

氏 名	益 子 貴 史
学 位 の 種 類	博士（医学）
学 位 記 番 号	甲第 509 号
学位授与年月日	平成 28 年 3 月 22 日
学位授与の要件	自治医科大学学位規定第 4 条第 2 項該当
学 位 論 文 名	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 審 査 委 員	(委員長) 教 授 山 形 崇 倫 (委 員) 教 授 吉 尾 卓 講 師 木 村 博 昭

論文内容の要旨

1 研究目的

筋萎縮性側索硬化症（ALS）や前頭側頭葉変性症（FTLD）を代表とする神経変性疾患の共通する主病理は神経細胞における細胞質封入体の形成であり，神経細胞選択的細胞死の原因とされる．TDP-43 を始め多くの RNA 結合タンパク質がこれまで細胞質封入体の構成因子として報告されてきた．変性神経細胞における TDP-43 の細胞質封入体の病理学的特徴は，核から細胞質への局在変化，細胞質で不溶性の凝集体形成，そして凝集体内の 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．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．最近，一部の ALS や FTLD 患者における神経細胞の細胞質封入体において，RNA 結合タンパク質 Drb1 が TDP-43 と共局在していることが示され，細胞質封入体の新規構成因子である可能性が示唆された．Drb1（Developmentally-regulated RNA-binding protein 1：別名 RBM45）は，神経系に強く発現する RNA 結合タンパク質としてクローニングされた．Drb1 はショウジョウバエから哺乳動物まで構造的に高く保存された 3 つの RRM を持ち，TDP-43 と構造的類似性を有している．ラット脳における mRNA の発現レベルは，胎生期に最も高く，成長と共に漸減する特徴を有し，脳神経の発生・分化に関わっていることが推察されるが，その細胞内機能についてはよく判っていない．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．

2 研究方法

1) プラスミド構築

pcDNA3, pEGFP, pEF-Bos-T7 の各種プラスミドベクターを用いて T7 タグ，Clover 蛍光タンパク質との融合 Drb1 とその欠失変異体および置換変異体を発現させるプラスミドを作製した．置換変異は overlap extension PCR 法で挿入した．TDP-43 およびその変異体は野中隆博士（国立精神神経センター）より供与された．

2) 細胞培養法および遺伝子導入

培養細胞は HeLa, SH-SY5Y, および NIH3T3 細胞を用いた. 細胞はリポフェクション法にて遺伝子導入後 24 時間で解析に用いた. 安定発現細胞株の作製は, Geneticin を用いて薬剤耐性選択し, クローン化した.

3) 蛍光免疫染色法

遺伝子を導入した細胞を 4% PFA で固定、氷冷 100% methanol で透過処理した. 各種 1 次抗体で処理後、蛍光標識 2 次抗体でラベルした. 核は Hoechst 33258 により染色した. 蛍光像は共焦点レーザー顕微鏡 (Leica) で取得した.

4) ヘテロカリオンアッセイ

目的タンパク質の核-細胞質間シャトル能を検証するため、核に発現する目的タンパク質の異種細胞核への移動を評価するヘテロカリオンアッセイを実施した. Clover 融合 Drb1 タンパク質を安定発現させた非神経系由来ヒト HeLa 細胞あるいは神経系由来ヒト SH-SY5Y 細胞を、翻訳阻害剤存在下で調整した. 異種細胞として野生型のマウス NIH3T3 細胞を用い、異種間細胞質融合には不活化センダイウィルスを用いた. ヘテロカリオン細胞内のマウス由来核の平均 Clover 融合タンパク質の蛍光強度を測定した.

5) 共免疫沈降法

タグ付き Drb1 または TDP-43 遺伝子を発現させた HeLa 細胞を核酸分解酵素含有バッファーで調整した. 抗タグ抗体およびプロテイン A 磁気ビーズを用いてタンパク質複合体を沈降した. 沈降物は 12%-SDS-PAGE で展開し、PVDF 膜に転写後 WB を実施した.

6) ミトコンドリア膜電位 ($\Delta\psi_m$) 測定

Drb1 に由来する細胞質凝集体を有する細胞の $\Delta\psi_m$ を、TMRE を用いて解析した. 各種 Clover 融合 Drb1 発現した細胞を TMRE 処理し、IN Cell Analyzer 1000 で蛍光像を採取・測定し、凝集体形成の有無で各群に分類し $\Delta\psi_m$ の変化を解析した.

3 研究成果

1) Drb1 は TDP-43 細胞質凝集体に共局在する.

HeLa 細胞に発現した EGFP 融合 TDP-43 変異体は細胞質凝集体を形成した. 本変異体は、ALS における細胞質凝集体のモデルとして SH-SY5Y 細胞にて既に報告されている. T7 タグ Drb1 を共発現させると TDP-43 由来細胞質凝集体へ Drb1 の共局在が認められた. 共発現させた細胞抽出液を核酸分解酵素処理後、免疫沈降法による野生型及び変異型 TDP-43 の沈降物の解析から、共に Drb1 を検出した. TDP-43 と Drb1 のタンパク質-タンパク質間の結合が示された.

2) Drb1 は核タンパク質で古典的核移行シグナル(NLS)を有する.

Clover 融合野生型 Drb1 (2-474) は、HeLa 細胞において核に局在した. 欠失変異体の細胞内局在解析から Drb1 の 401-474 領域に NLS の存在を明らかにした. 予測プログラムとアミノ酸置換変異体の細胞内局在の解析によって、Drb1 の C 末端領域に 3 つの塩基性アミノ酸から成る古典的 NLS を同定した.

3) Drb1 は核-細胞質間をシャトルする.

Clover 融合 Drb1 が発現する HeLa 細胞安定株とマウス由来 NIH3T3 細胞とのヘテロカリオン細胞において、Clover の蛍光シグナルをマウス由来核に検出したことから、Drb1 の核-細胞質間シ

ヤトル能を確認した。同様に SH-SY5Y 細胞を用いた際にも核-細胞質間シャトル能を確認した。一方、神経系細胞と非神経系細胞間で、Drb1 のシャトル効率に有意差を認めなかった。

4) 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 が主に核に局在する核-細胞質間シャトルタンパク質であることから、NES の存在を検討した。Clover 融合 Drb1 の欠失変異体の細胞内局在を解析したところ、301-400 アミノ酸領域が NES の機能を有することが示された。この 301-400 領域に古典的 NES に認められるロイシンリッチなコンセンサス配列は認めなかった。しかしこのリンカー領域内の 329, 330 番目のアミノ酸に位置する連続ロイシンに着目し、これにアラニン置換した変異体は、細胞質優位の局在を減じて核および細胞質に均等分布した。以上から、この連続ロイシンは NES 機能を有することが判明した。

5) NLS と NES の Drb1 二重変異体は TDP-43 陽性の細胞質凝集体を形成する。

Drb1 のシャトル機構の破綻が細胞質凝集体形成の誘因となり得るか検証した。Clover 融合 Drb1 において、NLS と NES への二重置換変異体においてのみ細胞質凝集体形成傾向を認めた。この Drb1 二重変異体発現細胞において、内因性あるいは強制発現させた TDP-43 いずれも Drb1 由来細胞質凝集体に共局在した。この細胞を用いた免疫沈降により、Drb1 の NLS/NES 二重変異体と共に TDP-43 の沈降を検出した。

6) Drb1 の細胞質凝集体はミトコンドリア膜電位 ($\Delta\psi_m$) を低下させる。

Drb1 由来の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 $\Delta\psi_m$ を解析した。局在変化のみを伴う Drb1 変異体では $\Delta\psi_m$ は変化しなかった。一方、Drb1 由来細胞質凝集体を伴う群においてのみ、 $\Delta\psi_m$ が低下した。

4 考察

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の解明を目的に、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 由来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が判った。また、他の ALS/FTLD 関連 RNA 結合タンパク質と同様に Drb1 は核-細胞質間シャトル能を有することを証明し、NLS と NES を同定した。Drb1 のシャトル機構を破綻させる NLS/NES の二重変異体は、Drb1 由来の細胞質封入体形成を誘導した。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 の集積が判明した。この Drb1 細胞質凝集体を形成した細胞では、ミトコンドリア膜電位の低下を認めた。ミトコンドリア膜電位の低下はミトコンドリア機能障害の前段階と考えられ、Drb1 の細胞質凝集体形成はミトコンドリア機能障害を通じた細胞機能障害を生じていると考えられる。

5 結論

本研究では、ALS/FTLD の細胞質封入体に存在する Drb1 の詳細な解析を行い、核移行シグナルと核外移行シグナルの部位を明らかにし、この二重変異体が細胞質封入体を形成すること、その結果生じた細胞質封入体がミトコンドリア機能を低下させることを明らかにした。以上の結果は、Drb1 が ALS/FTLD の細胞質封入体形成において主体的役割を果たし得ることを示唆している。

論文審査の結果の要旨

筋萎縮性側索硬化症 (ALS) と前頭側頭葉変性症 (FTLD) では、神経細胞における細胞質封入体形成と細胞死が共通する病態として挙げられている。本研究は、封入体形成機構の解明により、両疾患の発症機序を解明することを目的として、封入体形成に関与することが報告されている RNA 結合蛋白の解析が計画された。解析対象として、自治医大機能生化学部門で同定された RNA 結合蛋白である、Developmentally-regulated RNA-binding protein 1 (Drb1) が選択され、その機能解析と細胞質封入体形成機構を明らかにすることが計画された。まず、ALS での細胞内封入体の構成成分であり、患者での変異が確認されている TAR DNA-binding protein (TDP-43) と Drb1 がタンパク質-タンパク質間の結合が示され、TDP-43 由来細胞質凝集体へ Drb1 の共局在が認められたことから、Drb1 が凝集体形成に関与することが示唆された。Drb1 は核タンパク質で古典的核移行シグナル (NLS) を有し、また、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) として作用することを明らかにし、Drb1 が核-細胞質間シャトル能を有することを確認した。さらに、NLS と NES の Drb1 二重変異体は TDP-43 陽性の細胞質凝集体を形成することから、Drb1 のシャトル機構の破綻が細胞質凝集体形成の誘因となり得ることを示した。Drb1 の細胞質凝集体はミトコンドリア膜電位 ($\Delta\psi_m$) を低下させることにより、Drb1 由来の細胞質凝集体が細胞機能に影響する可能性も示されている。

ALS や FTLD の患者で Drb1 の変異は検出されておらず、また、疾患に直接結びつく結果は得られていないことから、初期の目的である ALS と FTLD の病態解明に結びついていない問題点がある。しかし、作用が明らかになっていない、RNA 結合蛋白としての Drb1 の機能と凝集体形成に対する詳細な解明が行われており、新たな知見も得ている。今後の RNA 結合蛋白と細胞質封入体形成、変性疾患の発症機序解明の基盤となり得る成果である。

よって、審査員一同、本論文は学位論文に相応しいと判断された。

最終試験の結果の要旨

最終試験では、まず、ALS や FTLD の病態としての封入体形成と関連する遺伝子変異についての概説、RNA 結合蛋白であるそれらの遺伝子と Drb1 についての説明がなされた。次に、Drb1 の機能解析として、核移行シグナル、核外移行シグナルの同定、他の RNA 結合蛋白との関連、封入体形成機序、さらに、ミトコンドリア膜電位低下作用等の研究結果について報告され、それらの意義についての考察が述べられた。研究方法も詳細に述べられており、結果は明確であり、結果の判断なども整然と発表され、研究内容の重要さと共に、申請者が高い研究能力を有し、今後も研究を発展させていく力を十分に持ち合わせていると判断された。

発表後、質疑応答がなされたが、質問に対しても、関連分野の知識も十分あることが示され、研究結果と解釈についての的確に返答し、今後の研究の方向性も語られた。疾患に結びついていないことなど疑問が呈されたことなどの、限界も理解した上で、研究の重要性が伝えられた。

以上から、申請者は、本学の学位授与に値する研究業績と学識を有すると、審査員全員により判断された。