



HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	Short repeat RNA-mediated suppression of the aggregation and cytotoxicity of TDP-43 and its C-terminal fragment TDP25 [an abstract of dissertation and a summary of dissertation review]
Author(s)	藤本, 愛
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(生命科学)
Dissertation Number	甲第16279号
Issue Date	2025-03-25
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/95451
Rights(URL)	https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/
Type	doctoral thesis
File Information	Ai_Fujimoto_abstract.pdf, 論文内容の要旨



学 位 論 文 内 容 の 要 旨

博士の専攻分野の名称 博士(生命科学) 氏 名 藤本 愛

学 位 論 文 題 名

Short repeat RNA-mediated suppression of the aggregation and cytotoxicity of TDP-43 and its C-terminal fragment TDP25

(TDP-43 及びそのカルボキシ末端断片 TDP25 の凝集およびその細胞毒性の抑制に働く短リピート RNA の研究)

筋萎縮性側索硬化症 (ALS) は、タンパク質の凝集体が運動ニューロン特異的に蓄積することで運動ニューロンの変性・脱落がおき、運動機能の喪失からはじまりやがて呼吸不全に陥る神経変性疾患である。運動ニューロン内に形成される TDP-43 凝集体およびその 25 kDa カルボキシ末端断片 (TDP25; 220-414 アミノ酸) の蓄積は、ALS の原因であると考えられている。TDP-43 は、2 つの RNA/DNA 認識モチーフ (RRM1 と RRM2)、およびアミロイド形成の核となり得る C 末端の天然変性領域 (IDR; 274-414 アミノ酸) を有する。この IDR は、アミロイド形成に関与するのみならず、他の RNA 結合タンパク質との相互作用や液-液相分離を介した TDP-43 の自己会合制御に寄与することが知られている。一方、TDP25 はプロテアーゼ切断により生じ、高い凝集性を持つことが知られている。TDP25 は RRM2 の N 末側 29 アミノ酸を欠損しており、この欠損領域には RNA を認識するための主要なアミノ酸が含まれることから典型的な RNA 結合能を欠いている。しかしながら、所属研究室の先行研究から、細胞破碎液中における RNA 分解により TDP25 の凝集形成が促進されることが示されている。このことから、何らかの RNA が TDP25 の凝集形成を抑制していることが予想されていた。しかしながらどのような配列の RNA がこのような TDP25 の凝集抑制に働くのかは明らかとなっていなかった。TDP-43 が認識する UG リピート RNA は TDP25 と相互作用しないことがわかっているため、UG リピート以外のリピート RNA がその役割を担っているのではないかと着想した。そこで ALS 原因遺伝子 *C9orf72* の非翻訳領域に含まれる GGGGCC リピート配列に着目し、これが TDP25 と相互作用し凝集抑制する RNA 配列ではないかと考えた。

まず両者の分子間相互作用を解析するために、単一分子検出感度を持つ蛍光相互相関分光法 (FCCS) を用いた。細胞破碎液中において、蛍光標識した GGGGCC 四回リピート RNA ($r(G4C2)_4$) は TDP-43 と相互作用することが確認されたことに加え、TDP25 と結合することが明らかとなった。また蛍光標識した AAAAUU 四回リピート RNA ($r(A4U2)_4$) も TDP-43 および TDP25 と相互作用した。次に、哺乳類細胞を用いて発現・精製した TDP-43 および TDP25 を用いてこれら RNA との FCCS 解析を行ったところ、TDP25 は他のタンパク質を介さず RNA と直接相互作用することが示された。次に、TDP-43/TDP25 と RNA 間の生化学的相互作用様式を調べるために、静電相互作用を阻害する高塩濃度下と弱い疎水性相互作用を阻害する 1,6-Hexandiol 存在下で、TDP-43 または TDP25 と RNA との相互作用強度を FCCS 解析したところ、TDP-43 の RNA 相互作用様式は疎水的相互作用より静電的相互作用の寄与が高いのに対し、TDP25 の RNA 相互作用様式は静電的相互作用より疎水的相互作用の寄与が高いことが示唆された。さらに TDP25 と RNA の相互作用領域を調べるために、TDP25 の欠損変異体である残存 RRM2 (220-263 amino acids) および IDR を用いたところ、 $r(G4C2)_4$ および $r(A4U2)_4$ とは相互作用しなくなったことから、TDP25 全体が相互作用に必要であることが示唆された。

これらの RNA が TDP25 の凝集を抑制する機能を持つかを検証するため、マウス神経芽細胞腫 Neuro2a にプラスミド DNA を導入し、 $r(G4C2)_4$ および $r(A4U2)_4$ を発現させたところ、 $r(G4C2)_4$ および $r(A4U2)_4$ 発現させた細胞群では TDP25 の細胞質凝集体を有する細胞の割合が減少し、また TDP25 発現により起こっていた細胞死も抑制させることがわかった。次に、 $r(G4C2)_4$ および

r(A4U2)₄ 配列の合成 RNA を細胞へ直接導入したときにも、TDP25 の細胞質凝集体を有する細胞の割合は低下した。さらに、次世代シーケンサーを用いたトランスクリプトーム解析を行ったところ、r(G4C2)₄ および r(A4U2)₄ を発現する細胞群において、分子シャペロンなどタンパク質凝集抑制効果を有する既知の遺伝子発現誘導は確認されなかった。次に、r(G4C2)₄ および r(A4U2)₄ が全長 TDP-43 の凝集形成およびそれによる細胞死を抑制できるのかを調べるため、ヒト胎児腎細胞株 HEK293 に r(G4C2)₄ または r(A4U2)₄ を発現させたところ、TDP-43 の細胞質凝集体を有する細胞の割合が減少し、また TDP-43 発現により起こっていた細胞死も抑制させることがわかった。さらに次世代シーケンサーを用いたトランスクリプトーム解析の結果により、TDP25 発現時と同様、タンパク質凝集抑制効果を有する既知の遺伝子の発現誘導は確認されなかった。

本研究により、r(G4C2)₄ および r(A4U2)₄ は、TDP25 および TDP-43 に直接結合し凝集および細胞死を抑える RNA 配列であることが示された。これまで分子シャペロンのように抗凝集機能を持つタンパク質は知られていたが、RNA にも抗凝集機能があることが示されたことから、細胞内において RNA が分子シャペロンとして働くことでプロテオスタシスの維持に寄与する可能性が考えられる。

Amyotrophic lateral sclerosis (ALS) is a neurodegenerative disease that begins with the loss of motor function and eventually leads to respiratory failure, caused by the accumulation of protein aggregates that specifically accumulate in motor neurons, resulting in the degeneration and loss of motor neurons. The accumulation of TDP-43 aggregates and its 25 kDa carboxy-terminal fragment (TDP25; 220–414 amino acids) in motor neurons is thought to be the cause of ALS. TDP-43 has two RNA/DNA recognition motifs (RRM1 and RRM2) and a C-terminal intrinsically disordered region (IDR; 274–414 amino acids) that may be the core of amyloid formation. This IDR is known to be involved in amyloid formation, as well as contributing to the interaction with other RNA-binding proteins and the regulation of TDP-43 self-aggregation via liquid-liquid phase separation. On the other hand, TDP25 is known to be generated by protease cleavage and to have high aggregation properties. TDP25 lacks the N-terminal 29 amino acids of RRM2, and since this deletion region includes the critical amino acids for RNA recognition, it lacks typical RNA binding ability. However, previous research in our laboratory has shown that RNA degradation in cell lysates promotes TDP25 aggregation. From this, it was predicted that some kind of RNA would inhibit the formation of TDP25 aggregates. However, it was not clear what kind of RNA sequence would inhibit the aggregation of TDP25 in this way. Since it is known that the UG repeat RNA recognized by TDP-43 does not interact with TDP25, we had the idea that repeat RNA other than UG repeats might be playing this role. We then focused on the GGGGCC repeat sequence observed in the untranslated region of an ALS causative gene *C9orf72*, and thought that this might be an RNA sequence that interacts with TDP25 and suppresses its aggregation.

To analyze the molecular interactions between the two proteins, we used fluorescence cross-correlation spectroscopy (FCCS), which detects the interaction with a single molecule sensitivity. In cell lysates, it was confirmed that the fluorescently labeled GGGGCC tetra-repeat RNA (r(G4C2)₄) interacts with TDP-43, and it was also found that it binds to TDP25. In addition, fluorescently labeled AAAAUU tetra-repeat RNA (r(A4U2)₄) also interacted with TDP-43 and TDP25. Next, we performed FCCS analysis of these RNAs using purified TDP-43 and TDP25 from mammalian cells. It was shown that TDP25 interacts directly with RNA without the involvement of other cellular proteins. Next, to investigate the biochemical interaction mechanism between TDP-43/TDP25 and RNA, we performed FCCS analysis of the interaction strength between TDP-43 or TDP25 and RNA were analyzed by FCCS, it was suggested that the RNA interaction of TDP-43 has a higher contribution from electrostatic interactions than from hydrophobic interactions, whereas the RNA interaction mode of TDP25 has a higher contribution from hydrophobic interactions than from electrostatic interactions. Furthermore, to investigate the interaction region between TDP25 and RNA, we used the remaining RRM2 (220–263 amino acids) and IDR, which are defective mutants of TDP25, and found that they no longer interact with r(G4C2)₄ and r(A4U2)₄, suggesting that the entire TDP25 is necessary for the interaction.

To demonstrate whether these RNAs have a function that inhibits the aggregation of TDP25, we introduced plasmid DNA into mouse neuroblastoma Neuro2a cells to express r(G4C2)₄ and r(A4U2)₄, the proportion of cells with cytoplasmic aggregates of TDP25 decreased in the cell groups expressing r(G4C2)₄ and r(A4U2)₄, and cell death caused by TDP25 expression was suppressed by these RNA expression. Next, the directly introduced synthetic r(G4C2)₄ and r(A4U2)₄ sequences decreased the proportion of cells with cytoplasmic aggregates of TDP25. Furthermore, transcriptome analysis using next-generation sequencing revealed that there was no induction of known genes that have a protein aggregation inhibitory effect, such as molecular chaperones, in the cell groups expressing r(G4C2)₄ and r(A4U2)₄. Next, to investigate whether r(G4C2)₄ and r(A4U2)₄ can inhibit the formation of aggregates of full-length TDP-43 and the cell death caused by its aggregates, we expressed r(G4C2)₄ or r(A4U2)₄ in human embryonic kidney 293 (HEK293) cells. The proportion of cells with cytoplasmic TDP-43 aggregates decreased, and cell death caused by TDP-43 expression was suppressed by these RNA expressions. Furthermore, as a result of transcriptome analysis using next-generation sequencing, it was confirmed that there was no induction of expression of known genes with a protein aggregation inhibitory effect, as was the case with TDP25 expression.

This study shows that r(G4C2)₄ and r(A4U2)₄ are RNA sequences that directly bind to TDP25 and TDP-43, suppressing aggregation and cell death. Although proteins with anti-aggregation functions, such as molecular chaperones, have been known, the fact that RNA also has anti-aggregation functions suggests that RNA may act as a molecular chaperone in the cell and contribute to the maintenance of proteostasis.