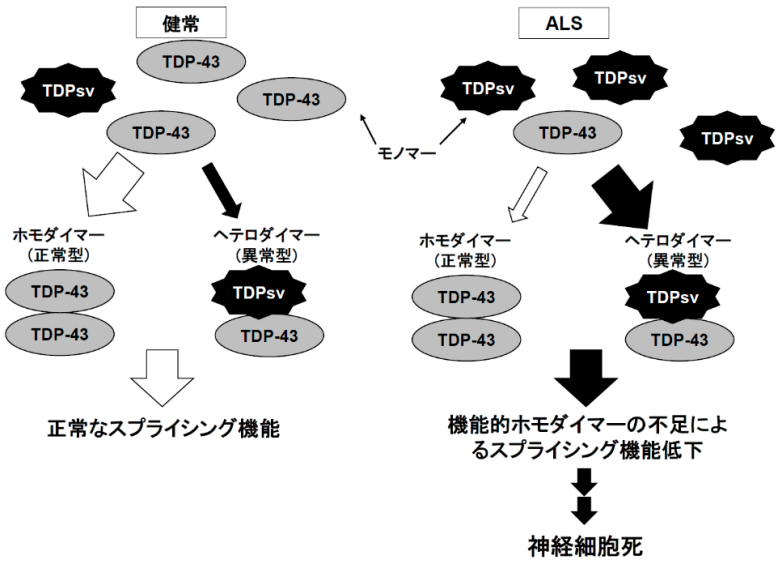
29　ALSにおけるRNA代謝異常メカニズムの解明	岡野　ジェイムス洋尚

【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 のスプライスバリアントの一つ（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、本スプライスバリアントは正常型 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 スプライスバリアントに着目し、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 スプライスバリアントのドミナントネガティブ活性による RNA 代謝異常仮説



29. ALS における RNA 代謝異常メカニズムの解明

岡野　ジェイムス洋尚

東京慈恵会医科大学 総合医科学研究センター 再生医学研究部

Key words : ALS，RNA 代謝，RNA 結合タンパク質，TDP-43，スプライシング

緒　言

筋萎縮性側索硬化症（ALS）は、運動ニューロン特異的な脱落により呼吸機能を含む運動機能を全廃に至らしめる最も悲惨な神経変性疾患の一つである。神経変性疾患患者の死後組織において、封入体の沈着がたびたび確認され、疾患の病態生理と密接に関連すると考えられてきた。ALS 患者の運動ニューロンにおいても同様にこの特徴的病理所見が観察されるが、9 割以上の ALS 患者において、封入体に TDP-43 が含まれていることが明らかとなった［1］。家族性および孤発性 ALS 症例の両方において *TDP-43* 遺伝子変異の報告があるものの、ALS 症例全体に占める割合はわずか数%である［2］。なぜ *TDP-43* 遺伝子変異を持たない大多数の ALS 患者の運動ニューロンにおいて TDP-43 の異常沈着に至るのか、分子メカニズムは未だ不明である。TDP-43 は標的 RNA のスプライシングを調節する RNA 結合タンパク質であるが、近年、ALS の 90%以上を占める孤発生 ALS 患者の脳内において TDP-43 スプライシング機能の低下が検出された［3］。よって、原因遺伝子変異の有無に関わらず運動ニューロンの脱落が起こるまでの過程において、共通して TDP-43 の機能異常が関与することが強く疑われる。

我々のこれまでの研究において、生理的に発現する TDP-43 スプライスバリアントの一つ（TDPsv-1）が、全長 TDP-43（正常型 TDP-43）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見出した（未発表）。TDPsv-1 は C 末端側の配列が欠落しており、代わりに全長 TDP-43 にはないアミノ酸配列を有している為、同特異的配列に対する抗体を作製し孤発性 ALS 患者の脊髄運動ニューロンにおける局在解析を行った。その結果、患者群において TDPsv-1 の有意な核内貯留を認めた（未発表）。しかし、TDPsv-1 の核内貯留による神経細胞死との関与や TDP-43 のスプライシング機能阻害メカニズムの詳細は不明である。

そこで本研究では、TDPsv-1 の神経毒性の有無および正常型 TDP-43 機能阻害の分子生物学的メカニズムの 2 点を明らかにすることを目的とした。

方法および結果

1. TDPsv-1 によるストレス顆粒形成への影響

ストレス顆粒（SGs）とは、細胞の防御反応として細胞内に可逆的に形成される RNA-タンパク質複合体である。SGs は酸化的ストレス、ヒートショックや浸透圧ストレス等の細胞ストレスにより形成が促進されるが、ALS などの神経変性疾患において SGs 恒常性の破綻が示唆されている［4］。そこで、本研究では TDPsv-1 が SGs の形成に影響するか検証した。N 末端側に FLAG タグが融合した TDPsv-1 の発現コンストラクトを作製し、HeLaS3 細胞に過剰発現させたところ、SGs マーカーG3BP1 陽性の細胞質内顆粒を認めた（図 1a）。この細胞質 SGs の陽性率を全長 TDP-43（TDP-FL）、TDPsv-1 とは別の TDP-43 スプライスバリアントである TDPsv-2 発現細胞と比較したところ、TDPsv-1 では有意な SGs 陽性率の上昇を認めた（図 1b）。さらに、SGs 陽性細胞において FLAG-TDPsv-1 が核内に顆粒状に局在するパターンの占める割合が多い傾向であった。このことから、TDPsv-1 の核局在は細胞にとってストレス状態とみなされ、SGs 形成を促進することが示唆された。

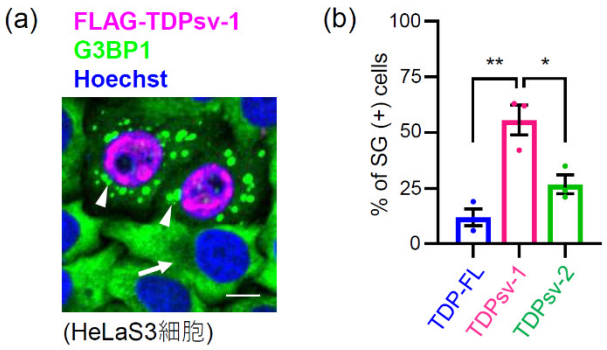


図 1. TDPsv-1 によるストレス顆粒形成の促進

a) FLAG-TDPsv-1（マゼンタ）を過剰発現させた HeLaS3 細胞における G3BP1 陽性 SGs（緑）。核は Hoechst（青）で示した。矢頭および矢印は、SGs 形成細胞および非形成細胞をそれぞれ示した。スケールバーは 10 μm。

b) FLAG 陽性細胞 100 個中の G3BP1 陽性 SGs の陽性率。ANOVA 解析の後、Tukey の多重比較検定を行った（N=3（各群につき 300 個の FLAG 陽性細胞）、平均値±SEM、*P＜0.05、**P＜0.01）。

2. iPS 細胞由来ニューロンにおける TDPsv-1 の神経毒性の検討

TDPsv-1 の神経毒性の有無を検証する為、健常ヒト iPS 細胞由来ニューロン（iNeurons）を作製し［5］、レンチウイルスを用いて TDPsv-1-Venus を過剰発現させた（TDPsv-1-iNeurons）。TDPsv-1-Venus の導入より 3 日後および 7 日後において、細胞死マーカーの一つである cleaved caspase-3（CC3）の陽性率を検証した。対照群として、蛍光タンパク質 Venus 単独および TDPsv-2-Venus を発現させた群と比較した。その結果、レンチウイルス感染後 3 日後および 7 日後の両方において、TDPsv-1 群では Venus および TDPsv-2 と比較して有意な CC3 陽性率の上昇を認めた（図 2a）。このことから、TDPsv-1 の過剰状態はニューロンの細胞死を引き起こすことが推察された。

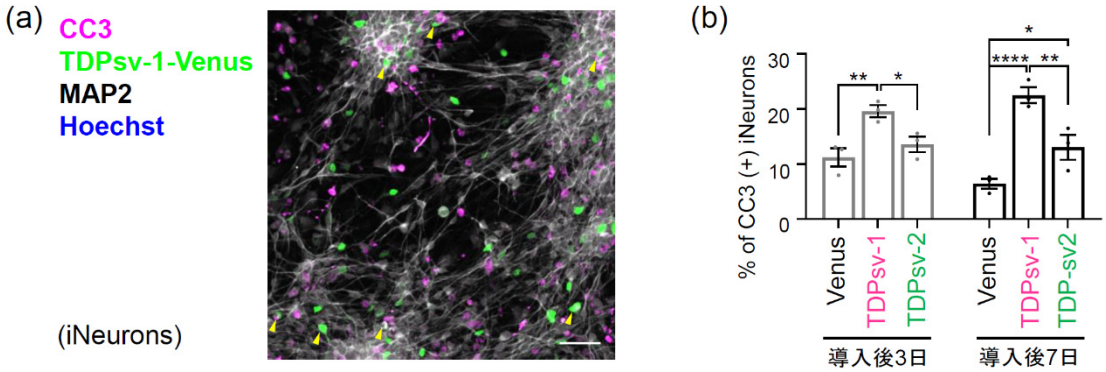


図 2. TDPsv-1 による神経毒性

a) TDPsv-1-Venus を過剰発現させた iNeurons（導入後 7 日）。TDPsv-1-Venus（緑）、CC3（マゼンタ）、神経細胞マーカーMAP2（白）。核は Hoechst（青）で示した。矢頭は CC3 陽性 TDPsv-1-iNeurons を示す。スケールバーは 50 μm。

b) TDPsv-1-iNeurons における CC3 の陽性率。ANOVA 解析の後、Sidak の多重比較検定を行った（N=3（各群につき 300 個の Venus 陽性細胞）、平均値±SEM、*P＜0.05、**P＜0.01、**** P＜0.0001）。

3. TDPsv-1 と TDP-FL とのヘテロダイマー形成と TDPsv-1 ドミナントネガティブ活性の関連

TDP-43 は N 末端ドメイン（NTD）を介してホモダイマーを形成することでそのスプライシング調節機能を発揮することが報告されている［6］。我々のこれまでの実験により TDPsv-1 を培養細胞に過剰発現させると TDP-43 のスプライシング機能が阻害されることから、機能的バリアントである TDP-FL のホモダイマーの形成が TDPsv-1 により阻害されることが推察された。そこで、TDP-FL-Venus と FLAG-TDPsv-1 の発現コンストラクトを HEK293T に導入し、免疫沈降法により両者のタンパク質複合体形成について検証した。その結果、TDP-FL と TDPsv-1 との複合体形成が認められた（図 3a）。さらに、TDPsv-1 は TDP-FL よりも TDP-FL との複合体形成能が高いことが示唆された。次に、TDPsv-1 の NTD に変異を導入したコンストラクト（NTDmt）を作製し同様の検討を行ったところ、両者の相互作用はほぼ消失した（図 3b）。ここで TDP-43 は、GPSM2 や ATG4B など標的のイントロン中のエクソンに似た配列（偽エクソン）の誤った選択を抑制する働きを持つことが知られている［3］。我々は TDPsv-1 による TDP-43 のスプライシング機能阻害が起こると、これらの標的の偽エクソンの選択が促進されることを見出しているが（未発表）、TDP-FL と TDPsv-1 のタンパク質相互作用を阻害するとこれと相関してこの偽エクソンはほぼ消失した（図 3c）。このことから、TDPsv-1 によるドミナントネガティブ活性は、TDP-FL との競合的なヘテロダイマー形成により TDP-FL ホモダイマー不足が起こることで引き起こされることが示唆された。

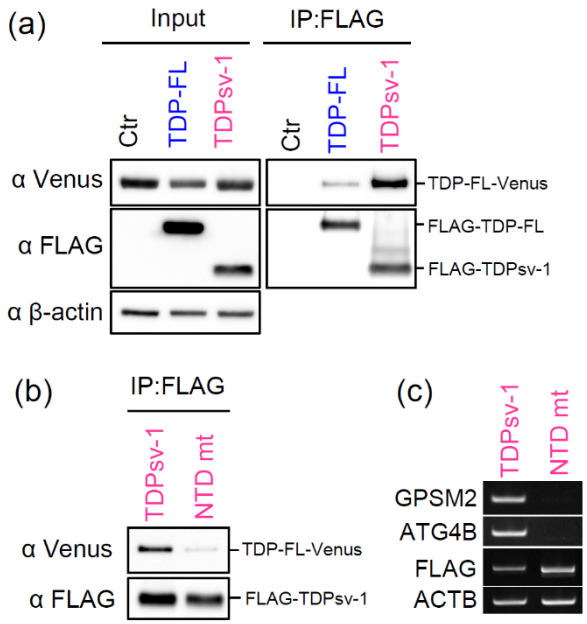


図 3. TDPsv-1 のドミナントネガティブ活性と TDP-FL との複合体形成能との相関

a）TDPsv-1 と TDP-FL のタンパク質相互作用。FLAG-TDPsv-1 と TDP-FL-Venus を HEK293T に共発現させ、抗 FLAG 抗体で免疫沈降後、抗 Venus 抗体でウエスタンブロットを行った。

b）TDPsv-1 NTD mt と TDP-FL のタンパク質相互作用。b）と同様の手法にて評価した。

c）GPSM2 および ATG4B の偽エクソン。FLAG-TDPsv-1 または-TDPsv-1 NTD mt を HEK293T に過剰発現させ、RT-PCR により GPSM2 と ATG4B の偽エクソンを検出した。

考　察

本研究により、生理的に発現する TDP-43 スプライスバリアントの一つが翻訳されると細胞ストレスとして認識され、神経細胞死を引き起こすことが示唆された。また、この神経細胞死が起こるまでの過程には、TDPsv-1 翻訳産物が正常型 TDP-43 のホモダイマー形成を競合的に阻害することによるスプライシング機能阻害が関与する可能性を示した。

近年、ヒト運動ニューロンにおける RNA-seq 解析により、ヒト運動ニューロンでは全 TDP-43 スプライスバリアントのうち機能的バリアントである TDP-FL はわずか 1 割程度であり、TDPsv-1 や 2 を含む短縮型のスプライスバリアントがそのほとんどを占めることが報告されている［7］。また、マウス大脳皮質における RNA-seq 解析では加齢により TDP-FL の減少と短縮型スプライスバリアントの増加が示されており、加齢により機能的バリアントが徐々に減少することが推察される［7］。TDP-43 は自己のスプライシングや発現量を自己調節することが知られているが、加齢により TDP-43 の機能が徐々に低下した場合、この自己調節機構が破綻することが考えられる［8］。ALS の病態として、一度運動障害を発症すると個体差はあるものの数年以内に急激な運動機能の悪化が認められることから、神経細胞環境が何らかのきっかけにより悪循環に陥ることが示唆されている。本研究で示した TDPsv-1 のようなドミナントネガティブ活性を持つスプライスバリアントの存在は、正常時は TDP-43 の機能を適正範囲に保つ生理的役割を担う可能性も考えられるものの、加齢等による TDP-43 の機能低下時にはさらなる TDP-43 の機能低下を招き、自己調節機構の破綻に関与することが考えられる。

上述の通り TDP-43 の機能低下により多くの標的の偽エクソンの選択が促進されることが知られているが、最新の研究において、運動ニューロンに多く発現する UNC13A の偽エクソンが TDP-43 の機能低下により選択され、神経細胞死を引き起こすことが証明された［3，9］。このことから、TDP-43 による偽エクソンの抑制機能は神経細胞の恒常性維持に必須であることが推察される。

本研究成果において、TDPsv-1 の正常型 TDP-43 機能および神経細胞死への影響を明らかにした。今後は TDP-43 自己調節機構に影響する上流因子の解析や TDP-43 と相互調節を行う RNA 結合タンパク質の解析等、複合的な RNA 代謝調節機構の解明が期待される。

共同研究者・謝辞

本研究の共同研究者は、東京慈恵会医科大学総合医科学研究センター再生医学研究部の長谷川実奈美助教、東京慈恵会医科大学脳神経内科の松野博優助教、恩田亜沙子助教である。また、本研究にご支援賜りました上原記念生命科学財団に感謝申し上げます。

文　献

1） Ling SC, Polymenidou M, Cleveland DW. Converging mechanisms in ALS and FTD: disrupted RNA and protein homeostasis. Neuron. 2013 Aug 7;79(3):416-38. PMID: 23931993 DOI: 10.1016/j.neuron.2013.07.033

2） Renton AE, Chiò A, Traynor BJ. State of play in amyotrophic lateral sclerosis genetics. Nat Neurosci. 2014 Jan;17(1):17-23. Epub 2013 Dec 26. PMID: 24369373 DOI: 10.1038/nn.3584

3） Ling JP, Pletnikova O, Troncoso JC, Wong PC. TDP-43 repression of nonconserved cryptic exons is compromised in ALS-FTD Science. 2015 Aug 7;349(6248):650-5. PMID: 26250685 DOI: 10.1126/science.aab0983

4） Patel A, Lee HO, Jawerth L, Maharana S, Jahnel M, Hein MY, Stoynov S, Mahamid J, Saha S, Franzmann TM, Pozniakovski A, Poser I, Maghelli N, Royer LA, Weigert M, Myers EW, Grill S, Drechsel D, Hyman AA, Alberti S. A Liquid-to-Solid Phase Transition of the ALS Protein FUS Accelerated by Disease Mutation. Cell. 2015 Aug 27;162(5):1066-77. PMID: 26317470 DOI: 10.1016/j.cell.2015.07.047

5) Ichiyanagi N, Fujimori K, Yano M, Ishihara-Fujisaki C, Sone T, Akiyama T, Okada Y, Akamatsu W, Matsumoto T, Ishikawa M, Nishimoto Y, Ishihara Y, Sakuma T, Yamamoto T, Tsuiji H, Suzuki N, Warita H, Aoki M, Okano H. Establishment of In Vitro FUS-Associated Familial Amyotrophic Lateral Sclerosis Model Using Human Induced Pluripotent Stem Cells. Stem Cell Reports. 2016 Apr 12;6(4):496-510. Epub 2016 Mar 17. PMID: 26997647 DOI: 10.1016/j.stemcr.2016.02.011

6) Mompeán M, Romano V, Pantoja-Uceda D, Stuani C, Baralle FE, Buratti E, Laurents DV. Point mutations in the N-terminal domain of transactive response DNA-binding protein 43 kDa (TDP-43) compromise its stability, dimerization, and functions. J Biol Chem. 2017 Jul 14;292(28):11992-12006. Epub 2017 May 31. PMID: 28566288 DOI: 10.1074/jbc.M117.775965

7) Weskamp K, Tank EM, Miguez R, McBride JP, Gómez NB, White M, Lin Z, Gonzalez CM, Serio A, Sreedharan J, Barmada SJ. Shortened TDP43 isoforms upregulated by neuronal hyperactivity drive TDP43 pathology in ALS. J Clin Invest. 2020 Mar 2;130(3):1139-1155. PMID: 31714900 DOI: 10.1172/JCI130988

8) Tziortzouda P, Van Den Bosch L, Hirth F. Triad of TDP43 control in neurodegeneration: autoregulation, localization and aggregation. Nat Rev Neurosci. 2021 Apr;22(4):197-208. PMID: 33654312 DOI: 10.1038/s41583-021-00431-1

9) Ma XR, Prudencio M, Koike Y, Vatsavayai SC, Kim G, Harbinski F, Briner A, Rodriguez CM, Guo C, Akiyama T, Schmidt HB, Cummings BB, Wyatt DW, Kurylo K, Miller G, Mekhoubad S, Sallee N, Mekonnen G, Ganser L, Rubien JD, Jansen-West K, Cook CN, Pickles S, Oskarsson B, Graff-Radford NR, Boeve BF, Knopman DS, Petersen RC, Dickson DW, Shorter J, Myong S, Green EM, Seeley WW, Petrucelli L, Gitler AD. TDP-43 represses cryptic exon inclusion in the FTD-ALS gene UNC13A. Nature. 2022 Mar;603(7899):124-130. Epub 2022 Feb 23. PMID: 35197626 DOI: 10.1038/s41586-022-04424-7