

TARDBP DNA メチル化状態による TDP-43 の自己調節機構関連スプライシングの変化

小 池 佑 佳

新潟大学医歯学総合研究科

分子細胞医学専攻 神経内科学分野

(主任：小野寺理教授)

Alteration of TDP-43 Autoregulation-relevant Splicing by DNA Methylation Status of *TARDBP* DNA

Yuka KOIKE

*Department of Neurology, Course for Molecular and Cellular Medicine,
Niigata University Graduate School of Medical and Dental Science*

(Director: Prof. Osamu ONODERA)

要 旨

筋萎縮性側索硬化症 (ALS) は運動神経細胞が障害される神経変性疾患であり、病理学的には核蛋白である TAR DNA-binding protein of 43kDa (TDP-43) が細胞質に蓄積する。TDP-43 をコードする *TARDBP* の発現量の異常は、神経細胞死をもたらす、ALS における TDP-43 病理に関与する。しかし、孤発性 ALS において *TARDBP* の発現を乱す初期因子は明らかではない。生理的な条件下では、TDP-43 は、*TARDBP* pre-mRNA の 3' 側非翻訳領域 (3' UTR) 内のイントロン 7 に結合し、選択的スプライシングを介して、自身の発現量を厳密に調節している。ALS 病態には、この *TARDBP* pre-mRNA 3' UTR の選択的スプライシングに関与する因子が関わると思われるが、孤発性 ALS において、その因子は不明である。遺伝子発現に大きく寄与する因子である DNA のメチル化は、選択的スプライシングにも影響を及ぼす。本研究では、*TARDBP* 3' UTR の DNA メチル化状態が *TARDBP* 発現量に寄与する可能性を検証するため、dCas9 を利用したゲノム編集の手法を用い、HEK293T 細胞における *TARDBP* 3' UTR のメチル化シトシン (CpG) 部位を選択的に脱メチル化させた。その結果、*TARDBP* mRNA の選択的スプライシング効率が減弱し、発現量は約 2 倍に増加した。さらに、*TARDBP* 3' UTR に着目したバイサルファイトアンプリコンシークエンシング解析は、運動野皮質において *TARDBP* イントロン 7 内の CpG 部位の DNA メチル化率が、選択的スプライシング効率と正相関することを示した。*TARDBP* イントロン 7 に存在する 6 か所の CpG 部位の DNA メチル化状態は、脳領域 (運動野皮質、後頭葉皮質および小脳半球) に依存して異なっていた。加えて、運動野皮質では、この 6 か所の CpG 部位の DNA メチル化率と年齢は逆相関を

Reprint requests to: Yuka KOIKE
Department of Neurology,
Course for Molecular and Cellular Medicine,
Niigata University Graduate School of Medical
and Dental Science,
1-757 Asahimachi-dori, Chuo-ku,
Niigata 951-8585, Japan.

別刷請求先：〒 951-8585 新潟市中央区旭町通 1-757
新潟大学医歯学総合研究科
分子細胞医学専攻 神経内科学分野

小 池 佑 佳

示した。選択的スプライシングに寄与する、*TARDBP* イントロン7のDNAメチル化状態は、細胞の状況や外的要因の影響を受けやすい。特に、ALSの罹患領域である運動野皮質において、*TARDBP* イントロン7のDNAメチル化状態の特性を見出したことは、孤発性ALS病態への寄与を考える上で、興味深い。今後、孤発性ALS患者脳において、*TARDBP*のDNAメチル化状態が変容しているか、明らかにしていく必要がある。

キーワード：筋萎縮性側索硬化症、*TARDBP* 遺伝子、DNAメチル化、自己調節機構、選択的スプライシング

緒 言

筋萎縮性側索硬化症 (amyotrophic lateral sclerosis: ALS) は、運動神経細胞が障害される進行性の神経変性疾患であり、約半数の症例では前頭側頭型認知症に関連する認知行動障害を合併する¹⁾。ALS症例の大部分を占める孤発例 (sporadic ALS: SALS) は中年以降に発症する。ALS患者の神経細胞およびグリア細胞では、核蛋白であるTAR DNA binding protein-43 (TDP-43) が、核から消失し細胞質に蓄積する²⁾³⁾。ALS患者におけるTDP-43病理の脳分布は、神経変性部位と一致し、TDP-43の細胞内伝播を示唆する⁴⁾⁵⁾。また、TDP-43をコードする*TARDBP* 遺伝子の変異は、SALSと同様の病理を有する家族性ALSを引き起こす⁶⁾⁷⁾。これらは、TDP-43がALS病態に直接的に関与していることを示している。実際、ALS患者の運動神経細胞やTDP-43変異をもつモデルマウスでは*TARDBP* mRNAの増加が示されており⁸⁾⁹⁾、TDP-43量の増加は、TDP-43病理と細胞死をもたらす。つまり、*TARDBP* mRNAの増加によるTDP-43の発現亢進がALS病態の背景にあると考えられる¹⁰⁾。しかし、SALSにおいて、*TARDBP* mRNAの発現増加をもたらす機序は不明である。

生理的条件下では、*TARDBP* mRNAの量は、*TARDBP* pre-mRNAの3'側非翻訳領域(3'UTR)を含む潜在的イントロンのスプライシングにより自己制御される。この自己制御機構は、3'UTRを含む最終エクソン内のpoly A結合部位の選択(pA1, pA2, pA4)と潜在的イントロン6と7のスプライシングによって調節される⁸⁾。TDP-43は、*TARDBP* 3'UTR内の潜在的イントロン

7に結合し、同領域のスプライシングを惹起し、新たな未成熟終止コドンを持つナンセンス依存性mRNA分解機構感受性のmRNAを誘導し、*TARDBP* mRNAを減少させ、結果としてTDP-43を低下させる。この機序によって、自身の発現量を厳密に調節している⁸⁾¹¹⁾¹²⁾。

したがって、*TARDBP* pre-mRNA 3'UTRの選択的スプライシングに関与する因子は、TDP-43の自己調節機構を崩し、TDP-43を増加させALSの病態に関わる可能性がある。実際、同部位に変異を持つモデルマウスでは、選択的スプライシング効率の変化を伴い、*TARDBP*の発現量が乱れ、神経変性を生じる⁹⁾¹³⁾。つまり、*TARDBP* pre-mRNA 3'UTRの選択的スプライシング異常がSALS病態の背景にある可能性を示している。しかしSALSにおいて、この選択的スプライシングを乱す因子は、明らかになっていない。

この選択的スプライシングに影響を与える因子として、私はDNAのメチル化に着目した。DNAのメチル化は、同一個体の脳内でも、領域毎に異なり¹⁴⁾¹⁵⁾、かつ環境因子や老化の影響も受ける¹⁶⁾。これらの事実は、神経変性疾患における、病変の系統性や、加齢という最大の危険因子を説明する。よってDNAのメチル化は、孤発性神経変性疾患の原因となる可能性がある。SALS患者のDNAメチル化状態に関しても、ゲノムワイドな解析を行った研究があるが、*TARDBP* 遺伝子に注目してメチル化状態の変化を検討した報告はない^{17)–20)}。さらに、これらは、主として、プロモーター領域のDNAメチル化による遺伝子発現調節に焦点を当て検討されてきた^{17)–20)}。しかし、近年、複数の遺伝子において、プロモーター領域以外のDNAのメチル化が選択的スプライシ

グにも影響を及ぼすことが報告されている^{21)–23)}。このことから、私は TARDBP 3'UTR の DNA メチル化状態が、同部位の選択的スプライシング機構を介し、TARDBP の発現量を規定すると推測した。本研究では、この仮説を、ヒト培養細胞及びヒト剖検脳組織で検証することを目的とした。

材料と方法

標的塩基配列に対する DNA メチル化状態の操作

標的とする DNA 領域の脱メチル化のために、DNA 脱メチル化酵素 ten-eleven translocation (TET) 1 を有する pPlatTET-gRNA2 (Addgene #82559; Addgene) を用いた。このベクターは、green fluorescent protein (GFP) を発現する。TARDBP 3'UTR を標的とした guide RNA の配列は、GTGATGCGTGATGACGAAT である。この TARDBP 3'UTR を標的とした脱メチル化ベクター (TET1-TDP43 標的ベクター) の作成にあたり、pPlatTET-gRNA2 を制限酵素 AflIII 部位で切断し、Gibson-assembly master mix (New England Biolabs) を用いて、切断部位に、guide RNA を挿入した。コントロールベクターとして、pHRdSV40-scFv-GCN4-sfGFP-VP64-GB1-NLS (Addgene) を使用した。

遺伝子導入に関しては、下記の手順で行った。まず、10%FBS を含む Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) (Gibco) で培養した HEK293T 細胞を 6 ウェルプレートに播種した。その 12 時間後に、1 ウェルあたり、ベクター 0.265 pmol、

Lipofectamine 3000 (Invitrogen) 7.5 μ l を Opti-MEM (Gibco) に溶解して計 250 μ l の溶液を調整し、細胞に導入した。遺伝子導入から 48 時間後に、FACS Aria II (BD Biosciences) を用いて GFP 陽性細胞のみを回収した。

ヒト剖検脳組織の解析対象

ヒト剖検脳組織の分析には、中枢神経疾患を有さない患者由来の凍結組織を用いた (表 1)。死亡から剖検までの所要時間が 10 時間以上の症例は除外した。TARDBP 遺伝子の DNA メチル化状態分析のために、8 症例由来の運動野皮質、後頭葉皮質および小脳半球を使用した。また、TARDBP 3'UTR の DNA メチル化状態と選択的スプライシングの関連を調べるために、9 症例由来の運動野皮質を用いた。組織から抽出した RNA に関して、RNA Integrity Number を測定し、4.0 未満の試料は分析から除外した。

TARDBP 遺伝子の DNA メチル化状態解析

FACS Aria II を用いたソーティングにより、1 試料あたり 2.5×10^5 個の HEK293T 細胞を回収し、Nucleo Spin Tissue XS (MACHERY-NAGEL) を用いてゲノム DNA を精製した。また、1 試料あたり 25 mg のヒト剖検脳組織から、DNeasy Blood & Tissue kit (QIAGEN) を用いてゲノム DNA を精製した。次に、HEK293T 及びヒト剖検脳組織から精製したゲノム DNA に関して、EpiTect Fast DNA Bisulfite キット (QIAGEN) を用いて、プロトコールに従い、バイサルファイト処理を行った。バイサルファイト処理後のゲノム DNA

表 1 本研究における解析症例の臨床情報

症例	年齢	性別	剖検時死後経過時間 (h:m)	疾患	DNAメチル化解析			スプライシング解析
					運動野皮質	後頭葉皮質	小脳	運動野皮質 (RIN)
1	66	男	3:30	ペラグラ	+	+	+	-
2	76	男	3:30	胃出血	+	+	+	7.2
3	64	男	2:00	腎不全	+	+	+	8.4
4	64	女	2:00	多発筋炎	+	+	+	9.1
5	51	男	4:00	ミオパチー	+	+	+	7.3
6	82	女	4:30	重症筋無力症	+	+	+	7.7
7	49	女	2:00	POEMS症候群	+	+	+	9
8	62	男	9:00	間欠性ポルフィリア症	+	+	+	3.5
9	71	男	1:40	無症候性ラクナ梗塞	+	-	-	9.3
10	54	男	-	心不全	+	-	-	8
11	68	男	3:00	肺癌	+	-	-	7.7

に対しては, nested PCR 法により, メチル化解析の対象領域を増幅した. Nested PCR では, KAPA HiFi HS Uracil + ReadyMix (Kapa Biosystems) を用い, 対象領域を二つに分けて (図 1 A), 表 2 の各プライマーにより増幅した. 1stPCR, 2nd PCR の条件は, 1) 95 °C, 3 分, 2) 98 °C, 20 秒, 3) 60 °C, 15 秒, 4) 72 °C, 15 秒, 2)-4) 30 サイクル, 5) 72 °C, 1 分で行った. 1stPCR の PCR 産物を Nuclease-free water で 1/100 に希釈した後, 2nd PCR の鋳型として使用した. この nested PCR 産物を, Agencourt AMPure XP (BECKMAN COULTER Life

sciences) を用いて精製した. 各試料を区別するために, TruSeq HT インデックス 1 (D 7XX) および TruSeq HT インデックス 2 (D 5XX) (Illumina) を有するプライマーを組み合わせた PCR を行うことで, インデックス配列を付加した. 試薬は, KAPA HiFi HS ReadyMix (Kapa Biosystems) を用いた. PCR の条件は, 1) 95 °C, 3 分, 2) 95 °C, 30 秒, 3) 55 °C, 30 秒, 4) 72 °C, 30 秒, 2)-4) 8 サイクル, 5) 72 °C, 1 分で行った. インデックス配列付加後の PCR 産物は, 再度 Agencourt AMPure XP を用いて精製した. パイサルファイトシーケンシングは, Miseq (illumine) を用い, 片

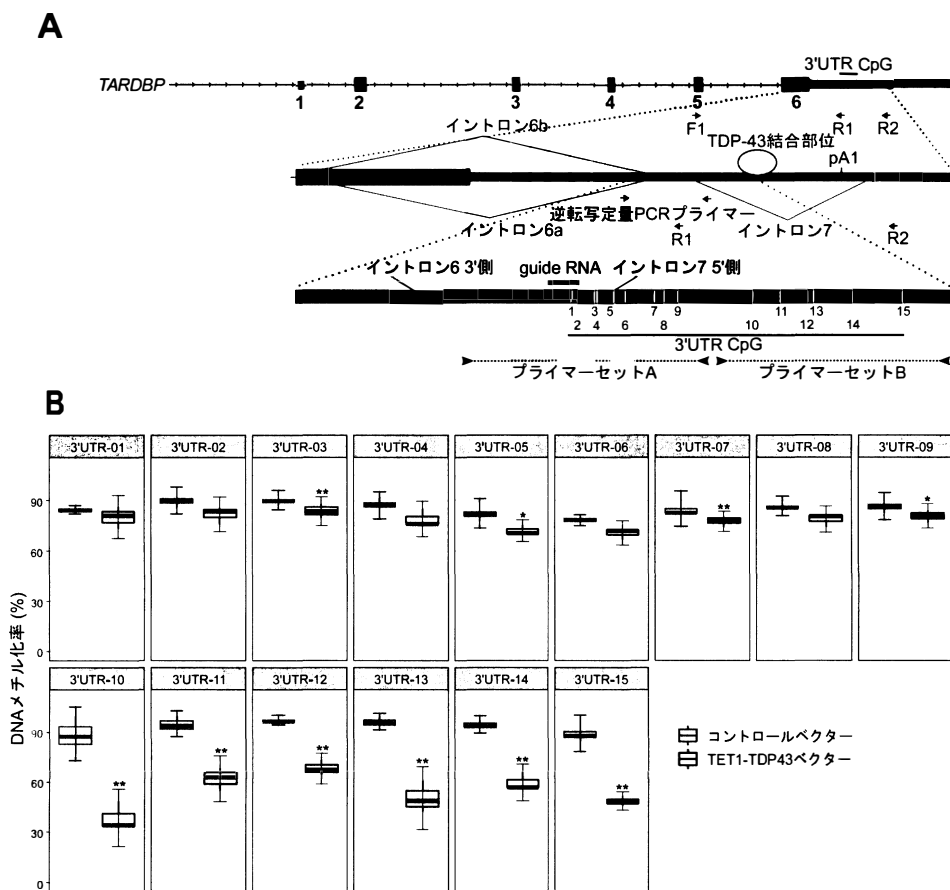


図 1 (A) *TARDBP* 遺伝子における選択的スプライシングおよび CpG 部位の模式図. 矢頭はパイサルファイト処理済 DNA を対象としたプライマーセットを, 矢印は逆転写定量 PCR およびアガロースゲル電気泳動による逆転写 PCR 分析用のプライマーを示す. (B) HEK293T 細胞における *TARDBP* 3'UTR 中の各 CpG 部位の DNA メチル化率 (平均値 ± 標準偏差, Student's t-test により検定). * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$.

表 2 本研究で用いたプライマーの配列

バイサルファイト処理後DNA用のプライマー

プライマー名	塩基配列 (5' to 3')
TARDBP 3'-UTR プライマーセットA 1st F	GTATTTTATTGAAAGTAGTGTGTAAA
TARDBP 3'-UTR プライマーセットA 1st R	CACCATACAACATTTCACAACAATTA
TARDBP 3'-UTR プライマーセットA 2nd F	ACACTCTTTCCCTACACGACGCTCTCCGATCTGGTATAGGAATATTGTTTATATGTTTTTT
TARDBP 3'-UTR プライマーセットA 2nd R	GTGACTGGAGTTCAGACGTGTGCTCTTCCGATCTGGCTTCTAATTCATATCACAACTTA
TARDBP 3'-UTR プライマーセットB 1st F	GTTGTGATATGGAATTAGAAGGTT
TARDBP 3'-UTR プライマーセットB 1st R	CACCATACAACATTTCACAACAATTA
TARDBP 3'-UTR プライマーセットB 2nd F	ACACTCTTTCCCTACACGACGCTCTCCGATCTGGGTGTGGGATTGATGGTGGT
TARDBP 3'-UTR プライマーセットB 2nd R	GTGACTGGAGTTCAGACGTGTGCTCTTCCGATCTGGATTTCACCTAACACATTCATCTAAT

逆転写PCR及びdroplet digital PCR用プライマー

プライマー名	塩基配列 (5' to 3')
TARDBP F1 (逆転写PCR)	GCGCTGTACAGAGGACATGA
TARDBP R1 (逆転写PCR)	GCCTGTGATGCGTGATGA
TARDBP R2 (逆転写PCR)	AGTTCCATCTCAAAAGGGTC
TARDBP qPCR F (逆転写定量PCR)	TGTACAGTGTGTTGGTCTTTTTG
TARDBP qPCR R (逆転写定量PCR)	AGCGGATAAAAATGGGACAC
TARDBP unspliced F (droplet digital PCR)	TTTGCTGCAGTCTGTGTCC
TARDBP unspliced R (droplet digital PCR)	AAAAAGGGGAATTAAGTGTATGAA
TARDBP spliced F (droplet digital PCR)	AAAGAAGTGGAGATTGTTGTTTC
TARDBP spliced R (droplet digital PCR)	TCITTGCAATTCAGGGCGTC
RPLP1 F and R	Purchased (Takara bio) primer set ID: HA067802
RPLP2 F and R	Purchased (Takara bio) primer set ID: HA067804

側 251 bp の paired-end read により行った。その際の試薬として、Miseq Reagent Nano kit v2 500 サイクル (illumine) を使用した。得られた塩基配列データは、メチル化分析ツール Bismark (Babraham Bioinformatics, Babraham, Cambridgeshire, UK) を用いて、標的ゲノム上にマッピングした。

また、ヒト剖検脳組織における DNA メチル化状態の分析にあたり、各 CpG 部位のメチル基修飾の有無の組み合わせを塩基配列に見立て、GATK's pileup コマンドを使用し、標的とする CpG 部位の塩基配列データを集積した。この塩基配列パターンを DNA メチル化パターンと定義し、個々の DNA メチル化パターン数を数えた。各メチル化パターン数は、比較毎に、全メチル化パターンの合計数によって補正した。各メチル化パターン数で計算された Z スコアを R ソフトの gplots パッケージ内の「heatmap.2」関数でクラスタリングし、視覚化した。

TARDBP pre-mRNA のスプライシング解析

FACS Aria II を用いたソーティングにより、1 試料あたり 2.5×10^5 個の HEK293T 細胞を回収し、Nucleo Spin RNA XS (MACHEREY-NAGEL) を用いて total RNA を抽出した。抽出した RNA から、

Prime Script Reverse Transcriptase (TAKARA Bio) を用い、ランダムプライマーにて逆転写反応を行い、cDNA を合成した。TARDBP pre-mRNA のスプライシング評価のため、cDNA を鋳型として、試薬には LA Taq (TAKARA Bio) を用い、表 2 のプライマーにより PCR を行った。PCR の条件は、1) 94 °C, 2 分, 2) 94 °C, 30 秒, 3) 55 °C, 30 秒, 4) 72 °C, 1 分 30 秒 (プライマー対: F1-R1) もしくは 2 分 30 秒 (プライマー対: F1-R2), 2) -4) 35 サイクル, 5) 72 °C, 5 分とした。PCR 増幅産物は、2% アガロースゲルを用いた電気泳動により分離した。逆転写定量 PCR には Thermal Cycler Dice Real Time System Single (TP850, TAKARA Bio) を、試薬は Green Premix ExTaq II (TAKARA Bio) を使用した。PCR 条件は、1) 95 °C, 30 秒, 2) 95 °C, 15 秒, 3) 60 °C, 30 秒, 2) -3) 40 サイクルで行った。RPLP1 と RPLP2 を内在性コントロール遺伝子とした。逆転写定量 PCR の定量には、 $\Delta\Delta$ CT 法を用いた。

また、1 試料あたり 100-200 mg のヒト剖検脳組織から、mirVana miRNA isolation kit (Applied Biosystems) により total RNA を抽出した。RNA 品質確認のため、Tape station 2200 (Agilent Technologies) により、RNA Integrity Number を測定した。この RNA から、SuperScript VILO

MasterMix (Invitrogen) を用い、ランダムプライマーにて、逆転写反応を行い、cDNA を合成した。ヒト剖検組織における、*TARDBP* pre-mRNA のスプライシングの定量的評価には、QX 200 ddPCR Eva Green Super mix (Bio Rad) による QX 200 Droplet Digital PCR System (Bio Rad) を用いた。Droplet Digital PCR に用いたプライマーを表2に示す。PCR 条件は、1) 95 °C 5 分、2) 95 °C 30 秒、3) 50 °C (プライマー対: spliced primer F-R) もしくは 55 °C (プライマー対: unspliced primer F-R) 1 分、2) -3) 40 サイクル、4) 4 °C 5 分、5) 90 °C 5 分とした。

結 果

TARDBP 3'UTR を標的とした DNA メチル化状態の操作

ヒト脳組織では、*TARDBP* 遺伝子 3'UTR のイントロン7の5'側周辺に15か所の CpG 部位が集中している(図1A)^{24) 25)}。そこで、まず、HEK293T 細胞において、*TARDBP* 3'UTR の15か所の CpG 部位の DNA メチル化率を検討した。同部位の平均 DNA メチル化率は $93.9 \pm 1.5\%$ であり、高度にメチル化されていた(図1B)。次に、dCas9 を利用したゲノム編集の手法を用いて²⁶⁾、この15か所の CpG 部位を標的的特異的に脱メチル化させた。同部位の脱メチル化を特異的に誘導する TET1-TDP43 標的ベクターを作製し、HEK293T 細胞に導入した上で、DNA メチル化率を検討した。15か所の CpG 部位の平均 DNA メチル化率は $71.4 \pm 2.4\%$ であり、有意な脱メチル化をみとめた。特にイントロン7内に存在する連続する6か所の CpG 部位 (No.10-15) (図1A) の平均 DNA メチル化率は、 $54.6 \pm 2.9\%$ であり、顕著な脱メチル化が誘導された(図1B)。

選択的脱メチル化細胞における *TARDBP* スプライシングの解析

次に、この選択的脱メチル化細胞において、*TARDBP* mRNA の発現量、および選択的スプライシング効率を調べた。逆転写 PCR 産物のアガ

ロースゲル電気泳動による分析からは、TET1-TDP43 標的ベクターを導入した細胞では、コントロールベクターを導入した細胞に比して、*TARDBP* pre-mRNA の3'-UTR のイントロン6およびイントロン7の選択的スプライシング効率が低下していた(図2A, B)。さらに *TARDBP* mRNA の発現量も 1.86 ± 0.21 倍 ($p=0.02$) に増加した(図2C)。

ヒト剖検脳組織における *TARDBP* 遺伝子のメチル化状態の解析

ヒト凍結剖検脳組織(運動野皮質、後頭葉皮質および小脳半球)を用いて、*TARDBP* 3'UTR の15か所の CpG 部位の DNA メチル化状態を調べた。平均 DNA メチル化率は、運動野皮質 $81.3 \pm 4.0\%$ 、後頭葉皮質 $85.5 \pm 3.4\%$ 、小脳半球 $90.2 \pm 1.3\%$ であった。各 CpG 部位に着目すると、No.2-6, 8, 10-15 では、運動野皮質で、小脳半球より有意に DNA メチル化率が低かった。特に、イントロン7内に存在する No.10-15 の6か所の CpG 部位では、平均 DNA メチル化率は、運動野皮質 $68.1 \pm 11.7\%$ 、後頭葉皮質 $72.8 \pm 8.4\%$ 、小脳半球 $84.0 \pm 3.4\%$ であり、他の脳領域と比較したときに、運動野皮質における DNA メチル化率の症例間の差も顕著であった(図3)。

運動野皮質における症例間の違いが、年齢の影響を受けている可能性を考え、年齢と DNA メチル化率の関連を検討した。運動野皮質において、イントロン7内の6か所の CpG 部位 (No.10-15) の DNA メチル化率は、いずれも、年齢と有意な逆相関を認めた(図4)。イントロン7の5'側スプライス部位周辺に存在する No.1-9 のメチル化率は、年齢との有意な相関はみとめず、No.1-9 の平均 DNA メチル化率は、 $90.1 \pm 2.9\%$ と年齢にかかわらず一定であった。一方、後頭葉皮質および小脳では、いずれの部位も年齢と有意な相関をみとめなかった。

脳領域の違いによる *TARDBP* 3'UTR のメチル化パターンの解析

DNA 毎に各々の部位のメチル化のパターンは

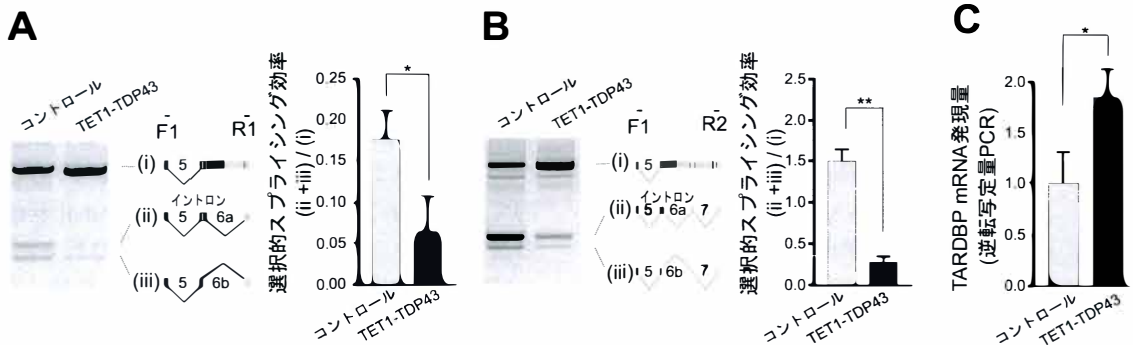


図2 (A) (B) *TARDBP* mRNA のアガロースゲル電気泳動による逆転写 PCR 分析 (平均値 \pm 標準偏差, $n = 3$, Student's *t*-test により検定). (C) *TARDBP* mRNA の逆転写定量 PCR 分析 (平均値 \pm 標準偏差, $n = 3$, Student's *t*-test により検定). * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$.

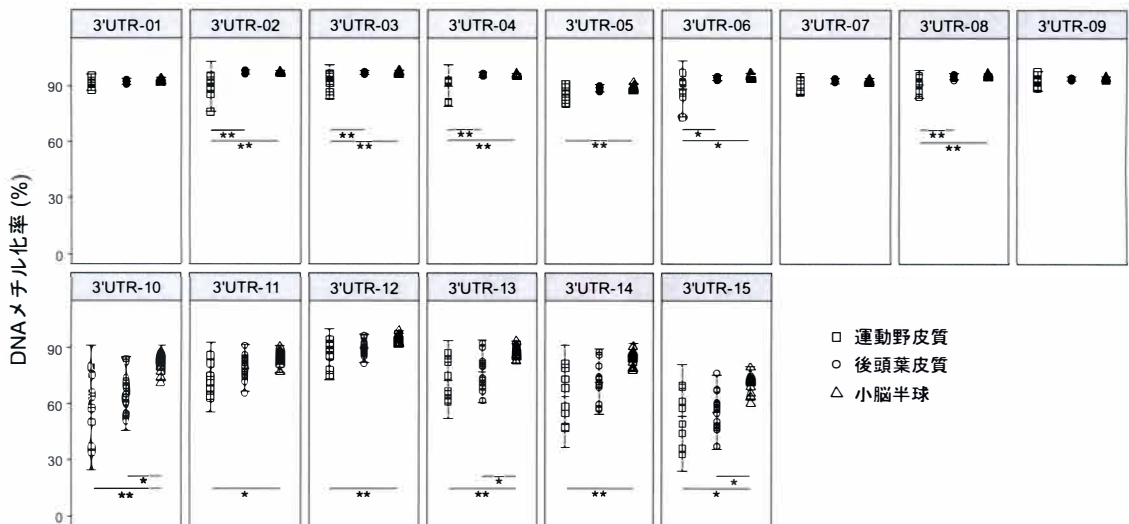


図3 *TARDBP* 3'UTR の各 CpG 部位の DNA メチル化率に関して、運動野皮質、後頭葉皮質および小脳半球の3群間比較 (平均値 \pm 標準偏差, one factor repeated measures ANOVA with Bonferroni's multiple comparison tests により検定). * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$.

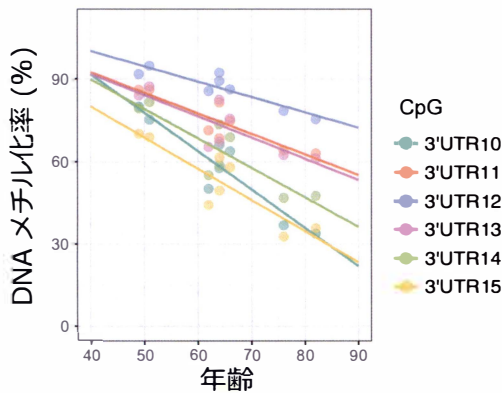


図4 運動野皮質における、死亡時年齢と *TARDBP* 3'UTR の6か所の CpG 部位 (No.10-15) の DNA メチル化率の相関. Pearson's correlation test にて検定. 全て $p < 0.05$.

異なる。私は、このパターンに領域特異性があるのではないかと仮定し、脳領域間のDNAメチル化率の違いが顕著であるNo.10-15のCpG部位について、この部位のDNAメチル化パターンを因子として、各症例の脳領域毎のクラスター解析を行った。その結果、DNAメチル化パターンにより、運動野皮質、後頭葉皮質および小脳半球に分類された(図5)。

ヒト剖検脳組織における *TARDBP* pre-mRNA のスプライシングの解析

ヒト培養細胞では、*TARDBP* 3'UTR のイント

ロン7内に存在するNo.10-15のCpG部位の脱メチル化によって、イントロン6およびイントロン7の選択的スプライシング効率が低下し、*TARDBP* mRNAの発現量は増加した。この関係がヒト脳組織でも成り立つかどうかを検証する目的で、運動野皮質において、DNAメチル化状態と選択的スプライシング効率の関連を分析した。*TARDBP* 3'UTRのDNAメチル化率は年齢に依存するため(図4)、年齢の影響を除いた残差相関を調べた。その結果、No.12のCpG部位のDNAメチル化率は、選択的スプライシング効率と有意に正の相関を示した($r=0.68$, $p=0.04$)(図6)。

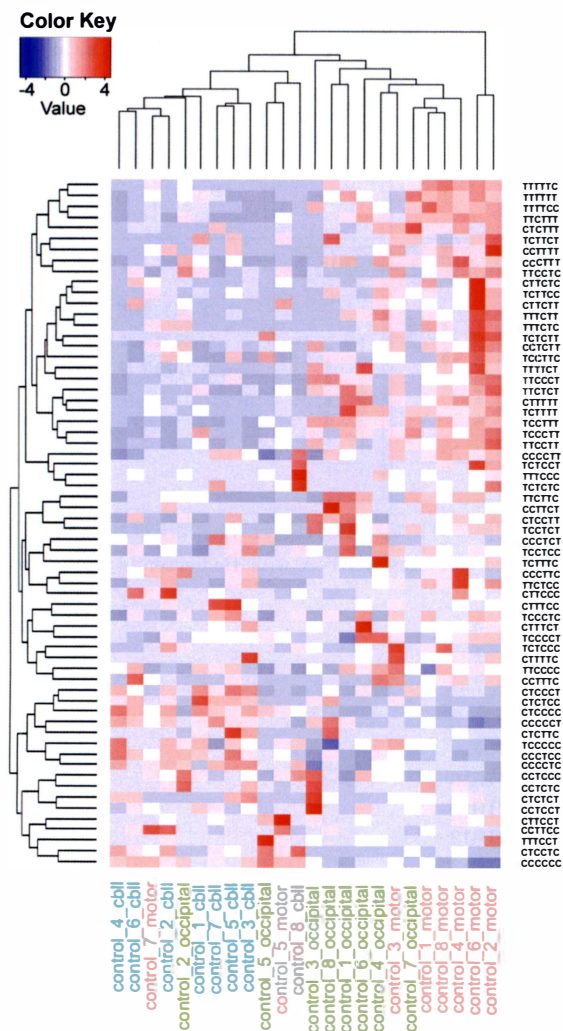


図5 運動野皮質、後頭葉皮質および小脳半球の各領域における、*TARDBP* 3'UTR中の6か所のCpG部位(No.10-15)のDNAメチル化パターンをヒートマップとして表示。*TARDBP*の6か所のCpG部位(No.10-15)のDNAメチル化パターンは、各シトシン塩基のメチル基修飾の有無に基づき、それぞれメチル化シトシンは“C”、非メチル化シトシンは“T”と表す。

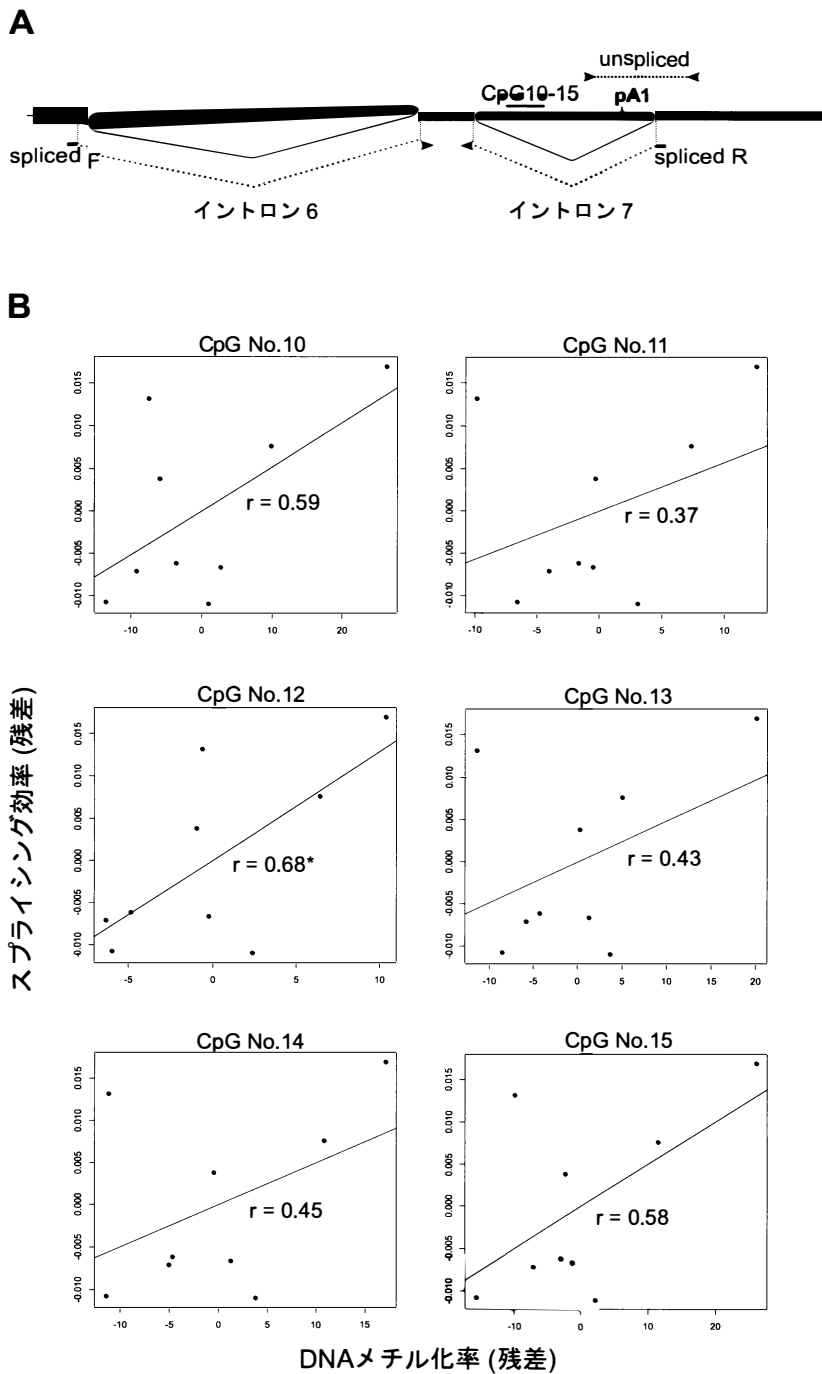


図6 (A) droplet digital PCR における *TARDBP* 3'UTR およびプライマーの概略図. unspliced プライマーは、イントロン6およびイントロン7を有する *TARDBP* mRNA を、spliced プライマーは、イントロン6およびイントロン7の両者がスプライシングされた *TARDBP* mRNA を検出する。(B) 運動野皮質における、年齢補正後の、*TARDBP* 3'UTR の6か所のCpG部位 (No.10-15) のDNAメチル化率 (No.10-15) とスプライシング効率の相関。相関係数は、Pearson's correlation test にて算出。* $p < 0.05$ 。

考 察

本研究は、*TARDBP* 3'UTR に存在する15か所の CpG 部位が、1) 通常は高度にメチル化されていること、2) 同部位のうち、イントロン7に存在する6か所の CpG 部位の脱メチル化により、TDP-43 量の自己調節機構に重要な潜在的イントロン6と7の選択的スプライシング⁸⁾ 効率を減少させ、*TARDBP* mRNA の発現量を増加させること、をヒト培養細胞で示した。次に、ヒト剖検脳組織の解析により、イントロン7に存在する6か所の CpG 部位の DNA メチル化状態が、3) 脳領域毎に異なること、4) 運動野皮質では加齢に伴い、脱メチル化すること、を見出した。最後に、5) 運動野皮質において、イントロン7の一部の CpG 部位の DNA メチル化率と、選択的スプライシング効率の間に正の相関があることを示した。

最初に、*TARDBP* 3'UTR の DNA 脱メチル化によるスプライシング抑制機構について考察する。DNA のメチル化状態の変化は、RNA ポリメラーゼ II の伸長速度を変化させ、スプライシング効率に影響を与える^{27)–29)}。実際、RNA ポリメラーゼ II の伸長速度の低下による、スプライシング効率亢進の例として、TDP-43 のイントロン7への結合によるスプライシング制御があげられる³⁰⁾。特に、ヒト運動野皮質で、イントロン7内の No.12 の CpG 部位の DNA メチル化率が、選択的スプライシング効率と有意な正相関を示した。この結果はヒト培養細胞における、イントロン7内の CpG 部位の脱メチル化により、選択的スプライシング効率を低下させ得た結果と矛盾しない。このことから、ヒト運動野皮質では、イントロン7内の No.12 の CpG 部位の DNA 脱メチル化が、RNA ポリメラーゼ II の伸長速度を促進し、選択的スプライシング効率を減少させる可能性があると考えた。今後、ゲノム編集技術を用いた変異の導入などにより同部位のメチル化を阻害し、この仮説を検証する必要がある。

次に、運動野皮質において、年齢依存性に DNA メチル化率が減少した理由について考察する。加齢によるメチル化状態の変化は、複数の遺

伝子で報告されている^{31) 32)}。この機序として、メチル化状態を維持する DNA メチルトランスフェラーゼの活性が、年齢依存性に低下することが考えられている³³⁾。同様の機序が存在するか、今後、運動野皮質を構成する細胞、特に運動神経細胞の DNA メチルトランスフェラーゼの加齢性変化を検討する必要がある。このことは、運動野皮質に存在する、運動神経細胞や介在ニューロンなどで、*TARDBP* イントロン7の DNA メチル化率が加齢により変容し、TDP-43 の自己調節機構の低下を介して、TDP-43 発現量の変化に寄与している可能性を示唆する。そのため、運動野皮質における、この CpG 部位の DNA メチル化状態の特性は、加齢の影響を受ける神経疾患の一つである、SALS の病態機序を考える上で大変興味深い。

最後に、イントロン7の6か所の CpG 部位 (No.10–15) のメチル化状態が、脳領域間で顕著に異なった理由について考察する。DNA メチル化は、遺伝子発現プロファイルの差を来し、細胞の個性を作る一因であり^{14) 15)}、細胞種毎のメチル化の相異はよく知られた現象である。よって、脳領域間の相異は、各領域を構成する細胞種の特性を反映していると考えた。特に、同 CpG 部位のメチル化プロファイルにより脳領域の分類が可能であったことは、これらの CpG 部位のメチル化状態の違いは、細胞種を規定する一因である可能性を示す。今後、細胞種毎の DNA メチル化プロファイルの検討が必要と考える。一方、イントロン7内の連続する6か所の CpG 部位において、脳領域間で、メチル化状態の差が顕著であった理由は不明である。しかし、標的特異的な脱メチル化操作の実験結果から、同 CpG 部位は脱メチル化因子に感受性が高いと推定される。また、前述したように、この中の No.12 の CpG 部位の DNA メチル化率は、加齢と共に低下する。つまり、TDP-43 の自己調節機構に関わるイントロン7内の CpG 部位 (No.10–15) の DNA メチル化状態は、外的要因の影響を受けやすい可能性があり、そのことが *TARDBP* 発現量を介して、ALS 病態に寄与しているかもしれない。

本研究の限界点としては、種々の細胞が混在していると想定される各脳領域の組織全体を対象に解析している、という点があげられる。そのため、細胞種毎の検討が出来ていない。正確な評価には、一細胞レベルで、DNA メチル化状態と選択的スプライシングの関連性を検証する必要がある^{34)–36)}。また、生体内での選択的スプライシング機構には、DNA メチル化以外に様々な要因が加わっていることが推定される。よって、選択的スプライシングの解析結果の解釈は慎重に行う必要がある。今後、各脳領域を構成する細胞種毎のメチル化状態を検証する一方で、より多数例のサンプルによる、網羅的な検討が必要である。

本研究では、TDP-43 の自己調節機構に寄与するイントロン 7 内の DNA メチル化状態が変化し得ること、実際に同部位の DNA メチル化率と選択的スプライシング効率に関連があることを示した。さらに、ALS の罹患領域である運動野皮質において、TARDBP イントロン 7 の DNA メチル化状態に特性があり、加齢による影響を受けていることを見出した。今後は、SALS 患者脳を用いて、これらの CpG 部位の DNA メチル化状態を詳細に調べることにより、ALS 病態における、TARDBP 遺伝子の DNA メチル化の寄与を明らかにしたい。

結 語

TARDBP の DNA メチル化状態は、自己調節機構に関連する選択的スプライシングを介し、TARDBP の発現量をエピジェネティックに規定する。運動野皮質でみとめた、TARDBP イントロン 7 の DNA メチル化状態の特性が、ALS 患者で変容しているかについては、今後明らかにすべき課題である。

謝 辞

本研究に際しご指導賜りました、新潟大学脳研究所神経内科学分野の小野寺理教授、横関明男先生、石原智彦先生、須貝章弘先生、同病理学分野の柿田明美教授、伊藤絢子先生、同遺伝子機能解析学分野 池内 健教授、原 範和先生に深謝致します。

参 考 文 献

- 1) van Es MA, Hardiman O, Chio A, Al-Chalabi A, Pasterkamp RJ, Veldink JH and van den Berg LH: Amyotrophic lateral sclerosis. Lancet 390: 2084–2098, 2017.
- 2) Neumann M, Sampathu DM, Kwong L, Truax AC, Micsenyi MC, Chou TT, Bruce J, Schuck T, Grossman M, Clark CM, McCluskey LF, Miller BL, Masliah E, Mackenzie IR, Feldman H, Feiden W, Kretzschmar HA, Trojanowski JQ and Lee VM: Ubiquitinated TDP-43 in frontotemporal lobar degeneration and amyotrophic lateral sclerosis. Science 314: 130–133, 2006.
- 3) Arai T, Hasegawa M, Akiyama H, Ikeda K, Nonaka T, Mori H, Mann D, Tsuchiya K, Yoshida M, Hashizume Y and Oda T: TDP-43 is a component of ubiquitin-positive tau-negative inclusions in frontotemporal lobar degeneration and amyotrophic lateral sclerosis. Biochem Biophys Res Commun 351: 602–611, 2006.
- 4) Brettschneider J, Del Tredici K, Toledo JB, Robinson JL, Irwin DJ, Grossman M, Suh E, Van Deerlin VM, Wood EM, Baek Y, Kwong L, Lee EB, Elman L, McCluskey L, Fang L, Feldengut S, Ludolph AC, Lee VM, Braak H and Trojanowski JQ: Stages of pTDP-43 pathology in amyotrophic lateral sclerosis. Ann Neurol 74: 20–38, 2013.
- 5) Porta S, Xu Y, Restrepo CR, Kwong LK, Zhang B, Brown HJ, Lee EB, Trojanowski JQ and Lee VM: Patient-derived frontotemporal lobar degeneration brain extracts induce formation and spreading of TDP-43 pathology in vivo. Nat Commun 9: 4220, 2018.
- 6) Yokoseki A, Shiga A, Tan C-F, Tagawa A, Kaneko H, Koyama A, Eguchi H, Tsujino A, Ikeuchi T, Kakita A, Okamoto K, Nishizawa M, Takahashi H and Onodera O: TDP-43 mutation in familial amyotrophic lateral sclerosis. Ann Neurol 63: 538–542, 2008.
- 7) Sreedharan J, Blair IP, Tripathi VB, Hu X, Vance C, Rogelj B, Ackerley S, Durnall JC,

- Williams KL, Buratti E, Baralle F, de Bellerocche J, Mitchell JD, Leigh PN, Al-Chalabi A, Miller CC and Nicholson G SC: TDP-43 Mutations in Familial and Sporadic Amyotrophic Lateral Sclerosis. *Science* 249: 318-321, 2008.
- 8) Koyama A, Sugai A, Kato T, Ishihara T, Shiga A, Toyoshima Y, Koyama M, Konno T, Hirokawa S, Yokoseki A, Nishizawa M, Kakita A, Takahashi H and Onodera O: Increased cytoplasmic TARDBP mRNA in affected spinal motor neurons in ALS caused by abnormal autoregulation of TDP-43. *Nucleic Acids Res* 44: 5820-5836, 2016.
 - 9) White MA, Kim E, Duffy A, Adalbert R, Phillips BU, Peters OM, Stephenson J, Yang S, Massenzio F, Lin Z, Andrews S, Segonds-Pichon A, Metterville J, Saksida LM, Mead R, Ribchester RR, Barhomi Y, Serre T, Coleman MP, Fallon JR, Bussey TJ, Brown RH Jr and Sreedharan J: TDP-43 gains function due to perturbed autoregulation in a Tardbp knock-in mouse model of ALS-FTD. *Nat Neurosci* 21: 552-563, 2018.
 - 10) Lee EB, Lee VM and Trojanowski JQ: Gains or losses: molecular mechanisms of TDP43-mediated neurodegeneration. *Nat Rev Neurosci* 13: 38-50, 2012.
 - 11) Polymenidou M, Lagier-tourenne C, Hutt KR, Stephanie C, Moran J, Liang TY, Ling SC, Sun E, Wancewicz E, Mazur C, Kordasiewicz H, Sedaghat Y, Donohue JP, Shiue L, Bennett CF, Yeo GW and Cleveland DW: Long pre-mRNA depletion and RNA missplicing contribute to neuronal vulnerability from loss of TDP-43. *Nat Neurosci* 14: 459-468, 2011.
 - 12) Sugai A, Kato T, Koyama A, Koike Y, Kasahara S, Konno T, Ishihara T and Onodera O: Robustness and vulnerability of the autoregulatory system that maintains nuclear TDP-43 levels: A trade-off hypothesis for als pathology based on in silico data. *Front Neurosci* 12: 1-15, 2018.
 - 13) Fratta P, Sivakumar P, Humphrey J, Lo K, Ricketts T, Oliveira H, Brito-Armas JM, Kalmar B, Ule A, Yu Y, Birsá N, Bodo C, Collins T, Conicella AE, Mejia Maza A, Marrero-Gagliardi A, Stewart M, Mianne J, Corrochano S, Emmett W, Codner G, Groves M, Fukumura R, Gondo Y, Lythgoe M, Pauws E, Peskett E, Stanier P, Teboul L, Hallegger M, Calvo A, Chiò A, Isaacs AM, Fawzi NL, Wang E, Housman DE, Baralle F, Greensmith L, Buratti E, Plagnol V, Fisher EM and Acevedo-Arozena A: Mice with endogenous TDP-43 mutations exhibit gain of splicing function and characteristics of amyotrophic lateral sclerosis. *EMBO J* 37: e98684, 2018.
 - 14) Ladd-Acosta C, Pevsner J, Sabunciyan S, Yolken RH, Webster MJ, Dinkins T, Callinan PA, Fan JB, Potash JB and Feinberg AP: DNA Methylation Signatures within the Human Brain. *Am J Hum Genet* 81: 1304-1315, 2007.
 - 15) Gibbs JR, van der Brug MP, Hernandez DG, Traynor BJ, Nalls MA, Lai SL, Arepalli S, Dillman A, Rafferty IP, Troncoso J, Johnson R, Zielke HR, Ferrucci L, Longo DL, Cookson MR and Singleton AB: Abundant quantitative trait loci exist for DNA methylation and gene expression in Human Brain. *PLoS Genet* 6: e1000952, 2010.
 - 16) Benayoun BA, Pollina EA and Brunet A: Epigenetic regulation of ageing: Linking environmental inputs to genomic stability. *Nat Rev Mol Cell Biol* 16: 593-610, 2015.
 - 17) Ebbert MTW, Ross CA, Pregent LJ, Lank RJ, Zhang C, Katzman RB, Jansen-West K, Song Y, da Rocha EL, Palmucci C, Desaro P, Robertson AE, Caputo AM, Dickson DW, Boylan KB, Rademakers R, Ordog T, Li H and Belzil VV: Conserved DNA methylation combined with differential frontal cortex and cerebellar expression distinguishes C9orf72-associated and sporadic ALS, and implicates SERPINA1 in disease. *Acta Neuropathol* 134: 715-728, 2017.
 - 18) Morahan JM, Yu B, Trent RJ and Pamphlett R: A genome-wide analysis of brain DNA methylation

- identifies new candidate genes for sporadic amyotrophic lateral sclerosis. *Amyotroph Lateral Scler* 10: 418-429, 2009.
- 19) Figueroa-Romero C, Hur J, Bender DE, Delaney CE, Cataldo MD, Smith AL, Yung R, Ruden DM, Callaghan BC and Feldman EL: Identification of Epigenetically Altered Genes in Sporadic Amyotrophic Lateral Sclerosis. *PLoS One* 7: e52672, 2012.
- 20) Garton FC, Benyamin B, Zhao Q, Liu Z, Gratten J, Henders AK, Zhang ZH, Edson J, Furlong S, Morgan S, Heggie S, Thorpe K, Pfluger C, Mather KA, Sachdev PS, McRae AF, Robinson MR, Shah S, Visscher PM, Mangelsdorf M, Henderson RD, Wray NR and McCombe PA: Whole exome sequencing and DNA methylation analysis in a clinical amyotrophic lateral sclerosis cohort. *Mol Genet Genomic Med* 5: 418-428, 2017.
- 21) Zheng Z, Ambigapathy G and Keifer J: MeCP2 regulates Tet1-catalyzed demethylation, CTCF binding, and learning-dependent alternative splicing of the BDNF gene in Turtle. *Elife* 6: 1-22, 2017.
- 22) Riffo-Campos ÁL, Gimeno-Valiente F, Rodríguez FM, Cervantes A, López-Rodas G, Franco L and Castillo J: Role of epigenetic factors in the selection of the alternative splicing isoforms of human KRAS in colorectal cancer cell lines. *Oncotarget* 9: 20578-20589, 2018.
- 23) He R and Kidder BL: H3K4 demethylase KDM5B regulates global dynamics of transcription elongation and alternative splicing in embryonic stem cells. *Nucleic Acids Res* 45: 6427-6441, 2017.
- 24) Song Q, Decato B, Hong EE, Zhou M, Fang F, Qu J, Garvin T, Kessler M, Zhou J and Smith AD: A reference methylome database and analysis pipeline to facilitate integrative and comparative epigenomics. *PLoS One* 8: e81148, 2013.
- 25) Zeng J, Konopka G, Hunt BG, Preuss TM, Geschwind D and Yi S V: Divergent whole-genome methylation maps of human and chimpanzee brains reveal epigenetic basis of human regulatory evolution. *Am J Hum Genet* 91: 455-465, 2012.
- 26) Morita S, Noguchi H, Horii T, Nakabayashi K, Kimura M, Okamura K, Sakai A, Nakashima H, Hata K, Nakashima K and Hatada I: Targeted DNA demethylation in vivo using dCas9-peptide repeat and scFv-TET1 catalytic domain fusions. *Nat Biotechnol* 34: 1060-1065, 2016.
- 27) Lev Maor G, Yearim A and Ast G: The alternative role of DNA methylation in splicing regulation. *Trends Genet* 31: 274-280, 2015.
- 28) Marina RJ, Sturgill D, Bailly MA, Thenoz M, Varma G, Prigge MF, Nanan KK, Shukla S, Haque N and Oberdoerffer S: TET-catalyzed oxidation of intragenic 5-methylcytosine regulates CTCF-dependent alternative splicing. *EMBO J* 35: 335-355, 2016.
- 29) Yearim A, Gelfman S, Shayevitch R, Melcer S, Glaich O, Mallm JP, Nissim-Rafinia M, Cohen AH, Rippe K, Meshorer E and Ast G: HP1 Is Involved in Regulating the Global Impact of DNA Methylation on Alternative Splicing. *Cell Rep* 10: 1122-1134, 2015.
- 30) Eréndira Avendaño-Vázquez S, Dhir A, Bembich S, Buratti E, Proudfoot N and Baralle FE: Autoregulation of TDP-43 mRNA levels involves interplay between transcription, splicing, and alternative polyA site selection. *Genes Dev* 26: 1679-1684, 2012.
- 31) Day K, Waite LL, Thalacker-Mercer A, West A, Bamman MM, Brooks JD, Myers RM and Absher D: Differential DNA methylation with age displays both common and dynamic features across human tissues that are influenced by CpG landscape. *Genome Biol* 14: R102, 2013.
- 32) Numata S, Ye T, Hyde TM, Guitart-Navarro X, Tao R, Wininger M, Colantuoni C, Weinberger DR, Kleinman JE and Lipska BK: DNA methylation signatures in development and aging of the human prefrontal cortex. *Am J Hum Genet* 90: 260-272, 2012.
- 33) Susan C. Wu and Yi Zhang: Active DNA

- demethylation: many roads lead to Rome. *Nat Rev Mol Cell Biol* 11: 607-620, 2010.
- 34) Luo C, Keown CL, Kurihara L, Zhou J, He Y, Li J, Castanon R, Lucero J, Nery JR, Sandoval JP, Bui B, Sejnowski TJ, Harkins TT, Mukamel EA, Behrens MM and Ecker JR: Single-cell methylomes identify neuronal subtypes and regulatory elements in mammalian cortex. *Science* 357: 600-604, 2017.
- 35) Farlik M, Sheffield NC, Nuzzo A, Datlinger P, Schönegger A, Klughammer J and Bock C: Single-Cell DNA Methylome Sequencing and Bioinformatic Inference of Epigenomic Cell-State Dynamics. *Cell Rep* 10: 1386-1397, 2015.
- 36) Zhu P, Guo H, Ren Y, Hou Y, Dong J, Li R, Lian Y, Fan X, Hu B, Gao Y, Wang X, Wei Y, Liu P, Yan J, Ren X, Yuan P, Yuan Y, Yan Z, Wen L, Yan L, Qiao J and Tang F: Single-cell DNA methylome sequencing of human preimplantation embryos. *Nat Genet* 50: 12-19, 2018.

(平成31年1月16日受付)