

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

TDP-43 の非必須領域 GaroS2 の機能解明

研究代表者 佐藤 俊哉¹⁾
研究分担者 加藤 利佳²⁾、笹岡 俊邦³⁾

1) 北里大学医学部実験動物学 2) 北里大学医学部遺伝子高次機能解析センター
3) 新潟大学脳研究所動物資源開発研究分野

研究要旨

筋萎縮性側索硬化症 (ALS) の病態に中心的な役割を持つ TAR DNA-binding protein (TDP-43) の生理的機能の理解、その中でも特に機能が明確でない GaroS2 領域の存在意義を個体レベルで解明し、ALS の治療法開発を目指す。申請者は、GaroS2 欠損を含む TDP-43 C 末領域の部分欠損マウス 12 系統を作成し、GaroS2 領域は TDP-43 の機能維持に必須ではないが、TDP-43 のオートレギュレーション活性を抑制している可能性があることを報告した。GaroS2 領域は、ALS の病理診断マーカーである過剰なリン酸化を受ける領域でもあることから、リン酸化擬態変異を中心とする複数のマウス系統を新たに作成し、GaroS2 領域の機能および存在意義を明らかにする。

A. 研究目的

ALS 治療の分子標的として、TDP-43 の最も C 末側に存在する GaroS2 領域の翻訳後修飾、特にリン酸化に着目し、ゲノム編集マウスを作成して解析する。正常な TDP-43 は主に核に局在するが、実際には核-細胞質間をシャトルして RNA 代謝を中心とする多様な機能に関与する。また核内の TDP-43 はオートレギュレーション活性を示し、自身の蛋白発現量を厳密に制御している。この平衡状態の乱れが、細胞質内凝集体形成とともに ALS 発症に関与する可能性があるため、TDP-43 の活性制御領域と推定した GaroS2 領域に変異を導入する計画を立案した。

B. 研究方法 (倫理面への配慮を含む)

GaroS2 領域には、リン酸化を受ける可能性があるセリン残基が 14 箇所、アセチル化の標的となるリシン残基が 1 箇所あることから、これらを標的としたノックインマウスを作成し、翻訳後修飾による TDP-43 の細胞内局在・活性変化について解析する。具体的には、14 のセリン (S) 残基の

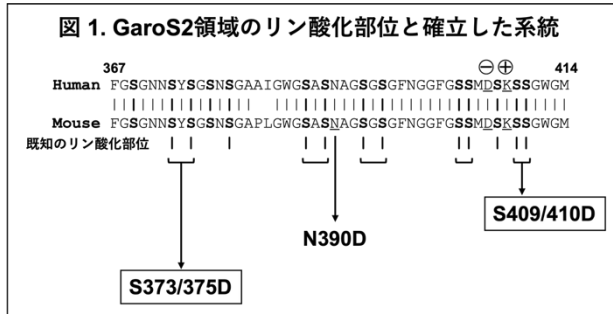
一部をアスパラギン酸 (D) 残基に置換したリン酸化擬態変異マウス系統を順番に作成し、TDP-43 の細胞内局在とオートレギュレーション活性を中心に各系統の表現型を比較する。既に報告された N390D ノックインマウスの表現型が明確なことから、負電荷の挿入 (N390D は置換数 1 に相当) による影響は充分にあるが、より強い効果を期待してアスパラギン酸への置換数を 2 に固定したマウスを作成する。

ノックインマウスの作成は CRISPR/Cas9 を用いる。具体的には、Cas9 蛋白、gRNA、修復用オリゴヌクレオチドをマウス受精卵にエレクトロポレーションし、相同組換えを起こした個体を選別する。ファウンダーマウス (N0) は、野生型マウスとの戻し交配によりオフターゲット効果を排除し、N2 世代で予備検討をおこない、N5 世代で本実験をおこなう。

C. 研究結果

GaroS2 領域へのリン酸化擬態変異部位として、セリン残基が近接する 5 箇所 (S373/375、S387/389、

S393/395、S403/404、S409/410) を候補とした。その中で、ALS の病理診断マーカーとして重要な S409/410D、および対照として最も N 末側に位置する S373/375D マウスを最初に確立した (図 1)。



現在までに S404/409D は N3 世代、S373/375D は N4 世代まで進め、N390D ノックインマウスの表現型を参考に解析の方向性を検討しているが、N390D とは異なり、明らかな表現型は認められていない。

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から研究を開始した。GaroS2 領域は、過剰なリン酸化を受けて ALS の病理診断マーカーにもなるが、リン酸化自体は、神経変性に対して防御的にも促進的にも働くと報告されている。GaroS2 を含む TDP-43 C 末領域は、プリオン様ドメインと呼ばれる天然変性蛋白である。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ることから、リン酸化による制御機構があると仮定して計画を立案した。現時点では明らかな表現型を認めていないが、TDP-43 の物性やオートレギュレーションに変化を来している可能性があるので、更なる検討を進める。また新たな系統の作成に関しては、新潟大学脳研究所 (笹岡俊邦教授) と相談し、今後の方針を決定する。

E. 結論

GaroS2 領域の機能を明らかにするため、リン酸化擬態変異マウスの作成を開始し、S404/409D および S373/375D ノックインマウスを樹立した。現在までに明らかな表現型は認めていないが、より詳細な検討が必要である。

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