

【目的】 RNA 結合タンパク質 TDP-43 は、筋萎縮性側索硬化症 (ALS) 患者の運動ニューロン細胞質への沈着、異常リン酸化等の特徴的病理所見を認めることが知られている。我々はこれまでの研究において TDP-43 のスプライスバリエーションの一つ (TDPsv-1) が翻訳され、ALS 患者の運動ニューロンにおいて局在パターンが変化することを見出した (未発表)。さらに、本スプライスバリエーションは正常型 TDP-43 (全長 TDP-43、TDP-FL) のスプライシング機能をドミナントネガティブに阻害することを発見したが、その詳細は不明であった。本研究では、この TDP-43 スプライスバリエーションに着目し、その神経毒性および正常型 TDP-43 の阻害機構を解明することを目的とした。

【方法】 TDPsv の細胞ストレスおよび細胞死への影響について検証する為、TDPsv-1 を培養細胞に発現させ、ストレス顆粒マーカーおよび細胞死マーカーの陽性率を免疫染色法により解析した。ストレス顆粒の解析には HeLaS3 細胞、細胞死マーカーの解析には iPS 細胞由来ニューロン (iNeurons) を用いた。また、TDPsv-1 が TDP-43 のスプライシング機能に必須の TDP-FL ホモダイマー形成を競合的に阻害する可能性を考え、両者を HEK293T 細胞に共発現させ免疫沈降法により複合体形成能を解析した。また、TDP-43 は標的のイントロン中のエクソンに似た配列 (偽エクソン) を抑制する機能を持ち、TDP-43 の機能低下により偽エクソンが誤って選択されることが知られている。本研究では TDP-43 機能の指標として 2 種類の標的の偽エクソンについて、その選択を RT-PCR により解析した。偽エクソンの検出は TDP-43 の機能低下を示し、我々の先行実験により TDPsv-1 を培養細胞に過剰発現させるとこの偽エクソンが検出されることを見出している。これについて TDPsv-1 と TDP-FL の複合体形成依存的に TDP-43 標的の偽エクソンが選択されるか検証した。

【結果】 HeLaS3 細胞に TDPsv-1 を過剰発現させたところ、著しいストレス顆粒の形成促進が認められた。さらに、iNeurons に TDPsv-1 を過剰発現させると CC3 陽性率の上昇を認めた。これらのことから、TDPsv-1 過剰状態は細胞ストレスとして認識され、神経細胞死を促進することが示唆された。また、TDPsv-1 と TDP-FL の共発現実験により、両者は複合体を形成することがわかった。さらに、TDPsv-1 は TDP-FL よりも複合体形成能が高く、TDPsv-1 は TDP-FL と競合的にヘテロダイマーを形成することが示唆された。TDPsv-1 の N 末端ドメインに変異を導入すると TDP-FL との複合体形成が抑制され、それと相関して TDP-43 標的の偽エクソンが検出されなくなることから、TDPsv-1 のドミナントネガティブ活性は、TDP-FL とのヘテロダイマー形成により競合的に TDP-FL ホモダイマー不足を引き起こすことによるものであることが示唆された。

TDP-43 スプライスバリエーションのドミナントネガティブ活性による RNA 代謝異常仮説

