

TDP-43 の機能喪失による OPA1 mRNA のスプライシング変化を介した

ミトコンドリアの断片化

伊藤 岳

新潟大学大学院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：西澤正豊教授）

Depletion of TDP-43 induces mitochondrial fragmentation by alteration of OPA1 mRNA splicing.

Gaku Ito

Department of Neurology, Niigata University Graduated School of Medical and Dental Science

Course for Molecular and Cellular Medicine

(Director: Prof. Masatoyo Nishizawa)

抄録

筋萎縮性側索硬化症（amyotrophic lateral sclerosis: ALS）は、成人期に発症し、進行性の筋萎縮と筋力低下をきたし、呼吸不全により致死性の経過をたどる運動神経細胞の変性疾患である。本症では、運動神経細胞の細胞質内に TAR DNA binding protein-43（TDP-43）による封入体が蓄積する。TDP-43 は RNA のスプライシングに関与する核タンパク質であるが、本症では核から消失するため、病態機序として TDP-43 の機能喪失が想定されている。一方、本症ではミトコンドリアの形態異常が報告されてきた。しかし、TDP-43 機能とミトコンドリアの形態との関連は不明であった。著者は TDP-43 の機能喪失により、ミトコンドリアの形態が変化するという仮説をたて、これを検討した。方法として、HEK293T 細胞を用い、TDP-43 の発現を抑制し、ミトコンドリアの形態と、ミトコンドリアの形態に関与するタンパク質、mRNA の解析を行った。更に、ALS 患者のホルマリン固定パラフィン包埋脊髄標本から、運動神経細胞をレーザーマイクロダイセクションにより収集し、mRNA の定量解析を行った。HEK293T 細胞では TDP-43 発現抑制によってミトコンドリアは断片化した。また、ミトコンドリアの内膜の融合に関わる Optic atrophy 1（OPA1）の 84 kDa タンパク質の増加、OPA1 mRNA スプライシング多様体 8 の増加を認めた。OPA1 の各々のエクソンでは、エクソン 4b が増加することを見出した。実際、HEK293T 細胞では、OPA1

mRNA スプライシング多様体 8 の強制発現によりミトコンドリアは断片化した。最後に ALS 患者脊髄運動神経細胞にて、OPA1 エクソン 4b の発現量を検討したが、コントロール患者群と比して差を認めなかった。これらの結果から、HEK293T 細胞では TDP-43 の発現抑制により OPA1 mRNA エクソン 4b のスプライシングが抑制され、OPA1 mRNA スプライシング多様体 8 が増加する。これにより、ミトコンドリアが断片化すると結論した。しかし、今回は ALS 患者の運動神経細胞にてそれを立証できなかった。今後、TDP43 が核から消失した運動神経細胞に対象を絞った解析が必要である。

序文

筋萎縮性側索硬化症 (amyotrophic lateral sclerosis: ALS) は、成人期に発症し、進行性の筋萎縮と筋力低下をきたし、呼吸不全により致死性の経過をたどる神経変性疾患である。有効な治療法は存在せず、病態機序の解明と治療法の開発が望まれている。ALS の病理学的な特徴として、運動神経細胞の細胞質内にユビキチン陽性封入体を認める。2006 年にその構成タンパク質として、核タンパク質である TAR DNA binding protein-43 (TDP-43) が同定された[1][2]。さらに、孤発性及び家族性の ALS にて TDP-43 の遺伝子変異が見出された[3][4][5]。これらの事から TDP-43 は ALS の発症に一次的に関わると考えられている。TDP-43 は、RNA 認識モチーフを持ち、RNA の発現調整やスプライシングに関与する核タンパク質である。ALS では核から消失する事から、TDP-43 の核内での機能の喪失が、病態機序として想定されている[2]。

一方、ALS の病態機序として、以前よりミトコンドリアの異常が唱えられてきた[6]。ALS 患者の運動神経細胞では、ミトコンドリアの膨張、ミトコンドリア内膜の折りたたみ構造であるクリステの増加が報告されてきた[7][8]。また、TDP-43 との関係では、家族性 ALS で見出された変異型 TDP-43 の遺伝子導入マウスで、運動神経細胞でのミトコンドリアの断片化が報告されている[9]。しかし、これらのミトコンドリアの形態異常と TDP-43 機能との関連については、検討されていない[10][11]。

ミトコンドリアは、ATP の産生に携わり、分裂と融合を頻回に繰り返す動的な細胞内小器官である。ATP を産出する代償として、多量の活性酸素を産生するためミトコンドリア DNA は活性酸素による障害を受けやすい[12]。ミトコンドリア DNA に障害を受けたミトコンドリアは、正常なミトコンドリアと融合し、障害の有るミトコンドリア DNA の、ミトコンドリア内での存在比率を低下させ、その影響を低下させる[13]。一方、障害の有るミトコンドリア DNA が蓄積したミトコンドリアは、分裂しミトコンドリア特異的オートファジー機構で分解される[14]。ミトコンドリアのホメオスターシスを保つこの動的な活

動は、ミトコンドリア・ダイナミクスと総称されている。ミトコンドリアの内膜の融合は Optic atrophy 1 (OPA1)、外膜の融合は Mitofusin 2 (Mfn2) によってなされ、これらの異常によりミトコンドリアは断片化する。一方、分裂は Dynamin-related protein 1 (DRP1) 及び Mitochondrial fission 1 protein (Fis1) によってなされ、これらの異常によりミトコンドリアは異常に伸張する[15]。

近年、OPA1 が dominant optic atrophy type1 [16] の、Mfn2 が Charcot-Marie-Tooth type 2A [17] の原因遺伝子として単離され、ミトコンドリア・ダイナミクスの異常、ミトコンドリアの断片化と神経細胞死との関連が注目されている。OPA1 や Mfn2 の変異マウスは胎生期初期に致死性となり、さらに、この胎児由来線維芽細胞では、ミトコンドリアの膜電位は低下し、断片化を示した[18]。さらに Mfn2 の神経特異的欠損マウスは神経細胞の変性を起こす[19]。著者は、ALS で認められるミトコンドリアの形態異常が、ミトコンドリア・ダイナミクスの異常に関与するという仮説を立て、ここに TDP-43 が関与するか、TDP-43 の発現抑制時のミトコンドリアの形態を分子生物学的に検討することにより明らかにすることを目的とした。

材料と方法

siRNA を用いた TDP-43 発現抑制

TDP-43 をターゲットとした siRNA として siTDP-43 : GAGCAATGATAGCAAATAA (Cosmo Bio) を用いた。陰性コントロールとして siRNA Negative Control (S20C-0600 ; Cosmo Bio)を使用した。HEK293T 細胞は 37°C、5% CO2 条件下で 10% FBS を含む Dulbecco's modified Eagle Medium (DMEM) (Thermo Fisher) で培養した。6 ウェルプレートに播種し、24 時間後、約 50%の密度となった細胞に、LipofectamiTM RNAi MAX (Invitrogen) 7.5 µl と siRNA 40 pmol を加え、それぞれ Opti-MEM® (Thermo Fisher)にて 250 µl の溶液を調整し、各ウェルに添加した。さらに 24 時間培養後、再度 6 ウェルプレートに播種し、24 時間後に再度 siRNA を導入した。この 24 時間後に細胞を回収し解析した。

ウェスタンブロット解析

細胞を Phosphate Buffered Saline (PBS)で洗浄後、各ウェルにトリプシン 250 µl を添加し、37°Cで 1 分間処理し、500 µl DMEM を加えて回収した。2000 rpm で 3 分間遠心後、上清を破棄し、1 ml PBS を添加し、2000 rpm で 3 分間遠心し細胞を回収した。回収した細胞に対し 100 µl の Lysis Buffer (RIPA buffer (25 mM Tris-HCl pH 7.6、 150 mM NaCl、 1% NP-40、 1% sodium deoxycholate、 0.1% SDS) と Protease inhibitor cocktail 5 µl を加え、15 秒間超音

波粉碎を行った。4℃で 14000 rpm にて 10 分間遠心し、上清 80 μ l を回収した。タンパク質量は BCA Protein Assay kit (Takara) で測定した。5 μ g のタンパク質に対し sample buffer (95% Laemmli sample buffer (BioRad)、5% β -mercaptoethanol (Sigma)) を等量加え、95℃で 5 分間処理した。10% ポリアクリルアミドゲル Super Sep™ Ace (Wako) に泳動し、0.45 μ m PVDF メンブレンに転写した。転写メンブレンを blocking buffer (5% Skim Milk、0.05% Tween20/PBS) で室温 1 時間浸透後、blocking buffer で希釈した一次抗体を加え、4℃で一晩浸透した。使用した 1 次抗体は以下の通りである： Mouse anti-TARDBP mAb (5000:1; H00023435-MO1; abnova)、 Mouse anti-GAPDH (5000:1; M171-3; MBL)、 Mouse anti-DLP1 (5000:1; 611112; BD)、 Rabbit anti-Fis1 (1000:1; 5113A; imgenex)、 Mouse anti-OPA1 (5000:1; 612606; BD)、 Mouse anti-mfn2 (5000:1; ab56889; abcam)、 Mouse anti-Magoh (1000:1; sc-56724; Santa cruz)。反応後 0.1% Tween20/PBS にて洗浄し、blocking buffer で希釈した anti-Mouse IgG (DAKO) (20000:1)、もしくは anti-Rabbit IgG (DAKO) (20000:1) を室温で 1 時間反応させ、再度 wash buffer にて洗浄後、Immobilon Western HRP substrate (Millipore) で検出した。定量解析は ImageQuant™ LAS4000 biomolecular imager (GE Healthcare) にて行った。

ミトコンドリアの形態解析

TDP-43 の発現抑制、もしくは OPA1 スプライシング多様体 8 の強制発現を行った後、3 mm ガラスボトムディッシュに播種し、24 時間後に観察した。培養液の半量を、OPTI-MEM™ (Thermo Fisher) で希釈した Mitotracker® Green (Thermo Fisher) 0.2 μ M 溶液で置換し、15 分後に 488 nm 励起で 600 倍で共焦点レーザー顕微鏡 (CSU-10; Yokogawa) にて撮像した。1 細胞中のミトコンドリアの数と各々のミトコンドリアの長さを Metamorph® (Molecular Devices) にて測定した。30 ピクセル長以上のミトコンドリアの数を全ミトコンドリアの数で除したものを tubular ratio とした。TDP-43 発現抑制実験では 20 細胞ずつ、OPA1 スプライシング多様体 8 の強制発現実験では 16 細胞ずつの tubular ratio を計測した。ミトコンドリアの撮影時および tubular ratio 算出時には、各々の検体に番号を振り、対象の条件（コントロール検体なのか、TDP-43 発現抑制もしくは OPA1 多様体 8 強制発現を行った検体か）を伏せて解析し、主観を排除した。得られた tubular ratio を、対応表に基づき対象の条件毎に振り分け、統計解析を行った。2 群間比較は Student-T 検定法を用いた。

OPA1 mRNA スプライシング多様体の発現量の解析

細胞からの total RNA は NucleoSpin® RNA kit (Takara)にて抽出した。抽出した total RNA 500 ng から RiverTra Ace® (Toyobo) を用い、random primer にて 10 µl の溶液中で cDNA を作成した。PCR 1 反応あたり 10 ng/µl cDNA 溶液を 0.33 µl ずつ使用し、最終プライマー濃度は 0.2 µM とした。逆転写定量 PCR には Thermal Cycler Dice® Real Time System (TP850 ; Takara) を、試薬は SYBR Premix Ex Taq™ (Takara)を使用した。PCR の条件は 1) 95℃、30 秒、2) 95℃、15 秒、3) 60℃、30 秒、2)-3) 40 サイクルで行った。内在性コントロールは次のように設定した。まず Human housekeeping gene primer set (ID3790 ; Takara) に含まれる 15 種類について各サンプルで逆転写定量 PCR を行い、その Threshold Cycle 値 (Ct 値) を用い、安定して発現している遺伝子を RefFinder にて検討した[20]。その結果、ribosomal protein large P1、ribosomal protein large P2 を選定した。これらの Ct 値をそれぞれ Cta、Ctb として Normalization Factor を算出した[21]。qRT-PCR の定量は、対象とする 2 検体間の濃度差を Normalization Factor で補正したのち (ΔCt)、両者の ΔCt 値の差 ($\Delta \Delta Ct$) を算出した。2 群間比較は Student-T 検定法を用いた。使用したプライマー配列は以下に記す。

OPA1 スプライシング多様体 1 F: CTTTTTTACCTCAGGTTCTCC R: CTCTTTGTCTGACACCTTTCT ; OPA1 スプライシング多様体 5 F: GACTTTTTTACCTCAGGT R: CTCTTTGTCTGACACCTTTCT ; OPA1 スプライシング多様体 7 F: CTTTTTTACCTCAGGTTCTCC R: TCACCAAGCAGACCCTTTCT ; OPA1 スプライシング多様体 8 F: GACTTTTTTACCTCAGGT R: TCACCAAGCAGACCCTTTCT。

OPA1 mRNA スプライシング多様体のエクソン別の定量

OPA1 mRNA スプライシング多様体のエクソン毎の定量は次のように行った。まず、cDNA (1 ng/µl) 2 µl、EvaGreen® (BioRad) 10 µl、1 µM の各スプライシング多様体特異的プライマーセット 2 µl、Ultra Pure™ Distilled Water (invitrogen) 6 µl の計 20 µl の溶液を作成し、QX200™ Droplet Generator で droplet を作成した。EvaGreen® (BioRad)のプロトコールに準じて PCR を行い、droplet digital PCR システム(QX200 ; BioRad)を用いて各エクソンの発現量を定量した。PCR の条件は 1) 95℃、5 分、2) 95℃、30 秒、3) 56℃、1 分、2)-3) 40 サイクル、4) 4℃ 5 分、5) 90℃ 5 分とした。エクソン 6-7 の発現量を OPA1 の総量とし、エクソン 4、4b、5b の各発現量をエクソン 6-7 の発現量で除し、各エクソンの OPA1 総量 (エクソン 6-7 の発現量) に対する比率を比較した。使用したプライマーの配列は以下の通りである。

OPA1 エクソン 6-7 F: CAGGAAGAACTTCTGCACAC R: TCGTTCCAAGATTCTCTGATAC ; OPA1 エクソン 4 F: TAGCACCAGACTTTG R: AGTCCTTCAATAAGC ; OPA1 エクソン 4b F: TCACAAATTGGTTAGTGAAGTCAT R: AACAAAGAGAAGTAGGTCAGAAGCTC ; OPA1 エクソン 5b F:

TGGATCTGAAAGTGACAAGCA R: ATGAGCTCACCAAGCAGACC。2群間比較は Student-T 検定法にて行った。

OPA1 mRNA スプライシング多様体 8 の強制発現

骨格筋由来 cDNA ライブラリー (Marathon-Ready cDNA ; S0634 ; Takara) から OPA1 の開始コドンから終始コドンまで PCR 法にて増幅した。使用したプライマー配列は F: GGGTCTAGAACCATGTGGCGACTACGTCGGGC R: AAAGCGGCCGCTTATTTCTCCTGATGAAGAGC である。増幅産物を XbaI および NotI で制限酵素処理し、pcDNA™3.1 myc-His (-) (Invitrogen) に挿入した。24 ウェルプレートで培養した HEK293T 細胞に対して、1 ウェルあたりプラスミド DNA 350 ng を X-tremeGENE™ (Roche) にてプロトコールに従い導入した。48 時間後に回収し、解析を行った。

ヒト脊髄運動神経細胞における OPA1 mRNA 発現量の定量

ALS 患者 4 例 (61 歳男性、57 歳男性、74 歳女性、84 歳女性) とコントロール 4 例 (68 歳女性、70 歳女性、76 歳男性、49 歳男性) について、ヒト脊髄のホルマリン固定パラフィン包埋標本(Formalin Fixed Paraffin Embedded: FFPE)の 14 µm 厚切片を各例で 10 枚用意した。室温で以下の順に脱パラフィン、および Cresyl violet 染色を行った。xylene (2 分)、xylene (2 分)、100% EtOH (1 分)、95% EtOH (1 分)、75% EtOH (1 分)、Nuclease free water (30 秒)、Staining: 0.1% Cresyl violet (15 秒)、75% EtOH (30 秒)、95% EtOH (30 秒)、100% EtOH (1 分)、xylene (5 分)、乾燥 (10 分)。

レーザーマイクロダイセクションは Leica LMD 7000 (Leica Microsystems)を使用した。脊髄前角の運動神経細胞を形状で選択し、細胞回収用チューブのキャップにミネラルオイル 50 µl を加え、1 例につき 100 細胞ずつ回収した。total RNA は proteinase K 処理を 56°C で一晩行った後に miRNeasy FFPE kit (Qiagen)を用いプロトコールに従い抽出し 20 µl の溶出液を得た[22]。この内 5 µl を用い、解析する遺伝子特異的逆転写プライマー (2 µM) 1 µl を使用し、High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystem)のプロトコールに従い 10 µl の cDNA を作成した。2 µl の cDNA に対して EvaGreen (BioRad) 10 µl、1 µM プライマーセット 2 µl、Ultra Pure™ Distilled Water (Invitrogen): 6 µl を加え、計 20 µl の溶液を作成し、QX200™ Droplet Generator で droplet を作成した。droplet digital PCR システム (QX200 ; BioRad) を用い、PCR 条件として 1) 95°C、5 分、2) 95°C、30 秒、3) 56°C、1 分、2)-3) 40 サイクル、4) 4°C 5 分、5) 90°C 5 分で解析した。プライマーは次の通りである。OPA1 エクソン 6-7 (PCR 長 51 bp) F: CAGGAAGAACTTCTGCACAC、R: TCGTTCCAAGATTCTCTGATAC ; OPA1 エクソン 6-7 (PCR 長 108 bp) F:

AGGAAGAACTTCTGCACACTCA、R: TGCCTTTGTCATCTTTCTGC; OPA1 エクソン 4b F: TCACAAATTGGTTAGTGAAGTCAT、 R: AACAAAGAGAAGTAGGTCAGAAGCTC。2 群間の比較は Student-T 検定法にて行った。

結果

TDP-43 発現抑制によるミトコンドリアの断片化

TDP-43 に対する siRNA による発現抑制効率について、HEK293T 細胞にて検討した。その結果、2 回 siRNA を行うことによって TDP-43 タンパク質が検出レベル以下となることを確認した (図 1A)。次に、この条件下で、ミトコンドリアの形態を共焦点顕微鏡にて検討した。1 細胞中の長いミトコンドリアの存在比率を tubular ratio として算出し、比較した。その結果、TDP-43 siRNA 処理細胞群ではコントロール群に比して tubular ratio の有意な低下 (断片化) を認めた (図 2A、B)。

TDP-43 発現抑制細胞での OPA1 の変化

次に、断片化の分子機序について検討した。ミトコンドリア長は、ミトコンドリアの融合、分裂により決定される。融合、分裂に関わる主要な因子である OPA1、DRP1、Fis1、Mfn2 のタンパク量をウェスタンブロット法にて検討した (図 1A)。その結果、TDP-43 siRNA 処理細胞群で、DRP1、Fis1、Mfn2 には変化を認めなかった。一方、OPA1 の 5 種類の C 末由来産物の中で、TDP-43 siRNA 処理細胞群では、94 kDa と 84 kDa 産物の有意な増加を認めた (図 1B、C)。

TDP-43 発現抑制細胞での OPA1 mRNA スプライシングの検討

OPA1 の多様体は、スプライシングと YME1 like 1 ATPase (Yme1L)、OMA1 zinc metallopeptidase (OMA1) による翻訳後タンパク質切断により産生される (図 3A) [7]。そこで、最初に TDP-43 siRNA 処理が Yme1L、OMA1 の発現に影響を与えるか否かを検討した。しかし、Yme1L および OMA1 タンパク質の発現量は、TDP-43 siRNA 処理細胞群とコントロール群を比して差を認めなかった (図 3B)。

次に OPA1 のスプライシング変化について検討した。OPA1 には 8 つのスプライシング多様体が存在するが、その内スプライシング多様体 1、5、7、8 が主である [23]。そこでこれらの発現量について定量的に解析した。その結果、TDP-43 siRNA 処理細胞にてスプライシング多様体 8 の有意な増加を認めた (図 3C)。これらのスプライシング多様体は、エクソン 4、4b、5b のスプライシングにより形成される (図 3A)。そこで、各々のエクソンの

量を検討した。その結果、TDP-43 siRNA 処理細胞ではエクソン 4b の有意な増加を認めた (図 3D)。

OPA1 スプライシング 多様体 8 強制発現細胞での 84 kDa 産物の増加とミトコンドリアの断片化

実際、OPA1 スプライシング 多様体 8 が 84 kDa の産生に繋がるか検討した。HEK293T 細胞に OPA1 スプライシング 多様体 8 の発現プラスミドベクターを導入し、ウェスタンブロット法にて OPA1 の発現を検討した。その結果、OPA1 スプライシング多様体 8 強制発現細胞で 84 kDa バンドの有意な増加を認めた (図 4A)。次に、OPA1 スプライシング 多様体 8 の増加により、ミトコンドリアの形態変化が引き起こされるか否かを検討した。OPA1 スプライシング 多様体 8 の強制発現細胞では、tubular ratio の有意な低下を認めた (図 4B、C)。

ホルマリン固定パラフィン包埋標本由来のヒト脊髄運動神経細胞

ヒト脊髄ホルマリン固定パラフィン包埋 (Formalin Fixed Paraffin Embedded: FFPE) 標本から、形状で運動神経細胞を選択し、レーザーマイクロディセクション法にて 1 例につき 100 細胞ずつ採取し、そこから total RNA を抽出した (図 5A)。抽出した RNA から cDNA を作成し 25 細胞に相当する cDNA を用いて droplet-digital PCR (ddPCR) による mRNA の定量を行った。FFPE 標本から抽出した核酸は、断片化により長い産物の増幅は難しいとされる[24]。そのため、まず OPA1 mRNA エクソン 6-7 の間を対象とし、51bp、108bp の PCR 長で検出感度を検討した。その結果、PCR 長が 51bp の場合、OPA1 mRNA を高感度で検出し得た (図 5B)。

ALS 患者脊髄運動神経細胞における OPA1 スプライシングの検討の検討

次に、ALS 患者の運動神経細胞から同様に RNA を抽出し、cDNA を作成した。OPA1 エクソン 4b 内、および OPA1 mRNA エクソン 6-7 の間に、各々 51 bp の PCR プローブを設定し、エクソン 4b と総 OPA1 mRNA 量を ddPCR にて測定し、総 OPA1 mRNA に対するエクソン 4b の比率を算出した。OPA1 エクソン 4b を含む mRNA の総 OPA1 mRNA の中での割合は、ALS とコントロール群で有意な差を認めなかった (図 6)。

考察

著者は TDP-43 の発現を抑制した HEK293T 細胞で、ミトコンドリアが断片化することを示し、さらに TDP-43 発現抑制下で、OPA1 の 84 kDa 成分の増加を見出した。OPA1 タンパク質には、スプライシングと翻訳後タンパク質切断により、5 種類の C 末断片が存在す

る[25]。OPA1 はミトコンドリア内膜の融合に関わり、その正常な機能にはこれらが適切なバランスで存在する必要がある[25][26]。OPA1 84 kDa バンドの増加により、このバランスが崩れ、ミトコンドリアの内膜の融合異常、断片化が引き起こされると考えた。OPA1 84 kDa 産物の強制発現でミトコンドリアの断片化を認めたことは、この仮説を支持する。

さらに、OPA1 84 kDa 産物が増加するメカニズムについて検討を加え、TDP-43 発現抑制条件下では、OPA1 mRNA スプライシング多様体 8 が増加することを見出した。実際、OPA1 mRNA スプライシング多様体 8 の強制発現により、OPA1 84 kDa タンパク質が増加した。次に、TDP-43 発現低下により OPA1 mRNA スプライシング多様体 8 が増加する機序について、検討を加えた。OPA1 のスプライシング多様体は、エクソン 4、4b、5b のスプライシングにより形成される（図 3A）[25]。TDP-43 発現低下細胞では、エクソン 4b の有意な増加を認めた。エクソン 4b の発現増加は多様体 5 と 8 の増加を引き起こすが、多様体 8 の量が多様体 5 に比して多いため、結果として OPA1 84 kDa バンドの増加が主体となると推察した。一般に、TDP-43 は、各エクソンのスプライシングに対し、エクソン毎に、促進的もしくは抑制的に作用する[27]。著者の結果は、TDP-43 が OPA1 エクソン 4b のスプライシングに対して促進的に働く可能性を示唆する。

さらに著者は、この変化が実際に ALS の脊髄前角運動神経細胞で生じているかについて検討を加えた。ヒトの剖検組織にて、1 細胞レベルでスプライシング多様体の量を検討し得る方法は確立されていない。方法として、スプライシング多様体特異的な抗体を用いるか、特異的 RNA プローブを用いた in situ hybridization 法が考えられる。しかし、OPA1 のエクソン 4b に対する特異的な抗体は存在しない。またエクソン 4b は 54 bp と短く、in situ hybridization 用の特異的な RNA プローブの設定も困難であった。そこで著者は、レーザーマイクロダイセクション法にて脊髄運動神経細胞を単離し、ddPCR 法にて定量する方法を試みた。ddPCR 法は、ターゲットを 1 粒 (droplet) あたり 1 コピー以下になるように希釈した溶液を用い、油膜に包まれた数万個の droplet を作成し、各々の droplet 毎に PCR を行い増幅の有無を判定し、反応した droplet の数でターゲットのコピー数を算出する方法であり、検量線を必要とせず、定量 PCR 法に比べて高感度である[28]。

今回は、解析対象として FFPE 標本を用いた。RNA の解析には凍結標本を使うことが推奨されるが、凍結標本では、形態評価や免疫染色が困難で、細胞の同定が難しい。一方、FFPE 標本は形態評価に優れ、免疫染色法を加えた解析にも耐え得る。さらに、FFPE 標本は凍結標本に比して多くの標本資源が存在し、これらを活用し得る。しかし、FFPE 標本から抽出した mRNA は、断片化や核酸の化学修飾により、PCR 法による増幅の長さに制限があるとされる[24][29][30]。実際、ヒト脊髄 FFPE 標本由来の 25 個の運動神経細胞から調整

した cDNA を用い OPA1 mRNA の定量を試みたところ、51 bp と 108 bp の産物の間で ddPCR 法による増幅高率に明らかな差があった。この結果から、FFPE 標本からの mRNA 定量に関しては、PCR 増幅長が短い必要があると結論した。今後、mRNA の抽出方法、cDNA の作製方法などにさらなる改良を加え、より検出感度を上げることが望まれる。

今回著者は、HEK293T 細胞において、TDP-43 の発現抑制によりミトコンドリアが断片化することを示し、その機序として OPA1 エクソン 4b のスプライシングの抑制による OPA1 スプライシング 多様体 8 の増加と、それによる OPA1 84 kDa タンパク質の増加を示した。この結果は、TDP-43 の機能不全とミトコンドリアの形態異常との関係を初めて示すものである。OPA1 はミトコンドリア内膜の融合やクリステの構造維持に関わるとされ、著者が見出した現象は、ALS で報告されているミトコンドリアのクリステの増加という形態異常を引き起こしている可能性がある[7][8]。しかし、今回の解析では、脊髄の運動神経細胞では ALS 患者と対象との間で OPA1 エクソン 4b の比率に差を指摘できなかった。この理由として、今回の解析では、TDP-43 の状態に関わらず、すべての運動神経細胞を対象としたことが挙げられる。ALS 患者の脊髄前角細胞において、TDP-43 の核からの消失は約 6 割の細胞のみに認められる[31]。TDP-43 の核からの消失により OPA1 のスプラインシング異常が惹起されるという仮説に従えば、今後、免疫染色法を加え、TDP-43 の核からの消失を認める細胞のみを選択して、解析する必要がある。これらの解析により、今回の知見の ALS 病態への寄与が明確になると期待される。

謝辞

本研究をご指導いただきました新潟大学脳研究所神経内科学分野 西澤正豊教授、新潟大学脳研究所生命科学リソース研究センター分子神経疾患資源解析学分野 小野寺理教授、新潟大学脳研究所脳疾患標本資源解析学分野 柿田明美教授、新潟大学脳研究所病理学分野 豊島靖子先生、新潟大学脳研究所超域学術院 志賀篤先生、小山哲秀先生に深謝いたします。

文献

- [1] M. Neumann, D. M. Sampathu, L. K. Kwong, A. C. Truax, M. C. Micsenyi, T. T. Chou, J. Bruce, T. Schuck, M. Grossman, C. M. Clark, L. F. McCluskey, B. L. Miller, E. Masliah, I. R. Mackenzie, H. Feldman, W. Feiden, H. a Kretzschmar, J. Q. Trojanowski, and V. M.-Y. Lee, “Ubiquitinated TDP-43 in frontotemporal lobar degeneration and amyotrophic lateral sclerosis.,” *Science*, vol. 314, no. 5796, pp. 130–133, 2006.

- [2] T. Arai, M. Hasegawa, H. Akiyama, K. Ikeda, T. Nonaka, H. Mori, D. Mann, K. Tsuchiya, M. Yoshida, Y. Hashizume, and T. Oda, "TDP-43 is a component of ubiquitin-positive tau-negative inclusions in frontotemporal lobar degeneration and amyotrophic lateral sclerosis," *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, vol. 351, no. 3, pp. 602–611, 2006.
- [3] A. Yokoseki, A. Shiga, C.-F. Tan, A. Tagawa, H. Kaneko, A. Koyama, H. Eguchi, A. Tsujino, T. Ikeuchi, A. Kakita, K. Okamoto, M. Nishizawa, H. Takahashi, and O. Onodera, "TDP-43 mutation in familial amyotrophic lateral sclerosis.," *Ann. Neurol.*, vol. 63, no. 4, pp. 538–542, 2008.
- [4] J. Sreedharan, I. P. Blair, V. B. Tripathi, X. Hu, C. Vance, B. Rogelj, S. Ackerley, J. C. Durnall, K. L. Williams, E. Buratti, F. Baralle, J. de Belleruche, J. D. Mitchell, P. N. Leigh, A. Al-Chalabi, C. C. Miller, G. Nicholson, and C. E. Shaw, "TDP-43 mutations in familial and sporadic amyotrophic lateral sclerosis.," *Science*, vol. 319, no. March, pp. 1668–1672, 2008.
- [5] E. Kabashi, P. N. Valdmanis, P. Dion, D. Spiegelman, B. J. McConkey, C. Vande Velde, J.-P. Bouchard, L. Lacomblez, K. Pochigaeva, F. Salachas, P.-F. Pradat, W. Camu, V. Meininger, N. Dupre, and G. a Rouleau, "TARDBP mutations in individuals with sporadic and familial amyotrophic lateral sclerosis.," *Nat. Genet.*, vol. 40, no. 5, pp. 572–574, 2008.
- [6] M. Cozzolino and M. T. Carri, "Mitochondrial dysfunction in ALS," *Prog. Neurobiol.*, vol. 97, no. 2, pp. 54–66, 2012.
- [7] S. Sasaki and M. Iwata, "Mitochondrial alterations in the spinal cord of patients with sporadic amyotrophic lateral sclerosis.," *J. Neuropathol. Exp. Neurol.*, vol. 66, no. 1, pp. 10–6, Jan. 2007.
- [8] L. Siklos Engelhardt, J., Harati, Y., Smith, R. G., Joo, F., Appel, S. H., "Ultrastructural evidence for altered calcium in motor nerve terminals in amyotrophic lateral sclerosis," *Ann Neurol*, vol. 39, no. 2, pp. 203–216, 1996.
- [9] W. Wang, L. Li, W. Lin, D. W. Dickson, L. Petrucelli, T. Zhang, and X. Wang, "The ALS disease-associated mutant TDP-43 impairs mitochondrial dynamics and function in motor neurons," vol. 22, no. 23, pp. 4706–4719, 2013.

- [10] Z. Jiang, W. Wang, G. Perry, X. Zhu, and X. Wang, "Mitochondrial dynamic abnormalities in amyotrophic lateral sclerosis," *Transl. Neurodegener.*, vol. 4, no. 14, pp. 1–6, 2015.
- [11] M. Cozzolino, S. Rossi, A. Mirra, and M. T. Carri, "Mitochondrial dynamism and the pathogenesis of Amyotrophic Lateral Sclerosis.," *Front. Cell. Neurosci.*, vol. 9, no. 31, pp. 1–5, 2015.
- [12] G. C. Kujoth, P. C. Bradshaw, S. Haroon, and T. A. Prolla, "The Role of Mitochondrial DNA Mutations in Mammalian Aging," *PLoS Genet.*, vol. 3, no. 2, pp. 0161– 0172, 2007.
- [13] K. Nakada, A. Sato, and J. Hayashi, "Mitochondrial functional complementation in mitochondrial DNA-based diseases.," *Int. J. Biochem. Cell Biol.*, vol. 41, no. 10, pp. 1907–13, 2009.
- [14] T. Tatsuta and T. Langer, "Quality control of mitochondria: protection against neurodegeneration and ageing," *EMBO J.*, vol. 27, no. 2, pp. 306–314, 2008.
- [15] K. Okamoto and J. M. Shaw, "Mitochondrial morphology and dynamics in yeast and multicellular eukaryotes.," *Annu. Rev. Genet.*, vol. 39, pp. 503–536, 2005.
- [16] C. Alexander, M. Votruba, U. E. Pesch, D. L. Thiselton, S. Mayer, a Moore, M. Rodriguez, U. Kellner, B. Leo-Kottler, G. Auburger, S. S. Bhattacharya, and B. Wissinger, "OPA1, encoding a dynamin-related GTPase, is mutated in autosomal dominant optic atrophy linked to chromosome 3q28.," *Nat. Genet.*, vol. 26, no. 2, pp. 211–215, 2000.
- [17] S. Züchner, I. V Mersiyanova, M. Muglia, N. Bissar-Tadmouri, J. Rochelle, E. L. Dadali, M. Zappia, E. Nelis, A. Patitucci, J. Senderek, Y. Parman, O. Evgrafov, P. De Jonghe, Y. Takahashi, S. Tsuji, M. A. Pericak-Vance, A. Quattrone, E. Battologlu, A. V Polyakov, V. Timmerman, J. M. Schröder, and J. M. Vance, "Mutations in the mitochondrial GTPase mitofusin 2 cause Charcot-Marie-Tooth neuropathy type 2A," *Nat. Genet.*, vol. 36, no. 5, pp. 449–451, 2004.
- [18] H. Chen, "Disruption of Fusion Results in Mitochondrial Heterogeneity and Dysfunction," *J. Biol. Chem.*, vol. 280, no. 28, pp. 26185–26192, 2005.
- [19] H. Chen, J. M. McCaffery, and D. C. Chan, "Mitochondrial Fusion Protects against Neurodegeneration in the Cerebellum," *Cell*, vol. 130, no. 3, pp. 548–562, 2007.

- [20] F. Xie, P. Xiao, D. Chen, L. Xu, and B. Zhang, “miRDeepFinder: a miRNA analysis tool for deep sequencing of plant small RNAs,” *Plant Mol. Biol.*, vol. 80, no. 1, pp. 75–84, 2012.
- [21] J. Vandesompele, K. De Preter, F. Pattyn, and B. Poppe, “GeNorm software manual,” *Last Updat. March*, pp. 1–16, 2007.
- [22] M. Hisaoka, S. Tsuji, Y. Morimitsu, H. Hashimoto, S. Shimajiri, S. Komiya, and M. Ushijima, “Molecular detection of EWS-FLI1 chimeric transcripts in Ewing family tumors by nested reverse transcription-polymerase chain reaction: application to archival paraffin-embedded tumor tissues,” *APMIS*, vol. 107, no. 6, pp. 577–584, Jun. 1999.
- [23] A. Olichon, G. Elachouri, L. Baricault, C. Delettre, P. Belenguer, and G. Lenaers, “OPA1 alternate splicing uncouples an evolutionary conserved function in mitochondrial fusion from a vertebrate restricted function in apoptosis,” *Cell Death Differ.*, vol. 14, no. 4, pp. 682–92, 2007.
- [24] N. Masuda, T. Ohnishi, S. Kawamoto, M. Monden, and K. Okubo, “Analysis of chemical modification of RNA from formalin-fixed samples and optimization of molecular biology applications for such samples,” *Nucleic Acids Res.*, vol. 27, no. 22, pp. 4436–4443, Nov. 1999.
- [25] Z. Song, H. Chen, M. Fiket, C. Alexander, and D. C. Chan, “OPA1 processing controls mitochondrial fusion and is regulated by mRNA splicing, membrane potential, and Yme1L,” *J. Cell Biol.*, vol. 178, no. 5, pp. 749–755, 2007.
- [26] R. Anand, T. Wai, M. J. Baker, N. Kladt, A. C. Schauss, E. Rugarli, and T. Langer, “The i-AAA protease YME1L and OMA1 cleave OPA1 to balance mitochondrial fusion and fission,” *J. Cell Biol.*, vol. 204, no. 6, pp. 919–929, 2014.
- [27] S. Syuing and C. Don, “TDP-43 toxicity : the usefulness of ‘ junk ,” *Nat. Genet.*, vol. 44, no. 12, pp. 1289–1291, 2012.
- [28] C. M. Hindson, J. R. Chevillet, H. A. Briggs, E. N. Gallichotte, I. K. Ruf, B. J. Hindson, R. L. Vessella, and M. Tewari, “Absolute quantification by droplet digital PCR versus analog real-time PCR,” *Nat. Methods*, vol. 10, no. 10, pp. 1003–1005, 2013.
- [29] E. Thompson, A. D. Burt, C. E. Barker, J. a Kirby, and J. G. Brain, “Development of a robust protocol for gene expression analysis using

formalin-fixed, paraffin-embedded liver transplant biopsy specimens.,” *J. Clin. Pathol.*, vol. 66, no. 9, pp. 815–8, Sep. 2013.

- [30] Z. Wang, J. a. Lebron, and J. J. Wolf, “Reliable quantification of mRNA in archived formalin-fixed tissue with or without paraffin embedding,” *J. Pharmacol. Toxicol. Methods*, vol. 71, pp. 103–109, 2015.
- [31] Y. Fujita, Y. Mizuno, M. Takatama, and K. Okamoto, “Anterior horn cells with abnormal TDP-43 immunoreactivities show fragmentation of the Golgi apparatus in ALS,” *J. Neurol. Sci.*, vol. 269, no. 1–2, pp. 30–34, 2008.

図表説明

図1 TDP-43 siRNA の抑制条件下でのミトコンドリア形態に関わるタンパク質の変化 (A) TDP-43 発現抑制時のミトコンドリア形態関連タンパク質のウエスタンブロッティング。HEK293T 細胞播種後 24 時間および 72 時間後に、コントロール siRNA (左) もしくは TDP-43 siRNA (右) を導入し、さらに 24 時間後に細胞を回収した。得られた細胞溶解液を用い TDP-43、および、ミトコンドリア形態に関わるタンパク質 (OPA1、Mfn2、DRP1、FIS1) をウエスタンブロット法にて検討した。MAGOH は内在性コントロールとして用いた。各々 5 回行った結果を示す。番号は各々の実験の番号を示す。(B) OPA1 のウエスタンブロッティング。代表的な 2 レーンを拡大して示す (A の四角で囲った部位)。コントロール siRNA (左)、TDP-43 siRNA (右)。(C) OPA1 のタンパク質量の定量解析。OPA1 95、92、88、84、81 kDa の各バンドの発現量を、MAGOH の値で補正し、コントロール siRNA 条件下での各バンドの値を 1 とした時の TDP-43 siRNA 処理下での各バンドの値を示す (n=5 ; 平均値±標準誤差)。2 群間比較は Student-T 検定法にて行った (* : p<0.05)。

図2 TDP-43 発現抑制時のミトコンドリアの形態変化 (A) TDP-43 発現抑制時のミトコンドリアの断片化。HEK293T 細胞にコントロール siRNA (左) もしくは TDP-43 siRNA (右) を 2 回導入後、Mitotracker™にて、生細胞下でミトコンドリアを可視化し、共焦点顕微鏡にて撮影した。代表的な画像を示す。(B) ミトコンドリア形態の定量的解析。1 細胞中のミトコンドリアの数と長さを計測し、長さ 30 ピクセル以上のミトコンドリアの数を全ミトコンドリアの数で除し tubular ratio とした (n=20 ; 平均値±標準誤差)。2 群間比較は Student-T 検定法にて行った (* : p<0.05)。

図3 TDP-43 発現抑制時の、OPA1 切断関連タンパク質および OPA1 mRNA 前駆体のスプライシングの検討 (A) OPA1 の mRNA のスプライシングとタンパク質切断の模式図。箱は OPA1 のエクソン 3、4、4 b、5、5 b、6 を示す。谷線はスプライシングを示す。OMA1 はエクソン 5 内で、Yme1L はエクソン 5 b 内で OPA1 タンパク質を切断する[25]。黒下矢印は切断部位を示す。5 種類の大きさ (95、92、88、84、81 kDa) の C 末断片が産生される。各々のスプライシング多様体から形成される断片の大きさを右に示す。(B) TDP-43 発現抑制時の OPA1 切断タンパク質のウエスタンブロッティング。HEK293 細胞にて TDP-43 もしくはコントロール siRNA を 2 回導入した細胞溶解液を用い検討した。各発現量を、MAGOH の値で補正し、コントロール siRNA 条件下での各バンドの値を 1 とした時の TDP-43 siRNA 処理下での各バンドの値は Yme1L 1.22±0.19 (平均値±標準誤差; n=5)

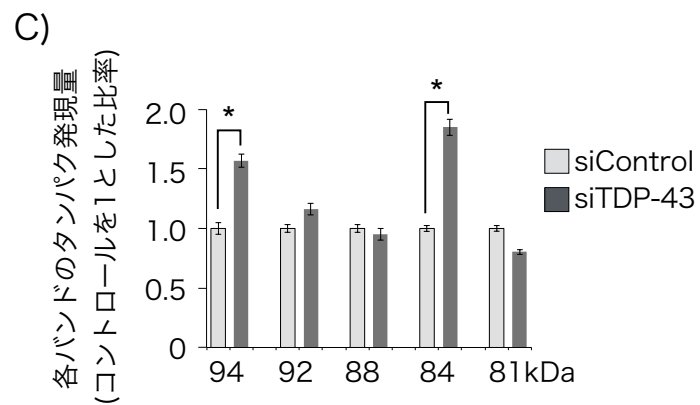
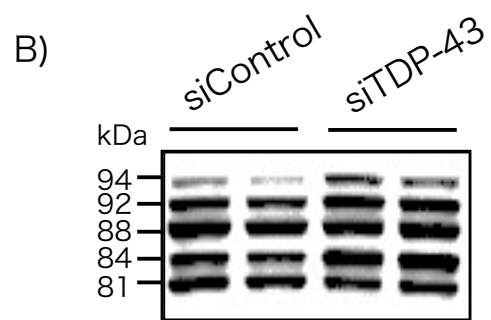
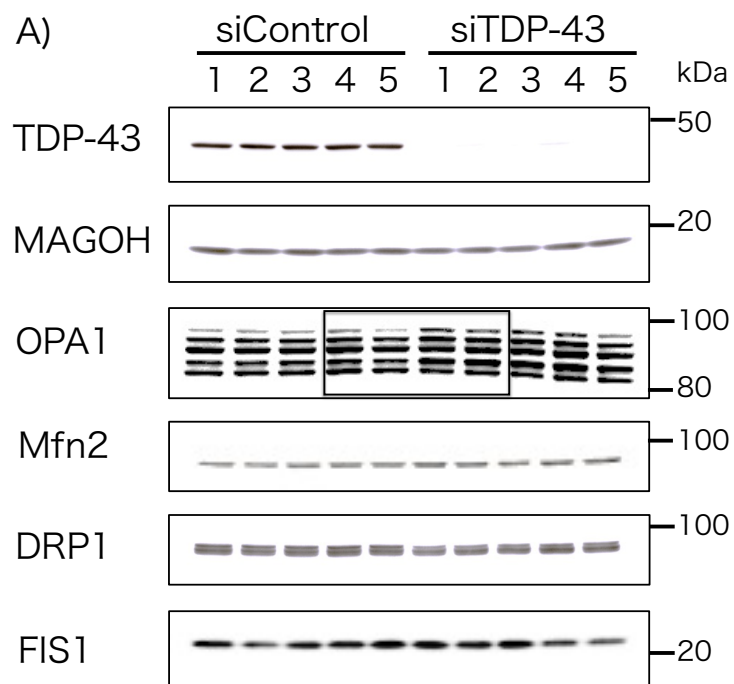
および OMA1 1.15 ± 0.06 (平均値 \pm 標準誤差 ; $n=5$) であり、コントロール siRNA 処理群と比して差がなかった。(C) OPA1 スプライシング多様体 mRNA の定量解析。TDP-43 もしくはコントロール siRNA を導入した細胞から mRNA を抽出し、スプライシング多様体 1、5、7、8 を定量 PCR 法により検討した。グラフは、コントロール群を 1 とした時の TDP-43 siRNA 処置群での各多様体の発現量をしめす($n=3$; 平均値 \pm 標準誤差)。2 群間比較は Student-T 検定法にて行った(* : $p<0.05$)。(D-F) OPA1 各エクソンを持つ mRNA の定量解析。OPA1 エクソン 4、4b、5b、6-7 の発現量を ddPCR 法にて測定し、エクソン 4、4b、5b 各々の値をエクソン 6-7 の値で除し、OPA1 mRNA の中で、エクソン 4 (D)、4b (E)、5b (F) を持つ mRNA の割合を算出した($n=5$; 平均値 \pm 標準誤差)。2 群間比較は Student-T 検定法にて行った (* : $p<0.05$)。

図 4 OPA1 スプライシング多様体 8 強制発現時のミトコンドリア形態の検討 (A) OPA1 スプライシング多様体 8 発現による 84 kDa バンドの増加。OPA1 スプライシング多様体 8 の発現プラスミドベクターを HEK293T 細胞に遺伝子導入し 48 時間後に細胞を回収し、抗 OPA1 抗体によるウエスタンブロッティングを行った。EV: empty vector ; V8 : OPA1 スプライシング多様体 8 発現プラスミドベクター。(B) OPA1 スプライシング多様体 8 発現時のミトコンドリアの形態。導入後 Mitotracker™にてミトコンドリアを可視化し、共焦点顕微鏡で撮像した。コントロールとして empty vector を導入した細胞 (左)、OPA1 スプライシング多様体 8 を導入した細胞 (右)。(C) OPA1 スプライシング多様体 8 発現時のミトコンドリア形態の定量解析。各々の条件下で tubular ratio (一細胞中の一個あたり 30 ピクセル以上のミトコンドリアの数の割合) を算出した ($n=16$; 平均値 \pm 標準誤差)。2 群間比較は Student-T 検定法にて行った (* : $p<0.05$)。

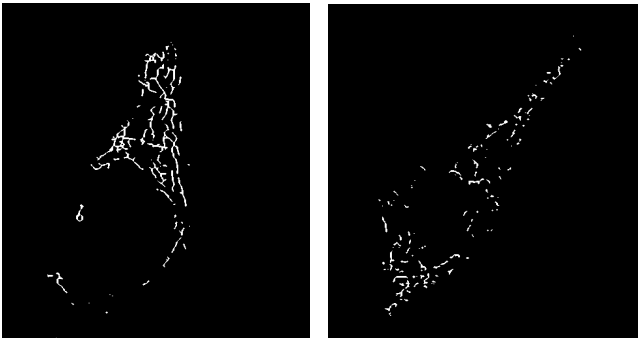
図 5 ヒト脊髄組織標本を用いた OPA1 mRNA の定量解析 (A)レーザーマイクロダイセクション法による運動神経細胞の単離。ヒト脊髄 Cresyl violet 染色標本にて、大きさ、場所、形から運動神経細胞を選択し、レーザーマイクロダイセクション法にて回収した。運動神経細胞を切り出した前後の像を示す。(B) 増幅産物の長さによる mRNA 検出感度の検討。25 細胞相当の total RNA から cDNA を作成し、droplet digital PCR システム (QX200 ; BioRad) を用い、OPA1 mRNA の検出を行った。OPA1 エクソン 6-7 に対し PCR 長を 51 bp および 108 bp に設定した。3 例の検出結果を示す。縦軸に蛍光強度、横軸に各 droplet を示す。10000 蛍光強度より強い蛍光強度が得られた droplet を陽性とした。PCR 長が 108 bp では殆ど陽性を示さないのに対し、PCR 長 51 bp では多数の陽性を示す droplet を認める。

図 6 ヒト脊髄運動神経細胞における OPA1 mRNA エクソン 4b 発現量の検討 ヒト脊髄 FFPE 標本由来の運動神経細胞 25 細胞から作成した cDNA を用い、ddPCR を用いて OPA1 mRNA エクソン 6-7 および OPA1 mRNA エクソン 4b の発現量を定量した。エクソン 4b の値をエクソン 6-7 の値で除した値を示す (n=4; 平均値±標準誤差)。2 群間比較は Student-T 検定法にて行った。

図1



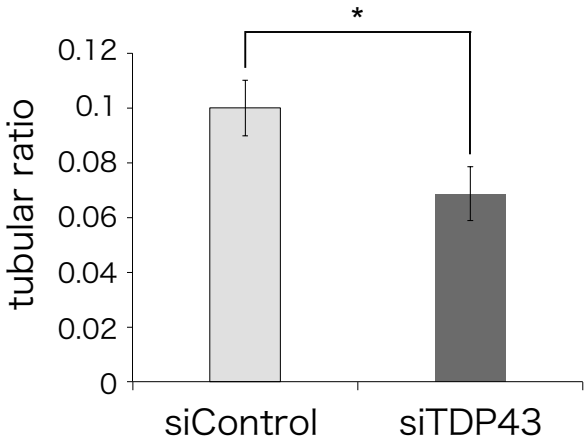
A)

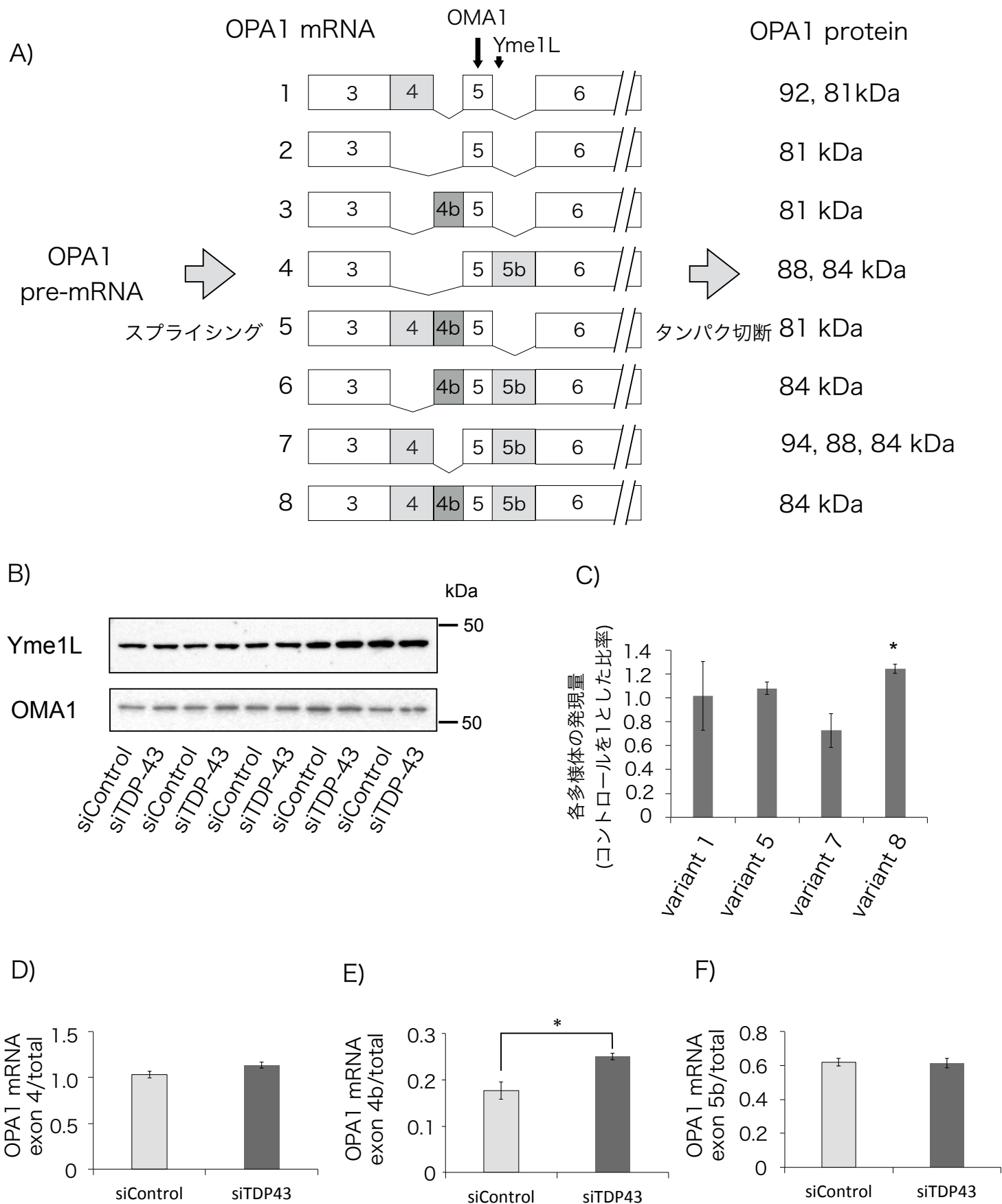


siControl

siTDP43

B)



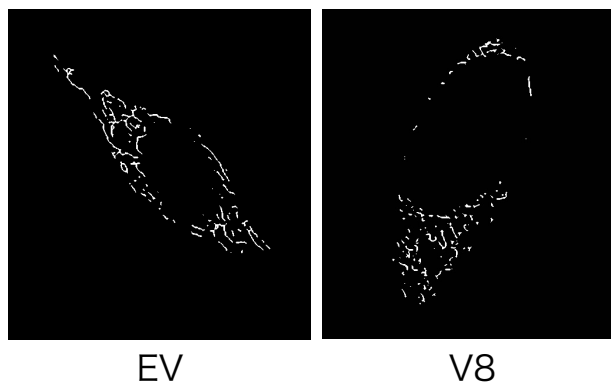


4

A)



B)



C)

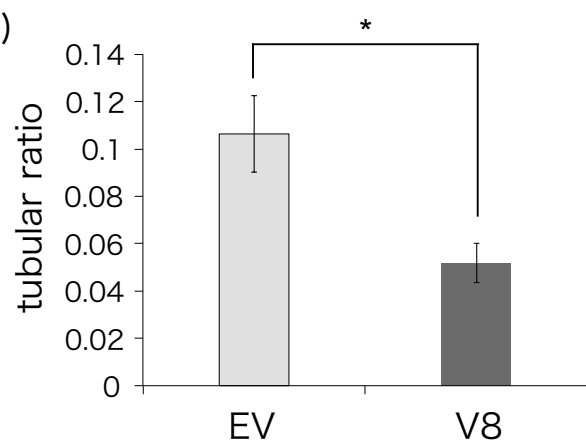
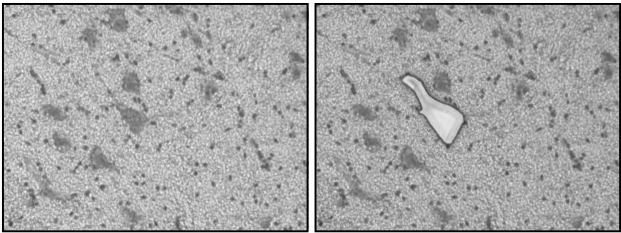


図5

A)



切り出し前

切り出し後

B)

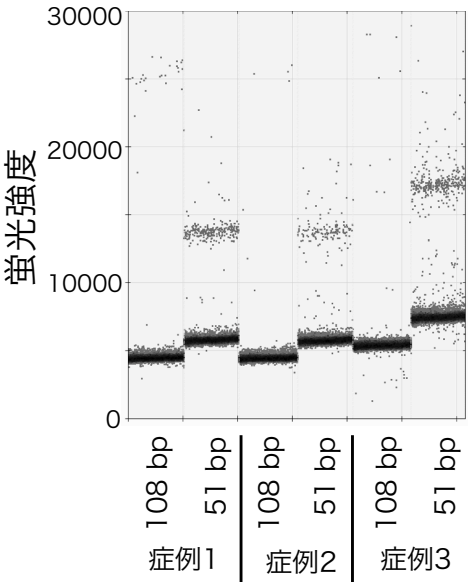


Figure 6

