



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_review.pdf, 審査の要旨



学 位 論 文 審 査 の 要 旨

博士の専攻分野の名称 博士（生命科学） 氏 名 藤本 愛

審査担当者	主査	准教授	北村 朗
	副査	教 授	門出 健次
	副査	教 授	尾瀬 農之
	副査	准教授	上原 亮太

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)

博士学位論文審査等の結果について（報告）

運動ニューロン内に形成される TDP-43 凝集体およびそのカルボキシ末端断片 (CTF) の蓄積は、筋萎縮性側索硬化症 (ALS)および前頭側頭葉型認知症 (FTD) の原因であるとされている。この TDP-43 の CTF のうち ALS/FTD 患者の運動ニューロン内より同定されておりかつ *in vitro* においても高い凝集性と細胞死誘導活性を有する 25 kDa の CTF (TDP25; TDP-43 の 220-414 アミノ酸領域) は、構造を安定化させる RNA 認識モチーフ (RRM) の活性に重要な残基を欠損しているにもかかわらず、細胞抽出液中において RNA 分解処理を施すと凝集することが先行研究で示されていた。このことから、特定の RNA が TDP25 と相互作用し凝集形成を抑制していると予想されていた。しかしながらその RNA がどのような配列なのか、その同定には至っていなかった。

TDP-43 が認識する RNA 配列として UG リピートおよび C9orf72 転写産物の非翻訳領域に含まれる GGGGCC リピートが知られていた。しかしながら UG リピートは TDP25 と相互作用しないことが先行研究よりわかっていたため、GGGGCC 四回リピート配列 (rG4)と TDP25 の相互作用を、単一分子感度の分子間相互作用解析法である蛍光相互相関分光法 (FCCS)を用いて調べたところ、rG4 と TDP25 は相互作用することが分かった。また AAAAUU 四回リピート (rA4)と TDP-43, TDP25 の相互作用を同様に FCCS 解析により調べたところ、これらも相互作用することが分かった。さらに哺乳類細胞発現系リコンビナントタンパク質 TDP25 および TDP-43 を用いた FCCS 解析により、これらの RNA とタンパク質が他の細胞内在性核酸結合タンパク質を介さず直接相互作用することが示された。次に TDP-43 および TDP25 と rG4, rA4 との相互作用様式を調べたところ、TDP-43 と RNA は静電相互作用の寄与が高かったのに対し、TDP25 と RNA は疎水性相互作用の寄与が高いことが示唆された。また、TDP25 どの領域を利用して RNA と相互作用しているのかを調べるために TDP25 に残存する RRM 領域 (TDP-43 の 220-262 アミノ酸) および最 C 末の天然変性領域 (TDP-43 の 274-414 アミノ酸) それぞれと rG4/rA4 との相互作用を調べたところ、いずれの領域とも単独では RNA と相互作用を示さなかったことから、TDP25 の全長が RNA 結合に必要であることが示唆された。さらに蛍光相関分光法 (FCS)を用いた拡散係数および一分子輝度の解析から TDP25 は単量体ではなく多量体を形成していたことから、多量体化した TDP25 が RNA と相互作用する可能性が考えられた。

rG4/rA4 が TDP25 の凝集を抑制することが可能かどうかを検証するため、マウス神経芽細胞腫 Neuro2a にこれらの RNA を RNA ポリメラーゼ III プロモーター制御下で発現可能なプラスミド DNA を一過的に導入し発現させた。TDP25 の細胞質凝集体形成率は rG4/rA4 発現により減少し

た. この細胞破碎液を分画し, SDS 不溶かつ尿素可溶画分に含まれる TDP25 の量をウェスタンブロット法により検出したところ, rG4/rA4 発現により減少することが分かった. さらにこの時の細胞死率を細胞死検出蛍光試薬で細胞を染色し蛍光顕微鏡下およびフローサイトメーターにより計測したところ, TDP25 発現により上昇した細胞死率が rG4/rA4 発現により低下することがわかった. さらに rG4/rA4 の合成 RNA 配列を直接リポフェクション法により細胞へ導入した場合にも TDP25 の細胞質凝集体形成率は低下した. 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により, rG4/rA4 発現による分子シャペロンなど抗凝集能を有する遺伝子の発現誘導は見られなかったことから, これらの RNA は直接的に抗凝集に働いていることが示唆された. さらにこれら rG4/rA4 の抗凝集能は全長 TDP-43 の凝集形成率を低下させると共に, TDP-43 発現により上昇した細胞死率を低下させることもできることがわかった.

以上より, rG4/rA4 は, TDP25 および TDP-43 に直接結合し, 凝集形成を抑制し, その作用機構により細胞死を低減させることができる RNA 配列であることがわかった. 抗凝集性を有する RNA 配列は世界的に報告例が少なく, 特に TDP25 の凝集に対し抑制的に働く RNA 配列は最初の報告である. 抗凝集活性は広義の分子シャペロン活性であるため, RNA が分子シャペロンとしての機能を有することが示唆された歴史上重要な知見である.

これを要するに, 著者は, これまで知られていなかった RNA のタンパク質抗凝集活性という新知見を得たものであり, 分子細胞生物学の進展上, 極めて重要な発見に対して貢献するところ大なるものがある.

よって著者は, 北海道大学博士 (生命科学) の学位を授与される資格あるものと認める.