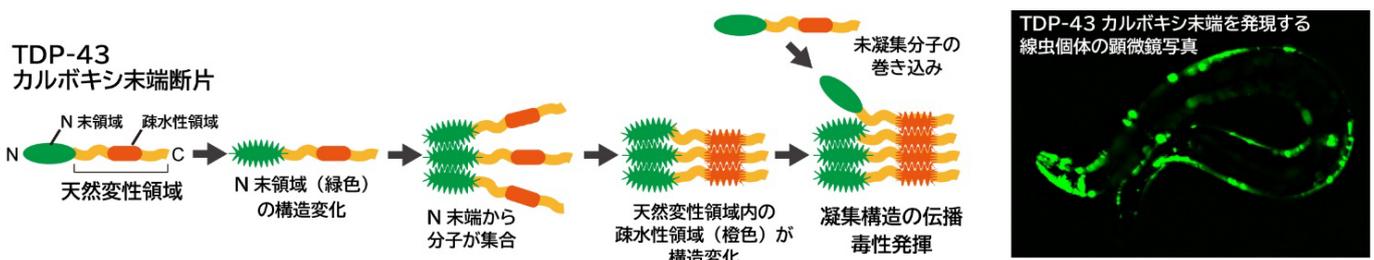
### 概要

北海道大学大学院先端生命科学研究院の北村 朗講師、同大学大学院生命科学院博士後期課程 3 年の藤本 愛氏らの研究グループは、筋萎縮性側索硬化症（ALS）<sup>\*1</sup> や前頭側頭型認知症（FTD）の原因となる TDP-43 カルボキシ末端断片<sup>\*2</sup> の細胞内凝集体形成機構を明らかにするとともに、モデル生物である線虫<sup>\*3</sup> を用いて凝集体による毒性を実証しました。本成果は、米国ノースウェスタン大学リチャード・モリモト教授らとの国際共同研究によるものです。

本成果では、TDP-43 カルボキシ末端断片が凝集する時、どの領域がどういう推移で凝集していくのかを、ドメイン欠損変異体やドメイン交換変異体などを使って明らかにしました。具体的には、TDP-43 カルボキシ末端断片の N 末端ドメインが最初に構造変化した後、分子間の会合が起こります。それにより、C 末端側の元来構造を取らない天然変性領域<sup>\*4</sup> が構造変化することで、まだ構造変化していない TDP-43 カルボキシ末端断片や細胞内のタンパク質を巻き込んでアミロイド<sup>\*5</sup> を含む凝集体を形成します。

また、光により時空間を制御しつつタンパク質の会合を誘導できるタグを用いた解析により、TDP-43 カルボキシ末端断片の天然変性領域の N 末端側は近接しやすいのに対し、C 末端側は近接しにくいことも示唆されました。さらに、有名なモデル生物である線虫に TDP-43 カルボキシ末端断片を発現させると、線虫内でも凝集体を形成しますが、流動性の低い凝集体を形成する線虫では運動性の低下が起こり、短寿命となることが分かりました。将来的には、本研究で確立した手法が利用して TDP-43 カルボキシ末端断片の凝集形成を抑える薬剤評価を行うことで、ALS や FTD の治療または予防戦略に期待が持たれます。

なお、本研究成果は、2024 年 6 月 20 日（木）公開の Communications Biology 誌にオンライン掲載されました。



TDP-43 カルボキシ末端断片の凝集モデル (左) とそれを発現する線虫の顕微鏡写真 (右)。

## 【背景】

神経変性疾患に分類される筋萎縮性側索硬化症（ALS）は、脳と筋肉を繋いで制御するための神経細胞である運動ニューロンが変性・脱落することにより発症します。また前頭側頭型認知症（FTD）は、脳内のニューロンやグリアが脱落し、人格、行動、言語に影響を与える一群の神経変性疾患であり、認知症として有名なアルツハイマー病よりも若年性発症がみられることがあります。これら ALS や FTD の根本的治療法は確立されていません。ニューロンが変性・脱落する要因としていくつかの仮説が提唱されていますが、その中の一つ有力な仮説として、タンパク質が誤った折り畳み構造を取ることによって会合し、凝集体と呼ばれる構造が運動ニューロン内に形成されるという凝集体仮説が提唱されています。

元来、細胞内の様々なタンパク質は、合成と分解を介して総合的にその量と質が制御されることで、生理的な細胞内外の恒常性が維持されている状態にあります。この状態はタンパク質恒常性（プロテオスタシス）と呼ばれます。タンパク質の凝集体が形成されると、凝集体そのものが細胞内のタンパク質を巻き込んだり、あるいは凝集体を形成する前段階にあるオリゴマーと呼ばれる誤った折り畳み状態にあるタンパク質の多量体が、プロテオスタシスの破たんを招くと考えられています。ALS においては、C9orf72、TDP-43、FUS などのタンパク質自身やその遺伝子の部分翻訳産物、あるいはタンパク質断片が凝集体を形成することが知られており、これらの凝集体がどのように形成され、プロテオスタシスを乱して毒性を獲得するに至るのかは世界的に着目されている重要な問いです。TDP-43 とそのカルボキシ末端断片は、ALS 患者の運動ニューロン内に形成された凝集体の構成タンパク質として 2006 年に同定されました。

研究グループは 2016 年に、TDP-43 カルボキシ末端断片の一つである TDP25（TDP-43 の C 末 220-414 アミノ酸領域、本研究では C220 と呼称）は、高い凝集体形成能と共に細胞毒性を示すことを報告しています（【関連するプレスリリース】参照）。本研究では、この C220 が凝集体を形成する機構の謎解きを行うと共に、線虫を用いた表現型解析にも取り組みました。

## 【研究手法】

まず C220 の N 末端からアミノ酸残基をある規則で欠損させた TDP-43 の C 末端断片（以下、TDP-43CTF と呼称）を培養細胞に発現させ、細胞内におけるそれらの凝集体形成効率と毒性を評価しました。

次にそれらのタンパク質を発現する細胞の破碎液を用意し、可溶性 TDP-43CTF の会合状態を解析しました。細胞内に形成された凝集体がアミロイドであるかどうかを識別するため、アミロイド特異的蛍光色試薬を用いて染色し、共焦点蛍光顕微鏡を用いて観察しました。光により時空間を制御しつつタンパク質の会合を誘導できるタグを付けた TDP-43CTF を培養細胞に発現させ、顕微鏡下にて光照射を行った後、凝集体の形成効率を解析しました。

さらに、TDP-43CTF を発現する線虫株を樹立し、その線虫が液体の中で泳ぐ時に屈曲する回数を計測することで、TDP-43CTF の凝集体が運動機能に与える影響を解析し、また線虫が生まれてから死ぬまでの経過時間を計測することで寿命に与える影響を解析しました。

## 【研究成果】

C220 の N 末端からアミノ酸残基をある規則で欠損させた TDP-43CTF は、N 末領域の二次構造の残存状況によって凝集性と細胞毒性が変化することが分かりました。TDP-43CTF 同士が集まって形成される凝集体よりも、細胞内の様々なタンパク質を巻き込んで形成された凝集体のほうが高い細胞毒性を持つことが示唆されました。TDP-43CTF の天然変性領域そのものの凝集性は低く、天然変性

領域の N 末端に付加されたドメインが凝集した後、多くの分子を巻き込みさらに凝集が拡大するということが分かりました。このようにして形成された細胞内の凝集体はアミロイドを含む構造でしたが、C220 から天然変性領域を完全に欠損させたときにもこのアミロイドを含む凝集体が形成されることが分かりました。

すなわち、TDP-43CTF の N 末端の凝集性が全体の凝集性を規定していることが示唆されました。一方、CRY2 タグを用いた解析から、天然変性領域はそれ自身の凝集性ではなく、他の凝集性因子により N 末側から分子間で会合しコンフォメーション変化が誘導されると共に、凝集を促進するような役割を有していることも分かりました。線虫においては、流動性の低い凝集体を形成する線虫では、流動性の高い凝集体を形成する線虫より、運動性の低下が起こり短寿命となることが分かりました。これらのことは、細胞内に形成されたタンパク質凝集体の物性<sup>6</sup>が、細胞の生死や個体の生理的・寿命など生物学的表現型に影響し得る重要な証拠です。

### 【今後への期待】

ALSをはじめとする多くの神経変性疾患は難病に指定され、根治法が確立されておらず、進行を抑制する有効な薬剤も極めて限定的です。本研究成果は、ALS/FTD におけるタンパク質凝集体を抑制する薬剤を設計・開発する上で重要な基礎的知見となります。今後は、実際の ALS や FTD の治療や予防に対し有効な薬剤の効能解析と選定へ進展させていくことは、重要な社会的意義があると考えます。

### 【謝辞】

本研究は、国立研究開発法人日本医療研究開発機構・革新的先端研究開発支援事業ソロタイプ (AMED-PRIME)・研究開発領域「プロテオスタシスの理解と革新的医療の創出」(課題名:細胞内プロテオスタシスを維持するシャペロン RNA の作動機序解明、代表者:北村 朗) (JP22gm6410028)、日本学術振興会科学研究費助成事業・国際共同研究加速基金(国際共同研究強化)(課題名:タンパク質恒常性による運動機能および寿命制御機構の解明、代表者:北村 朗) (16KK0156)、日本学術振興会科学研究費助成事業・学術変革領域研究 (A)『バイオリジカルクラスター:細胞内における超分子複合体の形成機構と機能特性』・計画研究(課題名:バイオリジカルクラスター解析のための極限時空間相関分光法の確立、代表者:北村 朗) (24H02286)、公益財団法人「蓬庵社」・研究助成(代表者:北村 朗)、公益財団法人「萩原学術振興財団」・研究助成(代表者:北村 朗)、北海道大学 L-Station 研究支援(代表者:北村 朗)、北海道大学 DX 博士人材フェロシップ (JST-SPRING; 現、北海道大学 EXEX 博士人材フェロシップ)(助成受領者:藤本 愛)などの支援を受けて行われました。

### 【関連するプレスリリース】

北海道大学・日本医療研究開発機構共同プレスリリース「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 -」

発表日: 2016 年 1 月 14 日

URL: [https://www.hokudai.ac.jp/news/160114\\_als\\_pr.pdf](https://www.hokudai.ac.jp/news/160114_als_pr.pdf)

## 論文情報

論文名 Hetero-oligomerization of TDP-43 carboxy-terminal fragments with cellular proteins contributes to proteotoxicity (TDP-43 カルボキシ末端断片と細胞内タンパク質のヘテロオリゴマー形成はタンパク質毒性に寄与する)

著者名 北村 朗<sup>1\*</sup>、藤本 愛<sup>2\*</sup>、川島怜維<sup>2 (研究当時)</sup>、Yidan Lyu<sup>2 (研究当時)</sup>、佐々木虎徹<sup>2</sup>、濱田悠太<sup>2</sup>、森谷香南<sup>2 (研究当時)</sup>、倉田歩実<sup>3 (研究当時)</sup>、高橋一帆<sup>3 (研究当時)</sup>、Reneé Briemann<sup>4</sup>、Laura Bott<sup>4</sup>、Richard Morimoto<sup>4</sup>、金城政孝<sup>1</sup> (<sup>1</sup>北海道大学大学院先端生命科学研究院、<sup>2</sup>北海道大学大学院生命科学院、<sup>3</sup>北海道大学理学部、<sup>4</sup>米国ノースウェスタン大学、\*筆頭共著者)

雑誌名 Communications Biology (英国 Nature Publishing Group 発行の生物・医生物学術誌)

D O I 10.1038/s42003-024-06410-3

公表日 2024年6月20日(木)(オンライン公開)

## お問い合わせ先

北海道大学大学院先端生命科学研究院 講師 北村 朗 (きたむらあきら)

T E L 011-706-9542 F A X 011-706-9045 メール akita@sci.hokudai.ac.jp

U R L <https://altair.sci.hokudai.ac.jp/infmcd/index.html>

## 配信元

北海道大学社会共創部広報課 (〒060-0808 札幌市北区北8条西5丁目)

T E L 011-706-2610 F A X 011-706-2092 メール jp-press@general.hokudai.ac.jp

## 【参考図】

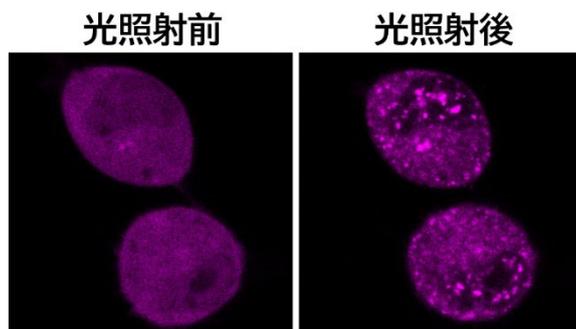


図1. 光照射により人工的に凝集体形成を誘導した細胞の蛍光顕微鏡像。

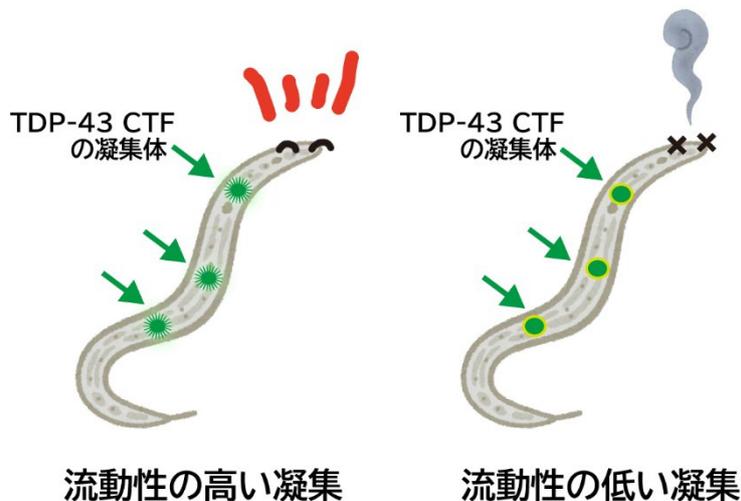


図2. 凝集体内部の流動性(物性)と線虫に与える生理的影響のイメージ図。

## 【用語解説】

- \* 1 筋萎縮性側索硬化症 (ALS) … 英名は Amyotrophic Lateral Sclerosis、略して ALS。中枢神経系（脳や脊髄）の運動ニューロンが徐々に退行し、筋肉の運動制御が行えなくなることで筋肉が弱くなり、最終的には筋肉の萎縮（筋肉のサイズの減少）が起こる。C9orf72、TDP-43、FUS などのタンパク質が発症に関与していることが知られており、それらの凝集体が ALS の原因となる仮説のことを「凝集体仮説」という。
- \* 2 TDP-43 カルボキシ末端断片 … ALS 患者の運動ニューロン内に形成された凝集体の構成タンパク質。全長の TDP-43 のみならずそのカルボキシ断片などが同時に凝集していることが知られている。ALS の他、認知症の一つである前頭側頭型認知症 (FTD) の原因タンパク質であることも知られている。
- \* 3 線虫 … 無脊椎動物の一種であり、その体形が糸状であることから線虫という名前がついている。野生の線虫は多数の種類が存在しており、土壌や淡水、海水など、様々な環境に生息している。一方で、*Caenorhabditis elegans* と呼ばれる種は、遺伝学や神経科学など科学研究のモデル生物として広く利用されている。この理由として、ゲノム情報や細胞系譜が分かっていることに加え、ふ化まで約 3 日、寿命が約 30 日と短い世代時間を持つこと、組織が透明であることなどが挙げられる。
- \* 4 天然変性領域 … 多くのタンパク質は種々の二次構造を形成し、それらが機能的に折り畳まれることで分子内の立体構造を形成する。一部のタンパク質では、このような明確な二次構造を取らない領域が含まれていることが知られており、それらは天然変性領域 (IDR) と呼ばれている。また IDR を含むタンパク質を総称して天然変性タンパク質 (IDP) と呼ばれる。
- \* 5 アミロイド … タンパク質が主に  $\beta$  シート構造を伴って規則正しく集積した構造。アルツハイマー病など神経変性疾患において脳内への沈着がよく観察される。
- \* 6 物性 … 物質の物理的性質のこと。ここではタンパク質凝集体内部におけるタンパク質の運動性や集積・構造の物理的状態を示す。