

# 翻訳後修飾アミロイドの合成と機能・構造解析

和歌山県立医科大学薬学部薬品化学研究室

相馬 洋平

## 1. 研究背景・目的

TDP-43は、主に細胞核内に存在する414残基からなるタンパク質である。TDP-43は生理的に自己会合することにより核内にてRNAスプライシングなどに関与する一方、細胞質内ではアミロイドへと自己会合（凝集）することにより筋萎縮性側索硬化症（ALS）および前頭側頭型認知症（FTD）の原因となる。TDP-43の翻訳後修飾は自己会合に影響を与えるため、これらの生理的機能および病態機能に影響すると考えられる。しかしながら、修飾を受けるアミノ酸残基の種類・部位が多様であるため、個別のTDP-43翻訳後修飾体の自己会合性を定量的に調べることは難しい。

タンパク質の化学合成は、特定の部位を均一に修飾した構造を与えることができるため、ユニークなそれぞれの翻訳後修飾体の機能を調べるための強力な方法になる。実際、TDP-43と同じくアミロイドへと自己会合して神経変性疾患を引き起こすタウ、 $\alpha$ シヌクレインについては、均一な翻訳後修飾体の化学合成により、それぞれの病態機能が明らかにされている<sup>[1]</sup>。一方、TDP-43における化学合成アプローチは、低複雑性ドメイン（LCD）に相当する260番目から414番目のC末端側のフラグメントに焦点が当てられてきた<sup>[2]</sup>。我々は、できるだけ全長に近い翻訳後修飾TDP-43を化学合成し（図1：研究背景の概念図の①）、その病態機能（②）および立体構造（③）の解析を通して、TDP-43翻訳後修飾体のALS発症へとつながるメカニズムを解明することを目指している。今回は、特にこれまでほとんど解析が進んでいないN末端領域（NTD）にリン酸化翻訳後修飾を有する完全長TDP-43（=Ser48側鎖がリン酸化されたTDP<sub>1-414</sub>、以下TDP<sub>1-414</sub>(pS48)と略す）を化学（半）合成することを計画した。ALSを悪化させる可能性が指摘されているTDP<sub>1-414</sub>(pS48)は、NTDに翻訳後修飾を持つまれな形態であり（ALS関連の翻訳後修飾のほとんどはC末端領域であるLCDに見られる）、TDP<sub>1-414</sub>(pS48)の病態機能は注目されている<sup>[3]</sup>。

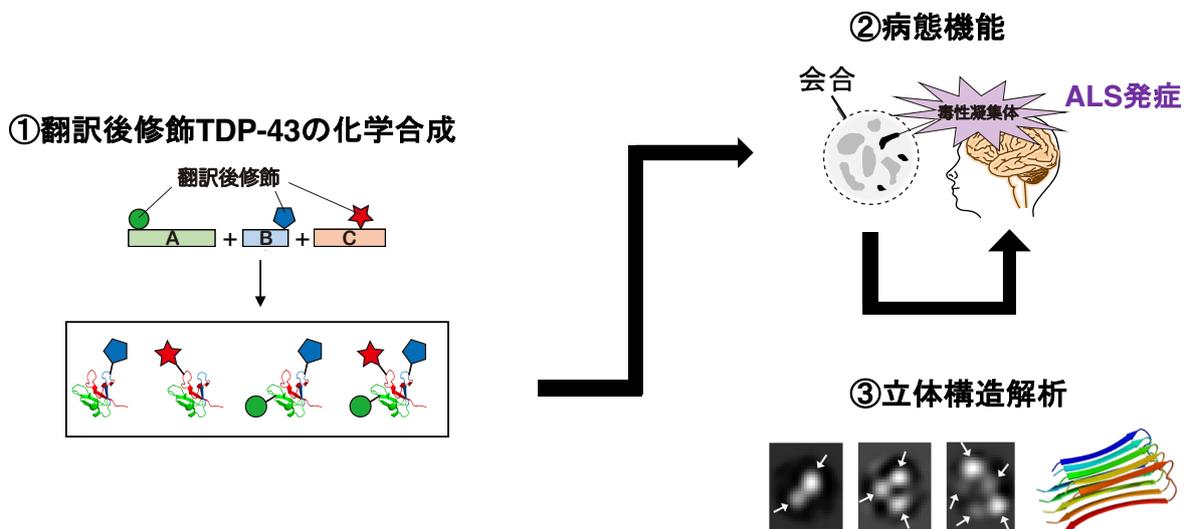


図1. 研究背景の概念図

## 2. 方法・結果

TDP<sub>1-414</sub>(pS48)を化学合成するにあたり、50-51番目のGln-Cys部位でnative chemical ligation法<sup>[4]</sup>により連結することを計画した（図2）。そこで、大腸菌によるリコンビナント合成で得られたCys-TDP<sub>51-414</sub>と化学合成したTDP<sub>1-49</sub>(pS48)のチオエステル等価体とのnative chemical ligationによるTDP<sub>1-414</sub>(pS48)の合成を検討した。なお、N末端にHis-tagを付与したTDP<sub>1-49</sub>(pS48)のチオエステル等価体を用いることで、native chemical ligationを実施した後、Ni-NTAカラムにより残存するCys-TDP<sub>51-41</sub>を除去する戦略をとった。

His-tag-TDP<sub>1-49</sub>(pS48)のチオエステル等価体とCys-TDP<sub>51-414</sub>とのnative chemical ligationは、低収率ながら反応が進行した。得られた全長のHis-tag-TDP<sub>1-414</sub>(pS48)をNi-NTAカラムに適用したところ、Cys-TDP<sub>51-414</sub>はフロースルー画分に抽出され、目的のHis-tag-TDP<sub>1-414</sub>(pS48)と分離することができた。その後、イミダゾール添加によりHis-tag-TDP<sub>1-414</sub>(pS48)を溶出した後、TEV protease処理によってHis-tagとTDP<sub>1-414</sub>(pS48)の間のリンカーを切断し、この反応溶液を再度Ni-NTAカラムに通すことでTDP<sub>1-414</sub>(pS48)をフロースルー画分に抽出した。フロースルー画分のTDP<sub>1-414</sub>(pS48)はさらにサイズ排除クロマトグラフィーによって残存しているTDP<sub>1-49</sub>(pS48)チオエステル等価体と分離することができ、最終的に高純度のTDP<sub>1-414</sub>(pS48)を得ることができた(図3—①)。

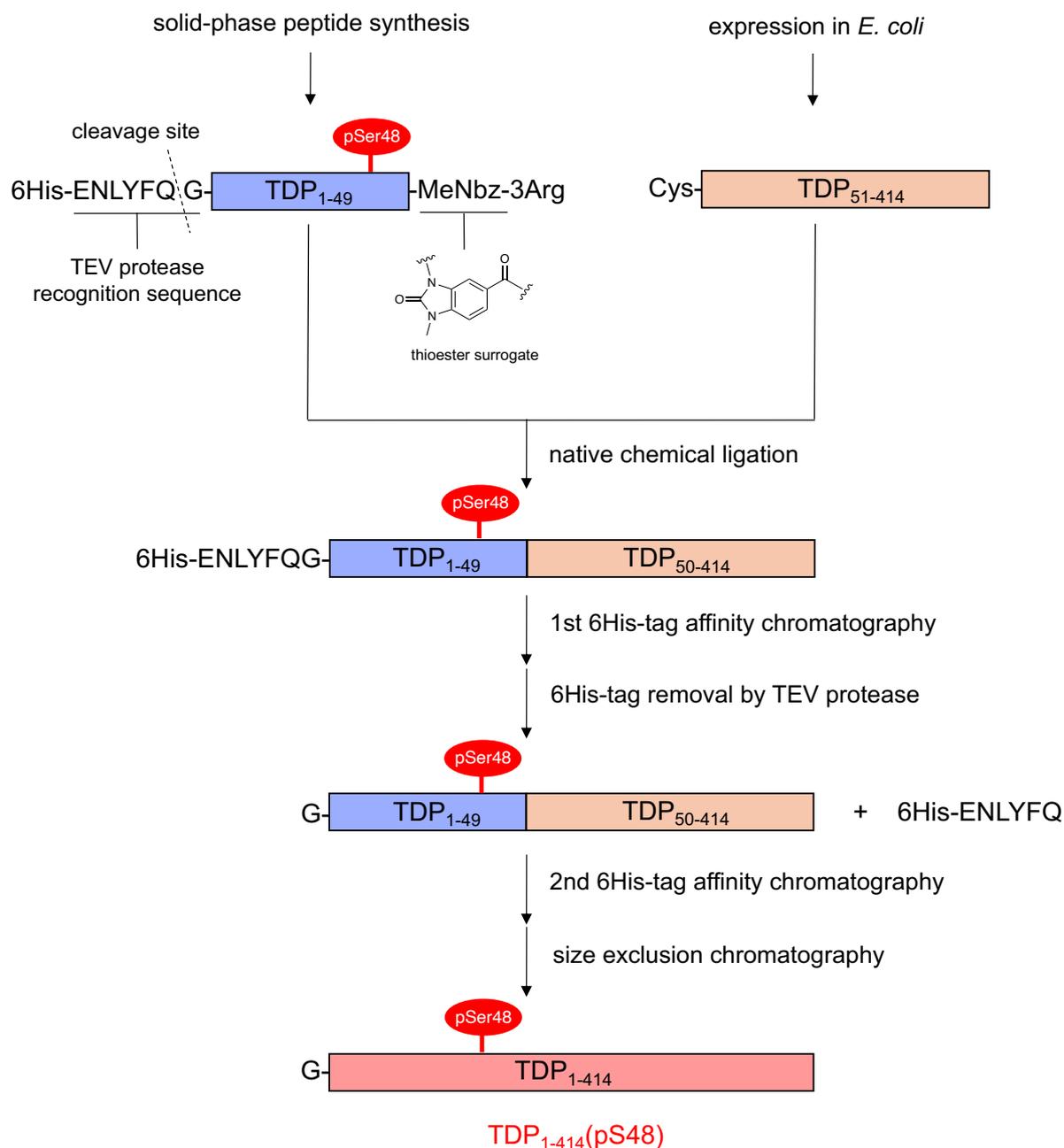


図2. TDP<sub>1-414</sub>(pS48)の合成スキーム。pSer: phosphorylated serine

興味深いことに、合成したTDP<sub>1-414</sub>(pS48)の自己会合性を、同じく化学合成した非リン酸化TDP<sub>1-414</sub>と比較した結果、Ser48のリン酸化がTDP<sub>1-414</sub>の自己会合性を低下させることが明らかとなった(図3—②)。また、非リン酸化TDP<sub>1-414</sub>が典型的なアミロイド状繊維を与えたのに対し、TDP<sub>1-414</sub>(pS48)は繊維状ではない形態の凝集体を与えることが分かった。

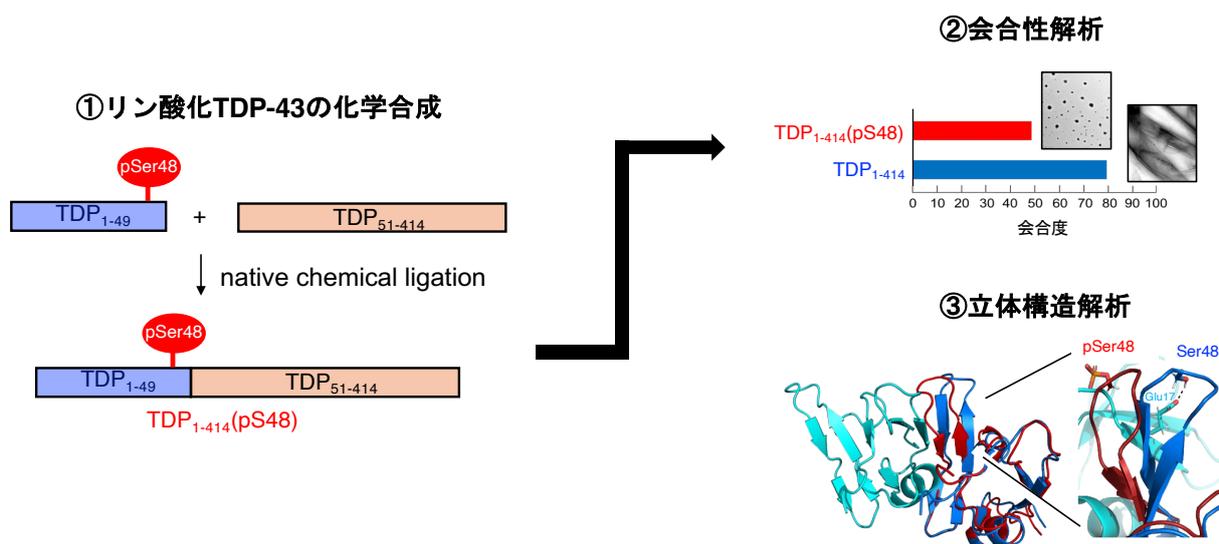


図3. 今回得られた成果のまとめ

TDP-43はNTD領域同士の相互作用を介して生理的に自己会合している<sup>[3]</sup>。そこで、48位Serのリン酸化は、静電反発によりNTD間の相互作用を弱めた可能性が考えられた。そこで次に、TDP<sub>1-414</sub>のNTDに相当するTDP<sub>1-80</sub>に焦点を当て、Ser48リン酸化体および非リン酸化それぞれを合成し、会合性評価を行った。TDP<sub>1-80</sub>(pS48)および非リン酸化TDP<sub>1-80</sub>の合成は、C末端にチオエステルを有するペプチドTDP<sub>1-38</sub>とTDP<sub>39-80</sub> (TDP<sub>1-80</sub>(pS48)の合成では48番目はリン酸化セリン)を合成し、native chemical ligationで連結させることで達成した。自己会合性を評価した結果、TDP<sub>1-80</sub>(pS48)は、非リン酸化TDP<sub>1-80</sub>と比べて自己会合性が低下した。この結果は、Ser48側鎖のリン酸基がNTD間の相互作用を弱めることを支持している。さらに、小角X線散乱法を用いた解析により、非リン酸化TDP<sub>1-80</sub>ではSer側鎖ヒドロキシ基がGlu側鎖カルボキシレートとNTD間で水素結合を形成するのに対し、TDP<sub>1-80</sub>(pS48)ではGlu側鎖カルボキシレートとSer側鎖リン酸基の静電反発によりNTDが遠ざかって位置していることが示唆された (図3—③)。

### 3. まとめ

今回、NTDに位置するSer48がリン酸化された全長TDP<sub>1-414</sub>(pS48)の化学合成に成功した<sup>[5]</sup>。その結果、Ser48リン酸化は対応する非リン酸化体と比べ、会合性が低く、異なる凝集形態を示すことが明らかとなった。また、Ser48リン酸化体が低会合性を示すことを支持する立体構造学的知見を得ることもできた。今後、TDP<sub>1-414</sub>(pS48)のALS悪化メカニズム (TDP<sub>1-414</sub>(pS48)はTDP<sub>1-414</sub>と比べて会合性が低くなるために核内での生理的な機能を失う、TDP<sub>1-414</sub>(pS48)は会合性が低くなるため細胞質での酵素分解を受けやすくなり凝集コアであるLCDの産生を促進するなど)を解明する。また、今回初めて全長TDP-43の化学合成に成功したことから、今後、TDP<sub>1-414</sub>の様々な翻訳後修飾体 (別の位置に存在するSerリン酸化およびリン酸以外の翻訳後修飾)の合成・解析を進める。さらに、翻訳後修飾TDP-43に対する特異的リガンドを取得することにより、TDP-43分解剤などの創薬研究を展開したいと考えている。

最後になりましたが、PIとして研究室を立ち上げて間もないタイミングで本研究助成をいただいたことは、オリジナルな研究をスタートするにあたって大変重要な支援となりました。ここに深く感謝申し上げます。

### 4. 参考文献

- [1] Moon S. P., Balana A. T., Pratt M. R., *Curr. Opin. Chem. Biol.*, **64**, 76 (2021).
- [2] (a) Li Q. Q., Liu Y. Q., Luo Y. Y., Chu T. T., Gao N., Chen P. G., Chen Y. X., Li Y. M., *Chem. Commun.*, **56**, 5370 (2020). (b) Zhou X., Sumrow L., Tashiro K., Sutherland L., Liu D., Qin T., Kato M., Liszczak G., McKnight S. L., *Science*, **377**, eabn5582 (2022).
- [3] Wang A., Conicella A. E., Schmidt H. B., Martin E. W., Rhoads S. N., Reeb A. N., Nourse A., Ramirez Montero D., Ryan V. H., Rohatgi R., Shewmaker F., Naik M. T., Mittag T., Ayala Y. M., Fawzi N. L., *EMBO J.*, **37**, e97452 (2018).
- [4] Kent S. B. H., *Chem. Soc. Rev.* **38**, 338 (2009).
- [5] Sasaki D., Tenda M., Sohma Y., *submitted*