トピックス

圧力摂動によりトラップされた蛋白質のミスフォールド状態

北原 亮¹, 北沢創一郎¹ ¹立命館大学薬学部漆谷 真^{2,*} ²滋賀医科大学分子神経科学センター / *現 京都大学大学院医学研究科臨床神経学

1. 筋萎縮性側索硬化症 ALS と TDP-43

筋萎縮性側索硬化症 (ALS) は, 進行性の神経細胞死とグリア細胞の集積に加え, 細胞質にユビキチン陽性封入体という病理学的な特徴を有する神経変性疾患であり, 患者の 90% 以上が孤発性である. ユビキチン化封入体の構成蛋白質として 2006 年に TDP-43 蛋白質が同定された. さらに一部の家族性 ALS 患者において TDP-43 遺伝子に突然変異が同定され^{1), 2)}, TDP-43 が ALS の直接原因となりうる事が判明した. TDP-43 蛋白質が如何に ALS 病態を引き起こすかは不明であるが, TDP-43 の断片化やリン酸化, RNA 代謝異常との関連が報告されており³⁾, TDP-43 は ALS 研究において最も注目されている蛋白質である.

TDP-43 は 2 つの構造ドメイン (RNA 結合ドメイン RRM1, RRM2) と長いフレキシブル領域からなる核内蛋白質であり, RNA プロセシングが主な機能と推定されるが, 核内外で行き来しているという報告もある. いずれにせよユビキチン化封入体は細胞質内で見られることから, 断片化や凝集により核内に戻れなくなると TDP-43 の機能低下や細胞質内の凝集体形成につながると考えられている⁴⁾.

これまでに TDP-43 の 2 つのドメイン RRM1 (PDB:2CQG) と RRM2 (PDB:1WF0) の溶液中の立体構造が解明されている. 著者らは, これら 2 つのドメインに着目し構造揺らぎと分子凝集について研究を行った⁵⁾. 本稿では特に RRM1 で観測されたミスフォールド状態に着目し TDP-43 の異常凝集について報告する.

2. 圧力摂動によるミスフォールド状態の蓄積

蛋白質の状態探索に優れた高圧力 NMR 法を用いて, RRM1 について 2000 気圧までの加圧実験を行っ

た. 加圧により主鎖アミド領域に対応する NMR 信号に化学シフトの変化が見られた. 興味深い事に, 加圧前 (30 気圧) と減圧直後 (30 気圧) における NMR スペクトルを比較すると, RRM1 の片側に位置する 20 残基以上の信号において化学シフトが変化していた (図 1, 図 2)⁵⁾. 加圧前後で信号の線幅にほとんど変化がないことから, 圧力処理後の蛋白質についても単量体を維持しているものと考えられる. このような“不可逆的”なスペクトルパターンの変化は無限希釈では考え難いので, 加圧により部分的に変性し, なんらかの弱い分子間相互作用により, リフォールドが妨げられ元の部分構造に戻る事ができず, ミスフォールド状態としてトラップされたものと解釈できる. このような高分解能の NMR スペクトルを与えるミスフォールド状態が観測される事は珍しい. ミスフォールド状態に転移した領域は 3 つあり (図 2 コア 1:113-122 番, コア 2:133-146 番, コア 3:166-174 番), それぞれはループを中心とした領域で構成されている.

図 1 RRM1 の HSQC スペクトル (ともに 30 気圧). 2000 気圧の加圧処理前後で化学シフトが不可逆的に変化.

Pressure-Induced Misfolding of RNA Recognition Motif1 of TDP-43
Ryo KITAHARA¹, Soichiro KITAZAWA¹ and Makoto URUSHITANI^{2,*}

¹College of Pharmaceutical Science, Ritsumeikan University

²Molecular Neuroscience Research Center, Shiga University of Medical Science

*Present Address: Kyoto University Graduate School of Medicine

※図 1, 図 2 は, 電子ジャーナル (<https://www.jstage.jst.go.jp/browse/biophys/-char/ja/>) ではカラー版を掲載しています.

図2 RRM1の立体構造と加圧処理により不可逆的なスペクトル変化を示した3領域(赤:コア1-コア3)およびCys173とCys175(スティック表記)。

さらに、RRM1凝集物の酵素による加水分解と質量分析による解析から凝集コアを特定したところ、ミスフォールド状態を示す領域のうちコア3は、凝集コア領域とも良い一致を示す事がわかった。

また圧力処理後に徐々に生じる凝集物をSDSページにより調べると、減圧後1-2週間の間にDTT感受性のあるすなわちS-S結合を介したダイマーやトリマーの量が増加していく事がわかった。RRM1には、Cys173とCys175の2つが存在するが、立体構造上は2つのCys側鎖はいずれも還元状態で分子内面を向いている(図2)。Cys173とCys175はコア3に隣接する事から、RRM1が熱揺らぎや圧力など外的因子で構造が揺らぐと分子間相互作用が生じ、一定期間の後に、分子間S-S結合を介したダイマー、トリマーへとポリ化していく事が示唆される。C173SまたはC175Sの変異により、RRM1やTDP-43の凝集が加速される事や、運動ニューロン細胞への毒性に強い影響を与える事もわかった⁵⁾。

3. ALS患者のTDP-43凝集物を認識する抗体

RRM1のミスフォールド状態を示す3領域のペプチド断片を用いてウサギポリクロナル抗体を作製したところ、コア1の一部を用いて作られた抗体は、培養細胞内のTDP-43凝集物やALS患者の運動ニューロンで見られる封入体を特異的に認識した。RRM1の天然状態構造によると、コア1の多くが分子内に保護されているため、コア1ペプチドによる抗体が凝集物を認識した事実は、凝集体中においてコア1は露出している事を示す。これらの事から、RRM1のミスフォールド

状態に移した3領域のうち、コア3はS-S結合などを介して直接的にオリゴマー化や凝集に関与し凝集コアとなる一方、コア1は凝集後も露出した状態を維持していると考えられる。

報告されているALS患者に見られるTDP-43遺伝子変異の大半はRRM1以降の263番～C末端(414番)の領域に集中しているが、疾患関連変異体(A315TやQ331K)を発現した培養細胞においては、TDP-43の凝集性や毒性については、野生型の2倍を超えない程度の増加しか見られない。一方RRM1における変異、たとえばC175Sでは約20倍に増加する⁵⁾。これらの結果から、RRM1はTDP-43の構造安定性、凝集性、毒性を強く左右するドメインである事がわかる。

今回、圧力実験により発見されたRRM1における構造揺らぎおよびミスフォールド状態への転移は、続いて生じるRRM1のオリゴマー化や凝集のトリガーとなるものであり、疾患メカニズムの解明や創薬研究においても注目すべき状態である。今後、立体構造解析を行い、凝集メカニズムの分子論的な解釈を行いたい。

謝辞

本内容は参考文献5の一部内容について報告したものである。共同研究者の方々に深く御礼申し上げます。

文献

- 1) Kabashi, E. *et al.* (2008) *Nat. Genet.* **40**, 572-574.
- 2) 石原智彦ら (2010) *最新医学* **65**, 1648-1653.
- 3) Yamashita, T. *et al.* (2012) *Nat. Comm.* **3**, 1307.
- 4) 漆谷 真 (2010) *最新医学* **65**, 1588-1596.
- 5) Shodai, A. *et al.* (2013) *J. Biol. Chem.* **288**, 14886-14905.

北原 亮

北原 亮(きたはら りょう)

立命館大学薬学部准教授 (PI)
神戸大学大学院修了, 博士 (理学), 理化学研究所基礎科学特別研究員など
研究内容: 高圧力 NMR を用いた蛋白質の構造揺らぎ研究

連絡先: 〒525-8577 滋賀県草津市野路東 1-1-1

E-mail: ryo@ph.ritsumei.ac.jp

北沢創一郎

北沢創一郎(きたざわ そういちろう)

立命館大学大学院博士後期課程3年生
研究内容: 蛋白質の高エネルギー状態の立体構造解析

E-mail: rc003052@ed.ritsumei.ac.jp

漆谷 真

漆谷 真(うるしたに まこと)

京都大学大学院医学研究科臨床神経学准教授
京都大学大学院, 博士 (医学), ラバル大学 (カナダ) 研究員, 滋賀医科大学准教授など
研究内容: 筋萎縮性側索硬化症を中心とした神経変性疾患の研究と治療法の開発

連絡先: 〒606-8705 京都市左京区聖護院川原町 54

E-mail: urumak@kuhp.kyoto-u.ac.jp