

凝集体形成による細胞毒性を抑える RNA 配列を発見

～筋萎縮性側索硬化症など神経変性疾患の治療薬など発展に期待～

ポイント

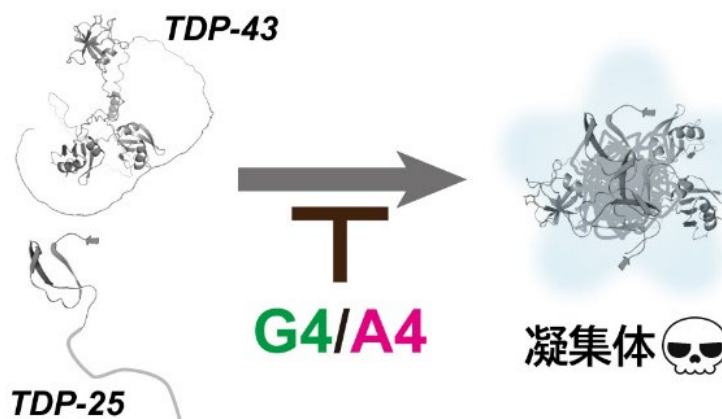
- ・ ALS や FTD の原因となる TDP-43 タンパク質凝集体形成と細胞死を防ぐ RNA 配列を二種発見。
- ・ RNA がプロテオスタシスを維持する分子シャペロンのような機能を有する可能性を示唆。
- ・ ALS や FTD など神経変性疾患の治療薬としての応用に期待。

概要

北海道大学大学院先端生命科学研究院の北村 朗准教授、同大学大学院生命科学院博士後期課程 3 年の藤本 愛氏らの研究グループは、筋萎縮性側索硬化症 (ALS) ^{*1} や前頭側頭型認知症 (FTD) の原因となる TDP-43 及びその 25 kDa カルボキシ末端断片 (以下、TDP-25) ^{*2} の細胞内凝集体形成を防ぐとともに、凝集体による細胞毒性を抑えられる短リピート RNA の配列を二種類発見しました (四回繰り返し GGGGCC または AAAAUU 配列^{*3})。

本成果では、まず単一分子検出感度を有する相互作用解析技術である蛍光相互相関分光法 (FCCS) ^{*4} を用いることにより、二種類の短リピート RNA 配列が TDP-43 及び及び TDP-25 と結合することが分かりました。特に TDP-25 は古典的な RNA 認識モチーフの大半と、RNA 認識に必要な主要アミノ酸残基が欠損しているにもかかわらず、RNA と結合することを発見しました。次に、これら RNA 配列を TDP-43 または TDP-25 を発現する細胞へ導入し、TDP-43 及び TDP-25 の細胞内凝集体形成が減少することを、共焦点顕微鏡観察及び細胞破碎液の生化学的分析から明らかにしました。さらに、TDP-43 及び TDP-25 の発現により上昇する細胞死がこれら RNA の発現により低減できることを明らかにしました。これらのことから、RNA が抗凝集活性を持つ分子シャペロン^{*5} のように機能し、細胞内のプロテオスタシスを維持する重要な働きを持つ可能性が考えられます。将来的には、本研究で発見された RNA の生体内投与及び薬物送達法に加えて安全性が確立されることにより、TDP-43 に起因した ALS/FTD の予防薬や治療薬として発展することが期待されます。

なお、本研究成果は、2024 年 9 月 23 日 (月) 公開の JACS Au 誌にオンライン掲載されました。



細胞内に形成された TDP-43 及び TDP-25 凝集の RNA による抑制モデル図。

【背景】

細胞内の様々なタンパク質は、その元となるポリペプチド翻訳（合成）過程、ポリペプチドを正しく折り畳んで三次元的に機能できる構造であるタンパク質を作る（フォールディング）過程、間違っただけで折り畳まれたミスフォールドタンパク質や不要となったタンパク質を除去する（分解）過程という三過程のバランスが細胞内の生理的恒常性を維持しています。この状態はタンパク質恒常性（プロテオスタシス）と呼ばれます。ミスフォールドタンパク質が分解により除去できない場合、細胞内に蓄積し凝集体を形成します。タンパク質の凝集体が形成されると、凝集体そのものが細胞内の機能的なタンパク質を巻き込み、細胞内の機能を低下させることがあります。あるいは凝集体を形成する前段階にあたるオリゴマーと呼ばれる誤った折り畳み状態にあるタンパク質の多量体が、プロテオスタシスバランスを破たんさせ、神経細胞死の原因になっていると考えられています。

神経変性疾患に分類される筋萎縮性側索硬化症（ALS）は、脳と筋肉を繋いで制御するための神経細胞である運動ニューロンが変性・脱落することにより発症します。また前頭側頭型認知症（FTD）は、脳内のニューロンやグリアが脱落し、人格、行動、言語に影響を与える一群の神経変性疾患であり、認知症として有名なアルツハイマー病よりも若年性発症がみられることがあります。これら ALS や FTD の根本的治療法は確立されていません。ニューロンが変性・脱落する要因としていくつかの仮説が提唱されていますが、その中の一つ有力な仮説として、運動ニューロン内に形成される凝集体が神経細胞死の原因となる「凝集体仮説」が提唱されています。ALS においては、C9orf72、TDP-43、FUS などのタンパク質自身やその遺伝子の部分翻訳産物、あるいはタンパク質断片が凝集体を形成することが知られており、これらの凝集体の形成を防ぐ、あるいは除去できる操作技術の創成は重要な治療法となる潜在性を有します。

TDP-43 とそのカルボキシ末端断片は、ALS 患者の運動ニューロン内に形成された凝集体の構成タンパク質として 2006 年に同定されました。研究グループは 2016 年に、TDP-43 カルボキシ末端断片の一つである TDP-25（TDP-43 の C 末 220-414 アミノ酸領域）は、RNA 分解により凝集体形成することを報告しています（【関連するプレスリリース】①参照）。また 2024 年には、TDP-25 が凝集体を形成する仕組みやそれが個体に与える影響を報告しています（【関連するプレスリリース】②参照）。特に 2016 年の報告では明らかにならなかった凝集抑制に機能する具体的な RNA 配列の同定は重要な問題でありました。

【研究手法】

本研究では、第一に RNA と TDP-43/TDP-25 の結合を調べるために、単一分子検出感度を有する相互作用解析技術である蛍光相互相関分光法（FCCS）を利用しました。第二に、緑色蛍光タンパク質（GFP）をタグ付けした TDP-43/TDP-25 をマウス神経芽細胞腫（Neuro-2a）またはヒト胎児腎細胞（293 細胞）に発現し細胞内に凝集体を形成させ、これらの細胞に RNA を発現させた上での凝集形成状態の変化を、共焦点蛍光顕微鏡観察及び細胞破碎液の生化学的分析により解析しました。また死細胞が特異的に染色される蛍光試薬で染まった細胞を共焦点蛍光顕微鏡及びフローサイトメトリー解析により、死細胞率を求めました。さらにこれら RNA の細胞内発現による転写産物の変化を次世代シーケンシングにより解析しました。

【研究成果】

GGGGCC 及び AAAUUU 配列の四回繰り返し RNA（以下それぞれ G4、A4 と表現）は TDP-43、TDP-25 共に結合し、G4 は相対的に強く、A4 は弱い親和性があることが分かりました。TDP-43 と G4/A4

間の相互作用では、静電相互作用の寄与が高いのに対し、TDP-25 とそれら RNA の間には、TDP-43 と比較して疎水的相互作用の寄与が高いことが示唆されました。G4/A4 間の相互作用に必要な TDP-25 の特異的な結合ドメインの同定には至りませんでした。TDP-25 の四次構造が RNA 結合に必要である可能性が考えられました。G4/A4 を TDP-43 または TDP-25 を発現する細胞へ導入すると、TDP-43 及び TDP-25 の細胞内凝集体を持つ細胞の割合並びに細胞破碎液中に含まれる不溶性 TDP-43/TDP-25 の量が減少しました (図 1)。さらに TDP-43/TDP-25 発現により上昇する細胞死が G4/A4 発現により抑制できることが分かりました。同配列の二回繰り返しとしたさらに短い RNA では、TDP-43/TDP-25 との相互作用強度が低下し、凝集抑制効果は見られなかったことから、ある程度の相互作用強度を有することが凝集抑制に必要であることが示唆されました。TDP-43/TDP-25 発現より前の段階で G4/A4 を導入すると凝集抑制効果が顕著にみられるのに対し、TDP-43/TDP-25 発現より後の段階で G4/A4 を導入すると凝集抑制効果が低下することから、G4/A4 は形成された凝集体を解く (脱凝集する) のではなく、凝集形成を防ぐ効果を有していることが示唆されました (図 2)。また G4/A4 の発現によりタンパク質性分子シャペロンなどプロテオスタシス維持遺伝子の転写誘導は確認されなかったことから、G4/A4 は TDP-43/TDP-25 の凝集形成を直接防いでおり、細胞内のプロテオスタシスを維持する分子シャペロンのような作用を持つことが予想されました。

【今後への期待】

細胞内に形成される凝集体は ALS などの神経変性疾患の発症に寄与する重要な生命現象であると考えられています。重要な課題は、本研究によって同定された RNA 配列が実際の神経変性疾患において予防薬・治療薬として有効であるのか、そして安全であるのかを検証することであると思います。また、細かい生化学的な観点では、本報告において TDP-43/TDP-25 と RNA 間の相互作用の様式が極めてユニークであると示唆されたことから、RNA が働く詳細な機構の解明や相互作用状態を原子分解能レベルで解明することも重要な基礎研究課題であると考えられます。さらには、TDP-43 のみならずその他の神経変性疾患において原因となる凝集性タンパク質に対して抗凝集作用があるのかを検証することも、より広範な神経変性疾患への治療戦略を組み立てる上で重要な課題です。このような観点から、本研究成果は生化学的な基礎科学課題に加え、難治性神経変性疾患の治療薬剤として実現させることも重要な社会的意義であると考えられます。

【謝辞】

本研究は、国立研究開発法人日本医療研究開発機構・革新的先端研究開発支援事業ソロタイプ (AMED-PRIME) ・研究開発領域「プロテオスタシスの理解と革新的医療の創出」(課題名: 細胞内プロテオスタシスを維持するシャペロン RNA の作動機序解明、代表者: 北村 朗) (JP22gm6410028)、日本学術振興会科学研究費助成事業・学術変革領域 (A) 『バイオリジカルクラスター: 細胞内における超分子複合体の形成機構と機能特性』・計画研究 (課題名: バイオリジカルクラスター解析のための極限時空間相関分光法の確立: 北村 朗) (JP24H02286)、日本学術振興会科学研究費助成事業・新学術領域研究『情報物理学でひもとく生命の秩序と設計原理』・公募研究 (課題名: 蛍光動的消光測定による生細胞内 RNA 立体構造の情報物理解析、代表者: 北村 朗) (JP22H04826)、公益財団法人 蓬庵社・研究助成 (代表者: 北村 朗)、公益財団法人 萩原学術振興財団・研究助成 (代表者: 北村 朗)、公益財団法人 中谷医工計測技術振興財団・技術開発研究助成 (代表者: 北村 朗)、北海道大学 L-Station 研究支援 (代表者: 北村 朗)、北海道大学 EXEX (旧 DX) 博士人材フェローシップ (JST-SPRING) (助成受領者: 藤本 愛) などの支援を受けて行われました。

【関連するプレスリリース】

①北海道大学・日本医療研究開発機構共同プレスリリース「RNA がタンパク質の凝集を抑制し神経細胞毒性を低減する－筋萎縮性側索硬化症（ALS）の神経細胞死機構を解明－」

発表日：2016年1月14日

URL： https://www.hokudai.ac.jp/news/160114_als_pr.pdf

②北海道大学プレスリリース「ALS/FTD の原因となる凝集体形成機構を解明～神経細胞の毒となるタンパク質凝集を抑制する薬剤などの研究発展に期待～」

発表日：2024年6月21日

URL： https://www.hokudai.ac.jp/news/pdf/240621_pr.pdf

論文情報

論文名 Short repeat ribonucleic acid reduces cytotoxicity by preventing the aggregation of TDP-43 and its 25 kDa carboxy-terminal fragment (短リピート RNA は TDP-43 及びその 25 kDa カルボキシ末端断片の凝集形成を防ぐことにより細胞毒性を低下させる)

著者名 藤本 愛¹、金城政孝² (研究当時)、北村 朗² (¹北海道大学大学院生命科学院、²北海道大学大学院先端生命科学研究院)

雑誌名 JACS Au (米国化学会発行のオープンアクセス学術誌)

DOI 10.1021/jacsau.4c00566

公表日 2024年9月23日 (月) (オンライン公開)

お問い合わせ先

北海道大学大学院先端生命科学研究院 准教授 北村 朗 (きたむらあきら)

TEL 011-706-9542 FAX 011-706-9045 メール akita@sci.hokudai.ac.jp

URL <https://altair.sci.hokudai.ac.jp/infmcd/index.html>

配信元

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

TEL 011-706-2610 FAX 011-706-2092 メール jp-press@general.hokudai.ac.jp

【参考図】

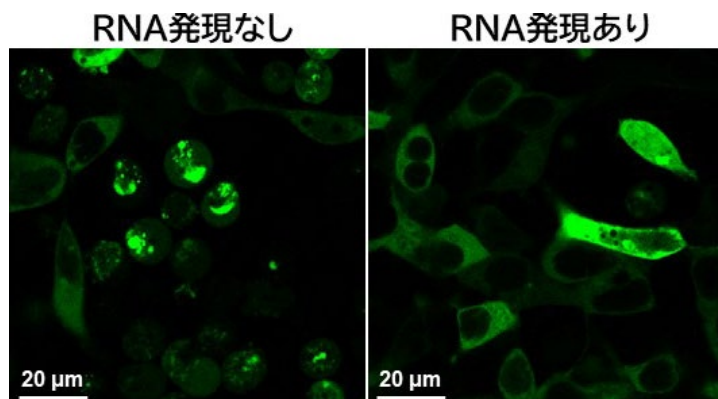


図 1. TDP-43 を発現する細胞の共焦点蛍光観察像。明るい輝点のように見えるものが細胞内に形成された凝集体。右の RNA 発現ではそのような凝集体陽性細胞が減っていることが分かる。

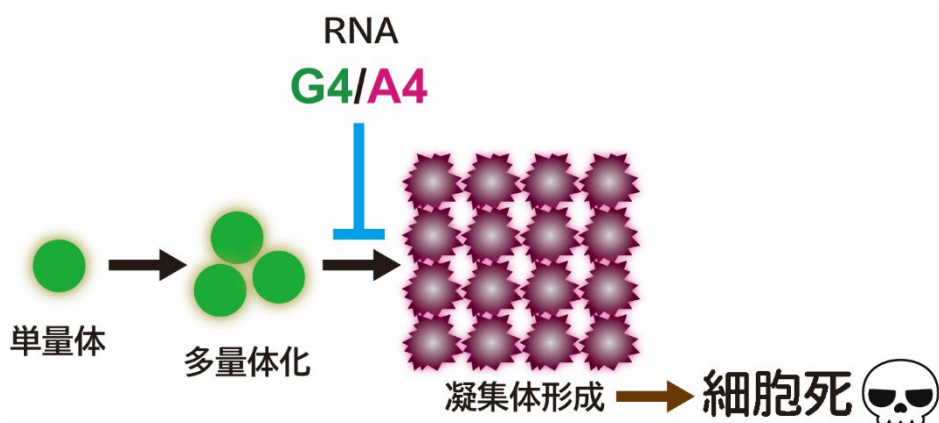


図 2. G4/A4 が TDP-43/TDP-25 の凝集抑制と細胞死阻止に働くイメージ図。

【用語解説】

- * 1 筋萎縮性側索硬化症 (ALS) … 英名は Amyotrophic Lateral Sclerosis、略して ALS。中枢神経系（脳や脊髄）の運動ニューロンが徐々に退行し、筋肉の運動制御が行えなくなることで筋肉が弱くなり、最終的には筋肉の萎縮（筋肉のサイズの減少）が起こる。C9orf72、TDP-43、FUS などのタンパク質が発症に関与していることが知られており、それらの凝集体が ALS の原因となる仮説のことを「凝集体仮説」という。
- * 2 TDP-43 及びその 25 kDa カルボキシ末端断片 (TDP-25) … ALS 患者の運動ニューロン内に形成された凝集体の構成タンパク質。全長の TDP-43 のみならずそのカルボキシ断片などが同時に凝集していることが知られている。ALS の他、認知症の一つである前頭側頭型認知症 (FTD) の原因タンパク質であることも知られている。
- * 3 四回繰り返し GGGGCC または AAAAUU 配列 … 本稿では G4 並びに A4 と呼称している 24-mer RNA 配列。全配列は下記参照。
 G4: GGGGCCGGGGCCGGGGCCGGGGCC
 A4: AAAAUUAAAAUUAAAAUUAAAAUU
 これらの配列が TDP-43 凝集抑制に効果があることは特許申請済 (PCT/JP2022/041001)。
- * 4 蛍光相互相関分光法 (FCCS) … 単一分子検出感度を有する蛍光測定技術の一つ。共焦点蛍光顕微鏡の光学系を利用し、サブフェムトリットル程度の極小領域を拡散しつつ通過する分子の運動速度と分子数を計測する蛍光相関分光法 (FCS) を二色の蛍光測定が可能のように拡張し、二色蛍光色素間の同時運動性から相互作用を解析する手法。分子数が測定できることから、生化学的な結合定数 (K_d) を求めることも可能。
- * 5 分子シャペロン … ポリペプチドがタンパク質にフォールディングされるまでを介助するタンパク質の総称。分子シャペロンとして働くタンパク質の中には、ポリペプチド鎖のフォールディングを助けるのみならずタンパク質の抗凝集効果があるものも知られている。