

主論文の要旨

RNP2 of RNA Recognition Motif 1 Plays a Central Role in the Aberrant Modification of TDP-43

RNA 認識モチーフ 1 の RNP2 は、TDP-43 の
異常修飾において中心的役割を果たす

名古屋大学大学院医学系研究科 細胞情報医学専攻
脳神経病態制御学講座 神経内科学分野

(指導：祖父江 元 教授)

高木 伸之介

【緒言】

筋萎縮性側索硬化症 (ALS) や前頭側頭葉変性症 (FTLD) は、ユビキチン陽性、タウ陰性の封入体を形成する疾患である。2006 年 ALS と FTLD のユビキチン陽性封入体の主要構成蛋白が TDP-43 であることが報告され、現在これらの疾患は TDP-43 プロテイノパチーという単一スペクトラムの疾患と考えられている。

TDP-43 は通常核に存在するが、TDP-43 プロテイノパチー患者の神経細胞では、細胞質に移行し、C 末断片 (CTF) で構成される凝集体が認められる。さらに異常に凝集した TDP-43 は C 末の複数の場所でリン酸化修飾を受けることが分かっている。

しかし、病的修飾の原因や TDP-43 のどの部分が凝集体形成に重要かについては、まだ分かっていない。今回、我々は、RNA 結合モチーフ 1 (RRM1) の RNP2 が、TDP-43 プロテイノパチーにおける TDP-43 の病的修飾に重要な役割を演ずることを報告する。

【方法及び結果】

我々はまず、野生型 TDP-43 (Wt)、核移行シグナル(NLS)欠損変異体(dNLS)、TDP-43 の CTF (35kDa CTF : TDP35、32kDa CTF : TDP32、25kDa CTF:TDP25) を作成し細胞内局在について調べた (Fig. 1.A,B)。免疫細胞染色実験では NSC34 細胞、細胞分画実験においては HEK293 細胞を使用し、リポフェクション法にて遺伝子導入した。Wt が主に核局在であったのに対し、dNLS や TDP35、TDP32 は細胞質に局在した。TDP32 は抗ユビキチン抗体、TDP-43 リン酸化抗体にて染色される凝集体形成も認めたが、TDP35 では認めなかった (Fig. 2.A,B) (Fig. 3.A,B)。次に、HEK293 細胞に変異体を発現させ、RIPA buffer により回収、RIPA buffer 不溶分画を、Urea buffer に溶解させ、Western blot にて解析をおこなった。TDP35 は可溶分画に認めたが、TDP32 は不溶分画に認め、TDP-43 リン酸化抗体によって認識された (Fig. 5.C,D)。

TDP35 と TDP32 の変異体の違いは、RNP2 モチーフである。RNP2 モチーフの役割について検討するため、RNP2 欠損変異体を 2 種類 (Δ RNP2、mtRNP2) 作成した (Fig. 4.A)。 Δ RNP2 は RNP2 モチーフが欠失、mtRNP2 では RNP2 配列のロイシンアミノ酸からアスパラギン酸への変異導入を行った。 Δ RNP2、mtRNP2 はともに、ユビキチン抗体、TDP-43 リン酸化抗体により染色される凝集体を形成した (Fig. 4.B,C) (Fig. 5.A,B)。また、 Δ RNP2、mtRNP2 はともに、RIPA buffer 不溶分画に認められ、TDP43 リン酸化抗体で強く認識された (Fig. 5.C,D)。

我々の研究では、TDP25 は可溶分画に存在し、凝集体形成もしなかった (Fig. 6.A,B)。TDP25 において殆ど欠損している RRM1 の重要性について検討するため、RRM2 と C 末領域の欠損した変異体 (mtRNP2(1-273)、mtRNP2(1-185))、RRM1 欠失変異体 (Δ RRM1)、RRM1 も RRM2 も含まない N 末断片 (TDP-43(1-105)) を作成し検討した。mtRNP2(1-273)、mtRNP2(1-185)はともに凝集体形成したが、RRM1 の欠失した変異体 (Δ RRM1 と TDP43(1-105)) は凝集体形成しなかった (Fig. S1.A,B,C)。

これらの結果から、RNP2 の破壊された RRM1 が凝集体形成に必要ではないかと考えられた。

TDP32 と mtRNP2 の不溶分画にて、TDP-43 抗体、TDP-43 リン酸化抗体で染色される 25kDa 以下のバンドを認めた (Fig. 6.C)。そこで 25kDa CTF は mtRNP2 と結合するという仮説を立て、V5-TDP25 と GFP-mtRNP2 との共発現の実験を行ったところ、GFP-mtRNP2 の凝集体に V5-TDP25 が共存し (Fig. 7.C)、GFP-mtRNP2 とともに V5-TDP25 が不溶分画に検出されることがわかった (Fig. 7.B)。TDP25 と mtRNP2 との結合の解析のため、免疫沈降を行った。TDP25 は Wt より mtRNP2 により多く結合し、mtRNP の C 末欠損変異体(mtRNP2(1-273))では、結合が失われた (Fig. 7.D,E)。さらに短い C 末断片 TDP14(274-414)についても同様の解析を行ったが、TDP25 と同様に mtRNP2 に効率よく結合していた (Fig. 7.F,G)。これらの結果から、C 末断片は mtRNP2 の C 末領域と結合することが分かった。

RNA 結合能を確認するために、RNP 免疫沈降を行った。この結果、mtRNP2 に結合する RNA 量は減少していることが確認された (Fig. 8.A,B,C)。また、TDP-43 のターゲット RNA と報告されている 3'UTR of the mRNA of human neurofilament light chain (NFL)が存在するか PCR を行って確認したところ、mtRNP2 の試料では NFL mRNA がほとんど認められなかった (Fig. 8.D)。我々は、RNA 結合の減少により TDP-43 の凝集が起こるのではないかと考えた。内因性 TDP-43 に対する RNase の影響を調べるため、HEK293 細胞の細胞破碎液に RNase の添加し、不溶化の有無を検討した。RNase を添加した試料では、コントロールに比較して不溶分画に検出される TDP-43 が増加していた (Fig. 8.E)。

【考察】

我々はまず TDP 35,TDP32 に注目し解析したところ、TDP32 のみが凝集体を形成し、不溶分画に認められた。これらの結果は、RNP2 モチーフが TDP-43 の凝集体形成に重要であることを示唆した。一方、TDP25 は RNP2 配列を含まないが、我々の実験系では凝集体を形成しなかった。この矛盾については我々の実験結果から、TDP-43 が凝集するためには“RRM1 が存在し RNP2 モチーフの機能異常がある”ことが重要であると考えられた。

RRM1 の RNP2 モチーフは、TDP-43 の RNA 結合にも重要であるため、TDP-43 と RNA との結合の異常は、TDP-43 の異常凝集に関与している可能性がある。RNP2 変異体は凝集体形成し、RNase を加えることで内因性 TDP-43 の不溶化が認められた。これらの結果から、RNA 結合が TDP-43 の凝集体形成に重要であると確認された。RNA との相互作用が RNA 結合蛋白の構造に重要であると言われており、RNA はその結合する蛋白に対してシャペロン様作用を持つのではないかと考えられた。それ故に、TDP-43 と RNA との結合が阻害されると、TDP-43 の構造変化が起こり、TDP-43 の凝集体形成につながるのではないかと考えられた。

TDP25 は我々の実験系では凝集体形成しなかったが、mtRNP2 や TDP32 の不溶分

画には、リン酸化された TDP25 が含まれていた。また mtRNP2 と TDP25 の共発現を行うと、TDP25 は、mtRNP2 とともに凝集していた。これらの結果から、mtRNP2 は TDP25 を凝集体に巻き込むことが示された。一方で、C 末ドメインが欠損した mtRNP2(1-273)は、TDP25 を取り込むことができなかった。この結果から、RNA 結合に異常をきたした TDP-43 がまず最初に凝集し、C 末での相互作用により凝集体に C 末断片が取り込まれると考えられた。

【結論】

RRM1 の RNP2 モチーフが TDP-43 の病的修飾に重要であることを示した。TDP-43 と RNA の結合異常は、TDP-43 の凝集体形成プロセスに関与する可能性がある。