

表 題 細胞質封入体に関与する RNA 結合タンパク質 Drb1 の細胞内機能  
および病態に関わる基礎的研究

論 文 の 区 分 課程博士

著 者 名 益子 貴史

担当指導教員氏名 松浦 徹 教授

所 属 自治医科大学大学院医学研究科  
地域医療学系専攻  
精神・神経・筋骨格疾患学分野  
臨床神経学

2016年1月8日申請の学位論文

# 目次

	頁
第 1 章 序論	3-12
第 1 節 筋萎縮性側索硬化症 (ALS) と前頭側頭葉変性症 (FTLD)	3-4
第 2 節 ALS および FTLD と RNA 結合タンパク質	5-11
第 3 節 Drb1/RBM45 と神経変性疾患の病態との関連および研究目的	11-12
第 2 章 実験材料および研究方法	13-29
第 1 節 材料	13-17
第 2 節 プラスミド	17-23
第 3 節 細胞培養と遺伝子導入	23-24
第 4 節 蛍光免疫染色	24
第 5 節 ヘテロカリオンアッセイ	24-27
第 6 節 共免疫沈降物の検出	27
第 7 節 ミトコンドリア膜電位測定	28
第 8 節 統計処理	29
第 3 章 結果	30-51
第 1 節 Drb1 は TDP-43 細胞質凝集体に共局在する	30-34
第 2 節 Drb1 は核タンパク質で古典的核移行シグナル (NLS) を有する	34-38
第 3 節 Drb1 は核-細胞質間をシャトルする	38-41
第 4 節 Drb1 のリンカー領域に存在する連続ロイシン配列は核外移行シグナル (NES) として作用する	42-45

第 5 節 Drb1 の NLS および NES への二重変異導入により TDP-43 陽性細胞質凝集体を形成する	45-49
第 6 節 Drb1 の細胞質凝集体はミトコンドリア膜電位を 低下させる	49-51
第 4 章 考察	52-60
第 1 節 はじめに	52
第 2 節 TDP-43 との相互作用	52-53
第 3 節 Drb1 の核-細胞質間シャトル能	53-56
第 4 節 Drb1 の二重変異体が細胞質凝集体を形成する メカニズム	56-58
第 5 節 ミトコンドリア膜電位低下	58-60
第 6 節 Drb1 の遺伝子変異について	60
第 5 章 終論	61
引用文献	62-72
謝辞	73

# 第 1 章 序論

## 第 1 節 筋萎縮性側索硬化症 (ALS) と前頭側頭葉変性症 (FTLD)

筋萎縮性側索硬化症 (amyotrophic lateral sclerosis; ALS) は上位および下位運動ニューロンが選択的かつ進行性に細胞死に陥ることにより引き起こされる成人発症の神経変性疾患である。全身の随意筋が進行性に障害されることにより、発症から平均 2-5 年で致死的な球麻痺や呼吸筋麻痺に至る予後不良な疾患である。ALS のおよそ 5-10% が家族性発症とされ、90% 以上は孤発性発症である (Kiernan et al., 2011)。また、前頭側頭葉変性症 (frontotemporal lobar degeneration; FTLD) は前頭葉および側頭葉の皮質に神経変性の首座がある神経変性疾患の総称である。その臨床症候はその変性部位の首座に基づき緩徐進行性の性格変化や社会的行動の障害あるいは進行性の失語症状といった特有の高度脳機能障害を特徴とする (Neary et al., 1998)。

ALS と FTLD は臨床および病理上の病変部位 (topography) に基づいた分類である。一方これまで、ALS の一部の患者において認知症を合併する患者が存在すること、また FTLD の一部の患者においても運動ニューロン症候を示す一群の存在が報告されている。以上のことから、ALS と FTLD は topography の点からも共通した疾患単位を含有している可能性が考えられている (Kiernan et al., 2011; Strong et al., 2009)。

分子病理学的には、ALS および FTLD の共通する主病理は神経細胞における細胞質封入体形成とその細胞死である。ALS 患者の運動神経細胞における細胞質封入体はユビキチン陽性を示す (Leigh et al., 1988; Lowe et al., 1988)。認知症を伴う ALS 患者においては運動神経細胞に留まらず、大脳皮質神経細胞においても細胞質封入体が認められる (Okamoto et al., 1992)。また、一部の FTLD



患者における大脳皮質神経細胞においてもユビキチン陽性細胞質封入体が認められる (Mann et al., 1993). これらの発見は ALS と FTLD の疾患発症機構において、共通の分子機構が存在することを示唆する.

ALS および FTLD の細胞質封入体形成機構の研究の歴史において大きな前進となった発見は、43 kDa の DNA/RNA 結合タンパク質 TAR DNA-binding protein (TDP-43) がユビキチン陽性細胞質封入体構成タンパク質として同定されたことである (Arai et al., 2006; Neumann et al., 2006). ALS の 90%以上を占める孤発性 ALS 患者のほぼ全例において TDP-43 陽性細胞質封入体が認められる. また FTLD においても、ユビキチン陽性封入体を有する一群 (FTLD-U と分類) で TDP-43 陽性であることが示された. また、一部の家族性 ALS および一部の孤発性症例中に TDP-43 をコードする *TARDBP* 遺伝子にミスセンス変異を認める症例群が見つかったことから、改めて TDP-43 と疾患の発症機構への深い関連性が認識されるようになった (Rutherford et al., 2008; Sreedharan et al., 2008). TDP-43 に続いて、一部の家族性 ALS (ALS6) において、RNA 結合タンパク質 fused in sarcoma/translocated in liposarcoma (FUS/TLS) の遺伝子変異が同定された (Kwiatkowski et al., 2009; Vance et al., 2009). ALS6 患者の運動神経細胞において FUS/TLS 陽性封入体が認められた. また FTLD-U の一部 (atypical FTLD-U, aFTLD-U) では封入体構成タンパク質が FUS/TLS であることが判明し、FTLD-FUS と呼ばれている (Neumann et al., 2009). その後も家族性症例の遺伝子変異を伴う封入体構成タンパク質として、heterogeneous nuclear ribonucleoprotein (hnRNP) などの RNA 結合タンパク質が同定された (Le Ber et al., 2014). これらのことより、ALS/FTLD の発症機構に RNA 結合タンパク質が重要な役割を担っていると考えられる.

## 第2節 ALS および FTLD と RNA 結合タンパク質

ALS/FTLD の発症と関連性の高い RNA 結合タンパク質について、以下に概説する。

### 1. TDP-43

TDP-43 は元々ヒト免疫不全ウイルスの transactivation response element に結合し、転写抑制に関与するタンパク質として同定された (Ou et al., 1995). TDP-43 は2つの RNA 認識モチーフ (RNA-recognition motif, RRM) を有する 414 アミノ酸から成る RNA 結合タンパク質である (図 1). 正常状態において TDP-43 は主に核に局在している一方、核と細胞質間をシャトルしていることも判明しており、核と細胞質の両方で機能することが指摘されている (Ayala et al., 2008). 実際、RNA のプロセッシングや輸送、安定化、さらにマイクロ RNA の生成など核と細胞質の多くの RNA 代謝に関わっている (Ling et al., 2013). この核-細胞質間シャトルを担っているのがアミノ (N) 末端側の RRM 上流域にある核移行シグナル (nuclear localization signal, NLS) とカルボキシル (C) 末端側の RRM の内部に存在する核外移行シグナル (nuclear export signal, NES) である (Ayala et al., 2008). ALS/FTLD の変性神経細胞における TDP-43 の病理学的特徴は、核から細胞質への局在性の変化、細胞質で不溶性の凝集体形成、そしてその凝集体内における TDP-43 のタンパク質修飾 (ユビキチン化、リン酸化、断片化) である (Arai et al., 2006). この TDP-43 病理における核から細胞質への局在変化について、TDP-43 の NLS への ALS 関連遺伝子変異が報告されており、局在変化の重要性を支持している (Matthew J. Winton et al., 2008). 一方、培養細胞の実験系では NLS への ALS 関連遺伝子変異を持つ TDP-43 変異体は核から細胞質に局在を変化させるが、凝集体形成の再現には至っていない (M. J. Winton et al., 2008; Matthew J. Winton et al., 2008). このことから局在変化に加えて、凝集促進のメカニズムが細胞質封入体形成において必要な要素

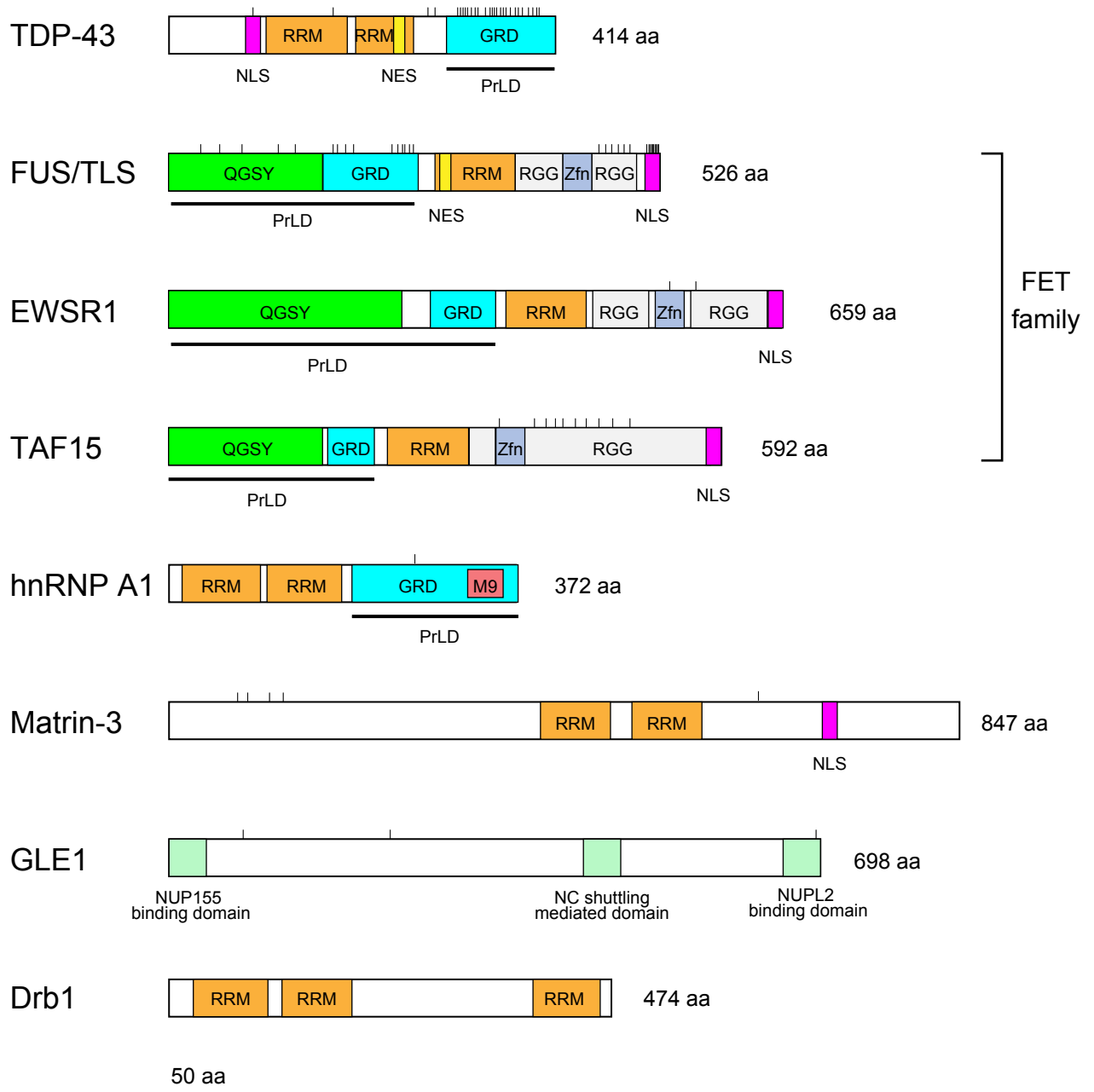


図 1. ALS および FTLD に関連する RNA 結合タンパク質の構造.

TDP-43, FUS/TLS, TAF15, EWS, hnRNP A1, Matrin-3, Nucleoporin GLE1, Drb1 のそれぞれの構造を示す. GLE1 のモチーフは N 末側より NUP155 binding domain, nucleocytoplasmic (NC) shuttling mediated domain, NUPL2 binding domain を示す. 縦線は疾患関連変異部位を表す.

FET family: Fused in sarcoma, Ewing's sarcoma, TAF15 RNA polymerase II TATA box binding associated factor 68 kDa, GRD: glycine-rich domain, NES: nuclear export signal, NLS: nuclear localization signal, PrLD: Prion-like domain, QGSY: glutamine glycine serine tyrosine-rich domain, RGG: arginine glycine glycine-rich domain, RRM: RNA-recognition motif, Zfn: zinc-finger motif.

と考えられる。TDP-43 において、ALS 関連遺伝子変異の多くは C 末端側にあるグリシンリッチドメイン(glycine-rich domain; GRD)に認められる (Lattante et al., 2013; Pesiridis et al., 2009)。この C 末端領域はプリオン様ドメイン(Prion-like domain, PrLD)と呼ばれ、この領域への変異はタンパク質間相互作用を促進させ、凝集体形成を誘導すると考えられている (Johnson et al., 2009; King et al., 2012)。TDP-43 の細胞質封入体形成に伴って、本来の TDP-43 の機能喪失による RNA 代謝の破綻、あるいは封入体形成そのものによって細胞毒性を生じると考えられているが、細胞死に至るメカニズムの全容は未だ不明のままである。また、TDP-43 封入体病理を認める孤発性 ALS 患者の中には、TDP-43 遺伝子変異を認める患者と認めない患者がいるが、両者の病理学的特徴に違いはないとされる (Pamphlett et al., 2009)。また近年では、一部のレビー小体型認知症あるいはアルツハイマー型認知症の神経細胞内、さらには正常高齢者の脳神経細胞内においても TDP-43 陽性封入体が報告された (Arai et al., 2009; Geser et al., 2010)。ALS/FTLD の発症機構において TDP-43 による細胞質封入体形成に関わる疾患特異性については未だ十分な理解は得られていない。

尚、本論文では、ALS/FTLD の病理像で確認できる TDP-43 陽性細胞質凝集物を“封入体”とした。そして“凝集体”は形態的に確認可能なタンパク質の集簇物を指し、病理像で認めた封入体とは生化学的に未同定の構造物として区別した。

## 2. FUS/TLS と FET protein family (EWSR1 と TAF15)

FUS/TLS は転座により、転写因子 CCAAT enhancer binding homologous protein (CHOP) 遺伝子との融合遺伝子を形成し、ヒトの myxoid liposarcoma を誘導する因子として同定された RNA 結合タンパク質である (Crozat et al., 1993)。同様

に、腫瘍において転座により融合する遺伝子として同定された EWSR1 および TAF15 を含め、FET (Fused in sarcoma, Ewing's sarcoma breakpoint region 1, and TAF15 RNA polymerase II TATA box binding associated factor 68 kDa) タンパク質ファミリーを構成する。その機能は転写促進、RNA のプロセッシングや輸送、DNA 修復反応の調節など多様である (Wang et al., 2008)。FUS/TLS は、526 のアミノ酸からなり、そのドメイン構造は FET タンパク質ファミリー間で類似している (図 1)。N 末側からグルタミン/グリシン/セリン/チロシンの豊富な領域 (QGSY region)、続いてグリシンの豊富な GRD、RRM、アルギニン/グリシン/グリシン繰り返し配列に富む 2 つの領域 (RGG region) がジンクフィンガードメインをはさんで並び、そして C 末端に NLS が存在する。FUS/TLS は核-細胞質間をシャトルしており、核外移行ドメインは RRM の内部に存在する。FUS/TLS の N 末端側の QGSY と GRD を含む領域はプリオン様ドメインとして知られる。FUS/TLS における多くの ALS 関連遺伝子変異はこの GRD と NLS に存在している (Lagier-tourenne et al., 2010)。FUS/TLS において GRD だけでなく NLS への疾患関連遺伝子変異が多くの家系で認められることは、FUS/TLS のプリオン様ドメインによる凝集形成傾向が元々強く、局在変化のみで病的な凝集形成傾向を促進することを示唆している。培養細胞レベルでも、FUS/TLS において NLS への疾患関連遺伝子変異を有する FUS/TLS 変異体は核から細胞質へ局在を変化させるだけでなく、細胞質凝集体形成も認められる (Ito et al., 2011)。また *in silico* 構造解析データ上でも FUS/TLS におけるプリオン様ドメインの凝集形成傾向は TDP-43 のそれよりも強いとされ (King et al., 2012)、細胞質封入体形成機構における FUS/TLS のプリオン様ドメインの重要性を支持している。FUS/TLS の遺伝子変異は家族性 ALS の 4%、孤発性 ALS の 1%程度とされている (Lattante et al., 2015)。また他の FET タンパク質ファミリー遺伝子である

*EWSR1* および *TAF15* についても ALS 症例で遺伝子変異解析が行われ、健常者群と比べ ALS への関与が疑われる変異がいくつか報告されている (Couthouis et al., 2012, 2011).

*FUS/TLS* 遺伝子変異を伴う ALS 症例において、変性神経細胞に FUS 陽性細胞質封入体を認めるが、TDP-43 の局在は概ね正常である (Tateishi et al., 2010; Vance et al., 2009). また FUS/TLS 細胞質封入体を認める細胞においても、TDP-43 の核排他的細胞質移行とは異なり、FUS/TLS の核から細胞質への局在変化は部分的で、核局在も残存する (Tateishi et al., 2010; Vance et al., 2009). FUS/TLS 細胞質封入体は一部でユビキチン陽性を示すが、不溶性画分から抽出した FUS/TLS は、ユビキチン化やリン酸化、断片化の修飾を示唆する所見は認められていない (Kwiatkowski et al., 2009; Neumann et al., 2009; Vance et al., 2009). FTLD との関連性については、FTLD-FUS 症例の多くが *FUS/FTLD* 遺伝子の変異を伴わないことが知られている. *FUS/TLS* 遺伝子変異を伴う純粋な FTLD 症例は非常に稀で、少数の ALS/FTLD 合併症例が報告されているのみである (Van Langenhove et al., 2010). さらに、FTLD における FUS/TLS 細胞質封入体は、ALS に見られる FUS/TLS 細胞質封入体とは異なり、FUS/TLS と共に TAF15 や EWS, FUS/TLS の NLS 受容体である karyopherin  $\beta 2$  が共局在することが報告されている (Neumann et al., 2012, 2011). 以上から、FUS/TLS の細胞質封入体形成の分子機構は TDP-43 と異なり、ALS と FTLD の間でも多様であることが示唆されている.

### 3. hnRNP A1

heterogeneous ribonucleoprotein A1 (hnRNP A1) は pre-mRNA のスプライシングを始め、RNA の輸送や安定化など多岐にわたる RNA 代謝に関わっている RNA

結合タンパク質である。その構造はN末端側に二つのRRMを有し、C末端側にはグリシンに富む領域GRDを有し、GRDはプリオン様ドメインを形成する。また、C末端側は38アミノ酸からなるM9と名付けられたNLSおよびNES活性を有するドメインが存在する。hnRNP A1もTDP-43やFUS/TLSと同様に核-細胞質間をシャトルするタンパク質である (Michael et al., 1995; Piñol-Roma and Dreyfuss, 1992)。

近年、*HNRNPA1* 遺伝子変異が家族性ALS症例1家系で報告された (Kim et al., 2013)。変異の位置は、HNRNP A/Bファミリーにおいて、高く保存されたプリオン様ドメイン内であった。*in vitro*細胞実験において、この変異により細胞質凝集体の形成が促進されることを示されている (Kim et al., 2013)

#### 4. Matrin-3

Matrin-3は847アミノ酸からなり、RRMを2つ有し、C末側にNLSを含むRNA結合タンパク質である。その正常機能としてRNAのプロセッシングや安定化に関わることが報告されている (Salton et al., 2011)。TDP-43とはRNAを介して相互作用することが示されている (Johnson et al., 2014)。近年家族性ALSのエクソームシーケンス解析により健常人には認められない *MATR3* 遺伝子変異が同定され、ALSの原因遺伝子の一つとして登録された (Johnson et al., 2014)。*MATR3* 遺伝子変異を伴うALS症例では障害部位の神経細胞において明らかな細胞質封入体形成は認めず、本来の核局在様式の変化もほとんど認められなかった。一部の *MATR3* 遺伝子におけるALS関連変異がMatrin-3とTDP-43との相互作用を障害することが *in vitro*で示されているものの、Matrin-3にはプリオン様ドメインのような凝集促進ドメインも知られておらず、神経変性発症機構は未だ不明のままである。

## 5. Nucleoporin GLE1

Nucleoporin GLE1 タンパク質は 698 アミノ酸から成り, Nuclear pore complex を構成する NUP155 や NUPL2 との結合ドメインを有し, poly(A)鎖を有する mRNA の核外輸送を担うシャトルタンパク質である (図 1). *GLE1* 遺伝子は新生児致死性の運動ニューロンに障害を生じる lethal congenital contracture syndrome 1 (LCCS1) の原因遺伝子として報告されていた (Nousiainen et al., 2008). 近年, 173 例の家族性 ALS および 760 例の孤発性 ALS より 3 例の遺伝子変異が同定された (Kaneb et al., 2015). スプライス部位の変異, ナンセンス変異, ミスセンス変異が各々 1 例ずつであった. 前二者の変異については, 培養細胞内で核膜孔における GLE1 タンパク質の消失を認めたことから, GLE1 タンパク質の関わる RNA の核外輸送の障害とそれに伴う RNA 代謝の破綻が生じていると考えられている.

### 第 3 節 Drb1/RBM45 と神経変性疾患の病態との関連および研究目的

発生段階特異的 RNA 結合タンパク質 (Developmentally-regulated RNA-binding protein 1, Drb1, RBM45) は神経発生において重要な役割を果たす RNA 結合タンパク質として, 本学機能生化学部門で同定された (Tamada et al., 2002). Drb1 をコードする遺伝子はショウジョウバエから, ゼブラフィッシュ, アフリカツメガエル, ニワトリ, マウス, ヒトに至るまで進化の過程で高く保存されている. Drb1 はラットにおいて, 胎生初期の中枢神経系で発現が高く, 発生が進むと共にその発現は減弱するという特徴を有する. Drb1 は 3 つの RRM 型 RNA 結合ドメインを有しており, RNA 結合タンパク質の大規模な結合配列解析から GACGAC モチーフに結合親和性を有することが示唆されている (Ray et al., 2013). 最近, Drb1 は ALS 患者の脳脊髄液中で健常人と比較して有意に発現量が



多いタンパク質として同定された。また、ALS および FTLD 患者の脳組織において、Drb1 は神経細胞の TDP-43 陽性細胞質封入体に共局在を示すことも明らかとなった (Collins et al., 2012; Konno et al., 2014)。また、酵母 two-hybrid system による解析により、TDP-43 の C 末端領域と Drb1 は相互作用することが示された (Hans et al., 2014)。神経系の培養細胞に過酸化水素やパラコートによる酸化ストレスを曝露することによって、Drb1 の局在が核質から細胞質へ変化することも示されている。このとき、Drb1 は、細胞質で Kelch-like ECH-associated protein 1 (KEAP1) タンパク質と相互作用することにより、NFE2-related factor 2 (NRF2) による抗酸化作用に関与する遺伝子の転写活性化を抑制し、結果として細胞の酸化ストレスを増強する (Bakkar et al., 2015)。

以上のことから Drb1 は ALS/FTLD の疾患発症に関わっていることが示唆されるが、病態発症と Drb1 の関連性は依然不明のままである。そこで本研究では、ALS および FTLD を始めとする神経変性疾患発症の分子基盤の詳細を理解するために、Drb1 の細胞質封入体形成機構とその影響を明らかにすることを目的とした。最初に、培養細胞を用いて、Drb1 と変異 TDP-43 との細胞質凝集体共局在モデルの作製を試みた。次に、Drb1 は核と細胞質を往復するシャトルタンパク質であるか否かを検討し、シャトルに関わる分子内ドメインの同定を試みた。さらにシャトルに関わるドメインの変異体を作製し、培養細胞において変異 Drb1 に由来する細胞質凝集体の形成を検討した。最後に、Drb1 に由来する細胞質凝集体の形成が細胞機能障害の指標となるミトコンドリア膜電位への影響を検討した。これらの検討により、ALS/FTLD の細胞質封入体形成細胞において、Drb1 が細胞傷害に関わる重要な役割を担うことを示した。

## 第 2 章 実験材料および研究方法

### 第 1 節 材料

#### (1) プラスミドの作製

- ・ プラスミドベクター

pcDNA3 (Invitrogen, Tokyo, Japan)

pEF-Bos-T7 (Kasashima et al., 1999)

pEGFP (Clontech, Tokyo, Japan)

- ・ 供与プラスミド

pEGFP-TDP-43-WT, pEGFP-TDP-mt, pcDNA3-TDP-43-WT : 野中隆博士 (国立精神神経センター) より譲り受けた.

pcDNA3-Myc-tag-NPc-NLS-REV-NES (Michael et al., 1995) : 藤原俊伸博士 (名古屋市立大学) より譲り受けた.

- ・ GFP および RFP 改変蛍光タンパク質 (Lam et al., 2012)

Clover (Addgene plasmid #40259)

mRuby2 (Addgene plasmid #40260)

- ・ PCR 用 DNA ポリメラーゼ

KOD-Plus- (Toyobo, Osaka, Japan)

#### (2) 細胞培養

- ・ 培養細胞株

ヒト子宮頸癌由来 HeLa 細胞, ヒト神経芽腫由来 SH-SY5Y 細胞, マウス線維芽細胞由来 NIH3T3 細胞

- ・ 培養試薬

Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) high-glucose 培養液  
(Wako, Tokyo, Japan)

Opti-MEM (Invitrogen)

胎児ウシ血清 (fetal bovine serum, FBS, Japan Bio Serum, Japan)

penicillin/streptomycin (P/S, Invitrogen)

Geneticin (Invitrogen)

- ・ トランスフェクション用試薬

Lipofectamine 2000 (Invitrogen)

### (3) 蛍光免疫染色と蛍光画像取得

- ・ 機器

共焦点レーザー顕微鏡 (TCS-SP5, Leica, Tokyo, Japan)

- ・ 画像解析ソフトウェア

ImageJ (National Institutes of Health, Bethesda, MD, U.S.A.)

- ・ 器具・試薬

35-mm 径 poly-L-lysine (PLL)-coated ガラスボトムディッシュ  
(Matsunami Glass, Osaka, Japan)

氷冷 methanol (Wako)

PBS(-) (Sigma)

4% paraformaldehyde (PFA)

PBS(-)に最終濃度が4%となるようにPFA (Sigma)の粉を加え、60℃  
で約1時間保温する。完全にPFAを溶解し、室温に戻したものを使用した。

Hoechst 33258 (Dojindo, Tokyo, Japan)

固定した細胞の核染色には, ブロッキング溶液または PBS (-) に  
2,000 倍希釈し, 使用した.

#### ブロッキング溶液

5%ウマ血清 (Sigma) と 0.02%アジ化ナトリウムを含有する PBS (-) を  
細胞用ブロッキング溶液として用いた.

ヤギ抗 T7 抗体 (Novus Biologicals, Littleton, CO, U.S.A.)

ウサギ抗 TDP-43 抗体 (Proteintech, Chicago, IL, U.S.A.)

Alexa Fluor 546 結合抗ヤギ IgG 抗体 (Molecular Probes, Eugene, OR,  
U.S.A.)

FluoroLink Cy5 結合抗ウサギ IgG 抗体 (GE Healthcare, Tokyo, Japan)

#### (4) ヘテロカリオンアッセイ

##### ・ 試薬

Hemagglutinating virus of Japan envelope (HVJ-E, Ishihara Sangyo  
Co., Tokyo, Japan)

cycloheximide (CHX)

Triton X-100 (Konica, Tokyo, Japan)

Phalloidin (Life Technologies, Tokyo, Japan)

#### (5) 共免疫沈降法

##### ・ 検出機器

ImageQuant LAS 4000 mini (GE Healthcare)

##### ・ 器具・試薬

IP buffer

50 mM Tris-HCl pH 7.5, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1% NP-40,  
protease inhibitor cocktail (Nacalai, Kyoto, Japan),

phosphatase inhibition cocktail (Sigma), Benzonase Nuclease  
(Novagen, Madison, WI, U.S.A.)

プロテイン A 磁気ビーズ (Invitrogen)

PBS-T (0.1% Tween 20; Sigma)

PBS(-)に 0.1% Tween 20 (Sigma)を含む。

5% skim milk 含有 PBS (-)

PBS(-)に 5% skim milk (Meiji, Tokyo, Japan)を含む。

2 × sample buffer

125 mM Tris-HCl, pH6.8, 4% SDS, 20% (v/v) glycerol, 0.01%  
(w/v) bromophenol blue, 10% (v/v) 2-mercaptoethanol (Bio-Rad)

ウサギ抗 GFP 抗体 (Torrey Pines Biolabs, San Diego, CA, U.S.A.)

マウス抗 T7 抗体 (Novagen)

マウス抗 TDP-43 抗体 (Abnova, Taipei, Taiwan)

horseradish peroxidase-conjugated 抗ウサギ IgG 抗体 (GE Healthcare)

horseradish peroxidase-conjugated 抗マウス IgG 抗体 (GE Healthcare)

ECL detection reagent (standard あるいは prime; GE Healthcare)

polyvinylidene fluoride (PVDF) membrane (Millipore, Tokyo, Japan)

## (6) ミトコンドリア膜電位測定

### ・ 検出機器

IN Cell Analyzer 1000 (GE Healthcare)

### ・ 解析ソフトウェア

IN Cell Developer Toolbox (GE Healthcare)

### ・ 器具・試薬

tetramethylrhodamine ethyl ester (TMRE, Life technologies)

Hoechst 33342 (Dojindo)

24-well マルチプレート (Sumitomo Bakelite, Tokyo, Japan)

Opti-MEM, no phenol red (Invitrogen)

## 第2節 プラスミド

哺乳動物由来の培養細胞で各種タンパク質を発現させるため以下のプラスミドベクターを作製した。プライマー配列は、表1に記載している。

### • pEF-Bos-T7-Drb1

EF-1 $\alpha$ プロモーター下で、T7 タグ融合 Drb1 タンパク質(2-474 aa)を発現するプラスミド。ヒト Drb1 遺伝子の cDNA を pBluescript SK+ (Invitrogen)ベクターにサブクローニングしたプラスミドを鋳型として、ポリメラーゼ連鎖反応(PCR)法で 2-474 アミノ酸の cDNA 領域を Drb-BamF と Drb-BamR プライマーを用いて増幅した。PCR 産物を *Bam*HI で処理し、pEF-Bos-T7 ベクターの *Bam*HI 部位へ挿入した。

### • pEF-Bos-T7-Drb1-2-300

EF-1 $\alpha$ プロモーター下で、T7 タグ融合 Drb1 タンパク質(2-300 aa)を発現するプラスミド。pEF-Bos-T7-Drb1 と同様の方法で、Drb-BamF と 2-300-BamR プライマーを用いて作製した

### • pEF-Bos-T7-Drb1-301-474

EF-1 $\alpha$ プロモーター下で、T7 タグ融合 Drb1 タンパク質(301-474 aa)を発現するプラスミド。pEF-Bos-T7-Drb1 と同様の方法で、301-474-BamF と Drb-BamR プライマーを用いて作製した。

表 1. プラスミド作製に使用したプライマー

Primer	sequence
Drb-BamF	: 5'-ATGGATCCTGGACGAAGCTGGCAGCTC-3'
Drb-BamR	: 5'-ATGGATCCTCAGTAAGTTCTTTGCCGTTTG-3'
T7-XbaF	: 5'-AGGTCTAGAATGGCCAGCATGACTGGTGG-3'
T7-XbaR	: 5'-AAATCTAGAGGTGGGGACCCTCACTCTAG-3'
2-400-XbaR	: 5'-CGGTCTAGACTAAGGATGAGGATTAAACACAATA-3'
401-474-BamF	: 5'-CGAGGATCCCTTTACCTTTAGACGTATTAGA-3'
2-300-BamR	: 5'-ATGGATCCTCATGCATAAATAGCTGATGC-3'
301-400-BamR	: 5'-CGGGGATCCTAAGGATGAGGATTAAACACAATA-3'
301-474-BamF	: 5'-GCAGGATCCAAAAATACAAATTACATGGATT-3'
mtNLSc1-R	: 5'-CTGCCAGCATAACTGCAAGTGCCACCCCATTCAGAATCTTTC-3'
mtNLSc1-F	: 5'-CTGAATGGGGTGGCACTTGCAAGTTATGCTGGCAGATTCGCC-3'
mtLL-F	: 5'-TAATGCAACAGATGCCGCTAGAAAAATGGCAACAC-3'
mtLL-R	: 5'-TGCCATTTTTCTAGCGGCATCTGTTGCATTACTTCCATC-3'
mtNLSc2-BamR	: 5'-TAGGGATCCTCAGTAAGTTGCTTGCGCTGCGTTAGATTCTTCTCTTGGCG-3'
R470G-BamR	: 5'-AAGGATCCTCAGTAAGTTCTTTGCCCTTTGTTAGATTCTTCTC-3'
NPcNLS-XbaF	: 5'-AAGTCTAGAATGGGAGAGCAGAAACTGATC-3'
NPcNLS-XbaR	: 5'-CACTCTAGATCACACTTTGCGTTTCTTTTTTGG-3'

\*F は forward, R は reverse を示す.

\*下線はそれぞれ制限酵素認識配列, 太字は置換変異挿入部位を示す.

- pEF-Bos-T7-Drb1-301-400

EF-1 $\alpha$ プロモーター下で, T7 タグ融合 Drb1 タンパク質(301-400 aa)を発現するプラスミド. pEF-Bos-T7-Drb1 と同様の方法で, 301-474-BamF と 301-400-BamR プライマーを用いて作製した.

- pEF-Bos-T7-Drb1-401-474

EF-1 $\alpha$ プロモーター下で, T7 タグ融合 Drb1 タンパク質(401-474 aa)を発現するプラスミド. pEF-Bos-T7-Drb1 と同様の方法で, 401-474-BamF と Drb-BamR プライマーを用いて作製した.

- pcDNA3-Clover-T7-Drb1-WT

CMV プロモーター下で, Clover-T7 融合 Drb1 タンパク質(2-474 aa)を発現する. pEF-Bos-T7-Drb1 を鋳型として, T7-XbaF と T7-XbaR プライマーを用いて PCR 法により T7-Drb1 をコードする領域を増幅した. PCR 産物を *Xba*I で切断し, pcDNA3-Clover ベクターの *Xba*I 部位へ挿入した.

- pcDNA3-Clover-T7-Drb1-2-400

CMV プロモーター下で, Clover-T7 融合 Drb1 タンパク質(2-400 aa)を発現する. pEF-Bos-T7-Drb1 を鋳型として, T7-XbaF と 2-400-XbaR プライマーを用いて PCR 法により T7-Drb1 (2-400 aa)をコードする領域を増幅した. PCR 産物を *Xba*I で切断し, pcDNA3-Clover ベクターの *Xba*I 部位へ挿入した.

- pcDNA3-Clover-T7-Drb1-2-300

CMV プロモーター下で, Clover-T7 融合 Drb1 タンパク質(2-300 aa)を発現する. pEF-Bos-T7-Drb1-2-300 を鋳型として, T7-XbaF と T7-XbaR プライマーを用いて PCR 法により T7-Drb1 をコードする領域を増幅した.



PCR 産物を *Xba*I で切断し, pcDNA3-Clover ベクターの *Xba*I 部位へ挿入した.

- pcDNA3-Clover-T7-Drb1-301-474

CMV プロモーター下で, Clover-T7 融合 Drb1 タンパク質 (301-474 aa) を発現する. pEF-Bos-T7-Drb1-301-474 を鋳型として, T7-XbaF と T7-XbaR プライマーを用いて PCR 法により T7-Drb1 をコードする領域を増幅した. PCR 産物を *Xba*I で切断し, pcDNA3-Clover ベクターの *Xba*I 部位へ挿入した.

- pcDNA3-Clover-T7-Drb1-301-400

CMV プロモーター下で, Clover-T7 融合 Drb1 タンパク質 (301-400 aa) を発現する. pEF-Bos-T7-Drb1-301-400 を鋳型として, T7-XbaF と T7-XbaR プライマーを用いて PCR 法により T7-Drb1 をコードする領域を増幅した. PCR 産物を *Xba*I で切断し, pcDNA3-Clover ベクターの *Xba*I 部位へ挿入した.

- pcDNA3-Clover-T7-Drb1-401-474

CMV プロモーター下で, Clover-T7 融合 Drb1 タンパク質 (401-474 aa) を発現する. pEF-Bos-T7-Drb1-401-474 を鋳型として, T7-XbaF と T7-XbaR プライマーを用いて PCR 法により T7-Drb1 をコードする領域を増幅した. PCR 産物を *Xba*I で切断し, pcDNA3-Clover ベクターの *Xba*I 部位へ挿入した.

- pcDNA3-Clover-T7-Drb1-mtNLSc1

CMV プロモーター下で, Clover-T7 融合 Drb1-mtNLSc1 タンパク質 (K454A, R456A のアミノ酸置換を有する) を発現する. overlap extension PCR 法 (Ho et al., 1989) を用いて変異配列を有する Drb1 cDNA 断片を増幅し,

pcDNA3-Clover ベクターの *Xba*I 部位へ挿入した．具体的には，pcDNA3-Clover-T7-Drb1-WT を鋳型として，2 種類のプライマーセット T7-XbaF と mtNLSc1-R または，mtNLSc1-F と T7-XbaR で 2 種類の短い Drb1 cDNA 断片を増幅する．次に 2 種類の増幅断片を混合したものを鋳型として，T7-XbaF と T7-XbaR のプライマーで長い cDNA 断片を増幅する．この塩基置換を含む長い cDNA 断片を *Xba*I で切断後，pcDNA3-Clover ベクターの *Xba*I 部位へ挿入した．

- pcDNA3-Clover-T7-Drb1-mtNLSc2

CMV プロモーター下で，Clover-T7 融合 Drb1-mtNLSc2 タンパク質 (K469A, R470A, R472A のアミノ酸置換を有する) を発現する．pEF-Bos-T7-Drb1 を鋳型として，PCR 法で 2-474 アミノ酸の cDNA 領域を Drb-BamF と mtNLSc2-BamR プライマーを用いて増幅した．塩基置換を含む PCR 産物を *Bam*HI で処理し，pEF-Bos-T7 ベクターの *Bam*HI 部位へ挿入し，pEF-Bos-T7-Drb1-mtNLSc2 とした．次に pEF-Bos-T7-Drb1-mtNLSc2 を鋳型として，T7-XbaF と T7-XbaR のプライマーで T7-Drb1-mtNLSc2 断片を増幅し，*Xba*I で切断後，pcDNA3-Clover ベクターの *Xba*I 部位へ挿入した．

- pcDNA3-Clover-T7-Drb1-mtNLSc1+c2

CMV プロモーター下で，Clover-T7 融合 Drb1-mtNLSc1+c2 タンパク質 (K454A, R456A, K469A, R470A, R472A のアミノ酸置換を有する) を発現する．pcDNA3-Clover-T7-Drb1-mtNLSc1 を鋳型として，PCR 法で 2-474 アミノ酸の cDNA 領域を Drb-BamF と mtNLSc2-BamR プライマーを用いて増幅した．NLS の c1 と c2 に塩基置換を含む PCR 産物を *Bam*HI で処理し，pEF-Bos-T7 ベクターの *Bam*HI 部位へ挿入し，pEF-Bos-T7-Drb1-mtNLSc1+c2 とした．次に pEF-Bos-T7-Drb1-mtNLSc1+c2 を鋳型として，

T7-XbaF と T7-XbaR のプライマーで T7-Drb1-mtNLSc1+c2 断片を増幅し、*XbaI* で切断後、pcDNA3-Clover ベクターの *XbaI* 部位へ挿入した。

- pcDNA3-Clover-T7-Drb1-R470G

CMV プロモーター下で、Clover-T7 融合 Drb1-R470G タンパク質 (R470G のアミノ酸置換を有する) を発現する。pEF-Bos-T7-Drb1 を鋳型として、PCR 法で 2-474 アミノ酸の cDNA 領域を Drb-BamF と R470G-BamR プライマーを用いて増幅した。塩基置換を含む PCR 産物を *BamHI* で処理し、pEF-Bos-T7 ベクターの *BamHI* 部位へ挿入し、pEF-Bos-T7-Drb1-R470G とした。次に pEF-Bos-T7-Drb1-R470G を鋳型として、T7-XbaF と T7-XbaR のプライマーで T7-Drb1-R470G 断片を増幅し、*XbaI* で切断後、pcDNA3-Clover ベクターの *XbaI* 部位へ挿入した。

- pcDNA3-Clover-T7-Drb1-mtLL

CMV プロモーター下で、Clover-T7 融合 Drb1-mtLL タンパク質 (LL329, 330AA のアミノ酸置換を有する) を発現する。変異は overlap extension PCR 法により挿入した。具体的には、pcDNA3-Clover-T7-Drb1-WT を鋳型として、2 種類のプライマーセット T7-XbaF と mtLL-R または、mtLL-F と T7-XbaR で 2 種類の短い Drb1 cDNA 断片を増幅する。次に 2 種類の増幅断片を混合したものを鋳型として、T7-XbaF と T7-XbaR のプライマーで長い cDNA 断片を増幅する。この塩基置換を含む長い cDNA 断片を *XbaI* で切断後、pcDNA3-Clover ベクターの *XbaI* 部位へ挿入した。

- pcDNA3-Clover-T7-Drb1-mtLL/R470G

CMV プロモーター下で、Clover-T7 融合 Drb1-mtLL/R470G タンパク質 (LL329, 330AA と R470G のアミノ酸置換を有する) を発現する。変異は overlap extension PCR 法により挿入した。具体的には、pcDNA3-Clover-

T7-Drb1-R470G を鋳型として、2 種類のプライマーセット T7-XbaF と mtLL-R または、mtLL-F と T7-XbaR で 2 種類の短い Drb1 cDNA 断片を増幅する。次に 2 種類の増幅断片を混合したものを鋳型として、T7-XbaF と T7-XbaR のプライマーで長い cDNA 断片を増幅する。この塩基置換を含む長い cDNA 断片を *Xba*I で切断後、pcDNA3-Clover ベクターの *Xba*I 部位へ挿入した。

- pcDNA3-Clover-Myc-NPc-NLS

CMV プロモーター下で、Clover-Myc 融合 NPc-NLS タンパク質を発現する。pcDNA3-Myc-tag-NPc-NLS-REV-NES を鋳型として、NPc-NLS-XbaF と NPc-NLS-XbaR プライマーで PCR 法により NPc-NLS cDNA を増幅した。PCR 産物を *Xba*I で切断後、pcDNA3-Clover ベクターの *Xba*I 部位へ挿入した。

### 第 3 節 細胞培養と遺伝子導入

HeLa 細胞ならびに NIH3T3 細胞は、10% FBS および 1% P/S を含む DMEM (標準培養液) を使用し、37°C、5% CO<sub>2</sub> の条件下で培養した。SH-SY5Y 細胞については 15% FBS および 1% P/S を含む DMEM (標準培養液) で培養した。HeLa 細胞ならびに SH-SY5Y 細胞へのプラスミドの導入は、Lipofectamine 2000 を使用した。前日に播種した細胞が約 80-90% の飽和状態に達した段階で培地を除去し、Opti-MEM 培地に交換した。その後、Lipofectamine 2000 とプラスミドの複合体を添加し、37 °C、5% CO<sub>2</sub> の条件下で培養した。添加から約 12 時間後に標準培養液に交換した。さらに 12 時間培養後の細胞を解析に用いた。HeLa 細胞ならびに SH-SY5Y 細胞において安定発現株の作製においては、標準培養液に交換して約 12 時間培養後、500 µg/mL Geneticin を含む標準培養液に交換し、耐性選択を開始した。幾つかのシングルコロニーの形成が観察された段階で、クローニングリング

を用いてそれらのコロニーを単離し、クローン化した。数週間継代を続け、形質に大きな変化が認められなかった株について、共焦点レーザー顕微鏡(TCS-SP5, Leica)による蛍光観察、ウェスタンブロッティングによる解析を行い、目的タンパク質の発現を確認後、安定発現株とした。

#### 第4節 蛍光免疫染色

細胞の培養には、35-mm 径 PLL-coated ガラスボトムディッシュを用いた。トランスフェクション後約 24 時間で、細胞を 4% PFA で室温 15 分間処理し、固定した。続けて、氷冷 100% methanol に交換し、室温 10 分間処理し、permeabilization を行った。その後、PBS(-)で3回細胞を5分おきに洗浄した。ブロッキング溶液で室温 45 分間処理した後、PBS(-)で希釈した1次抗体で4℃一晩処理した。翌朝、PBS(-)で3回洗浄後、ブロッキング溶液で希釈した2次抗体で室温 2 時間処理した。PBS(-)で3回洗浄後、蛍光画像を共焦点レーザー顕微鏡で取得した。画像は Image J (National Institutes of Health)で処理した。Hoechst 33258 による細胞核の染色は、2次抗体と同時に、もしくは2次抗体処理後に20分間追加処理することで行った。1次抗体として、ヤギ抗 T7 抗体は 1,000 倍希釈、ウサギ抗 TDP-43 抗体は 100 倍希釈で使用した。2次抗体として用いた Alexa Fluor 546 結合抗ヤギ IgG 抗体と FluoroLink Cy5 結合抗ウサギ IgG 抗体は、どちらも 500 倍希釈で使用した。

#### 第5節 ヘテロカリオンアッセイ

Drb1 が核-細胞質間シャトルタンパク質であるか、ヘテロカリオンアッセイにより検証した。ヘテロカリオンアッセイは異種の細胞を細胞質融合することでヘテロカリオン細胞を作製し、核質に発現する目的タンパク質の異種細胞核へ

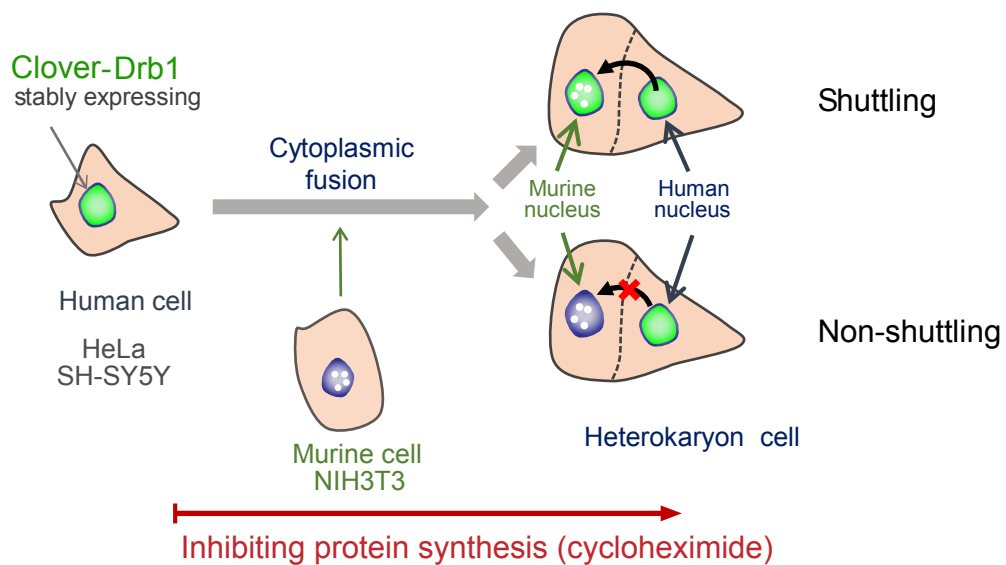


図 2. ヘテロカリオンアッセイの概略図.

Clover 蛍光タンパク質と融合した目的タンパク質を安定発現させたヒト由来細胞 (HeLa 細胞, SH-SY5Y 細胞) にマウス由来細胞 (NIH3T3 細胞) をタンパク質合成阻害剤処理下で細胞質融合させる. 一定時間培養後に固定して, ヘテロカリオン細胞内のマウス由来核 (ヘテロクロマチンが斑状に見えるため判別可能) における Clover 融合タンパク質の蛍光シグナルの有無を観察する. マウス由来核に Clover 蛍光シグナルを認めればシャトルありと判定する.

の移動を評価することによりタンパク質の核-細胞質間シャトル能を検証する方法である (図 2).

異種間細胞融合には、通常ポリエチレングリコール (PEG) がよく利用されている (Piñol-Roma and Dreyfuss, 1992) が、本研究では融合細胞への毒性が低い不活化センダイウイルス, HVJ-E を用いた. 35-mm 径 PLL-coated ガラスボトムディッシュに播種したマウス NIH3T3 細胞とは別に, Clover 融合 Drb1 タンパク質を安定に発現するヒト HeLa 細胞およびヒト神経芽細胞腫 SH-SY5Y 細胞を用意した. 細胞融合処置前後で, 各細胞を CHX 含有標準培養液で培養し, 各細胞の細胞質における新規タンパク質合成を阻害した. 具体的には, 細胞融合前に 50  $\mu\text{g/mL}$  の濃度で 37°C, 4 時間, さらに 100  $\mu\text{g/mL}$  の濃度で 37°C, 30 分間処理した. HeLa 細胞および SH-SY5Y 細胞 ( $2 \times 10^5$  個) を 25  $\mu\text{L}$  の PBS に懸濁し, エッペンドルフチューブ中で 4  $\mu\text{L}$  の HVJ-E とピペティングで混ぜ合わせた後, 氷上で 5 分間静置した. HVJ-E で処理したヒト細胞は 200  $\mu\text{L}$  PBS を加えて懸濁後, PBS で一度洗浄したマウス NIH3T3 細胞上へ上層し, 異種間細胞質融合を開始させた. 融合反応は 5%  $\text{CO}_2$  インキュベーター内で 37°C, 20 分間行った. PBS で一度洗浄した後, 50  $\mu\text{g/mL}$  の CHX 含有標準培養液中で 37 °C, 5%  $\text{CO}_2$  インキュベーター内で 2 時間培養した. 培養後, 4% PFA を用いて室温で 15 分間固定, 続いて 0.1% Triton で permeabilization 処理を行い, Hoechst 33258 を用いて核の染色を行った. ヘテロカリオン細胞の細胞輪郭を明確にするために, Phalloidin でアクチン染色を行った. 蛍光像は共焦点蛍光レーザー顕微鏡 (Leica) で撮影し, LAS AF ソフトウェアで解析した. 描画ツールを用い, 各ヘテロカリオン細胞内のマウス由来核領域と細胞質領域を各々選択した. 各領域のピクセルあたりの平均 Clover 蛍光強度を定量した. 各ヘテロカリオン細胞につき, マウス由来核領域の平均 Clover 蛍光強度から細胞質の平均 Clover 蛍光強度を差し引き

た値を各細胞の補正 Clover 蛍光強度と定義し、各々の Clover 融合タンパク質の測定値を箱ひげ図へプロットした。

## 第 6 節 共免疫沈降物の検出

10-cm ディッシュ 1 枚分の細胞を氷冷 PBS(-) で洗浄後、1 mL の IP buffer に溶解した。細胞溶解物は 22 ゲージおよび 27 ゲージ注射針の順にそれぞれ 5 回通して DNA を剪断後、4 °C, 30 分間静置した。細胞不溶物は 15,000 × rpm, 4 °C, 20 分間遠心により除去した。上清(約 400 μg)に抗体(Novagen 社製抗 T7 抗体 0.5 μg, または抗 GFP 抗体 1.5 μg)を加え、4 °C で一晩転倒混和した。その後プロテイン A 磁気ビーズを加え、さらに 4 °C で 1 時間転倒混和した。磁気ビーズは予め 5% skim milk 含有 PBS(-) で室温, 1 時間処理したものを用いた。磁気ビーズを IP buffer で 3 回洗浄後、2 × sample buffer を加え、90 °C で 5 分間処理した。2 × sample buffer に溶解したタンパク質を 12% SDS-ポリアクリルアミドゲルで展開した。タンパク質はセミドライ法で PVDF 膜にブロットした。5% skim milk 含有 PBS (-) でブロッキング処理を室温 30 分間行い、0.25% skim milk 含有 PBS (-) で希釈した 1 次抗体で 4 °C, 一晩の条件で処理した。1 次抗体として、ウサギ抗 GFP 抗体を 3,000 倍希釈、マウス抗 T7 抗体 を 5,000 倍希釈(Novagen 社製)、マウス抗 TDP-43 抗体 を 10,000 倍希釈で用いた。0.25% skim milk 含有 PBS (-) で希釈した 2 次抗体で、室温, 1 時間処理をした。2 次抗体として、horseradish peroxidase-conjugated 抗ウサギ、あるいは抗マウス抗体はそれぞれ、3,000 倍希釈で使用した。検出には、ECL detection reagent (standard あるいは prime)を用い、ImageQuant LAS 4000 mini で画像取得した。ウェスタンブロットにおける洗浄は全て PBS-T を用いた。



## 第7節 ミトコンドリア膜電位測定

ALS を含めた神経変性疾患におけるアポトーシス様細胞死の誘導や、変性細胞におけるミトコンドリアの形態や局在の異常などから、ALS の病態とミトコンドリア機能の障害との関連が示唆されている (Galbiati et al., 2014; Itoh et al., 2013). そこで、Drb1 による細胞質凝集体形成に伴う細胞傷害を調べる目的で、ミトコンドリア機能の一つの指標であるミトコンドリア膜電位を検討した.

ミトコンドリア膜電位 ( $\Delta\psi_m$ ) の測定には、TMRE を用いた. 35 mm PLL-coated ガラスボトムディッシュに播種した HeLa 細胞に、Clover タンパク質のみ、あるいは Clover-T7-tag-Drb1-WT およびその変異体-R470G, ならびに -mtLL/R470G を発現させるプラスミドを前述の方法でトランスフェクションし、さらに 24 時間培養した. 培養液を除いて PBS(-) 溶液で洗浄した後、37 °C 保温した 100 ng/mL の TMRE および 1  $\mu$ g/mL の Hoechst 33342 を含む標準培養液で 20 分間、37 °C、5% CO<sub>2</sub> 下で培養した. 37 °C 保温した PBS(-) 溶液で 1 回洗浄後、フェノールレッド不含 Opti-MEM 溶液 500  $\mu$ L と交換し、直ちに観察した. 共焦点蛍光レーザー顕微鏡 (Leica) を用い、LAS AF software で画像取得した. また、各群のミトコンドリア膜電位の定量評価のため、24-well マルチプレートを用いて同様の方法で TMRE 染色した細胞を用意し、IN Cell Analyzer 1000 (GE Healthcare) を用いて加温条件下、20 倍対物レンズを用いて画像を取得した. 画像解析には IN Cell Developer Toolbox (GE Healthcare) を用いた. 各群 Clover 発現細胞のみを抽出し、その細胞につき 1 単位面積あたりの Rhodamine 蛍光強度を測定・定量し、箱ひげ図を描いた. Clover-T7-Drb1-mtNLS/R470G 発現細胞については凝集体形成の有無で各群に分けた. 各群 250 個以上の細胞を測定した.

## 第 8 節 統計処理

箱ひげ図描写および、各標本の要約、Fisher 正確検定、Mann-Whitney U 検定、Kruskal-Wallis 順位和検定および Steel-Dwass 検定は全て Easy R (ver. 1.29) 統計処理ソフトで行った (Kanda, 2013).

## 第 3 章 結果

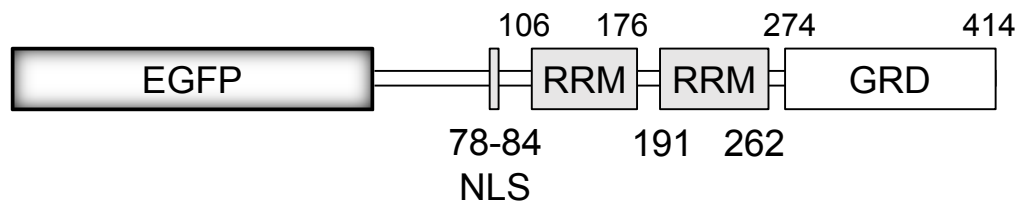
### 第 1 節 Drb1 は TDP-43 細胞質凝集体に共局在する

ALS の病理像では TDP-43 陽性細胞質封入体に Drb1 が共局在することが近年明らかになっている。この封入体形成機構を明らかにするために、先ず TDP-43 細胞質封入体形成 HeLa 細胞モデルを作製した。TDP-43 の NLS と RRM2 の一部の配列を欠失させた人為的な TDP-43 の欠失変異体 TDP-43-mt は、SH-SY5Y 細胞において一過性発現により細胞質凝集体を形成し、この凝集体は ALS 患者で認める封入体と同様の生化学的性質を有することが示されている (Nonaka et al., 2009)。EGFP 融合野生型 TDP-43 (EGFP-TDP-43-WT) および変異型 TDP-43 (EGFP-TDP-mt) を発現するプラスミド (図 3A) を HeLa 細胞に導入し、約 24 時間後の EGFP-TDP-43 の蛍光像を観察した。その結果、EGFP-TDP-43-WT は主に核小体を除く核質に局在を示す (図 3B, a-c) のに対し、EGFP-TDP-mt は同様の核局在に加えて細胞質に凝集体の形成が認められた (d-f)。この結果は、SH-SY5Y 細胞で観察される結果と一致したことから、EGFP-TDP-mt の細胞質凝集体形成を HeLa 細胞においても再現したことを示唆する。次に TDP-43 細胞質封入体形成モデル細胞において Drb1 の細胞内局在への影響を評価するため、T7 タグ融合野生型 Drb1 (T7-Drb1-WT) 発現プラスミドを作製した (図 4A)。HeLa 細胞内での T7-Drb1-WT 単独発現では T7-Drb1-WT は核小体を除く核質に局在を示し、細胞質における凝集体形成は認めなかった (図 4B, a-c)。一方、EGFP-TDP-mt と T7-Drb1-WT を同時発現させた HeLa 細胞では、一部の細胞において TDP-43 由来細胞質凝集体へ T7-Drb1-WT の共局在が認められた (d-f)。

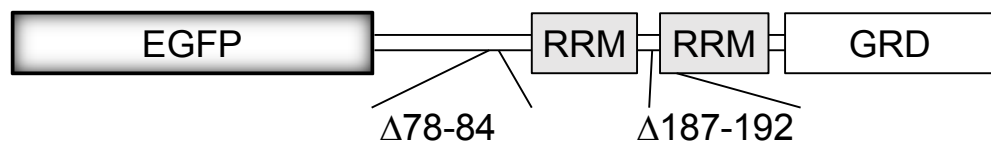
次に、TDP-43 と Drb1 間の結合状態を明らかにするために免疫沈降法を行った。EGFP, EGFP-TDP-43-WT, EGFP-TDP-43-mt の各タンパク質と T7-Drb1-WT を同

A

### EGFP-TDP-43-WT



### EGFP-TDP-mt



B

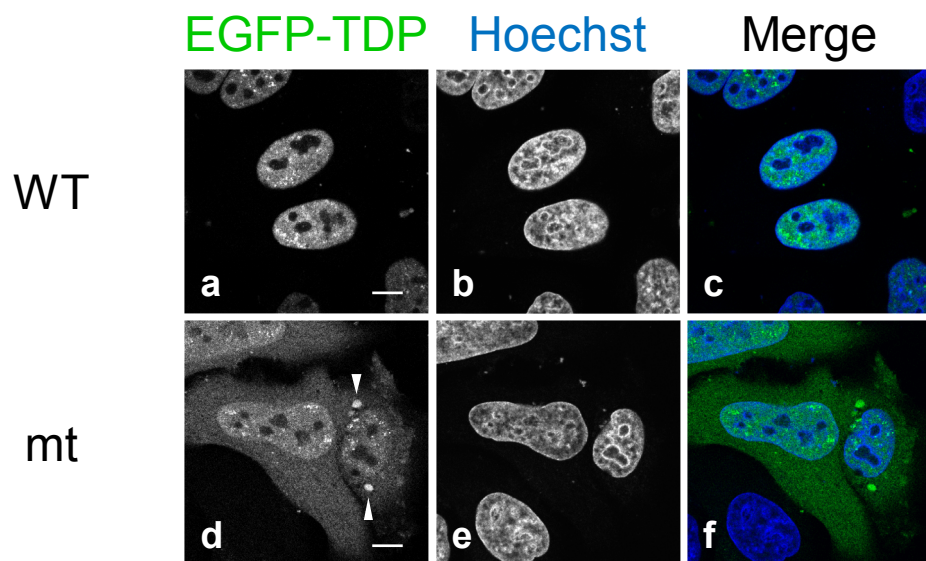
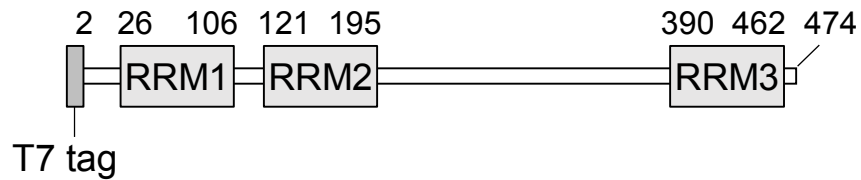


図 3. 変異型 TDP-43 による細胞質凝集体形成モデル細胞.

(A) EGFP 融合ヒト野生型 TDP-43 (WT) (上段) および 2 重欠失変異体 (-mt) (下段) のコンストラクト. (B) 各コンストラクトを HeLa 細胞にトランスフェクション後 24 時間で固定した. EGFP-TDP-43-WT (a-c) および EGFP-TDP-mt (d-f) の蛍光像を示す. (d) の矢頭は EGFP-TDP-mt の細胞質凝集体を指す. 核は Hoechst 33258 により染色. Bar = 10  $\mu$ m. GRD: glycine-rich domain, NLS: nuclear localization signal, RRM: RNA-recognition motif.

A

## T7-Drb1-WT



B

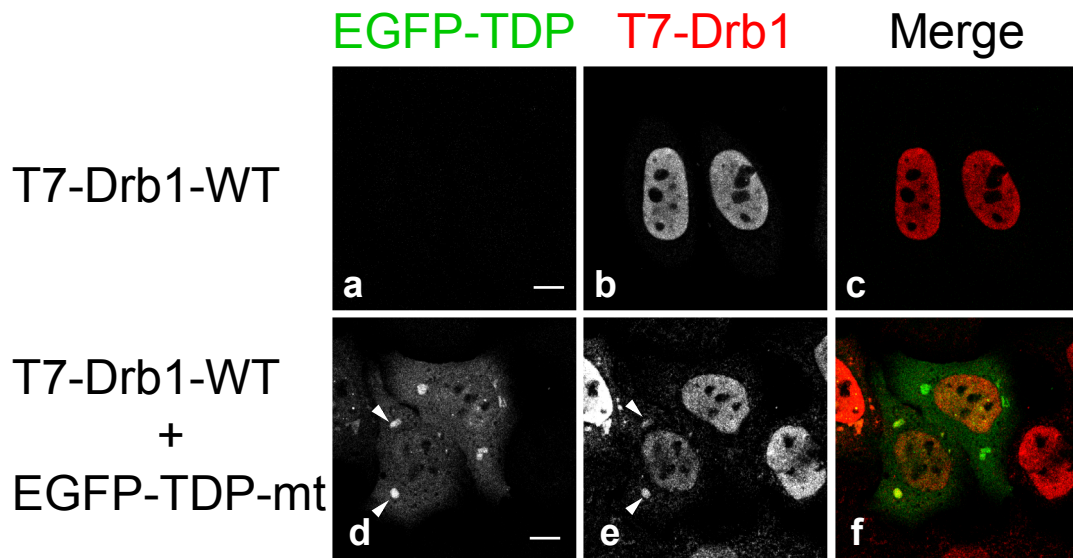


図 4. TDP-43 細胞質凝集体形成モデル細胞における Drb1 の細胞内局在像。

(A) T7 タグ融合ヒト Drb1 のコンストラクト. (B) T7-Drb1-WT を単独で一過性発現させた HeLa 細胞の免疫細胞蛍光像 (a-c). T7-Drb1-WT と EGFP-TDP-mt を共発現させた HeLa 細胞 (d-f). トランスフェクション後 24 時間で固定した. 1 次抗体: ヤギ抗 T7 抗体, 2 次抗体: Alexa Fluor 546 結合抗ヤギ Ig 抗体. 一部の細胞質凝集体に TDP-43 と Drb1 の共局在を認めた (矢頭, [d, e]). Bar = 10  $\mu$ m.

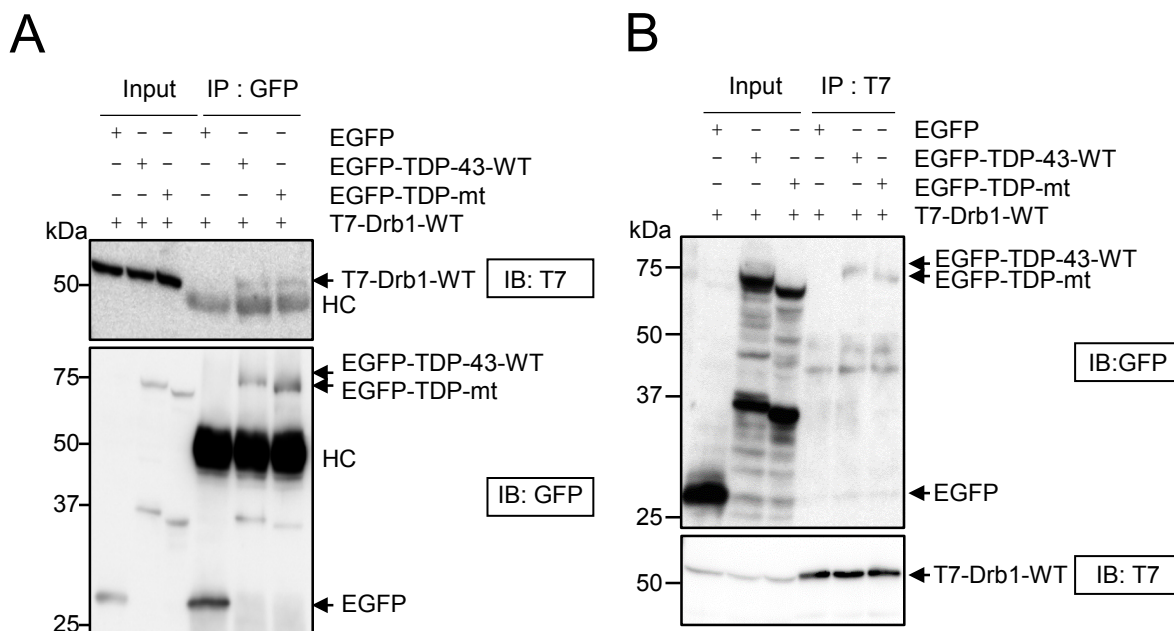


図 5. TDP-43 と Drb1 のタンパク質間相互作用.

T7-Drb1-WT と EGFP, EGFP-TDP-43-WT, または EGFP-TDP-mt を共発現させた HeLa 細胞のヌクレアーゼ処理を施した全細胞溶解液を用いて共免疫沈降を行った. (A) 抗 GFP 抗体で EGFP, EGFP-TDP-43-WT, あるいは EGFP-TDP-mt を免疫沈降し, 共沈する T7-Drb1-WT を抗 T7 抗体で検出した. EGFP-TDP-43-WT および EGFP-TDP-mt と共に T7-Drb1-WT の沈降を検出したが, EGFP のレーンでは検出しなかった. (B) 抗 T7 抗体で T7-Drb1-WT を免疫沈降し, 共沈する EGFP 融合タンパク質を抗 GFP 抗体で検出した. T7-Drb1-WT と共に EGFP-TDP-43-WT および EGFP-TDP-mt の沈降を検出したが, EGFP のレーンでは検出しなかった. IP: immunoprecipitation, IB: immunoblot.

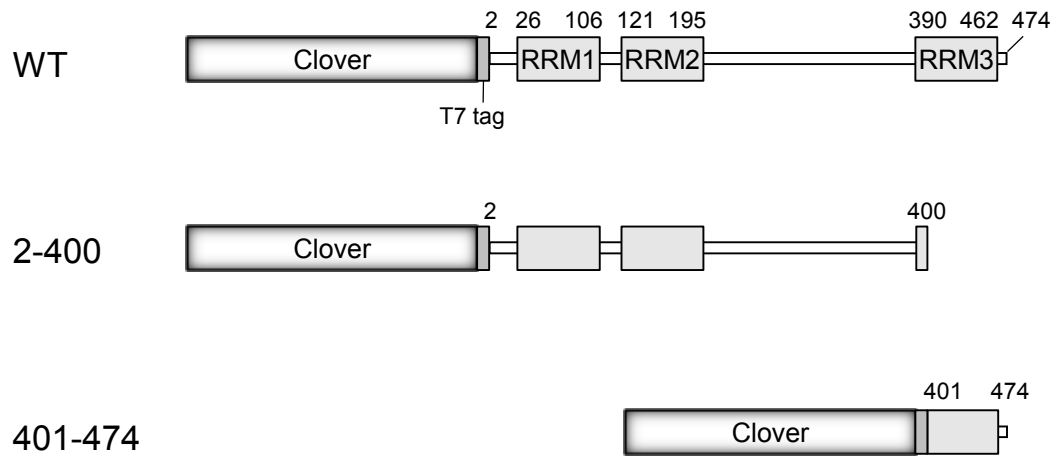
時発現させた HeLa 細胞溶解液について抗 GFP 抗体 (EGFP に結合する) を用いて免疫沈降を行った。その結果、EGFP-TDP-43-WT および EGFP-TDP-mt の沈降物と共に T7-Drb1-WT が検出された (図 5A)。一方、EGFP 単独では T7-Drb1-WT は検出されなかった。次に TDP-43 と Drb1 間の結合を再確認するために、抗 T7 抗体による免疫沈降を行った。その結果、T7-Drb1-WT の沈降物とともに EGFP-TDP-43-WT および EGFP-TDP-mt が検出された (図 5B)。用いた細胞溶解液は核酸分解酵素処理したものであることから、これらの結果は TDP-43-WT および TDP-43-mt は共に Drb1 とタンパク質-タンパク質間相互作用を介して結合することを示している。

## 第 2 節 Drb1 は核タンパク質で古典的核移行シグナル(NLS)を有する

Drb1 の細胞内局在に関わるドメインを明らかにするために、Clover 蛍光タンパク質 (GFP 改変タンパク質) を融合した野生型および欠失変異型 Drb1 を発現させるプラスミドを作製した (図 6A)。これらプラスミドを HeLa 細胞に導入し約 24 時間後、Drb1 の細胞内局在を蛍光顕微鏡により解析した。野生型 Drb1 は核小体を除く核質に局在を示した (図 6B, a-c)。この局在は内因性 Drb1 (Bakkar et al., 2015; Collins et al., 2012) や T7-Drb1-WT (図 4B, b) で観察されたものと一致していた。次に、C 末欠失変異体 2-400 を発現させると、核排他的な細胞質局在が観察された (図 6B, d-f)。また、N 末欠失変異体 401-474 では、細胞質に弱いシグナルが観察されたが、主要なシグナルは野生型と同様に核質に局在を示した (図 6B, g-i)。以上の結果は Drb1 の C 末端領域に核局在に必要なドメインが存在することを示唆している。

詳細な NLS を決定する目的で NLS 配列予測プログラム cNLS Mapper (Kosugi et al., 2009) を用いてヒト Drb1 タンパク質内の NLS を解析したところ、C 末端

A



B

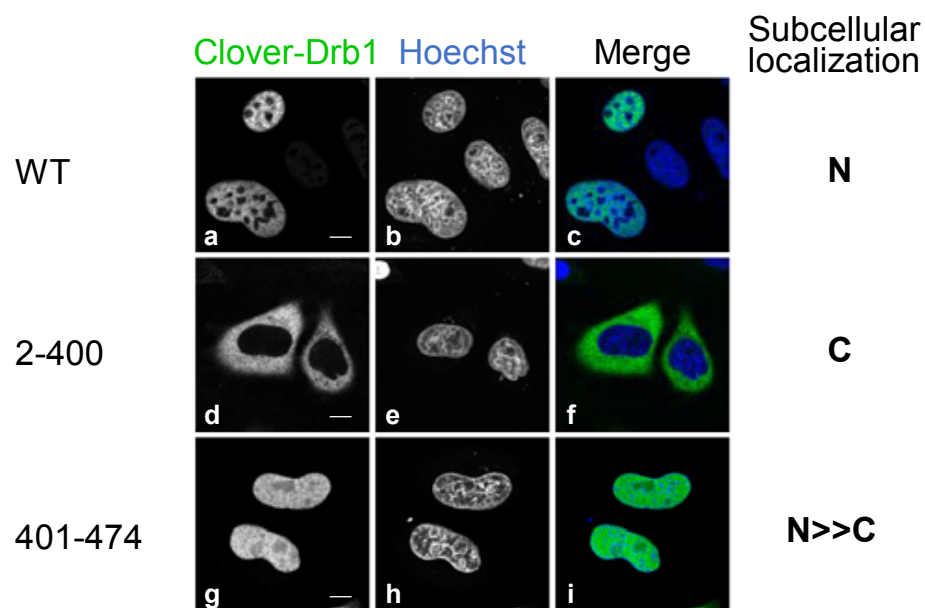


図 6. Drb1 の C 末端に NLS が存在する。

(A) Clover-T7 融合野生型 Drb1 (WT) とその欠失変異体 (2-400, 401-474) のコンストラクト. (B) Clover-T7-Drb1-WT (a-c), -2-400 (d-f), -401-474 (g-i) の細胞内局在像. 各コンストラクトを HeLa 細胞にトランスフェクション後 24 時間で固定した. 核は Hoechst 33258 により染色. Bar = 10  $\mu$ m. 右に主要な細胞内局在様式を表す (N: 核質, C: 細胞質). Drb1 の C 末端を含有するコンストラクトでは核質を主局在とし (a-c および g-i), C 末端を欠失させた変異体は核質局在を示さず細胞質局在を示した (d-f).



Human	451	NGVRLKVMLADSPREESN-----KRQRTY	474	Q8IUH3-3
Rabbit	451	NGVRLKVMLADSPREESN-----KRQRTY	474	G1SET2
Cattle	451	NGVRLKVMLADSPREESN-----KRQRTY	474	Q3MHF0
Mouse	451	NGVRLKVMLADSPREESK-----KRQRTY	476	Q8BHN5
Rat	451	NGVRLKVMLADSPREVSK-----KRQRTY	476	Q8CFD1
Chicken	451	NGVRLKVRLADSPTEESN-----KRQRTY	502	F1NEX8
Frog	451	NGVKLKVMQADSPREESN-----KRQRTY	476	Q7ZXD8
Zebrafish	451	NGVKMKVMLADPPKEESH-----KRQRTY	467	B0S522
Fruit fly	446	CGTKIKVMEAEERSGSDGDDGGRKRLRN	470	Q9VZE4
		c1	c2	

**図 7. Drb1 の C 末端における予測 bipartite-type classical NLS**

9 種の生物種における Drb1 の C 末端アミノ酸配列. 網掛けは塩基性アミノ酸を示す. 各々の UniProt ID を右側に示す. 配列下の “c1” および “c2” はそれぞれ bipartite-type NLS を構成する塩基性アミノ酸クラスターを表す. c1 および c2 クラスターの各塩基性アミノ酸は種間で高度に保存されている. NLS は, cNLS Mapper (Kosugi et al., 2009) により予測.

A

	451	<u>c1</u>		<u>c2</u>	474
WT	NGV	<b>RLK</b>	VMLADSPREESN	<b>KRQR</b>	TY
mtNLSc1+c2	---	<b>A-A</b>	-----	<b>AA-A</b>	---
mtNLSc1	---	<b>A-A</b>	-----		
mtNLSc2	-----			<b>AA-A</b>	---
R470G	-----			<b>G</b>	---

B

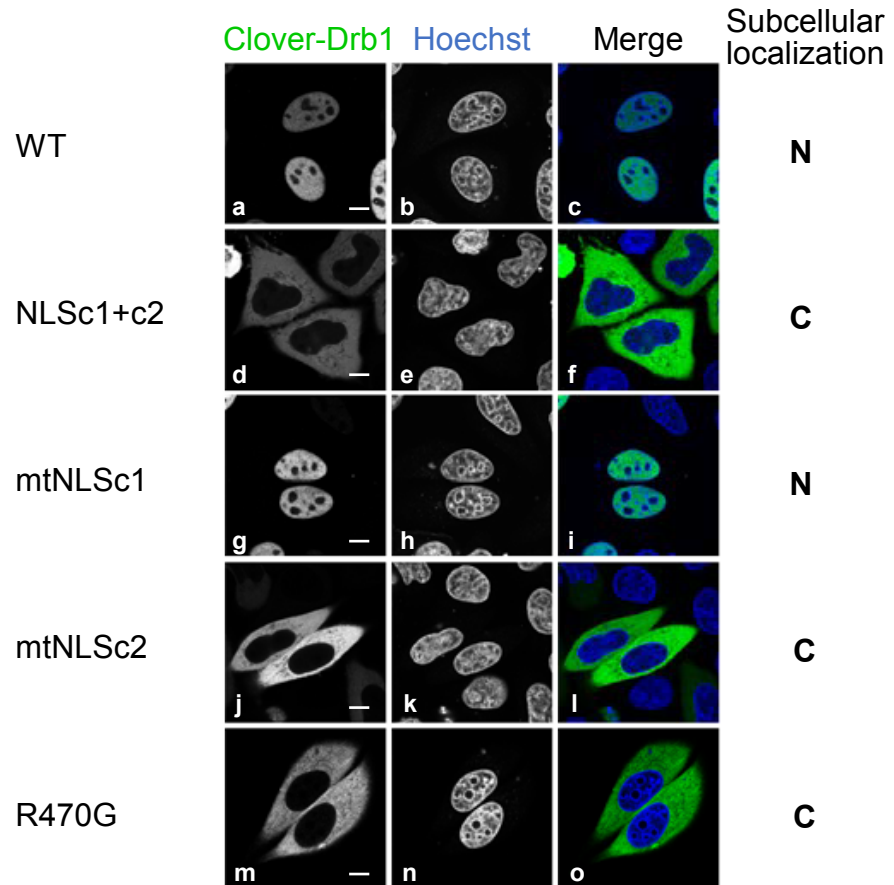


図 8. Drb1 の NLS は monopartite-type である。

(A) ヒト Drb1 の C 末端におけるアミノ酸配列. 予測 bipartite-type NLS の塩基性アミノ酸クラスターを c1 および c2 とした. 各クラスターの塩基性アミノ酸に対するアラニン (A) あるいはグリシン (G) 置換変異体を示す. (B) Clover-T7-Drb1 について野生型 WT (a-c) および置換変異体 mtNLSc1+c2 (d-f), mtNLSc1 (g-i), mtNLSc2 (j-l), R470G (m-o) の細胞内局在像を示す. 各コンストラクトを HeLa 細胞にトランスフェクション後, 24 時間で固定した. 核は Hoechst 33258 により染色. Bar = 10  $\mu$ m. 右に主要な細胞内局在様式を表す (N: 核質, C: 細胞質).

領域に bipartite-type NLS が検出された(図 7). この予測 bipartite-type NLS は NLS のコンセンサス配列成分として知られる塩基性タンパク質リジン (K) およびアルギニン (R) 残基に富む二つのクラスター(c1, c2)から構成されており, ショウジョウバエから哺乳動物まで高く保存されている(図 7). この予測 bipartite-type NLS について, NLS としての活性を検証するため, 両クラスターの K および R 残基を非極性アミノ酸であるアラニン(A)あるいはグリシン(G)へ置換した変異 Drb1 発現プラスミドを作製した (図 8A). c1 と c2 の両クラスターの置換変異体 mtNLSc1+c2 は, 予測通り細胞質へ局在を変化させた (図 8B, d-f, 野生型 Drb1 (a-c)は核局在を示す). 一方, c1 クラスターのための置換変異体 (mtNLSc1)は野生型と同様の核局在を示した(g-i). c2 クラスターのための置換変異体(mtNLSc2)は細胞質局在を示した(j-l). このことから Drb1 の c1 クラスターは NLS に寄与しておらず, c2 のみの monopartite-type NLS であることが明らかになった. さらに c2 クラスターを構成する 3 つの塩基性アミノ酸一つ R470 を G に置換しただけで NLS の活性が消失した (m-o). この結果は, Drb1 の核移行に c2 クラスターが重要な役割を果たしていることを支持している.

### 第 3 節 Drb1 は核-細胞質間をシャトルする

ALS および FTLD 関連 RNA 結合タンパク質である TDP-43 および FUS/TLS タンパク質は共に核局在を示し, 核-細胞質間シャトルするタンパク質であることが知られている (Ayala et al., 2008; Zinszner et al., 1997). このことから Drb1 についても核と細胞質をシャトルする機構を有しているのかどうかを検証するために, タンパク質の核-細胞質間シャトルを検証する手法であるヘテロカリオンアッセイ(図 2)を実施した. アフリカツメガエル nucleoplasmin の core domain (NPc)に SV40 large T antigen の NLS を融合したタンパク質 NPc-NLS は,

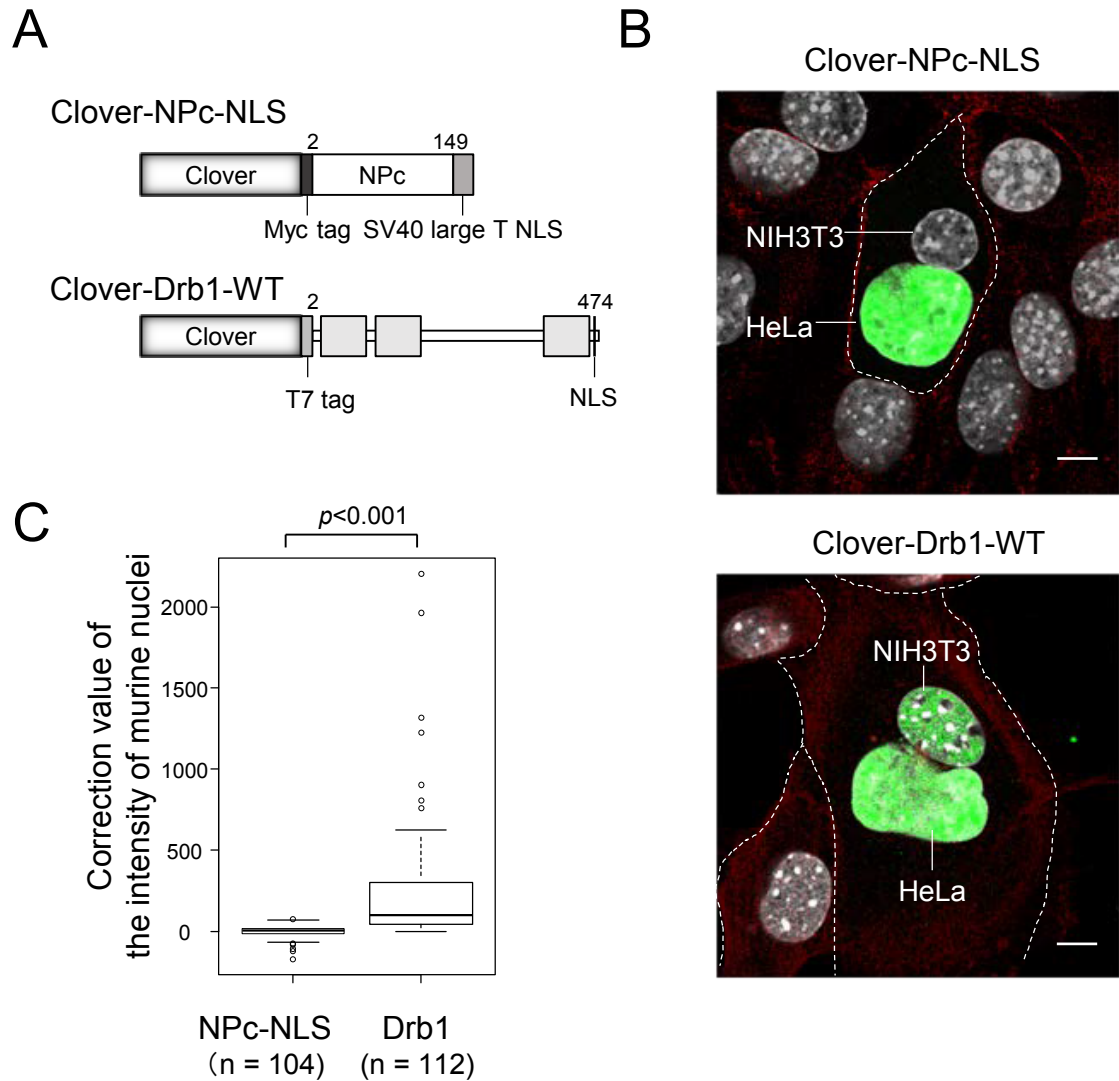
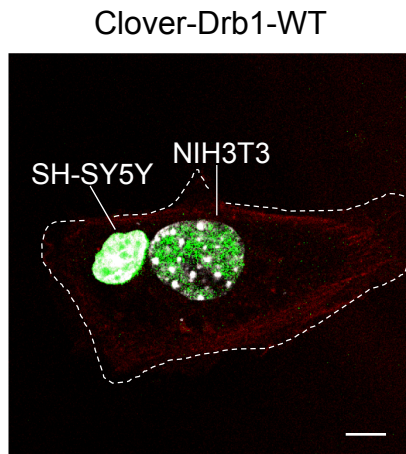


図 9. Drb1 は核 - 細胞質間をシャトルする。

(A) Clover-NPc-NLS (上段) と Clover-Drb1-WT (下段) のコンストラクト。  
 (B) Clover-NPc-NLS (上段) または Clover-Drb1-WT (下段) の安定発現 HeLa 細胞と NIH3T3 細胞のヘテロカリオン細胞像。Clover-NPc-NLS (非シャトルタンパク質) ではヘテロカリオン細胞内の NIH3T3 由来核に Clover の蛍光シグナルを認めない。一方, Clover-Drb1-WT ではヘテロカリオン細胞内の NIH3T3 由来核に Clover の蛍光シグナルを認める。緑: Clover, 白: Hoechst 33258, 赤: Phalloidin. 点線: 細胞膜輪郭. Bar = 10  $\mu$ m. (C) Clover-NPc-NLS, または Clover-Drb1-WT の安定発現 HeLa 細胞と NIH3T3 細胞のヘテロカリオン細胞において, マウス細胞由来核におけるピクセルあたりの補正 Clover 蛍光強度を測定し, 箱ひげ図を描いた。

A



B

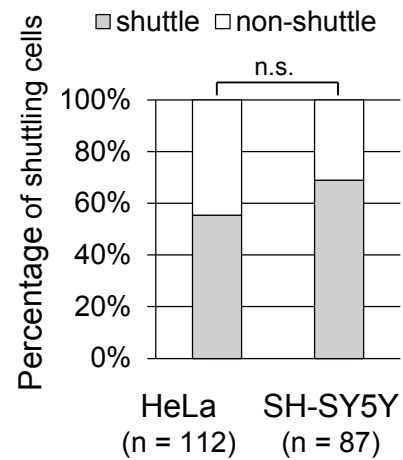


図 10. Drb1 の核 - 細胞質間シャトル能は神経系由来細胞でも機能する.

(A) Clover-Drb1-WT の安定発現 SH-SY5Y 細胞と NIH3T3 細胞とのヘテロカリオン細胞像. ヘテロカリオン細胞内の NIH3T3 由来核に Clover 蛍光を認める. 緑: Clover, 白: Hoechst 33258, 赤: Phalloidin. 点線: 細胞膜輪郭. Bar = 10  $\mu$ m. (B) 非神経細胞由来 HeLa 細胞と神経細胞由来 SH-SY5Y 細胞とのシャトル効率の比較. シャトルの有無は Clover-NPc-NLS についてヘテロカリオン細胞内の NIH3T3 細胞由来核内における補正 Clover 蛍光強度の最大値をカットオフ値と定めて判定した. HeLa 細胞と SH-SY5Y 細胞間でシャトル効率に有意差は認められなかった.  $p = 0.0573$  (フィッシャー正確検定). 表中のパーセントは Drb1 がシャトルしているヘテロカリオン細胞の割合を示す.

核移行後、核内に留まりシャトルしないタンパク質であることが示されていることから (Michael et al., 1995), これを陰性コントロールとした。まず, Clover-NPc-NLS 融合タンパク質または, Clover-Drb1-WT 融合タンパク質の発現プラスミドを HeLa 細胞に導入し, 安定発現株を作製した。これら細胞にタンパク質合成阻害剤存在下でマウス由来 NIH3T3 細胞を融合させ, ヘテロカリオン細胞を作製し, マウス由来細胞核への Clover 融合タンパク質の蛍光シグナルの移行を蛍光顕微鏡にて観察した。陰性コントロールである Clover-NPc-NLS では, ヘテロカリオン細胞内のマウス由来細胞核に Clover 蛍光を認めなかった (図 9B, 上段)。このことは, NPc-NLS はシャトルしないタンパク質であることを示している。一方, Clover-Drb1-WT では, ヘテロカリオン細胞内のマウス由来細胞核に Clover の蛍光シグナルが移行したことを観察した (下段)。この HeLa 細胞と NIH3T3 細胞を用いたヘテロカリオン細胞における Clover-Drb1-WT のシャトルは統計学的にも有意な差が認められた ( $p < 0.001$ , 図 9C)。この結果は, Drb1 は核-細胞質間をシャトルするタンパク質であることを示している。

次に, Drb1 の核-細胞質間シャトル機能が細胞種により影響するかどうかについて検討した。ヒト神経芽腫由来 SH-SY5Y 細胞を用いて Clover-Drb1-WT の安定発現細胞株を作製し, マウス由来 NIH3T3 細胞を用いてヘテロカリオンアッセイを実施した。その結果, SH-SY5Y 細胞のヘテロカリオン細胞においても Drb1 の核-細胞質間シャトルが認められた (図 10A)。また, 非神経系 HeLa 細胞と神経系由来 SH-SY5Y 細胞で, Drb1 のシャトル効率に有意な差は認められなかった (図 10B)。このことから Drb1 は細胞種に依らず核-細胞質間をシャトルするタンパク質であることが明らかとなった。

#### 第 4 節 Drb1 のリンカー領域に存在する連続ロイシン配列は核外移行シグナル (NES) として作用する

Drb1 は核-細胞質間をシャトルすることから、NLS に加えて核外移行ドメイン (nuclear export signal; NES) が存在することが考えられる。Drb1 の NES を探索する目的で、Clover 融合 Drb1 の欠失変異体を作製した (図 11)。各欠失変異体のプラスミドを HeLa 細胞に導入し、約 24 時間後における Drb1 の細胞内局在を蛍光顕微鏡にて観察した。単独の Clover タンパク質は核および細胞質に等しく分布が見られた (図 12, a-c)。野生型 Drb1 は核局在を示す (d-f) のに対し、NLS を含む C 末側の欠失変異体 2-400 は核排他的に細胞質に局在した (g-i)。更に C 末側を欠失させた変異体 2-300 では核排他性を失い、Clover 単独発現と同様に核および細胞質に均等に分布した (j-l)。N 末側を 300 アミノ酸欠失させた変異体である 301-474 では、NLS を含有することから野生型と同様の核局在を示した (m-o)。301-474 から C 末側を欠失した変異体 301-400 では、核に弱い局在が認められるが、細胞質優位な局在を示した (p-r)。図 6B において変異体 401-474 が強い核局在を示したことを考え合わせると、これらの結果は、Drb1 の RRM2 と RRM3 の間のリンカー領域 (301-400 aa) に NES が存在することを示唆している。アミノ酸の一次配列を探索したところ、一般的な NES のコンセンサス配列として知られるロイシン (L) に富んだ配列 (Bogerd et al., 1996; la Cour et al., 2004) はこの領域には存在せず、唯一この領域に連続ロイシン配列 (329L, 330L) が存在するのみであった (図 11, 301-400-mtLL 参照)。そこで、この連続ロイシン配列が NES としての機能を有するかどうかを検証するために、アラニン置換変異体 301-400-mtLL を発現するプラスミドを作製した (図 11)。301-400-mtLL を発現するプラスミドを HeLa 細胞に導入し、Clover の蛍光シグナルを観察した。その結果、301-400-mtLL は細胞質優位な核排他的な局在が減弱し、

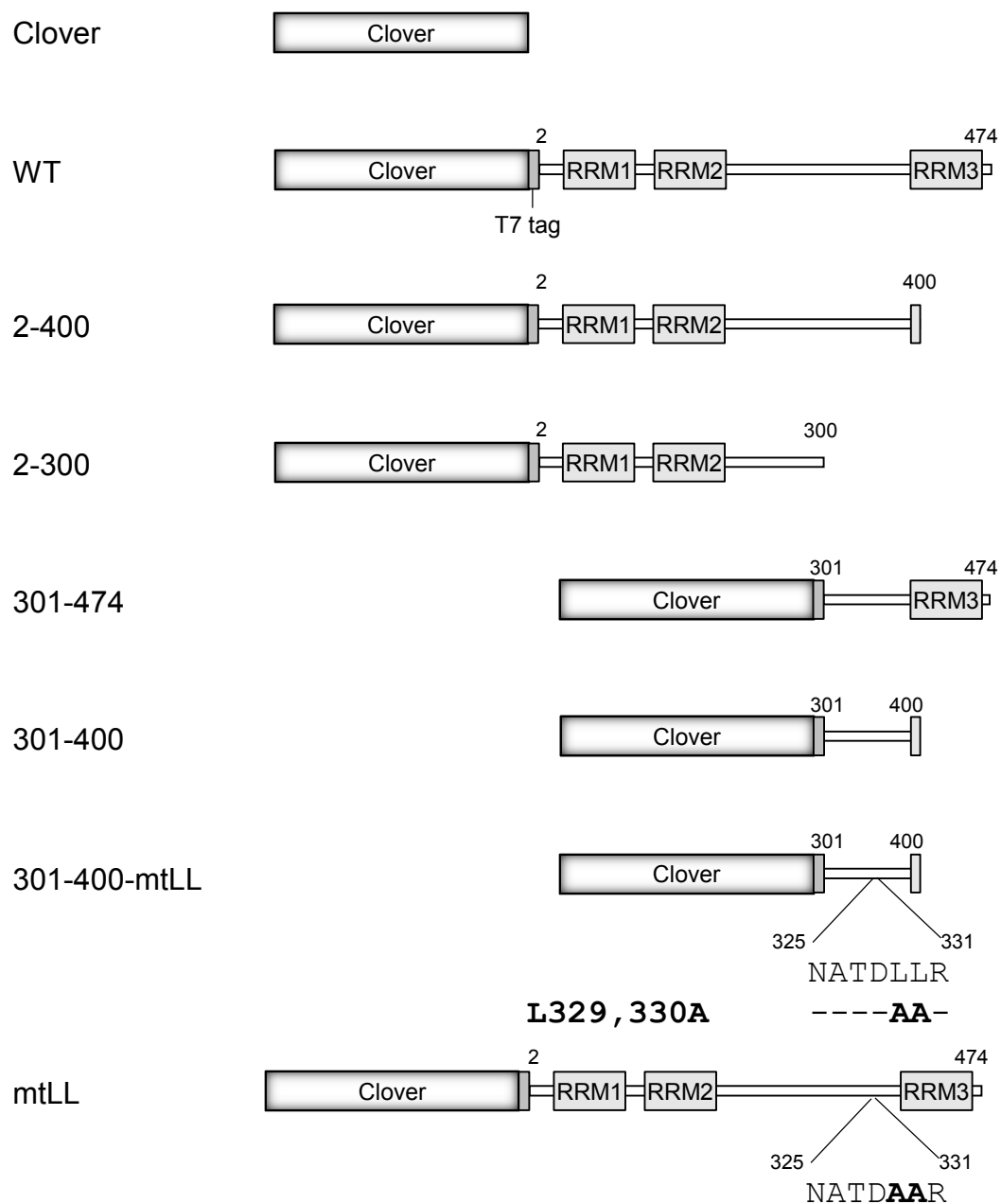


図 11. Clover 融合 Drb1 の欠失変異体とアミノ酸置換変異体のコンストラクト。上から順に緑色蛍光タンパク質 Clover と Clover 融合野生型 Drb1 (WT:2-474), とその欠失変異体 2-400, 2-300, 301-474, 301-400 を示す。続いて 301-400 欠失変異体の 329 および 330 番目の連続ロイシンに対するアラニン置換変異体 301-400-mtLL, および全長 Drb1 の連続ロイシンに対するアラニン置換変異体 mtLL.



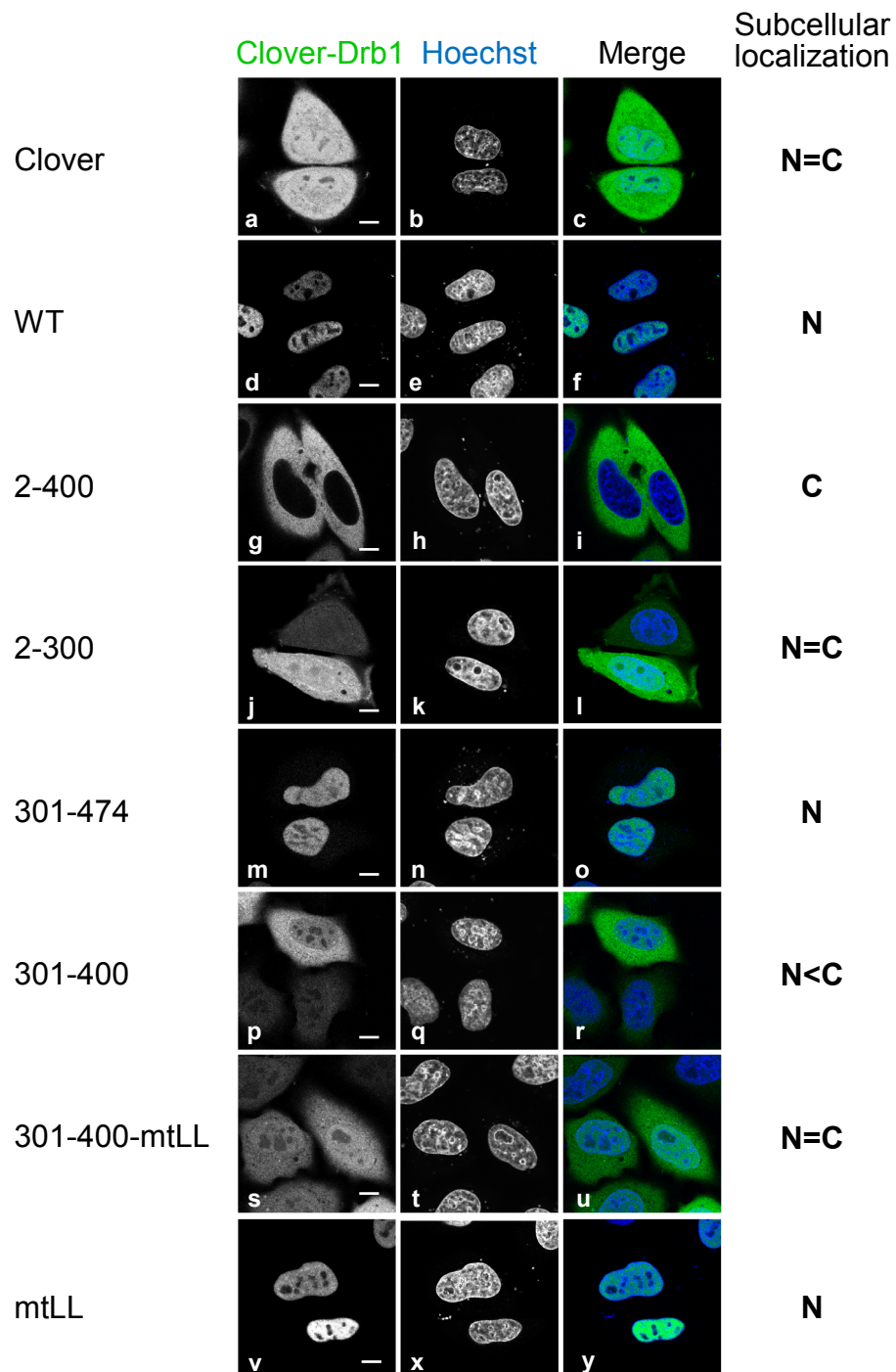


図 12. Drb1 のリンカー領域の連続ロイシンは NES として機能する。

図 11 で示した Clover および Clover-T7-Drb1 の欠失変異体およびアミノ酸置換変異体を HeLa 細胞に発現させた時の細胞内蛍光画像。それぞれ Clover (a-c), 野生型 Clover-Drb1(WT) (d-f), およびその欠失変異体 2-400 (g-i), 2-300 (j-l), 301-474 (m-o), 301-400 (p-r) とそのアミノ酸置換変異体 301-400-mtLL (s-u), そして Drb1 全長のアミノ酸置換変異体 mtLL (v-y) の蛍光像を示す。核は Hoechst 33258 により染色。Bar = 10  $\mu$ m. 右に主要な細胞内局在様式を表す (N: 核質, C: 細胞質)。

Clover 単体と同様に核および細胞質に均等分布を示した(図 12, s-u). このことから Drb1 の RRM2 と RRM3 の間のリンカー領域に存在する連続ロイシン配列は NES 活性を有することが示された.

#### 第 5 節 Drb1 の NLS および NES への二重変異導入により TDP-43 陽性細胞質凝集体を形成する

一部の孤発性および家族性 ALS 症例では脊髄前角ニューロンの免疫組織染色の検討において、核輸送受容体タンパク質の局在異常や、核膜孔複合体の形態異常を認め、核-細胞質間輸送機構の機能障害を示唆する報告がある(Kinoshita et al., 2009). その他にも、近年、ALS を始めとする神経変性疾患の傷害神経細胞において核-細胞質間輸送機構の変化と病態発症との関係を示唆する免疫組織学的検討およびモデル動物やモデル細胞における検討が複数報告された(Nagara et al., 2013; Patel and Chu, 2011; Zhang et al., 2015). そこで Drb1 の NLS および NES の破綻が障害神経細胞のマーカーである細胞質凝集体形成の誘因となり得るかどうかを検証した. Drb1 の NLS と NES を片方のみ、もしくは同時にアミノ酸置換した変異体(mtLL, R470G, mtLL/R470G)を発現させるプラスミドを作製した(図 13A). 各プラスミドを HeLa 細胞に導入後、約 24 時間タンパク質を発現させて細胞質凝集体を形成するかどうかを解析した. 野生型 Drb1 (WT)や NES 変異体 (mtLL) では、核局在のみで細胞質凝集は認められなかった(図 13C, および図 12, d-f(WT), v-y(mtLL)). また NLS 変異体では細胞質局在を示すが、細胞質凝集体の形成は認められなかった(図 13C および図 8, m-o(R470G)). 一方で、NLS と NES の二重変異体 mtLL/R470G では、主要な細胞質局在様式に加えて、細胞質凝集体を形成する細胞が観察された(図 13B および C).

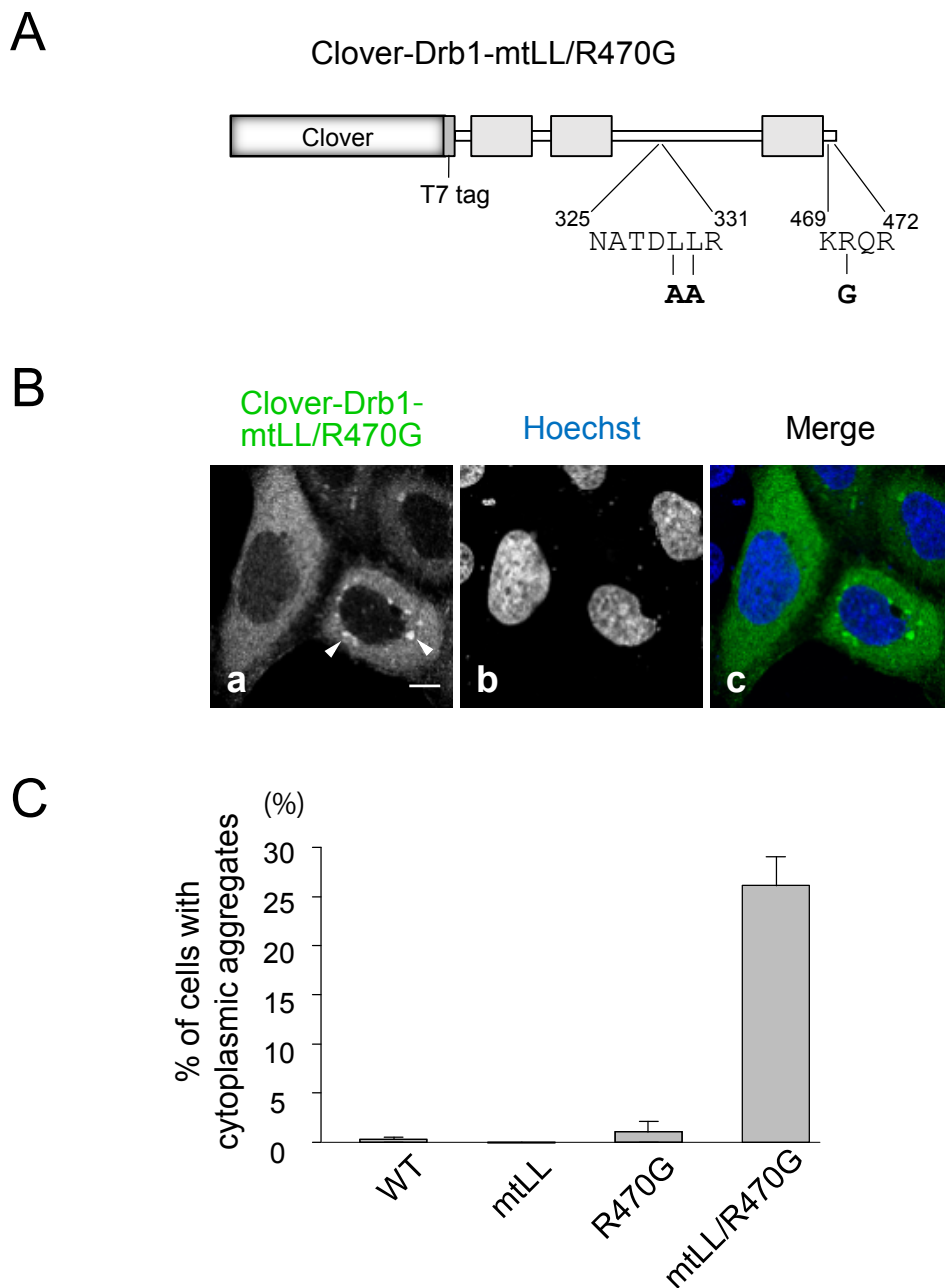


図 13. Drb1 の NLS と NES の二重置換変異導入は細胞質凝集体を誘導する.

(A) Clover-T7 融合 Drb1 二重変異体のコンストラクト. (B) HeLa 細胞に発現させた Clover-Drb1-mtLL/R470G の細胞内局在を示す. 細胞質凝集体の形成が認められる (a, 矢頭). 核は Hoechst 33258 により染色. Bar = 10  $\mu$ m. (C) Clover-Drb1-WT, -mtLL, -R470G, -mtLL/R470G を発現する HeLa 細胞において, 細胞質凝集体を伴う細胞の割合 (%). 各々 100 個以上の細胞をカウントした (n = 3).

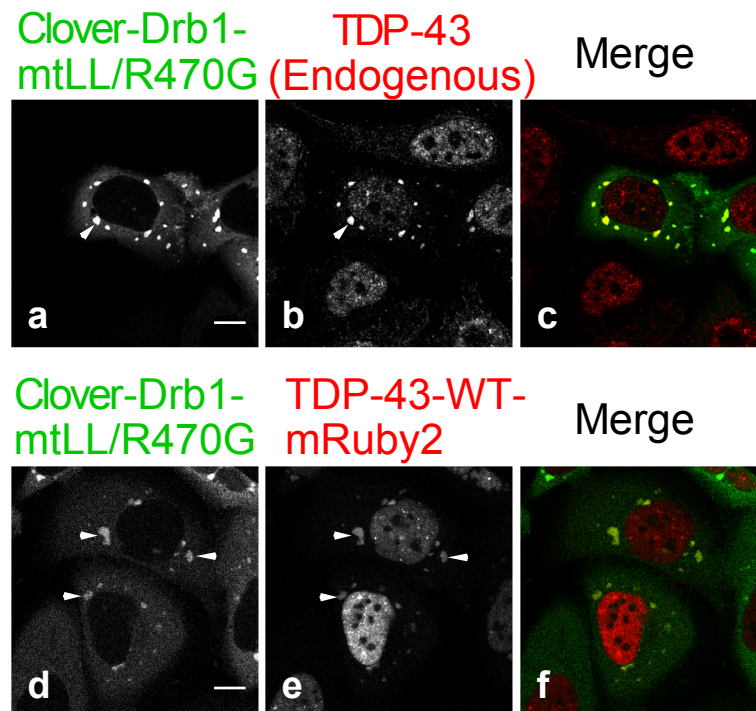


図 14. TDP-43 は変異型 Drb1 由来細胞質凝集体に共局在する。

Clover-Drb1-mtLL/R470G を発現させた HeLa 細胞をトランスフェクション後 24 時間で固定し，ウサギ抗 TDP-43 抗体で染色した（上段）．2 次抗体には Cy5 結合抗ウサギ Ig 抗体を使用した．Clover-Drb1-mtLL/R470G と共に TDP-43-WT-mRuby2 を共発現させた（下段）HeLa 細胞の蛍光像．（a, b, d, e）の矢頭は Drb1 と TDP-43 の共局在した細胞質凝集体を指す．Bar = 10  $\mu$ m.

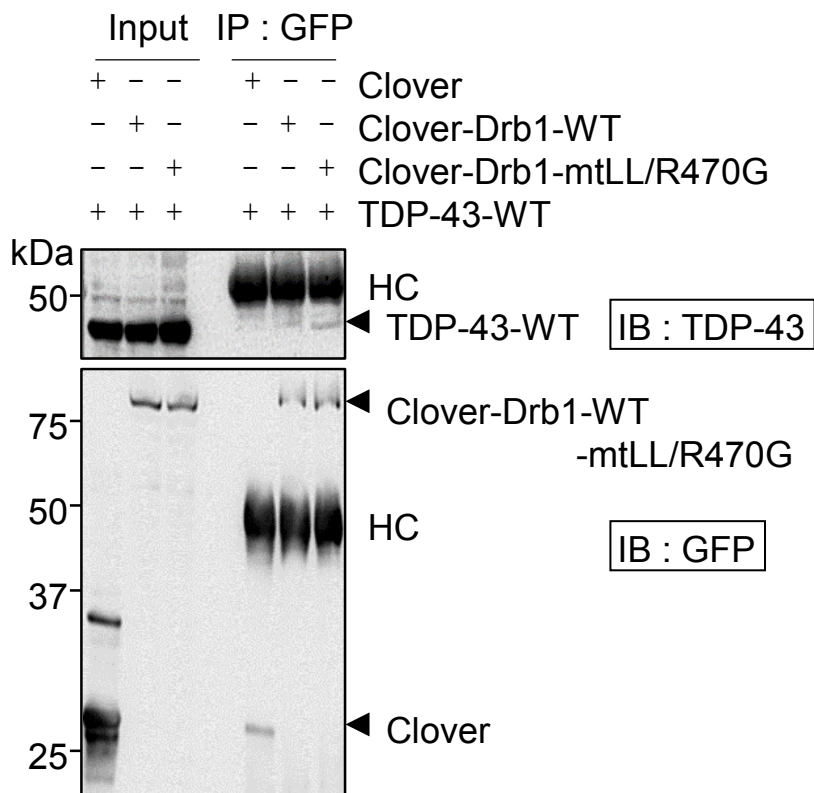


図 15. 変異型 Drb1 も TDP-43 とタンパク質間相互作用を介して結合する。  
 Clover, Clover-Drb1-WT または -mtLL/R470G, と TDP-43-WT を共発現させた HeLa 細胞をヌクレアーゼ処理の下, 全細胞溶解液を抽出して共免疫沈降を行った. 抗 GFP 抗体で Clover タンパク質を免疫沈降し, 共沈する TDP-43 を抗 TDP-43 抗体で検出した. Clover-Drb1-WT および Clover-Drb1-mtLL/R470G と共に TDP-43 の沈降を検出したが, Clover のレーンでは沈降を検出しなかった.

さらに、この Drb1 に由来する細胞質凝集体に TDP-43 が共局在するかどうかを検証するために、HeLa 細胞における内在性および外因性 TDP-43 の局在様式を検討した。内在性 TDP-43 は、間接蛍光免疫染色で検出した。外因性 TDP-43 は、mRuby2 赤色蛍光タンパク質を C 末に融合したコンストラクトを HeLa 細胞に発現させ、その蛍光を検出した。その結果、Drb1 由来細胞質凝集体に、内因性および外因性の TDP-43 が一部共局在した(図 14, a-c (内因性), d-f (外因性))。これらの結果は、HeLa 細胞において NLS/NES 二重変異体 Drb1 に由来する細胞質凝集体に TDP-43 が共局在することを示している。

次に、NLS/NES 二重変異体 Drb1 と TDP-43 間の相互作用を解析するために免疫沈降法を行った。Clover, Clover-Drb1-WT, Clover-Drb1-mtLL/R470G の各タンパク質と TDP-43-WT を同時発現させた HeLa 細胞の溶解液を核酸分解酵素で処理後、抗 GFP 抗体 (Clover に結合する) を用いて免疫沈降を行った。その結果、Clover-Drb1-WT および Clover-Drb1-mtLL/R470G の沈降物と共に TDP-43 が検出された(図 15)。一方、Clover 単独では、TDP-43 は検出されなかった。これらの結果は Clover-Drb1-mtLL/R470G と TDP-43 はタンパク質-タンパク質間相互作用を介して結合していることを示している。

## 第 6 節 Drb1 の細胞質凝集体はミトコンドリア膜電位を低下させる

Drb1 に由来する細胞質凝集体が細胞機能に与える影響について検証するため、ミトコンドリア膜電位 ( $\Delta\psi_m$ ) の変化を解析した。ミトコンドリア膜電位の変化は、テトラメチルローダミンエチルエステル(TMRE)をミトコンドリアに取り込んだ細胞におけるミトコンドリア蛍光強度変化として評価した。Clover, Clover-T7-Drb1-WT, -R470G, -mtLL-R470G の各コンストラクトを HeLa 細胞に導入し、トランスフェクション後 24 時間で TMRE 処理を行い、ミトコンドリア膜

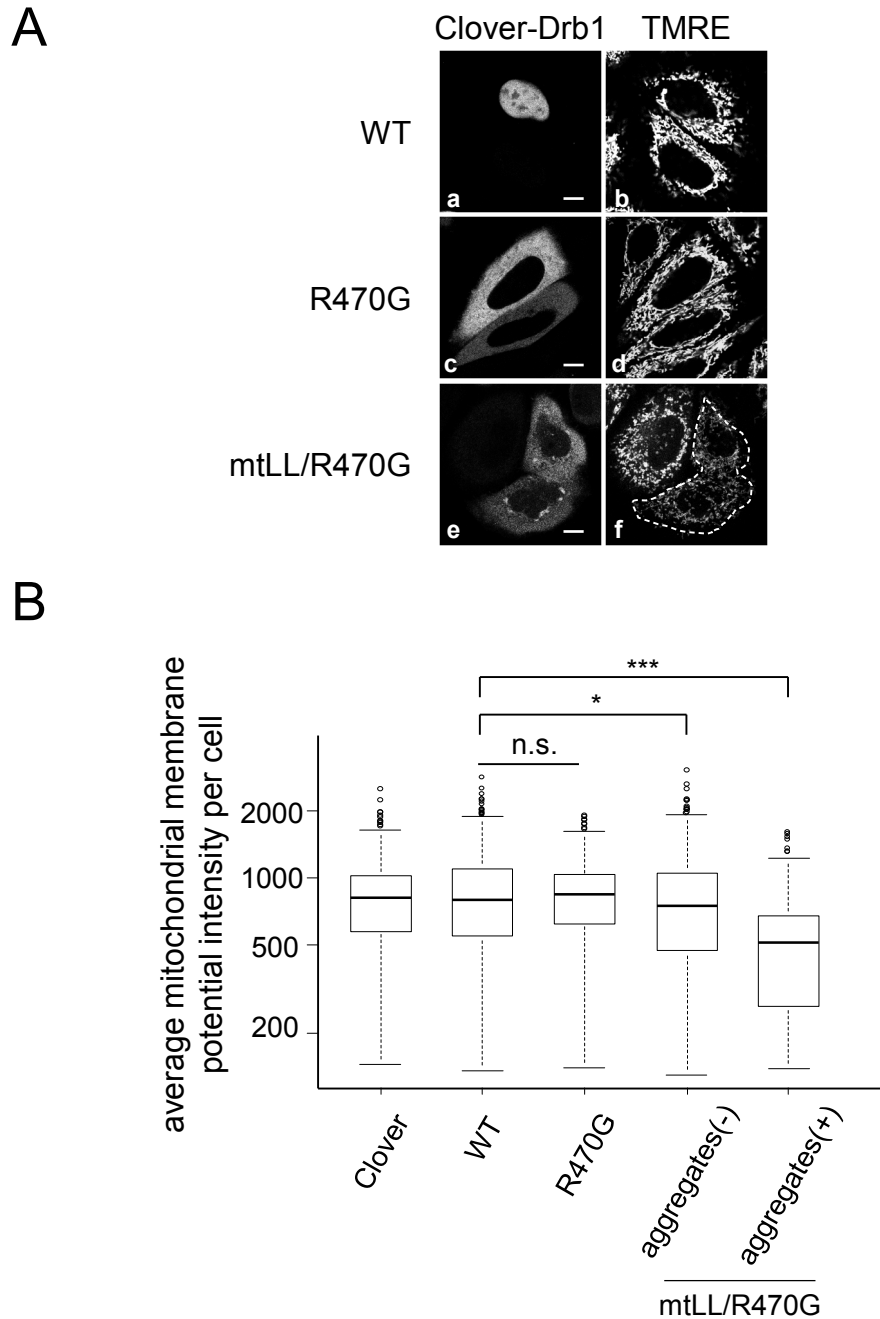


図16. 変異Drb1由来細胞質凝集体形成とミトコンドリア膜電位 $\Delta\psi_m$ の低下.

(A) Clover-Drb1-WT (a, b), Clover-Drb1-R470G (c, d), および Clover-Drb1-mtLL/R470G (e, f) をそれぞれ一過性に発現させた HeLa 細胞における  $\Delta\psi_m$  を TMRE 色素を用いて可視化した. Drb1 の二重置換変異体による細胞質凝集体形成細胞において,  $\Delta\psi_m$  の低下を認めた (e, f). 点線は  $\Delta\psi_m$  が低下した細胞における細胞膜の輪郭を表す. (B) Clover, Clover-Drb1-WT, -R470G, または -mtLL/R470G を発現させた HeLa 細胞において, 平均 TMRE 蛍光強度を測定し, 箱ひげ図へプロットした. Clover-Drb1-mtLL/R470G 発現細胞においては, さらに凝集体の有無で群別した (aggregates (-) と aggregates (+)). 野生型と比較して R470G のみの変異体では  $\Delta\psi_m$  に有意差を認めないが, 二重置換変異体 mtLL/R470G において, 特に aggregates (+) 群で  $\Delta\psi_m$  の低下を示した. \*,  $p < 0.05$ ; \*\*\*,  $p < 0.001$ .

電位を計測した. Clover-Drb1-WT の発現は Clover 単独発現細胞におけるミトコンドリア膜電位と変化なかったことから, 野生型 Drb1 発現によるミトコンドリア膜電位への影響は認められなかった(図 16B). また, R470G では, NLS の破壊により, Drb1 の局在は核から細胞質に変化するが, ミトコンドリア膜電位は野生型と比較して統計学的な有意差は認められなかった(図 16A, a, b (WT), c, d (R470G), 図 B). 次に, mtLL/R470G を発現させると, Drb1 の細胞内局在様式は, 細胞質局在のみを示す群(aggregates (-))と, 細胞質局在に加えて細胞質凝集を伴う群(aggregates (+))とに二分された. aggregates (-)群でも, ミトコンドリア膜電位の低下が認められた. さらに, aggregates (+)群ではミトコンドリア膜電位は顕著に低下することが示された(図 16A, e, f, および図 16B). この結果は, ミトコンドリア膜電位の低下は, 単に Drb1 の局在変化の影響によるのではなく, Drb1 に由来する細胞質凝集体の形成そのものがミトコンドリア膜電位低下を誘導したことを示している.



## 第4章 考察

### 第1節 はじめに

TDP-43 や FUS/TLS を始めとして、いくつかの RNA 結合タンパク質は ALS や FTLD の神経細胞細胞質封入体の構成成分であり、神経変性病理の形成に関与していることが示唆されている。近年、ALS や FTLD 患者の神経細胞において、RNA 結合タンパク質 Drb1 が TDP-43 陽性細胞質封入体に共局在するタンパク質として報告された (Collins et al., 2012; Konno et al., 2014)。本研究では、まず始めに培養細胞を用いた *in vitro* の実験系で、変異型 TDP-43 によって誘導された細胞質封入体に、タンパク質間相互作用を介して Drb1 が共局在することを示した。さらに、Drb1 は、TDP-43 と FUS/TLS と同様に、核と細胞質間を往復するタンパク質であることが判明した。この往復に関わるドメインへ変異を導入すると、Drb1 は TDP-43 を含む細胞質凝集体を形成することを明らかにした。さらにこの細胞質凝集体がミトコンドリア機能障害を生じる可能性も示した。本研究の結果より、細胞質封入体形成を介する神経変性疾患発症において Drb1 が重要な役割を果し得る可能性を明らかにした。以下に、各結果が示す意義や背景にある機序について考察する。

### 第2節 TDP-43 との相互作用

TDP-43 の人工変異体に由来する細胞質封入体形成モデル細胞において、共発現させた Drb1 が TDP-43 細胞質凝集体に共局在することを再現した (図 4)。さらにこのモデル細胞では、核酸分解酵素処理を行った細胞溶解液を用いた免疫沈降実験で、TDP-43 の沈降とともに Drb1 が検出された (図 5)。このことは Drb1 がタンパク質間相互作用を介して TDP-43 と結合していることを示している。一方、

他グループからの最近の論文で, Drb1 と TDP-43 間の結合は RNA を介した間接的な結合であることが示唆された (Li et al., 2015). 本研究とは, 材料と証明手法が異なるため現段階でどちらが正しいかは判定できないが, 細胞質凝集体を形成した TDP-43 は Drb1 と直接または間接的に相互作用し, Drb1 の核内移行を妨げ, TDP-43 凝集体へ Drb1 を誘導していると推察される. このことは, ALS/FTLD の細胞質封入体形成細胞において TDP-43 に由来する封入体形成に伴う TDP-43 自体の機能喪失に加えて, Drb1 の機能喪失も付随的に生じることを示唆している. 一方, 本研究では, Drb1 の人工変異に由来する細胞質凝集体に内因性の TDP-43 が取り込まれることを示した (図 14). そしてこの Drb1 変異体と TDP-43 もタンパク質間相互作用を介して結合することを示した (図 15). このことは ALS/FTLD 病理において, Drb1 が主体となって細胞質封入体を形成し得ることを示唆している. TDP-43 については, ALS 患者の神経細胞でその正常機能が障害され, TDP-43 の関わる RNA 代謝に異常が生じていると報告されている (Shiga et al., 2012). Drb1 が原因となって形成する封入体病理においても, Drb1 との結合を介して, TDP-43 の異常局在が誘導されることで本来の機能を失うことが推察される. 以上から, ALS/FTLD の細胞質封入体病理において, 細胞質凝集体形成の主体が Drb1 あるいは TDP-43 の何れのタンパク質であっても, 両者のタンパク質間相互作用により細胞質封入体に共局在し, 両タンパク質の機能喪失を生じ得ることが考えられた.

### 第 3 節 Drb1 の核-細胞質間シャトル能

神経細胞あるいは非神経細胞に関わらず, Drb1 は主に核質に局在し, 核-細胞質間をシャトルするタンパク質であることを示した (図 9, 図 10). このことは, Drb1 が核および細胞質で機能するタンパク質であることを示唆している. 核と

細胞質間のシャトルについては、他の ALS 関連 RNA 結合タンパク質である TDP-43 (Ayala et al., 2008), FUS/TLS (Zinszner et al., 1997), hnRNP A1 (Piñol-Roma and Dreyfuss, 1992)においても確認されている。したがって、核と細胞質間のシャトルは、ALS/FTLD の細胞質封入体の構成タンパク質に共通する特徴と考えられる。

本研究において Drb1 の核-細胞質間シャトルを担うドメインとして、C 末端に存在する古典的な monopartite-type NLS, および RRM2 と RRM3 のリンカー領域に存在する連続ロイシン配列からなる NES を同定した(図 8, 図 12)。他グループによる最近の報告において、Drb1 の NLS は bipartite-type NLS として報告された(Li et al., 2015)。彼らの主張する bipartite-type NLS は、我々の主張する c2 クラスターに加えて上流の c1 クラスターを含む領域で、cNLS mapper による NLS 予測プログラムで検出された領域と一致する(図 7)。しかしながら、本研究結果では、Drb1 の c2 クラスター内の K469, R470, および R472 のアミノ酸置換変異体は核局在性を失って細胞質局在を示す一方で、c1 クラスターの R454 および K456 のアミノ酸置換変異体は核局在を示し、その局在性は野生型と変わらなかった(図 8)。以上の結果から筆者は、c1 クラスターは核局在に必要ではないと結論づけた。TDP-43 は、二つの塩基性アミノ酸クラスターから成る古典的 bipartite-type NLS をタンパク質の N 末側 (82-84 および 95-98 アミノ酸)に有する (M. J. Winton et al., 2008)。TDP-43 は輸送受容体として importin  $\alpha$  と結合し、さらに importin  $\beta$ 1 と複合体を形成して核内へ移行する(Nishimura et al., 2010)。FUS/TLS の場合は、C 末端に PY-NLS と呼ばれる特有の NLS を有する (Lee et al., 2006)。PY-NLS は塩基性アミノ酸に富み、内部に非極性あるいは塩基性アミノ酸を含む R/H/KX<sub>(2-5)</sub>PY をコンセンサスモチーフとする NLS である。FUS/TLS の輸送受容体は古典的 NLS のそれとは異なり、importin  $\beta$ 2 である

(Lee et al., 2006). hnRNP A1 は 38 アミノ酸からなる M9 と呼ばれるドメインをその C 末端に有する (Michael et al., 1995). この M9 ドメインは輸送受容体として importin  $\beta$ 2 とともに importin  $\beta$ 2b にも親和性を有する (Rebane et al., 2004). これら ALS/FTLD 関連 RNA 結合タンパク質は各々 NLS を有するが, その核内輸送機構は異なっている. 現時点で, Drb1 の核輸送受容体は明らかになっていないが, Drb1 の NLS が古典的 NLS のコンセンサス配列であることから, TDP-43 とは monopartite-type と bipartite-type の違いはあるものの同じ核内輸送機構を共有している可能性が考えられる. 近年, ALS の変性神経細胞において, 核-細胞質間輸送機構の一部が障害されていることを示唆する報告がなされている (Kinoshita et al., 2009; Nagara et al., 2013; Nishimura et al., 2010; Patel and Chu, 2011; Zhang et al., 2015). 遺伝子変異が認められない大多数の孤発性 ALS/FTLD 患者において, 特定の核-細胞質間輸送機構の破綻が疾病発症の一因である可能性が考えられる. Collins らの報告で, TDP-43 をコードする *TARDBP* 遺伝子に変異を認めない孤発性 ALS および FTLD 患者で TDP-43 および Drb1 陽性細胞質封入体を認めたことは, TDP-43 と Drb1 に共通の核-細胞質間輸送機構の破綻が背景にあることを示しているのかもしれない (Collins et al., 2012).

Drb1 は, 典型的 NES として知られるロイシンに富むコンセンサス配列 ( $[\Phi-X_{(2-3)}-\Phi-X_{(2-3)}-\Phi-X-\Phi]$ ,  $\Phi$  は疎水性アミノ酸 [L, V, I, M, F], X は任意のアミノ酸) を有さない (Bogerd et al., 1996; la Cour et al., 2004). その代わり, リンカー領域の連続ロイシン配列が NES 活性を有していた. Drb1 の連続疎水性アミノ酸はロイシン-ロイシンあるいはロイシン-イソロイシンとして脊椎動物間で高く保存されている. TDP-43 の場合, NES は疎水性アミノ酸で構成されるがコンセンサス配列としては非典型配列で, 2 番目の RRM の内部に位置してい

る (M. J. Winton et al., 2008). FUS/TLS は, N 末側に典型的な NES コンセンサス配列を有している (Kino et al., 2011). 核内輸送機構に関して, TDP-43 と FUS/TLS では異なる輸送受容体を用いていたが, TDP-43 と FUS/TLS の核外輸送機構は共に chromosomal maintenance 1 (CRM1) 依存的で共通している. CRM1 は典型的 NES の受容体で, CRM1 と NES との結合阻害作用を有するレプトマイシン B によりその核外輸送は阻害される. 一方, hnRNP A1 の核外移行は, NLS として作用する M9 ドメインが NES としての活性も有し, CRM1 非依存的である (Michael et al., 1995). 以上から, Drb1 および ALS 関連 RNA 結合タンパク質はいずれも核に主局在し, 核-細胞質間シャトル能を有するという共通性を有するが, 各々の核-細胞質間の輸送機構は多様である.

#### 第 4 節 Drb1 の二重変異体が細胞質凝集体を形成するメカニズム

本項では, Drb1 の変異体が細胞質凝集体形成を誘導したことについて, NLS (C 末端の古典的 NLS) のみならず NES (リンカー領域の連続ロイシン) への変異導入も要した機序について考察する. Drb1 は NLS への変異導入により核質から細胞質へ主局在を変化させたが, 細胞質凝集体の形成は極めてまれであった (図 13). Drb1 の NES への変異導入は核質の主局在を変化させないばかりか, 細胞質凝集体の形成促進も認めなかった. このことは, 細胞質凝集体の形成機構には Drb1 の核移行阻害あるいは核から細胞質への局在の変化が必要であることを示している. さらに, Drb1 の NLS と NES への同時変異導入による機能破壊によって, 細胞質において顕著な凝集体形成傾向を認めた. このことから, Drb1 のリンカー領域における連続ロイシンモチーフへの変異導入は NES 活性の喪失のみならず, 細胞質凝集体の形成促進の追加効果をもたらしたと考えられる. 家族性 ALS の封入体構成タンパク質の一つである SOD1 については, 神経細胞における

細胞質封入体の形成機序の一つとして、タンパク質のミスフォールディングの重要性が提唱されている (Bosco et al., 2010). 一方で, TDP-43, FUS/TLS, あ  
るいは hnRNP A1 といった ALS/FTLD 関連 RNA 結合タンパク質ではプリオン様ド  
メインと呼ばれる, 凝集形成を促進しやすい領域を有することが知られている  
(King et al., 2012). プリオン様ドメインの予測プログラム (Espinosa  
Angarica et al., 2014) を用いた配列解析では, Drb1 にプリオン様ドメインは  
検出されなかった. しかし最近の報告において, Drb1 がオリゴマー形成を促進  
するドメイン (homo-oligomer assembly (HOA) domain) を有することが示され  
た (Li et al., 2015). この HOA ドメインは, 本研究で変異を導入した連続ロ  
イシン配列 (NES) のわずか 12 アミノ酸上流に位置する. したがって, 連続ロイ  
シンへの変異導入は NES 活性を喪失させると共に, 上流の HOA ドメインを介し  
た Drb1 間のホモオリゴマー化を誘発し, 凝集促進に働いたのではないかと推察  
される. 本研究結果と類似した例として, 肝細胞の発生分化に関わる転写調節因  
子 Liver receptor homolog 1 (LRH-1) について, NES ドメインへの変異導入に  
より核周囲に凝集体が形成されることが報告されている (Yang et al., 2015).  
LRH-1 は RNA 結合タンパク質ではないが, 核-細胞質間シャトル能を有する DNA  
結合タンパク質で, NLS と NES が同定されている. この NES はロイシンリッチな  
ドメインではあるが, コンセンサス配列とは異なり, その受容体も CRM1 ではな  
く calreticulin とされる. LRH-1 の細胞質凝集体はオートファジー・リソソ  
ーム経路のマーカーで染色され, ユビキチン化されていることからミスフォール  
ディングを生じている可能性が示されている. それゆえ, Drb1 の場合も, 連続  
ロイシン配列への変異導入によって LRH-1 と同様のミスフォールディングを生  
じたのではないかと考えられる.

Drb1 の細胞質凝集体形成を促進させる機構として、ミスフォールディングに加えて、タンパク質分解系の抑制を生じた可能性も考えられる。元々、ALS/FTLD における TDP-43 陽性細胞質封入体はユビキチン化されていることが知られており、その不適切な局在をとるタンパク質は主要なタンパク質分解系の一つであるユビキチン・プロテアソーム系により分解される過程にあることが推定される。ミスフォールディングによりこの分解系の誘導シグナルが阻害された可能性もある。また、ゴルジ体や小胞体における膜貫通タンパク質では細胞質側の連続ロイシンモチーフはリソソームへの輸送を促すモチーフとしても知られている (Braulke and Bonifacino, 2009; Koh et al., 2005)。そのため、Drb1 の連続ロイシン配列への変異導入により Drb1 の分解が抑制され、分解されるべきタンパク質の蓄積を促し、凝集体を形成した可能性も考えられる。タンパク質の不必要な寿命延長が神経変性をもたらす可能性については、TDP-43 の ALS 関連遺伝子変異を伴う変異体について、発症年齢がより早い臨床型を呈する変異体ほど、タンパク質の寿命は延長し、不溶性 TDP-43 画分を増やし、細胞毒性を生じやすいことが *in vitro* の系で示されている (Watanabe et al., 2013)。

本研究で認めた Drb1 による細胞質凝集体形成は培養細胞を用いた過剰発現の系であり、神経変性疾患における緩徐進行性な経過を伴った病態と同一視はできないであろう。しかし、今回の結果およびその仮説を踏まえ、本研究で見出した Drb1 細胞質凝集体について今後解析していくことで、疾病における細胞質封入体形成機構をより明らかにすることができるものと考えられる。

## 第 5 節 ミトコンドリア膜電位低下

Drb1 の NES/NLS の二重変異体による細胞質凝集体形成細胞では、ミトコンドリアの膜電位の低下が認められた (図 16)。興味深いことに、NLS の変異導入体

による核質から細胞質への局在変化のみではミトコンドリア膜電位の低下は認められなかった。ミトコンドリアはエネルギー産生や脂質代謝等様々な細胞内代謝の場として中心的役割を果たしている。ミトコンドリアは活性酸素 reactive oxygen species (ROS) の主な産生源でもあり、アポトーシスカスケードの起点でもある。つまり、ミトコンドリアの機能障害はエネルギー代謝の破綻やアポトーシスの原因となり、細胞機能にも大きく影響する。ミトコンドリアの膜電位低下はミトコンドリア機能障害の前段階と考えられることから、Drb1 による細胞質凝集体の形成はミトコンドリア機能障害を通じた細胞の機能障害を生じていることが示唆される。ALS においても、ミトコンドリア機能障害と病態の進行との関連性が示唆されている (Cozzolino and Carri, 2012)。またマウス神経細胞の初代培養を用いた系では、ALS 関連遺伝子変異を伴う TDP-43 を一過性に発現させることにより、ミトコンドリア機能維持に必要なミトコンドリアの分裂・融合の障害を来し、ミトコンドリア膜電位を低下させることが示されている (Wang et al., 2013)。但し、この細胞モデルにおいて凝集体形成の有無は示されておらず、ALS における細胞質凝集体形成とミトコンドリア機能障害との関連を直接示したデータは乏しい。一方、細胞内での凝集体形成とミトコンドリア機能障害との関連については、異常タンパク質の蓄積による小胞体ストレスを通じたミトコンドリア機能障害とそれに伴うアポトーシス経路が知られている (Xu et al., 2005)。本研究結果では局在変化に加えて Drb1 細胞質凝集体形成によって、著しくミトコンドリア膜電位を低下させた。このことを踏まえると、マウス神経細胞を用いた実験で示された TDP-43 のミトコンドリア機能障害機構と異なり、Drb1 細胞質凝集体に固有のミトコンドリア機能障害機序が存在する可能性も考えられる。本研究で示した Drb1 細胞質凝集体形成モデルにおいて、



どのような機構でミトコンドリア機能へ影響を及ぼしているのか、今後更なる検証が必要である。

#### 第 6 節 Drb1 の遺伝子変異について

本研究では Drb1 の変異導入が疾病発症の原因となる細胞質封入体形成機構を誘導することを示してきたが、現在までに ALS/FTLD 患者における *DRB1* 遺伝子変異の報告はなされていない。The National Center for Biotechnology Information (NCBI) の一塩基多型および一塩基変異のデータベース (dbSNP および dbSNV) において、Drb1 の NLS/NES 領域における変異は、NES 中の 329 番目のロイシンがフェニルアラニンに置換した一塩基変異が報告されているのみである。この変異は、アフリカ人において標本数 121,404 人の内、唯 1 人に認められた程度である。この一塩基変異による ALS 発症リスクへの影響については次のように考察する。前述のように ALS ではその変性神経細胞の細胞内環境として核-細胞質間輸送機構が機能障害に陥っているとする報告がある (Kinoshita et al., 2009)。この細胞内環境において、329 番目のロイシンに一塩基変異を有する Drb1 が細胞質へ局在を変化させた場合、この一塩基変異は凝集体形成促進因子として機能し疾病発症に関わる可能性を有する。また一方で、その変異を有する家系があるならば、その家系内で NLS への突然変異を生じることにより Drb1 が病態の中心となって単独で細胞質凝集体を生じることが支持される。現在明らかとなっている一塩基変異のデータにおける ALS 発症リスクへの影響について、更なる解析が必要である。同様に Drb1 を主原因とした疾病発症に関わる基礎データとして ALS/FTLD 患者において *DRB1* 遺伝子変異を探索する意義は大きいと考えられる。

## 第 5 章 終論

本研究は、神経変性疾患における細胞質封入体を構成する新規の RNA 結合タンパク質 Drb1 に着目し、Drb1 による ALS/FTLD の細胞質封入体形成機構とその影響を明らかにすることを目的に、*in vitro* の実験系を通して追究したものである。その結果、TDP-43 を由来とする細胞質凝集体形成細胞モデルにおいて、タンパク質間相互作用を通して Drb1 は凝集体に集積することを明らかにした。また、Drb1 は核と細胞質間を往復するシャトルタンパク質であることを証明し、NLS と NES を同定した。Drb1 のシャトル機構を破綻させる NLS/NES の二重変異を Drb1 に導入すると、Drb1 に由来する細胞質封入体形成が誘導された。さらに、その凝集体には、タンパク質間相互作用を介して TDP-43 が集積することが判明した。また、この Drb1 細胞質凝集体を形成した細胞では、ミトコンドリアの機能障害が誘導されることが明らかとなった。以上の結果は、Drb1 が ALS/FTLD の細胞質封入体形成において中心的役割を果たし得ることを示唆している。今後、Drb1 の核-細胞質間の輸送受容体の同定や Drb1 の標的遺伝子の探索を通じた正常 Drb1 の細胞内機能の解明が ALS/FTLD 発症の分子基盤を理解する上で必要である。また、今回明らかにした Drb1 の細胞質凝集体の形成機構が治療の標的や、診断マーカーとして応用されるためには、ALS/FTLD 病理において Drb1 遺伝子の遺伝子変異解析や、既知の診断マーカーである TDP-43 や FUS/TLS に併用して Drb1 の免疫組織学的解析が必要であると考えられる。

## 引用文献

- Arai, T., Hasegawa, M., Akiyama, H., Ikeda, K., Nonaka, T., Mori, H., Mann, D., Tsuchiya, K., Yoshida, M., Hashizume, Y., Oda, T., 2006. TDP-43 is a component of ubiquitin-positive tau-negative inclusions in frontotemporal lobar degeneration and amyotrophic lateral sclerosis. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 351, 602–611.
- Arai, T., Mackenzie, I.R. A., Hasegawa, M., Nonaka, T., Niizato, K., Tsuchiya, K., Iritani, S., Onaya, M., Akiyama, H., 2009. Phosphorylated TDP-43 in Alzheimer's disease and dementia with Lewy bodies. *Acta Neuropathol.* 117, 125–136.
- Ayala, Y.M., Zago, P., D'Ambrogio, A., Xu, Y. F., Petrucelli, L., Buratti, E., Baralle, F.E., 2008. Structural determinants of the cellular localization and shuttling of TDP-43. *J. Cell Sci.* 121, 3778–3785.
- Bakkar, N., Kousari, A., Kovalik, T., Li, Y., Bowser, R., 2015. RBM45 Modulates the Antioxidant Response in Amyotrophic Lateral Sclerosis through Interactions with KEAP1. *Mol. Cell. Biol.* 35, 2385–2399.
- Bogerd, H.P., Fridell, R.A., Benson, R.E., Hua, J., Cullen, B.R., 1996. Protein sequence requirements for function of the human T-cell leukemia virus type 1 Rex nuclear export signal delineated by a novel in vivo randomization-selection assay. *Mol. Cell. Biol.* 16, 4207–14.
- Bosco, D. A, Morfini, G., Karabacak, N.M., Song, Y., Gros-Louis, F., Pasinelli, P., Goolsby, H., Fontaine, B.A., Lemay, N., McKenna-Yasek, D., Frosch, M.P., Agar, J.N., Julien, J. P., Brady, S.T., Brown, R.H., 2010. Wild-type and mutant SOD1 share an aberrant conformation and a common pathogenic pathway in ALS. *Nat Neurosci* 13, 1396–1403.
- Braulke, T., Bonifacino, J.S., 2009. Sorting of lysosomal proteins. *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Cell Res.* 1793, 605–614.
- Collins, M., Riascos, D., Kovalik, T., An, J., Krupa, K., Krupa, K., Hood, B.L., Conrads, T.P., Renton, A.E., Traynor, B.J., Bowser, R., 2012. The RNA-binding motif 45 (RBM45) protein accumulates in inclusion bodies in amyotrophic lateral sclerosis (ALS) and frontotemporal lobar degeneration with TDP-43 inclusions (FTLD-TDP) patients. *Acta Neuropathol.* 124, 717–732.

- Couthouis, J., Hart, M.P., Erion, R., King, O.D., Diaz, Z., Nakaya, T., Ibrahim, F., Kim, H.J., Mojsilovic-Petrovic, J., Panossian, S., Kim, C.E., Frackelton, E.C., Solski, J.A., Williams, K.L., Clay-Falcone, D., Elman, L., McCluskey, L., Greene, R., Hakonarson, H., Kalb, R.G., Lee, V.M.Y., Trojanowski, J.Q., Nicholson, G.A., Blair, I.P., Bonini, N.M., Van Deerlin, V.M., Mourelatos, Z., Shorter, J., Gitler, A.D., 2012. Evaluating the role of the FUS/TLS-related gene EWSR1 in amyotrophic lateral sclerosis. *Hum. Mol. Genet.* 21, 2899–2911.
- Couthouis, J., Hart, M.P., Shorter, J., DeJesus-Hernandez, M., Erion, R., Oristano, R., Liu, A.X., Ramos, D., Jethava, N., Hosangadi, D., Epstein, J., Chiang, A., Diaz, Z., Nakaya, T., Ibrahim, F., Kim, H.-J., Solski, J.A., Williams, K.L., Mojsilovic-Petrovic, J., Ingre, C., Boylan, K., Graff-Radford, N.R., Dickson, D.W., Clay-Falcone, D., Elman, L., McCluskey, L., Greene, R., Kalb, R.G., Lee, V.M.Y., Trojanowski, J.Q., Ludolph, A., Robberecht, W., Andersen, P.M., Nicholson, G.A., Blair, I.P., King, O.D., Bonini, N.M., Van Deerlin, V., Rademakers, R., Mourelatos, Z., Gitler, A.D., 2011. A yeast functional screen predicts new candidate ALS disease genes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 108, 20881–20890.
- Cozzolino, M., Carri, M.T., 2012. Mitochondrial dysfunction in ALS. *Prog. Neurobiol.* 97, 54–66.
- Crozat, A., Aman, P., Mandahl, N., Ron, D., 1993. Fusion of CHOP to a novel RNA-binding protein in human myxoid liposarcoma. *Nature* 363, 640–644.
- Espinosa Angarica, V., Angulo, A., Giner, A., Losilla, G., Ventura, S., Sancho, J., 2014. PrionScan: an online database of predicted prion domains in complete proteomes. *BMC Genomics* 15, 1–9.
- Galbiati, M., Crippa, V., Rusmini, P., Cristofani, R., Cicardi, M.E., Giorgetti, E., Onesto, E., Messi, E., Poletti, A., 2014. ALS-related misfolded protein management in motor neurons and muscle cells. *Neurochem. Int.* 79, 70–78.
- Geser, F., Robinson, J.L., Malunda, J., Xie, S.X., Clark, C.M., Kwong, L.K., Moberg, P.J., Moore, E.M., Van Deerlin, V.M., Lee, V.M.-Y., Arnold, S.E., Trojanowski, J.Q., 2010. Pathological 43-kDa transactivation response DNA-binding protein in older adults with and without severe mental illness. *Arch. Neurol.* 67, 1238–1250.
- Hans, F., Fiesel, F.C., Strong, J.C., Jackel, S., Rasse, T.M., Geisler, S., Springer, W.,

- Schulz, J.B., Voigt, A., Kahle, P.J., 2014. UBE2E ubiquitin-conjugating enzymes and ubiquitin isopeptidase y regulate TDP-43 protein ubiquitination. *J. Biol. Chem.* 289, 19164–19179.
- Ho, S.N., Hunt, H.D., Horton, R.M., Pullen, J.K., Pease, L.R., 1989. Site-directed mutagenesis by overlap extension using the polymerase chain reaction. *Gene* 77, 51–59.
- Ito, D., Seki, M., Tsunoda, Y., Uchiyama, H., Suzuki, N., 2011. Nuclear transport impairment of amyotrophic lateral sclerosis-linked mutations in FUS/TLS. *Ann. Neurol.* 69, 152–162.
- Itoh, K., Nakamura, K., Iijima, M., Sesaki, H., 2013. Mitochondrial dynamics in neurodegeneration. *Trends Cell Biol.* 23, 64–71.
- Johnson, B.S., Snead, D., Lee, J.J., McCaffery, J.M., Shorter, J., Gitler, A.D., 2009. TDP-43 is intrinsically aggregation-prone, and amyotrophic lateral sclerosis-linked mutations accelerate aggregation and increase toxicity. *J. Biol. Chem.* 284, 20329–20339.
- Johnson, J.O., Pioro, E.P., Boehringer, A., Chia, R., Feit, H., Renton, A.E., Pliner, H. a, Abramzon, Y., Marangi, G., Winborn, B.J., Gibbs, J.R., Nalls, M. , Morgan, S., Shoaib, M., Hardy, J., Pittman, A., Orrell, R.W., Malaspina, A., Sidle, K.C., Fratta, P., Harms, M.B., Baloh, R.H., Pestronk, A., Weihl, C.C., Rogaeva, E., Zinman, L., Drory, V.E., Borghero, G., Mora, G., Calvo, A., Rothstein, J.D., Drepper, C., Sendtner, M., Singleton, A.B., Taylor, J.P., Cookson, M.R., Restagno, G., Sabatelli, M., Bowser, R., Chio, A., Traynor, B.J., Chiò, A., Traynor, B.J., 2014. Mutations in the Matrin 3 gene cause familial amyotrophic lateral sclerosis. *Nat. Neurosci.* 17, 664–666.
- Kanda, Y., 2013. Investigation of the freely available easy-to-use software “EZR” for medical statistics. *Bone Marrow Transplant.* 48, 452–8.
- Kaneb, H.M., Folkmann, A.W., Belzil, V. V., Jao, L.E., Leblond, C.S., Girard, S.L., Daoud, H., Noreau, A., Rochefort, D., Hince, P., Szuto, A., Levert, A., Vidal, S., Andre-Guimont, C., Camu, W., Bouchard, J.P., Dupre, N., Rouleau, G. A., Wente, S.R., Dion, P. A., 2015. Deleterious mutations in the essential mRNA metabolism factor, hGle1, in amyotrophic lateral sclerosis. *Hum. Mol. Genet.* 24,

1363–1373.

Kasashima, K., Terashima, K., Yamamoto, K., Sakashita, E., Sakamoto, H., 1999.

Cytoplasmic localization is required for the mammalian ELAV-like protein HuD to induce neuronal differentiation. *Genes Cells* 4, 667–683.

Kiernan, M.C., Vucic, S., Cheah, B.C., Turner, M.R., Eisen, A., Hardiman, O., Burrell, J.R., Zoing, M.C., 2011. Amyotrophic lateral sclerosis. *Lancet* 377, 942–955.

Kim, H.J., Kim, N.C., Wang, Y.D., Scarborough, E. a., Moore, J., Diaz, Z., MacLea, K.S., Freibaum, B., Li, S., Molliex, A., Kanagaraj, A.P., Carter, R., Boylan, K.B., Wojtas, A.M., Rademakers, R., Pinkus, J.L., Greenberg, S. a., Trojanowski, J.Q., Traynor, B.J., Smith, B.N., Topp, S., Gkazi, A.-S., Miller, J., Shaw, C.E., Kottlors, M., Kirschner, J., Pestronk, A., Li, Y.R., Ford, A.F., Gitler, A.D., Benatar, M., King, O.D., Kimonis, V.E., Ross, E.D., Weihl, C.C., Shorter, J., Taylor, J.P., 2013. Mutations in prion-like domains in hnRNPA2B1 and hnRNPA1 cause multisystem proteinopathy and ALS. *Nature* 495, 467–473.

King, O.D., Gitler, A.D., Shorter, J., 2012. The tip of the iceberg: RNA-binding proteins with prion-like domains in neurodegenerative disease. *Brain Res.* 1462, 61–80.

Kino, Y., Washizu, C., Aquilanti, E., Okuno, M., Kurosawa, M., Yamada, M., Doi, H., Nukina, N., 2011. Intracellular localization and splicing regulation of FUS/TLS are variably affected by amyotrophic lateral sclerosis-linked mutations. *Nucleic Acids Res.* 39, 2781–2798.

Kinoshita, Y., Ito, H., Hirano, A., Fujita, K., Wate, R., Nakamura, M., Kaneko, S., Nakano, S., Kusaka, H., 2009. Nuclear contour irregularity and abnormal transporter protein distribution in anterior horn cells in amyotrophic lateral sclerosis. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 68, 1184–1192.

Koh, Y.H., von Arnim, C.A.F., Hyman, B.T., Tanzi, R.E., Tesco, G., 2005. BACE Is Degraded via the Lysosomal Pathway. *J. Biol. Chem.* 280, 32499–32504.

Konno, T., Tada, M., Shiga, A., Tsujino, A., Eguchi, H., Masuda-Suzukake, M., Hasegawa, M., Nishizawa, M., Onodera, O., Kakita, A., Takahashi, H., 2014. C9ORF72 repeat-associated non-ATG-translated polypeptides are distributed independently of TDP-43 in a Japanese patient with c9ALS. *Neuropathol. Appl. Neurobiol.* 40, 783–788.

- Kosugi, S., Hasebe, M., Tomita, M., Yanagawa, H., 2009. Systematic identification of cell cycle-dependent yeast nucleocytoplasmic shuttling proteins by prediction of composite motifs. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 106, 10171–10176.
- Kwiatkowski, T.J., Bosco, D. A, Leclerc, A. L., Tamrazian, E., Vanderburg, C.R., Russ, C., Davis, A, Gilchrist, J., Kasarskis, E.J., Munsat, T., Valdmanis, P., Rouleau, G. A, Hosler, B. A, Cortelli, P., de Jong, P.J., Yoshinaga, Y., Haines, J.L., Pericak-Vance, M. A, Yan, J., Ticozzi, N., Siddique, T., McKenna-Yasek, D., Sapp, P.C., Horvitz, H.R., Landers, J.E., Brown, R.H., 2009. Mutations in the FUS/TLS gene on chromosome 16 cause familial amyotrophic lateral sclerosis. *Science* 323, 1205–1208.
- la Cour, T., Kiemer, L., Molgaard, A., Gupta, R., Skriver, K., Brunak, S., 2004. Analysis and prediction of leucine-rich nuclear export signals. *Protein Eng. Des. Sel.* 17, 527–536.
- Lagier-tourenne, C., Polymenidou, M., Cleveland, D.W., 2010. TDP-43 and FUS / TLS : emerging roles in RNA processing and neurodegeneration. *Human Molecular Genetics* 19, 46–64.
- Lam, A.J., St-Pierre, F., Gong, Y., Marshall, J.D., Cranfill, P.J., Baird, M. A, McKeown, M.R., Wiedenmann, J., Davidson, M.W., Schnitzer, M.J., Tsien, R.Y., Lin, M.Z., 2012. Improving FRET dynamic range with bright green and red fluorescent proteins. *Nat. Methods* 9, 1005–12.
- Lattante, S., Ciura, S., Rouleau, G.A., Kabashi, E., 2015. Defining the genetic connection linking amyotrophic lateral sclerosis ( ALS ) with frontotemporal dementia ( FTD ) *Trends in Genetics* 31, 263–273.
- Lattante, S., Rouleau, G. a., Kabashi, E., 2013. *TARDBP* and *FUS* Mutations Associated with Amyotrophic Lateral Sclerosis: Summary and Update. *Hum. Mutat.* 34, 812–826.
- Le Ber, I., Van Bortel, I., Nicolas, G., Bouya-Ahmed, K., Camuzat, A., Wallon, D., De Septenville, A., Latouche, M., Lattante, S., Kabashi, E., Jornea, L., Hannequin, D., Brice, A., 2014. hnRNPA2B1 and hnRNPA1 mutations are rare in patients with “multisystem proteinopathy” and frontotemporal lobar degeneration phenotypes. *Neurobiol. Aging* 35, 934.e5–6.

- Lee, B.J., Cansizoglu, A.E., Süel, K.E., Louis, T.H., Zhang, Z., Chook, Y.M., 2006. Rules for Nuclear Localization Sequence Recognition by Karyopherin $\beta$ 2. *Cell* 126, 543–558.
- Leigh, P.N., Anderton, B.H., Dodson, A., Gallo, J.M., Swash, M., Power, D.M., 1988. Ubiquitin deposits in anterior horn cells in motor neurone disease. *Neurosci. Lett.* 93, 197–203.
- Li, Y., Collins, M., Geiser, R., Bakkar, N., Riasecos, D., Bowser, R., 2015. RBM45 homo-oligomerization mediates association with ALS-linked proteins and stress granules. *Sci. Rep.* 5, 14262.
- Ling, S.C., Polymenidou, M., Cleveland, D.W., 2013. Converging Mechanisms in ALS and FTD: Disrupted RNA and Protein Homeostasis. *Neuron* 79, 416–438.
- Lowe, J., Lennox, G., Jefferson, D., Morrell, K., McQuire, D., Gray, T., Landon, M., Doherty, F.J., Mayer, R.J., 1988. A filamentous inclusion body within anterior horn neurones in motor neurone disease defined by immunocytochemical localisation of ubiquitin. *Neurosci. Lett.* 94, 203–210.
- Mann, D.M., South, P.W., Snowden, J.S., Neary, D., 1993. Dementia of frontal lobe type: neuropathology and immunohistochemistry. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry* 56, 605–614.
- Michael, W.M., Choi, M., Dreyfuss, G., 1995. A nuclear export signal in hnRNP A1: a signal-mediated, temperature- dependent nuclear protein export pathway. *Cell* 83, 415–422.
- Nagara, Y., Tateishi, T., Yamasaki, R., Hayashi, S., Kawamura, M., Kikuchi, H., Iinuma, K.M., Tanaka, M., Iwaki, T., Matsushita, T., Ohyagi, Y., Kira, J.I., 2013. Impaired cytoplasmic-nuclear transport of hypoxia-inducible factor-1 $\alpha$  in amyotrophic lateral sclerosis. *Brain Pathol.* 23, 534–546.
- Neary, D., Snowden, J.S., Gustafson, L., Passant, U., Stuss, D., Black, S., Freedman, M., Kertesz, A., Robert, P.H., Albert, M., Boone, K., Miller, B.L., Cummings, J., Benson, D.F., 1998. Frontotemporal lobar degeneration. *Neurology* 51, 1546–1554.
- Neumann, M., Bentmann, E., Dormann, D., Jawaid, A., DeJesus-Hernandez, M., Ansorge, O., Roeber, S., Kretzschmar, H.A., Munoz, D.G., Kusaka, H., Yokota,



- O., Ang, L.C., Bilbao, J., Rademakers, R., Haass, C., Mackenzie, I.R.A., 2011. FET proteins TAF15 and EWS are selective markers that distinguish FTLD with FUS pathology from amyotrophic lateral sclerosis with FUS mutations. *Brain* 134, 2595–2609.
- Neumann, M., Rademakers, R., Roeber, S., Baker, M., Kretzschmar, H.A., Mackenzie, I.R.A., 2009. A new subtype of frontotemporal lobar degeneration with FUS pathology. *Brain* 132, 2922–2931.
- Neumann, M., Sampathu, D.M., Kwong, L.K., Truax, A.C., Micsenyi, M.C., Chou, T.T., Bruce, J., Schuck, T., Grossman, M., Clark, C.M., McCluskey, L.F., Miller, B.L., Masliah, E., Mackenzie, I.R., Feldman, H., Feiden, W., Kretzschmar, H.A., Trojanowski, J.Q., Lee, V.M.Y., 2006. Ubiquitinated TDP-43 in Frontotemporal Lobar Degeneration and Amyotrophic Lateral Sclerosis. *Science*. 314, 130–133.
- Neumann, M., Valori, C.F., Ansorge, O., Kretzschmar, H. A., Munoz, D.G., Kusaka, H., Yokota, O., Ishihara, K., Ang, L.C., Bilbao, J.M., MacKenzie, I.R. A., 2012. Transportin 1 accumulates specifically with FET proteins but no other transportin cargos in FTLD-FUS and is absent in FUS inclusions in ALS with FUS mutations. *Acta Neuropathol.* 124, 705–716.
- Nishimura, A.L., Upunski, V., Troakes, C., Kathe, C., Fratta, P., Howell, M., Gallo, J.M., Hortobágyi, T., Shaw, C.E., Rogelj, B., 2010. Nuclear import impairment causes cytoplasmic trans-activation response DNA-binding protein accumulation and is associated with frontotemporal lobar degeneration. *Brain* 133, 1763–1771.
- Nonaka, T., Arai, T., Buratti, E., Baralle, F.E., Akiyama, H., Hasegawa, M., 2009. Phosphorylated and ubiquitinated TDP-43 pathological inclusions in ALS and FTLD-U are recapitulated in SH-SY5Y cells. *FEBS Lett.* 583, 394–400.
- Nousiainen, H.O., Kestilä, M., Pakkasjärvi, N., Honkala, H., Kuure, S., Tallila, J., Vuopala, K., Ignatius, J., Herva, R., Peltonen, L., Kestila, M., Pakkasjarvi, N., Honkala, H., Kuure, S., Tallila, J., Vuopala, K., Ignatius, J., Herva, R., Peltonen, L., 2008. Mutations in mRNA export mediator GLE1 result in a fetal motoneuron disease. *Nat. Genet.* 40, 155–157.
- Okamoto, K., Murakami, N., Kusaka, H., Yoshida, M., Hashizume, Y., Nakazato, Y., Matsubara, E., Hirai, S., 1992. Ubiquitin-positive intraneuronal inclusions in the

- extramotor cortices of presenile dementia patients with motor neuron disease. *J. Neurol.* 239, 426–430.
- Ou, S.H., Wu, F., Harrich, D., Garcia-Martinez, L.F., Gaynor, R.B., 1995. Cloning and characterization of a novel cellular protein, TDP-43, that binds to human immunodeficiency virus type 1 TAR DNA sequence motifs. *J. Virol.* 69, 3584–3596.
- Pamphlett, R., Luquin, N., McLean, C., Jew, S.K., Adams, L., 2009. TDP-43 neuropathology is similar in sporadic amyotrophic lateral sclerosis with or without *TDP-43* mutations. *Neuropathol. Appl. Neurobiol.* 35, 222–225.
- Patel, V.P., Chu, C.T., 2011. Nuclear transport, oxidative stress, and neurodegeneration. *Int. J. Clin. Exp. Pathol.* 4, 215–229.
- Pesiridis, G.S., Lee, V.M.-Y., Trojanowski, J.Q., 2009. Mutations in TDP-43 link glycine-rich domain functions to amyotrophic lateral sclerosis. *Hum. Mol. Genet.* 18, R156–R162.
- Piñol-Roma, S., Dreyfuss, G., 1992. Shuttling of pre-mRNA binding proteins between nucleus and cytoplasm. *Nature* 355, 730–732.
- Ray, D., Kazan, H., Cook, K.B., Weirauch, M.T., Najafabadi, H.S., Li, X., Gueroussov, S., Albu, M., Zheng, H., Yang, A., Na, H., Irimia, M., Matzat, L.H., Dale, R.K., Smith, S. A, Yarosh, C. A, Kelly, S.M., Nabet, B., Mecnas, D., Li, W., Laishram, R.S., Qiao, M., Lipshitz, H.D., Piano, F., Corbett, A.H., Carstens, R.P., Frey, B.J., Anderson, R. A, Lynch, K.W., Penalva, L.O.F., Lei, E.P., Fraser, A.G., Blencowe, B.J., Morris, Q.D., Hughes, T.R., 2013. A compendium of RNA-binding motifs for decoding gene regulation. *Nature* 499, 172–7.
- Rebane, A., Aab, A., Steitz, J.A., 2004. Transportins 1 and 2 are redundant nuclear import factors for hnRNP A1 and HuR. *RNA* 10, 590–599.
- Rutherford, N.J., Zhang, Y.-J., Baker, M., Gass, J.M., Finch, N. A., Xu, Y.-F., Stewart, H., Kelley, B.J., Kuntz, K., Crook, R.J.P., Sreedharan, J., Vance, C., Sorenson, E., Lippa, C., Bigio, E.H., Geschwind, D.H., Knopman, D.S., Mitsumoto, H., Petersen, R.C., Cashman, N.R., Hutton, M., Shaw, C.E., Boylan, K.B., Boeve, B., Graff-Radford, N.R., Wszolek, Z.K., Caselli, R.J., Dickson, D.W., Mackenzie, I.R., Petrucelli, L., Rademakers, R., 2008. Novel Mutations in TARDBP (TDP-43)

- in Patients with Familial Amyotrophic Lateral Sclerosis. *PLoS Genet.* 4, e1000193.
- Salton, M., Elkon, R., Borodina, T., Davydov, A., Yaspo, M.-L., Halperin, E., Shiloh, Y., 2011. Matrin 3 binds and stabilizes mRNA. *PLoS One* 6, e23882.
- Shiga, A., Ishihara, T., Miyashita, A., Kuwabara, M., Kato, T., Watanabe, N., Yamahira, A., Kondo, C., Yokoseki, A., Takahashi, M., Kuwano, R., Kakita, A., Nishizawa, M., Takahashi, H., Onodera, O., 2012. Alteration of POLDIP3 splicing associated with loss of function of TDP-43 in tissues affected with ALS. *PLoS One* 7, e43120.
- Sreedharan, J., Blair, I.P., Tripathi, V.B., Hu, X., Vance, C., Rogelj, B., Ackerley, S., Durnall, J.C., Williams, K.L., Buratti, E., Baralle, F., de Belleruche, J., Mitchell, J.D., Leigh, P.N., Al-Chalabi, A., Miller, C.C., Nicholson, G., Shaw, C.E., 2008. TDP-43 Mutations in Familial and Sporadic Amyotrophic Lateral Sclerosis. *Science*. 319, 1668–1672.
- Strong, M.J., Grace, G.M., Freedman, M., Lomen-Hoerth, C., Woolley, S., Goldstein, L.H., Murphy, J., Shoesmith, C., Rosenfeld, J., Leigh, P.N., Bruijn, L., Ince, P., Figlewicz, D., 2009. Consensus criteria for the diagnosis of frontotemporal cognitive and behavioural syndromes in amyotrophic lateral sclerosis. *Amyotroph. Lateral Scler.* 10, 131–146.
- Tamada, H., Sakashita, E., Shimazaki, K., Ueno, E., Hamamoto, T., Kagawa, Y., Endo, H., 2002. cDNA cloning and characterization of Drbl, a new member of RRM-type neural RNA-binding protein. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 297, 96–104.
- Tateishi, T., Hokonohara, T., Yamasaki, R., Miura, S., Kikuchi, H., Iwaki, A., Tashiro, H., Furuya, H., Nagara, Y., Ohyagi, Y., Nukina, N., Iwaki, T., Fukumaki, Y., Kira, J., 2010. Multiple system degeneration with basophilic inclusions in Japanese ALS patients with FUS mutation. *Acta Neuropathol.* 119, 355–364.
- Van Langenhove, T., van der Zee, J., Sleegers, K., Engelborghs, S., Vandenberghe, R., Gijssels, I., Van den Broeck, M., Mattheijssens, M., Peeters, K., De Deyn, P.P., Cruts, M., Van Broeckhoven, C., 2010. Genetic contribution of FUS to frontotemporal lobar degeneration. *Neurology* 74, 366–371.
- Vance, C., Rogelj, B., Hortobagyi, T., De Vos, K.J., Nishimura, A.L., Sreedharan, J., Hu, X., Smith, B., Ruddy, D., Wright, P., Ganesalingam, J., Williams, K.L.,

- Tripathi, V., Al-Saraj, S., Al-Chalabi, A., Leigh, P.N., Blair, I.P., Nicholson, G., de Bellerocche, J., Gallo, J.-M.J.-M., Miller, C.C., Shaw, C.E., Hortobágyi, T., De Vos, K.J., Nishimura, A.L., Sreedharan, J., Hu, X., Smith, B., Ruddy, D., Wright, P., Ganesalingam, J., Williams, K.L., Tripathi, V., Al-Saraj, S., Al-Chalabi, A., Leigh, P.N., Blair, I.P., Nicholson, G., de Bellerocche, J., Gallo, J.-M.J.-M., Miller, C.C., Shaw, C.E., 2009. Mutations in FUS, an RNA Processing Protein, Cause Familial Amyotrophic Lateral Sclerosis Type 6. *Science*. 323, 1208–1211.
- Wang, W., Li, L., Lin, W. L., Dickson, D. W., Petrucelli, L., Zhang, T., & Wang, X. 2013. The ALS disease-associated mutant TDP-43 impairs mitochondrial dynamics and function in motor neurons. *Hum. Mol. Genet.* 22, 4706–4719.
- Wang, X., Arai, S., Song, X., Reichart, D., Du, K., Pascual, G., Tempst, P., Rosenfeld, M.G., Glass, C.K., Kurokawa, R., 2008. Induced ncRNAs allosterically modify RNA-binding proteins in cis to inhibit transcription. *Nature* 454, 126–130.
- Watanabe, S., Kaneko, K., Yamanaka, K., 2013. Accelerated Disease Onset with Stabilized Familial Amyotrophic Lateral Sclerosis (ALS)-linked Mutant TDP-43 Proteins. *J. Biol. Chem.* 288, 3641–3654.
- Winton, M.J., Igaz, L.M., Wong, M.M., Kwong, L.K., Trojanowski, J.Q., Lee, V.M.-Y., 2008. Disturbance of Nuclear and Cytoplasmic TAR DNA-binding Protein (TDP-43) Induces Disease-like Redistribution, Sequestration, and Aggregate Formation. *J. Biol. Chem.* 283, 13302–13309.
- Winton, M.J., Van Deerlin, V.M., Kwong, L.K., Yuan, W., Wood, E.M., Yu, C.-E., Schellenberg, G.D., Rademakers, R., Caselli, R., Karydas, A., Trojanowski, J.Q., Miller, B.L., Lee, V.M.-Y., 2008. A90V TDP-43 variant results in the aberrant localization of TDP-43 in vitro. *FEBS Lett.* 582, 2252–2256.
- Xu, C., Bailly-Maitre, B., Reed, J.C., 2005. Endoplasmic reticulum stress: cell life and death decisions. *J. Clin. Invest.* 115, 2656–2664.
- Yang, F.-M., Feng, S.-J., Lai, T.-C., Hu, M.-C., 2015. A calreticulin-dependent nuclear export signal is involved in the regulation of liver receptor homologue-1 protein folding. *Biochem. J.* 471, 199–209.
- Zhang, K., Donnelly, C.J., Haeusler, A.R., Grima, J.C., Machamer, J.B., Steinwald, P., Daley, E.L., Miller, S.J., Cunningham, K.M., Vidensky, S., Gupta, S., Thomas,

- M.A., Hong, I., Chiu, S.-L., Haganir, R.L., Ostrow, L.W., Matunis, M.J., Wang, J., Sattler, R., Lloyd, T.E., Rothstein, J.D., 2015. The C9orf72 repeat expansion disrupts nucleocytoplasmic transport. *Nature* 525, 56–61.
- Zinszner, H., Sok, J., Immanuel, D., Yin, Y., Ron, D., 1997. TLS (FUS) binds RNA in vivo and engages in nucleo-cytoplasmic shuttling. *J. Cell Sci.* 110, 1741–1750.

## 謝辞

本研究は、著者が自治医科大学大学院医学研究科地域医療学系臨床神経学専攻科に在籍中の研究成果をまとめたものである。同専攻科前教授（故）中野今治先生、前准教授 藤本健一先生、現教授 松浦徹先生には担当教員として本研究の実施の機会を与えて戴き、その遂行にあたってご指導を戴きました。ここに深謝の意を表します。また同専攻科講師 森田光哉先生には研究や進路等ご指導いただきました。ここに感謝の意を表します。人間生物学系 生体分子医学専攻分野 分子生化学専攻科教授 遠藤仁司先生、同講師 坂下英司先生には、研究指導協力教員として研究における論理的思考法から実験方法のみならず、研究倫理、そして本論文執筆の細部にまで厚くご指導を戴きました。ここに深謝の意を表します。自治医科大学生化学講座機能生化学部門 教授 浜本敏郎先生、准教授 富永薫先生、講師 笠嶋克己先生、講師 黒岩憲二先生には実験手法や研究遂行にあたり篤くご指導をいただきました。同部門研究補助員 太田恵理子氏、加藤千代子氏には、本研究における実験機器操作や研究室管理についてご指導をいただきました。自治医科大学生化学講座機能生化学部門の各位には日頃より有益な討論、ご助言を戴きました。ここに感謝の意を表します。自治医科大学情報センター准教授 三重野牧子先生には統計学的解析法についてご指導をいただきました。ここに感謝の意を表します。

細胞質封入体に関与するRas結合タンパク質Rac1の細胞内機能および病態に関わる基礎的研究

益子 貴史