

令和 3 年 5 月 20 日現在

機関番号：32675

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2020

課題番号：17K07291

研究課題名(和文) TDP-43とRNAグアニン四重鎖の相互作用及びその破綻の研究

研究課題名(英文) Study of interaction between TDP-43 and RNA guanine quadruplex and its disruption

研究代表者

石黒 亮 (Ishiguro, Akira)

法政大学・マイクロ・ナノテクノロジー研究センター・研究員

研究者番号：70373264

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：TDP-43は筋萎縮性側索硬化症(ALS)や前頭側頭葉変性症(FTLD)など神経変性疾患の神経細胞内で凝集体の形成やアミノ酸変異が同定されているRNA結合タンパク質である。研究代表者はTDP-43がグアニン四重鎖結合タンパク質であることを発見。10種のALS変異タンパク質を発現・精製し解析した結果、全てが相互作用の低下を示し、ALS発症機序との関連が明らかとなった。さらに、グアニン四重鎖は同列に核酸が配置するparallelタイプと、入り乱れて配置するanti-parallelタイプが知られているが、TDP-43はparallelタイプのみを認識し、強く結合する事が解った。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ALSは未だ有効な治療薬や治療法の無い神経変性疾患である。これまで主に変性タンパク質の蓄積による毒性が原因とされ、多くの研究が進められて来た。しかし、結局未だ変性タンパク質の毒性は証明されず、高齢健常者の3割で同様の蓄積が認められるに至り「タンパク質毒性仮説」の矛盾点が表面化している。本研究では責任タンパク質の機能に焦点を当て、その破綻が細胞機能阻害を引き起こす事を証明した。本研究の成果は今後の研究の基礎として、他グアニン四重鎖結合タンパク質の機能解析や、さらには医薬シーズとしてのグアニン四重鎖結合化合物の探索・開発にも直結する。

研究成果の概要(英文)：Neurodegenerative disorders such as amyotrophic lateral sclerosis (ALS) and frontotemporal dementia (FTLD) are characterized by the progressive degeneration of nerve cells in the brain and spinal cord. TDP-43 is the major pathogenic protein of ALS and FTLD. Previously I identified the involvement of TDP-43 in interaction with G4 (G-quadruplex)-containing RNA for long-distance transport in neurons. For the molecular dissection of TDP-43, I analyzed ALS-linked ten mutant TDP-43 proteins and detected all ten mutants with reduced activity of G4-RNA-binding. Furthermore, I identified that TDP-43 binds to cover the entire parallel-stranded G4 and maintains a stable conformation. These results suggested that the altered interaction between G4-RNAs and mutant proteins is somehow connected with the pathogenesis of ALS and FTLD.

研究分野：分子生物学

キーワード：RNA グアニン四重鎖 筋萎縮性側索硬化症 TDP-43 局所翻訳 FUS 神経変性疾患

1. 研究開始当初の背景

TDP-43 は、RNA 認識モチーフを持つタンパク質で ALS (Amyotrophic Lateral Sclerosis) 患者の神経細胞内に出現するユビキチン陽性封入体の主要成分であることが報告されている (Arai et al. 2006, Neumann et al. 2006)。その後、FTLD (FrontoTemporal Lobar Degeneration; 前頭側頭葉変性症)、アルツハイマー病、パーキンソン病など多くの神経変性疾患の神経細胞内で蓄積していることから TDP-43 の異常と神経変性の直接的な関与が提唱され始めた。しかし TDP-43 proteinopathy という概念が定着し疾患との関連解明が進む一方で、未だ TDP-43 本来の分子機能が明確ではない。研究代表者は TDP-43 二量体タンパク質を高度に精製することに成功し人工進化法 (SELEX; Systematic Evolution of Ligands by Exponential Enrichment) により結合 RNA を探索したところ、得られた候補配列は全てグアニン四重鎖構造を構築する配列であることを明らかにした (研究代表者ら Ishiguro et al. 2016)。グアニン四重鎖は 4 つのグアニンが、特殊な水素結合によりコンパクトな正方形へと折り畳まれてできており、内部に一価の金属イオンを取り込むことで非常に安定化する。神経突起に局在する mRNA の 30% 以上はその 3' -UTR にこの構造を持つことが報告されている (Subramanian et al. 2011)。従って、“TDP-43 はグアニン四重鎖結合タンパク質であり、神経突起への mRNA 輸送および局所的翻訳に関与する” という仮説を提唱した。

2. 研究の目的

神経細胞では細胞体から遠く離れた場所での素早いタンパク質合成に対応するため、局所的翻訳機構によりタンパク質が合成されることが古くから解っており、神経突起でもリボソームの集積が顕著であることが知られている (Bunge et al. 1973)。しかし以来 40 年以上、何が mRNA を特異的に輸送しているのか、全く解っていなかった。

TDP-43 は、家族性・孤発性の患者でも遺伝子変異が報告されている。何故 TDP-43 の異常が ALS などの神経変性疾患を引き起こすのか機能に則した研究が病態の形成や進行の理解に必要と考えた。研究代表者は TDP-43 が、グアニン四重鎖構造と呼ばれる特殊な RNA 立体構造を認識し、核から遠く離れた神経末端に輸送することから、正しい標的 RNA を同定する目的で、生理活性を有する TDP-43 ホモ二量体タンパク質を分離・精製することに初めて成功した (Ishiguro et al. 2016)。続いて行った相互作用実験では TDP-43 の RNA 結合領域のみのフラグメントは強固に UG リピート配列と結合するが、TDP-43 ホモ二量体タンパク質は全く結合しないことが解った。これは本来の TDP-43 は異なる RNA 配列と結合することを強く示唆する結果である。本研究は、TDP-43 が標的を認識する分子機能と結合 RNA 構造の解明を目的とする。

3. 研究の方法

神経変性疾患の原因因子である TDP-43 の未知の機能は正しい標的 RNA 構造の解明が進めば飛躍的な研究の進展に繋がることが予想される。研究代表者は本研究の準備段階で発見した、TDP-43 とグアニン四重鎖構造の相互作用を中心に研究を進める。グアニン四重鎖は、局所翻訳のため神経突起に輸送される mRNA の多くに存在する構造である。細胞内での mRNA、TDP-43 及び局所翻訳を解析し、TDP-43 の点突然変異による相互作用低下を確認することで、mRNA 輸送の分子メカニズムとその破綻による局所翻訳の異常を明らかにする。また、RNA との直接の結合を精製した変異タンパク質で詳細に解析する。TDP-43 はグアニン四重鎖構造の特殊な RNA 立体構造を認識する為、ユニークな結合様式を持つと考えられ、これ迄に提唱されて来た RNA 結合領域以外にも協調して機能する分子内ドメインがあると推測した。さらに、グアニン四重鎖構造の立体構造は TDP-43 と結合する事で、どの様に変化するのか？ 立体構造を保ったまま安定に結合する場合と、構造を変化させる事により相互作用が安定化する場合も考えられる。ALS 関連タンパク質には RNA 結合領域を持つものが多く、RNA の構造の変化は TDP-43 だけではなくそれらとの比較解析も必要と考えられる。

4. 研究成果

(1) グアニン四重鎖を有する mRNA と TDP-43 タンパク質の細胞内局在解析

TDP-43 と標的 mRNA の結合により核から細胞質へと輸送されるシステムを、蛍光分子を用いた細胞内局在解析により、定量的に計測した。グアニン四重鎖を有する mRNA に、バクテリオファージ外皮タンパク質由来の MS2 結合配列を融合し、強制発現した GFP-MS2 蛍光タグタンパク質との結合によるシグナルの局在を検出した。結果、TDP-43 は mRNA と結合すると細胞質に高率に輸送されるが、ALS 患者由来アミノ酸変異を有する変異タンパク質は、輸送が有意に低下した。これは検討した 10 種類全ての変異タンパク質で確認された

為、ALS 発症に関わる RNA 代謝機能破綻を示す結果であると考えられる。(Ishiguro et al. *FEBS Letters*, 2020)

(2) C9ORF72 の GGGGCC 反復配列が形成するグアニン四重鎖との相互作用解析

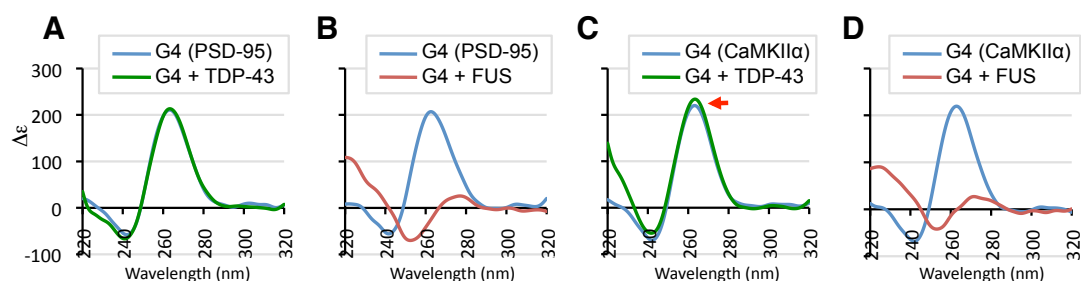
TDP-43 と同様に家族性 ALS の責任遺伝子として知られる C9ORF72 遺伝子 (機能不明) について、患者の遺伝子ではグアニン四重鎖を取りうる GGGGCC 反復配列の延長が見つかっている。実際、GGGGCC 反復配列は TDP-43 タンパク質と非常に強く結合する (Ishiguro et al. 2016)。その結果から、C9ORF72 の反復配列 RNA は TDP-43 のスポンジ (吸収阻害因子) として働いている可能性がある。結合の特異性を表面プラズモン共鳴法で解析したところ、反復配列がグアニン四重鎖した時にだけ TDP-43 との相互作用が確認され、グアニン四重鎖ではなくステムループを形成した場合は結合が観られなかった。同様に ALS の責任タンパク質である FUS (fused in sarcoma) とも比較解析した結果、FUS の場合はグアニン四重鎖とステムループの両方に結合し、TDP-43 との結合特異性の違いが明らかとなった。(Ishiguro et al. *FEBS Letters*, 2021; 他 1 報投稿中)

(3) 局所輸送システムの同定

これまでの結果により TDP-43 はグアニン四重鎖構造を有する mRNA を特異的に神経突起へ輸送し、局所翻訳への関与するモデルを提唱することはできたが、恐らくその輸送には細胞内のキネシンやダイニンなどのモータータンパク質が関与し、樹状突起や軸索に存在するフィラメント上を移動していると予想される。その直接の作用分子や認識システムは未だ全く不明である。神経細胞では神経突起に局在する mRNA の実に 30%以上が 3' 非翻訳領域にグアニン四重鎖を持つことから考えても、非常に離れた長い距離を能動的に移動する機構の存在は明らかである。それらタンパク質間相互作用やタンパク質-RNA 間相互作用を理解するために、TDP-43 と結合するタンパク質因子を分離・精製し、質量分析法により同定した。結果、微小管関連タンパク質 2 種類を同定し、それらはグアニン四重鎖 RNA 依存的に結合する事を突き止めた。今後、新たな研究課題として進展が期待出来る。

(4) 結合 RNA の構造変化

グアニン四重鎖構造に TDP-43 が結合すると構造はどう変化するのか? 安定的な結合を担保する上での立体構造変化を、同様にグアニン四重鎖構造を認識する FUS と共に比較解析した。円偏光二色性測定法、FRET (Förster Resonance Energy Transfer,)、蛍光色素チオフラビン T 結合性試験及びヒドロキシラジカルによるフットプリント法により解析した結果、TDP-43 はグアニン四重鎖構造の全体をくまなく被い、構造を保ったまま強固な相互作用を示した。対照的に、FUS は結合グアニン四重鎖構造を完全に破壊し、結合様式の興味深い相違が確認された。(Ishiguro et al. *FEBS Letters*, 2021)



円偏光二色性測定法による解析

2 種類のグアニン四重鎖 RNA (A&B; PSD-95 由来, C&D; CaMKII α 由来) を TDP-43 (A&C) 又は FUS (B&D) と結合させた際の波形の変化を解析。グアニン四重鎖に特有の正と負のピーク (265nm, 240nm) は TDP-43 で変化しないが、FUS の結合で大きく変化し、構造の崩壊が確認出来る。

(5) TDP-43 の分子解剖

TDP-43 はグアニン四重鎖構造を立体的に認識する結合能を持つ事が示唆された。そこで各結合ドメインに分離・精製したタンパク質モジュールを用い、G4 との相互作用を確認した。結果、RRM と C 末端のグリシンリッチ領域の両方が協調して正確で安定した結合を担っている事が明らかとなった。RRM は強い核酸結合能を有するが、結合特異性は無く、グリシンリッチ領域がその制御をしている事が判明した。(Ishiguro et al. 1 報投稿中)

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Ishiguro A, Kimura N, Noma T, Shimo-Kon R, Ishihama A, Kon T.	4. 巻 594
2. 論文標題 Molecular dissection of ALS-linked TDP-43: involvement of the Gly-rich domain in interaction with G-quadruplex mRNA.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 FEBS letters	6. 最初と最後の頁 2254 ~ 2265
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/1873-3468.13800	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Ishiguro Akira, Hatayama Minoru, Otsuka Maky I., Aruga Jun	4. 巻 8
2. 論文標題 Link between the causative genes of holoprosencephaly: Zic2 directly regulates Tgif1 expression	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 1 ~ 12
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-018-20242-2	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Ishiguro Akira, Katayama Akira, Ishihama Akira	4. 巻 595
2. 論文標題 Different recognition modes of G quadruplex RNA between two ALS/FTLD linked proteins TDP 43 and FUS	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 FEBS Letters	6. 最初と最後の頁 310 ~ 323
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/1873-3468.14013	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

〔学会発表〕 計7件（うち招待講演 3件/うち国際学会 2件）

1. 発表者名 Ishiguro A, Katayama A & Ishihama A
2. 発表標題 Role of glycine-rich domain of ALS-linked TDP-43 and FUS proteins in G-quadruplex recognition for mRNA transport
3. 学会等名 第42回日本分子生物学会大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Ishiguro A, Kimura N, Katayama A & Kon T.
2. 発表標題 ALS-linked G-quadruplex binding proteins TDP-43 and FUS have common and distinct roles in the molecular interaction mechanisms.
3. 学会等名 NEURO 2019
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Akira Ishiguro, Nobuyuki Kimura Takashi Noma, and Takahide Kon
2. 発表標題 Molecular mechanisms of interaction between ALS causative proteins and an RNA G-quadruplex
3. 学会等名 第41回日本分子生物学会年会 (招待講演)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Akira Ishiguro, Nobuyuki Kimura Takashi Noma, and Takahide Kon
2. 発表標題 Guanine oxidization of G-quadruplex affects TDP-43 dependent mRNA transport.
3. 学会等名 5th RNA Metabolism in Neurological Disease Conference, Society for Neuroscience (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Akira Ishiguro
2. 発表標題 Molecular mechanisms of interaction between TDP-43 and RNA G-quadruplex
3. 学会等名 Hong Kong RNA club seminar, Hong Kong City University, Hong Kong (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Akira Ishiguro
2. 発表標題 Molecular mechanisms of interaction between TDP-43 and RNA G-quadruplex
3. 学会等名 第4回神経難病治療学セミナー 大阪大学大学院医学系研究科(招待講演)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 石黒 亮・野間 崇志・木村 展之・昆 隆英
2. 発表標題 グアニン四重鎖の酸化は TDP-43による mRNA輸送機能を阻害する
3. 学会等名 生命科学系学科合同年次大会
4. 発表年 2017年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関