

新潟大学脳研究所
「脳神経病理資源活用の疾患病態共同研究拠点」
共同利用・共同研究報告書

運動ニューロン変性に関与する翻訳後修飾の同定

研究代表者 佐藤 俊哉¹⁾
研究分担者 中村 幹昭²⁾、加藤 利佳³⁾、笹岡 俊邦⁴⁾

1) 北里大学医学部実験動物学 2) 北里大学医学部脳神経内科
3) 北里大学医学部遺伝子高次機能解析センター 4) 新潟大学脳研究所

研究要旨

筋萎縮性側索硬化症 (ALS) の原因遺伝子である TDP-43 の生理的機能を明らかにするため、内在性 TDP-43 C 末領域の部分欠損マウス 12 系統を樹立し、C 末に存在する 4 つの領域 (GaroS1、HP、Q/N、GaroS2) の機能的な相違を検討した。TDP-43 の基本的な機能 (蛋白の安定性・マウスの生存性) には、GaroS1 から Q/N 領域までが必須で、Q/N の有無が蛋白の安定性を劇的に改善させた。これは GaroS2 が非必須領域であることを意味するが、GaroS2 欠損マウスでは TDP-43 mRNA 量が低下し、量の自己調節機構に変化があると考えられた。この結果から GaroS2 領域の存在意義を推定し、GaroS2 領域の翻訳後修飾が自己調節機構を調整するという仮説を立て、GaroS2 領域を標的とした新たなノックインマウスの作成を開始した。

A. 研究目的

運動ニューロン疾患は、遺伝及び環境要因を受けるとともに、加齢という明確なリスク要因の影響を受けて発症する。加齢との関連から、酸化ストレスの影響が注目されているが、酸化ストレスにより変化する分子の実体は明らかではない。酸化傷害の標的となる細胞成分は、核酸・蛋白・脂質などであるが、加齢による蓄積性、神経変性に共通して認められる蛋白凝集などとの直接的な関連を推察しやすいことから、本研究では蛋白に認められる異常な翻訳後修飾に着目して検討する。具体的には、ALS の原因遺伝子産物である TDP-43 に認められる翻訳後修飾の検索とともに、新潟大学脳研究所 (笹岡俊邦教授) と共同でモデルマウスを樹立し、遺伝子変異が集中する TDP-43 C 末領域の機能解析を進める。またこれと並行して、古典的な ALS モデルである Wobbler マウスの定量的プロテオミクス解析を行い、運動ニューロン変性と蛋白レベルの変化を解析する。

B. 研究方法 (倫理面への配慮を含む)

運動ニューロン変性と翻訳後修飾の関連を調べるため、以下の方法で解析を進めた。

(1) TDP-43 C 末領域の機能解析と翻訳後修飾の同定 (加藤利佳、佐藤俊哉)

TDP-43 C 末領域はプリオン様ドメインとも呼ばれる天然変性領域である。一般的に天然変性蛋白は、細胞内ネットワークにおけるハブ蛋白として働き、翻訳後修飾により制御され、様々な蛋白と結合する。しかし C 末領域はアミノ酸配列の特殊性から、トリプシンで切断されにくく、野生型ペプチドの同定すら困難な領域であることが分かっている。そこで TDP-43 C 末に存在する 4 つの領域 (GaroS1、HP、Q/N、GaroS2) の機能的な違いを個体および培養細胞を用いて明らかにし、領域を絞った上で翻訳後修飾の候補を検索する方針で進めている。

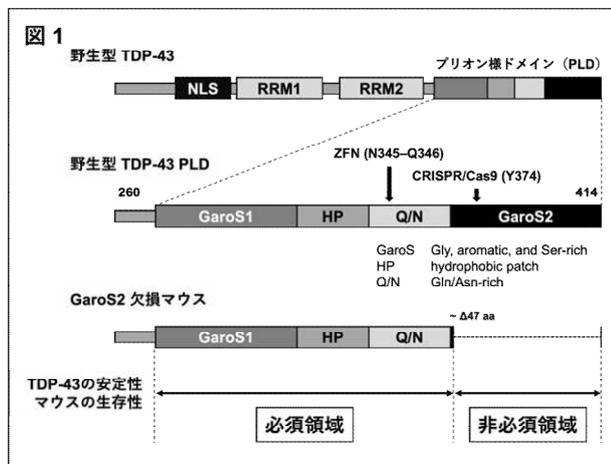
(2) Wobbler マウスの定量的プロテオミクス解析 (中村幹昭、加藤利佳)

6 週齢の Wobbler マウス大脳を用い、トリプシ

ン消化後に Tandem mass Tag (TMT) で安定同位体標識し、液体クロマトグラフィー質量分析計 (LC-MS) にて定量的プロテオーム解析を行った。トリプシン消化ペプチドの由来は、データベースソフトウェア (Proteome discoverer) を用いて同定した。野生型マウスとの比較解析では、TMT 標識されたペプチドの信号強度に基づき信号強度比を求め、Wobbler マウスで 1.2 倍を超えるものを増加ペプチド、0.83 未満のものを減少ペプチドと定義した。なお本検討では、蛋白の発現量比較に加え、トリプシン消化ペプチドの発現量比較を行うことにより、翻訳後修飾やスプライシング異常などの変化も推定した。

C. 研究結果

2022 年度の結果から、TDP-43 の基本的な機能 (蛋白の安定性・マウスの生存性) には、GaroS1 から Q/N 領域までが必須であることが分かった (図 1)。その一方、GaroS2 領域は非必須であったが、TDP-43 の量の自己調節機構に変化があったことから、自身の機能を調整している可能性が示唆された。



GaroS2 領域には、リン酸化の標的となるセリン残基が 14 箇所、アセチル化の標的となるリシン残基が 1 箇所あり、凝集した TDP-43 においてリン酸化・脱アミド・酸化という翻訳後修飾が報告されている。そこで GaroS2 領域に生じた翻訳後修飾が、TDP-43 の生理的機能、特に自己調節機構を変化させる可能性を検討する必要があると考え、GaroS2 領域を標的とした新たなノックインマウスの作成を開始した。2023 年度中に 1 系統を確立し、現在は比較対照となる系統も作成している。

D. 考察

TDP-43 GaroS2 領域が、非必須領域であるにも関わらず何故存在するのかという疑問に答えるため、新たな検討を開始した。家族性 ALS の原因となる変異が GaroS2 領域内にも存在することから、この領域が病態を促進することは明らかである。それにも関わらず GaroS2 領域が残されている理由としては、この領域が病態を促進するだけでなく抑制という両方向性の作用があるためだと推定し、個体レベルでの更なる解析が必要と考えた。

E. 結論

TDP-43 の生理的機能、特に GaroS2 領域の存在意義を確認するため、GaroS2 領域を標的とした新たなノックインマウスの作成を開始した。

F. 研究発表 (上記課題名に関するもの)

1. 論文発表

該当なし

2. 学会発表

該当なし

G. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む)

該当なし