

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 4 月 22 日現在

機関番号：14401

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2013～2014

課題番号：25670419

研究課題名(和文) ALS発症病態に関与する新規TDP-43分解制御機構の同定への挑戦

研究課題名(英文) The biological significance of the cleavage of ALS-associated protein TDP-43

## 研究代表者

河原 行郎 (KAWAHARA, Yukio)

大阪大学・医学(系)研究科(研究院)・教授

研究者番号：80542563

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：筋萎縮性側索硬化症(ALS)などでは、TDP-43が断片化などの修飾を受け、変性神経細胞内に蓄積している。中でも、約25kDaのC末端断片(CTF25)の蓄積が顕著である。しかし、正確な切断点、切断酵素、切断の生物学的意義の詳細については不明であった。本研究では、小胞体に局在するカスパーゼ4が、174番目のアスパラギン酸残基を認識・切断することによりCTF25が産生されることを明らかにした。本切断は、TDP-43のクリアランス開始のシグナルとなっており、この切断を阻止すると、クリアランス速度が著しく遅くなり、過剰となった完全長TDP-43を介して、細胞死が増悪することも明らかにした。

研究成果の概要(英文)：TDP-43 and its C-terminal fragment of 25 kDa (CTF25) play critical roles in amyotrophic lateral sclerosis and frontotemporal lobar degeneration. Although overexpression of TDP-43 in cultured cells and animals results in the production of CTF25, the cleavage site that generates CTF25 and biological significance of the cleavage remain undetermined. In this study, we identify Asp174 as a predominant cleavage site for CTF25. TDP-43 is cleaved initially after Asp174, which activates caspase-3/7 to accelerate TDP-43 fragmentation. Consequently, blockage of this cleavage results in a severe delay in TDP-43 clearance and prolonged necrotic cell death. We further show that endoplasmic reticulum membrane-bound caspase-4 is the enzyme responsible for the cleavage after Asp174 and inhibition of caspase-4 activity slows TDP-43 fragmentation and reduces cell viability. These findings suggest that caspase-4-mediated cleavage after Asp174 is an initiator of TDP-43 clearance.

研究分野：神経内科

キーワード：脳神経疾患 ポトーシス 筋萎縮性側索硬化症 痴呆 カスパーゼ 細胞死 前頭側頭葉変性症 ネクローシス ア

## 1. 研究開始当初の背景

筋萎縮性側索硬化症 (ALS) は、上位および下位の運動ニューロンが選択的に変性し、全身の筋力が低下していく神経難病である。ALS は、中年以降に発症するケースが多く、一端発症すると進行は早く、多くは数年で呼吸不全に至る。明らかな遺伝性を示すケースは全体の1割程度で、多くは孤発性である。1年間の新規発症者は、人口10万人あたり1人程度で、本邦では9000人弱の患者が存在する。依然として根治療法はない。2006年以前には、遺伝性ALSの原因としてSOD1やALS2/Alsinなどが同定されたが、その数は限られていた上、これらがALSの大部分を占める孤発性とどこまで発症メカニズムが同じなのかという議論も絶えなかった。しかし、2006年にTDP-43と呼ばれる43kDaのRNA結合蛋白質が、ALSと前頭側頭葉変性症 (FTLD) と呼ばれる痴呆性疾患における変性ニューロン中の細胞質封入体に、ユビキチン化、異常リン酸化、断片化などの修飾を受けて蓄積していることが発見された (Neumann et al, Science, 2006; Arai et al, BBRC, 2006)。このTDP-43の蓄積は、孤発性を含む大部分のALSに認められる病理像であったことから、遺伝性・孤独性ALSに共通した鍵分子として認識されるようになった。さらに、この発見からまもなく、頻度は極めて稀ながら、ALSとFTLDの一部に、TDP-43をコードした*TARDBP* 遺伝子の点変異が同定されたことから、TDP-43がALSやFTLDの疾患病態に深く関連していることが確実となった (Sreedharan et al, Science, 2008; Kabashi et al, Nat Genet, 2008) (図1)。このため、ALSとFTLDの一部は1つの疾患スペクトラムとして捉えられるようになり、特にTDP-43陽性封入体を伴うケースは、TDP-43 proteinopathy と呼ばれるようになった。

TDP-43は、414アミノ酸から構成され、2つのRNA結合モチーフ (RRM1 (aa 104-176) と RRM2 (aa 191-262)) とグリシンに富んだC末端ドメイン (glycine-rich domain (GRD)) から構成され (Da Cruz et al, Curr Opin Neurobiol, 2011; Janssens et al, Hum Mol Genet, 2013) (図1)。ALSやFTLDで同定されている点変異は、そのほとんどがGRDを含むC末端側にあるが、D169GだけがRRM1中に存在している (Sreedharan et al, Science, 2008; Kabashi et al, Nat Genet, 2008) (図1)。これらの点変異が、どのように神経変性を誘導するのかの詳細は不明であるが、TDP-43の機能よりも構造への影響が高いと考えられており、安定性を高め、分解されにくくなることが報告されている (Ling et al, PNAS, 2010; Watanabe et al, JBC, 2013)。

TDP-43は、広範な組織に発現しており、ノックアウトマウスは胎生致死を呈することから、細胞の生存に不可欠な役割を担っている (Wu et al, Genesis, 2010)。その主要な局在は核だが、ALSやFTLDでは、核から消失し、細胞質封入体に蓄積している (Neumann et al, Science, 2006; Arai et al, BBRC, 2006)。この蓄積したTDP-43は、完全長のものや幾つかの稀なC末端断片 (CTF) に加え、約25kDaのC末端断片 (CTF25) が特徴的に蓄積している。このため、蓄積したCTFが細胞毒性を獲得することによって細胞死が誘導されるという考え方がある (Nonaka et al, Hum Mol Genet, 2009)。しかし一方で、細胞死は、不溶化したCTF量よりも、完全長TDP-43の発現量に相関するという意見もある。例えば、ALSで同定されている点変異は、TDP-43を分解されにくくし、各点変異による半減期延長の程度とALS発症時期には相関があることや、人工的にTDP-43の安定性を高めると、培養細胞における細胞毒性が増すことが報

告されている (Watanabe et al, JBC, 2013)。また、野生型ヒトTDP-43を過剰発現するトランスジェニックマウス (Tg) マウスはALS様症状を呈し、TDP-43の発現量が多いものほど重篤化する (Wils et al, PNAS, 2010)。更に、完全長ヒトTDP-43をショウジョウバエの眼に発現させると神経変性が誘導されるが、CTFだけを発現させても誘導されない (Li et al, PNAS, 2010)。これらの事実から、CTFを産み出す断片化メカニズムを含めて、TDP-43がどのようにクリアランスされるのかを明らかにすることは、ALSやFTLDの病態解明の鍵を握っていると言える。

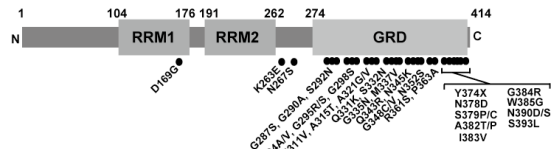


図1 TDP-43の構造と疾患関連点変異 TDP-43は、2つのRNA結合モチーフ (RRM1, RRM2) とグリシンに富んだ領域 (GRD) からなる。ALSやFTLDで同定されている点変異のほとんどは、D169G点変異を除いて、C末端領域に集中している。

これまで、FTLD患者の剖検脳を用いて、CTFの切断点が同定されており、Arg208、Asp219、Asp247などが報告されている (Igaz et al, JBC, 2009; Nonaka et al, Hum Mol Genet, 2009)。しかし、これらのアミノ酸で切断された場合のCTFは、25kDaよりも小さいと予想されることから、ALSやFTLDで観察される不溶性CTF25はこれとは異なる部位で切断されていると考えられている。

一方、TDP-43を培養細胞に過剰発現した場合や、TDP-43を過剰に発現するTgマウスでは、35kDaのC末端断片 (CTF35) とCTF25が観察される (Zhang et al, J Neurosci, 2007; Nishimoto et al, JBC, 2010; Wils et al, PNAS, 2010; Suzuki et al, JBC, 2011)。N末端断片 (NTF) は急速に分解されるが、CTFは不溶化しやすく、完全長TDP-43を巻き込んで、凝集体を形成する。CTF35については、カスパーゼ3,7によって、カスパーゼ認識モチーフ中にある89番目のアスパラギン酸 (D89) の後ろが切断されることによって産生されると考えられている (Zhang et al, J Neurosci, 2007; Nishimoto et al, JBC, 2010; Suzuki et al, JBC, 2011; De Marco et al, Biochem Biophys Acta, 2014)。一方、CTF25の産生量が、CTF35に比べて少量であることから、CTF25は、カスパーゼ3,7による比較的マイナーな部位の切断によって産生されると予想されてきた。これまでに、D219がその候補として挙げられているが、本部位で切断された場合のCTFは25kDaより小さい (Zhang et al, J Neurosci, 2007; Furukawa et al, Biochem Biophys Acta, 2011; De Marco et al, Biochem Biophys Acta, 2014)。また、D169もその候補として報告されているが、D169E点変異挿入は、CTF25の産生を完全には抑制できないことから、別の切断部位の存在も示唆されている (Suzuki et al, JBC, 2011)。更に、カスパーゼ3をノックアウトしても、CTF25の産生を抑制できないことから、CTF25の少なくとも一部は、カスパーゼ3非依存的に産生されると考えられる (Nishimoto et al, JBC, 2010)。したがって、研究開始時点において、CTF25の正確な切断点、切断を担う責任酵素は確定しておらず、更に断片が生じる生理的意義についても未解決であった。

## 2. 研究の目的

本研究では、CTF25の切断点や切断を担う責

任酵素を同定し、TDP-43 断片化の生理的・病理的意義を明らかにすることによって、ALS 病態解明への突破口となる分子基盤情報を確立することを目的とした。

### 3. 研究の方法

**①TDP-43 断片の切断点の同定:** TDP-43 の N 末端側に SNAP-tag、C 末端側に HaloTag を付加した SNAP-TDP-43-Halo の発現ベクターを作成し、ドキシサイクリン (Dox) 添加時のみ発現する安定発現細胞株を樹立した。細胞株は、ヒト骨肉腫由来の U2OS 細胞を用いた。本細胞株に Dox を添加し、誘導発現した SNAP-TDP-43-Halo の断片を回収し、エドマン法によるアミノ酸シークエンス法を用いて決定した。次に、切断点から責任酵素を推定し、*in vitro* の切断アッセイを行って、候補を絞りこんだ。また、*in vivo* での活性の有無をウエスタンブロット法で確認した。また、切断点に点変異を挿入した場合や責任酵素のインヒビターを添加した場合に、責任酵素の活性や切断パターンがどのように変化するかもウエスタンブロット法で確認した。

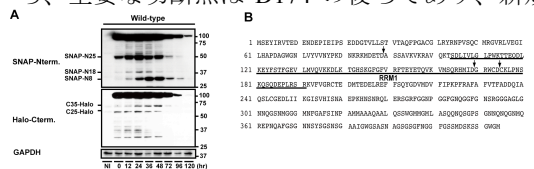
**②イメージングによる TDP-43 代謝経路の同定:** 25kDa 断片などの TDP-43 断片が細胞内のどのようなオルガネラで産生または輸送されるのかをイメージングにより解析した。具体的には、SNAP-TDP-43-Halo および切断点に点変異を挿入した変異型ベクターの安定発現細胞株を U2OS 細胞を使って樹立した。Dox 添加により発現誘導後、30 分だけ SNAP タグと Halo タグを染色し、共焦点顕微鏡を用いて両タグの局在について経時的に観察した。染色直後は両タグの局在は完全に重なるはずだが、TDP-43 の切断が生じ 25kDa 断片が産生・輸送されれば、Halo タグだけが検出される場所が出てくるものと予想し、観察した。この場所を、様々なオルガネラマーカーを使って特定した。

**③細胞死の評価:** TDP-43 の発現が一過性に上昇した際にどの程度細胞死が誘導されるか WST-8 アッセイ法で定量評価した。この評価法では細胞死と増殖抑制が区別できないため、細胞外に放出された LDH も合わせて定量し、細胞死かどうかを確認した。また、アポトーシスとネクロトーシスの区別をするため、FITC-Annexin V と EthD-III で共染色し、蛍光顕微鏡を用いて、染色性の有無を確認した。

### 4. 研究成果

**①TDP-43 の断片化パターンと切断点の解析:** TDP-43 が発現後、どのように分解していくのか、その代謝メカニズムを解析するため、TDP-43 の N 末端側に SNAP-tag、C 末端側に HaloTag を付加した SNAP-TDP-43-Halo の発現ベクターを作成し、これを用いて、ドキシサイクリン (Dox) 添加時のみ発現する安定発現細胞株を樹立した。細胞株は、ヒト骨肉腫由来の U2OS 細胞を用いた。本細胞株に Dox を 24 時間のみ添加し、この間に誘導発現した SNAP-TDP-43-Halo がどのように代謝されるのかを、誘導後 120 時間まで観察した。抗 SNAP 抗体を用いた N 末端側と、抗 Halo 抗体を用いた C 末端側に対するウエスタンブロット解析では、120 時間後には、完全長の SNAP-TDP-43-Halo はほぼ観察されず、TDP-43 の寿命が最長でも 120 時間前後であることが示唆された (図 2A)。また、この間、3 つの N 末端断片 (NTF) が観察され、推定される分子量から、それぞれを SNAP-N25、-N18、-N8 と命名した (図 2A)。一方、C 末端断片 (CTF) については 2 つ観察され、推定される分子量から、それぞれを C35-Halo、C25-Halo と命名した (図 2A)。次に、エドマン法によるアミノ酸シークエンス法

を用いて、2 つの CTF の N 末端の同定を試みた。本手法は、蛋白質の N 末端側から 1 つずつアミノ酸を決定していく手法であるため、NTF の C 末端の同定には応用できない。また、クマシーブリリアントブルー (CBB) 染色で可視できる程度の量が確保できないと、解析が困難となる。このため、72 時間 Dox 添加によって SNAP-TDP-43-Halo を誘導した細胞を大量に調整し、CTF を HaloTag を用いて沈降を繰り返した。これらを更に濃縮後、電気泳動し、CBB 染色を行った。この結果、CTF35、CTF25 とともに可視できたので、これらのバンドを切り出し、シークエンスを行った。この結果、C35-Halo の切断点は、既報 (Zhang et al, J Neurosci, 2007) 通り 89 番目のアスパラギン酸 (D89) の後ろで切断されていた (図 2B)。一方、C25-Halo については、切断点が二カ所あると考えられた。このうち、主要な切断点は D174 の後ろであり、新規



**図 2 断片化 TDP-43 の切断点の同定** A: SNAP-TDP-43-Halo を Dox 添加により 24 時間誘導発現し、その後の分解過程を経時的に観察した。N 末端側を抗 SNAP 抗体、C 末端側を抗 Halo 抗体でウエスタンブロット解析した。N 末端側には 3 つの断片が観察され (SNAP-N25、-N18、-N8)、C 末端側には 2 つの断片が観察された (C35-Halo、C25-Halo)。NI; 発現誘導前 B: TDP-43 のアミノ酸配列と、同定された切断点を矢印で示した。

の切断点と考えられた (図 2B)。もう一つは、既報の D169 の後ろであった (Suzuki et al, JBC, 2011) (図 2B)。興味深いことに、本アミノ酸残基には、D169G という点変異が家族性 ALS で同定されている (Kabashi et al, Nat Genet, 2008)。

これまで CTF25 は、CTF35 の産生と同時に、より稀な部位で切断されて産生されると考えられてきた。しかし本解析では、CTF25 は SNAP-TDP-43-Halo 誘導直後から観察されるのに対し、CTF35 が観察されるのは誘導 24 時間後であった (図 2A)。また、NTF についても同様に、NTF18の方が NTF8 よりも早期に観察され、その後早期に消失する。このパターンは CTF25 と同じである (図 2A)。したがって、CTF25 の少なくとも一部は、CTF35 を産生するメカニズムとは独立に産生され、かつ CTF35 より早期に産生されることを示唆している。

**②TDP-43 のクリアランスは、D174 での切断によって開始される:** 同定された CTF の 3 つの切断点における切断がどのような生理的意義を持つのかを解析するため、野生型と同様に、Dox 添加により一過性に単一点変異型 SNAP-TDP-43-Halo (D89E、D169G または D174A) を発現する安定細胞株を U2OS 細胞を用いて樹立した。D89E 点変異挿入は、CTF35 の産生を完全に抑制した (図 3A)。しかし、CTF25 の早期出現には影響しなかった。また、D89 での切断を抑制しているにもかかわらず、SNAP-TDP-43-Halo のクリアランス速度は、野生型より有意に早まった (図 3C)。この結果は、CTF35 を産み出す機構が、TDP-43 のクリアランスには必ずしも必要ではないことを示唆していると考えられた。

次に D169G 点変異について解析した。本変異の挿入は、CTF35 や CTF25 の出現時間にはほとんど影響しなかった (図 3A)。しかし、誘導後 24 時間の CTF25 の産生量は野生型と比較し



て低下しており、また SNAP-TDP-43-Halo のクリアランス速度は、中等度に低下した (図 3C)。一方、D174A 点変異は、CTF25 の産生を著明に低下させ、誘導後 96 時間の SNAP-TDP-43-Halo は、90%以上残存していた (図 3A, 3C)。これらの結果から、CTF25 の主要な切断点は D174 であり、特に誘導発現後、初期的に認められる CTF25 については D174 で切断されていると考えられた。一方で、D169 での切断は、誘導発現後、後期に少量生じていると考えられた。また、特に D174 での切断は、TDP-43 のクリアランス開始に必要な不可欠だと考えられた。

次に、上記の結果を更に確認するため、Dox 添加により一過性に二重点変異型 SNAP-TDP-43-Halo (D89E/D169G, D89E/D174A または D169G/D174A) を発現する安定細胞株を樹立した。D89E/D169G 二重点変異挿入は、CTF35 の産生を抑制したが、CTF25 の出現時間には影響しなかった (図 3B)。これに伴い、SNAP-TDP-43-Halo のクリアランス速度も、野生型と比較して有意差を認めなかった (図 3C)。一方、D89E/D174A 二重点変異挿入は、CTF25 と CTF35 の両方の著明な産生を抑制した (図 3B)。また、SNAP-TDP-43-Halo のクリアランス速度は、著しく低下した (図 3C)。更に、D169G/D174A 二重点変異挿入は、CTF25 の産生を完全に抑制し、一方で CTF35 の産生量を増加させた (図 3B)。これに伴って、SNAP-TDP-43-Halo のクリアランス速度は、著しく低下した (図 3C)。これらの結果は、D89

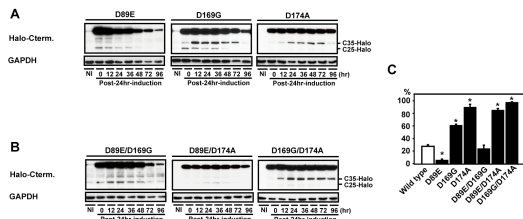


図 3 切断点に挿入した点変異が、TDP-43 の断片化とクリアランスに与える影響 A: 切断点に単一点変異を挿入した SNAP-TDP-43-Halo を 24 時間誘導発現し、その後の分解過程を C 末端側から経時的に観察した。B: 切断点に二重点変異を挿入した SNAP-TDP-43-Halo を 24 時間誘導発現し、その後の分解過程を C 末端側から経時的に観察した。C: 各 SNAP-TDP-43-Halo の発現誘導後 96 時間における相対的残存量を定量した (\*p<0.05; n=3-6)。

での切断は、TDP-43 のクリアランスに必要な不可欠ではないこと、CTF25 の主要な切断点が D174 であること、D174 での切断が TDP-43 のクリアランス開始に必要なこと、特に誘導発現後早期の D174 での切断は、CTF35 の産生メカニズムとは別のメカニズムによることを裏付けていると考えられた。

③CTF の不溶化・リン酸化は、TDP-43 代謝の最終段階で生じる: CTF は、不溶化しやすく、リン酸化などの修飾を受けることが知られている。これら修飾の経時変化を解析するため、野生型 SNAP-TDP-43-Halo を 24 時間発現誘導後、120 時間後までの各時間帯で細胞を回収し、detergent への溶解性に基づき 4 分画した (TS buffer 可溶、Triton X-100 可溶、Sarkosyl 可溶、そして Sarkosyl 不溶) (Nonaka et al, Hum Mol Genet, 2009)。まず NTF は、ほとんどが TS buffer 可溶化分画にのみ認められ、不溶化しにくいことが確かめられた。一方、CTF については、CTF35 と CTF25 の両方とも、発現誘導後 36 時間から Sarkosyl 不溶化分画に検出され、72 時間後にピークに達し、その後 120 時間後までに消失した。リン酸化 TDP-43 のみを検出する

抗体を用いて解析を行ったところ、リン酸化 CTF は、Sarkosyl 不溶化分画にのみ検出され、72 時間後から出現した。したがって TDP-43 は、断片化→CTF の不溶化 (36 時間後から)→CTF のリン酸化 (72 時間後から) という流れで代謝されていることが明らかとなった。

④一過性過剰量の TDP-43 による細胞死は、CTF の不溶化前から生じる: 次に、24 時間誘導発現した SNAP-TDP-43-Halo によって、いつからどの程度細胞死が誘導されるのかを定量評価した。野生型の場合、誘導発現後 24 時間で有意な細胞死増加が観察された (図 4)。更に 48 時間後には、細胞生存率は約 70%まで低下し、その後 96 時間後には、対照と有意差のないレベ

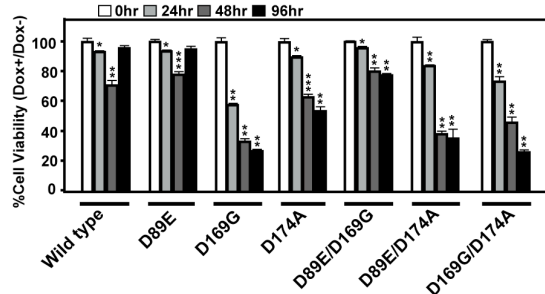


図 4 過剰な TDP-43 によって誘導される細胞死 野生型および点変異型の SNAP-TDP-43-Halo を 24 時間誘導発現し、その後経時的に細胞生存率を定量した (\*p<0.05, \*\*p<0.01, \*\*\*p<0.001; n=5-11)。

ルまで回復した。この結果は、細胞死は CTF が不溶化する前から生じており、また、不溶化した CTF が消失する前に回復することを示唆している。

D89E 点変異を挿入すると、野生型と比べて若干細胞死の程度は軽減し、これは SNAP-TDP-43-Halo のクリアランス速度が早まることと相関していると考えられた (図 3C, 4)。一方、D174A 点変異を挿入すると、単一であっても、D89E や D169G との二重点変異であっても、早期から強い細胞死が観察され、96 時間後も回復することなく遷延した (図 4)。この結果は、D174A 点変異によって、SNAP-TDP-43-Halo のクリアランス速度が著明に低下することと相関していると考えられた。また、細胞死は、SNAP-TDP-43-Halo の残存量に依存しており、CTF の量や不溶化の程度とは相関しなかった。興味深いことに、D169G 点変異は、中等度に SNAP-TDP-43-Halo のクリアランス速度を低下させるが、一方で非常に強く遷延する細胞死が観察された (図 4)。

⑤TDP-43 の初期切断を触媒する責任酵素は、カスパーゼ 4 である: 同定された 3 つの切断点は、すべてアスパラギン酸の後ろであること、アスパラギン酸に点変異を挿入すると切断が阻止されることから、これらの切断はカスパーゼによって触媒されていると予想された。しかし、D174 の周囲には、カスパーゼ 3 やカスパーゼ 7 などが認識するモチーフ配列が見いだせないことから、バイアスをかけずに、ヒトカスパーゼ 1-10 を用いて in vitro 系で切断アッセイを行った。TDP-43 を in vitro 翻訳によって合成後、各カスパーゼと混合し、その後切断パターンを解析した。その結果、カスパーゼ 3, 4, 6, 7, 8, 9, 10 で切断した場合に、CTF35 が観察された (図 5A)。活性はカスパーゼ 6, 7 が最も強かった。一方で、D89E 点変異を持つ TDP-43 の場合、すべてのカスパーゼによる CTF35 産生が抑制されたことから、CTF35 はカスパーゼによる D89

の切断によって産生されていることが確かめられた (図 5A)。ウエスタンブロット解析したメンブレンを長時間フィルムに焼き付けたところ、

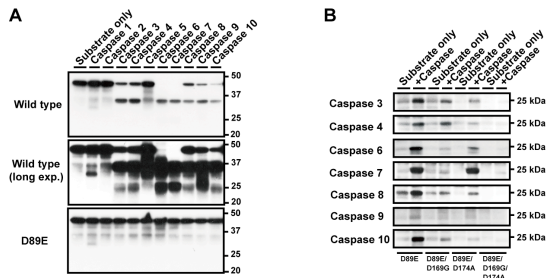


図 5 カスパーゼによる TDP-43 の *in vitro* 切断アッセイ A: 野生型および D89E 点変異型 TDP-43 を *in vitro* 翻訳による合成後、各カスパーゼによる切断アッセイを行った。Long exp.: 長時間フィルムに露光したもの。B: 各点変異型 TDP-43 に対して、カスパーゼで切断アッセイを行い、CTF25 の有無を解析した。

カスパーゼ 3, 4, 6, 7, 8, 10 と混合した場合に CTF25 が検出された (図 5A)。カスパーゼ 9 も不明瞭ながら切断する可能性が示唆された。このため、カスパーゼ 9 を含む 7 種類のカスパーゼについて、CTF25 の切断点について更に詳細に解析した。D89E 点変異挿入はこれらカスパーゼによる CTF25 産生に影響しなかったが、D89E/D169G/D174A 三重変異挿入は、CTF25 の産生を完全に抑制した (図 5B)。この結果から、カスパーゼは D169 か D174 のいずれかを認識し、切断していると考えられた。このため、D89E/D169G 二重点変異を挿入した場合と、D89E/D174A 二重点変異を挿入した場合とを比較した。この結果、カスパーゼ 9 には切断活性はないと判断した。カスパーゼ 3, 8 は D169 と D174 を同程度に切断し、カスパーゼ 6, 7 は D169 を強く認識し、一方でカスパーゼ 4, 10 は D174 を強く切断した (図 5B)。

次に、*in vitro* 系で D169 または D174 を切断した 6 種類のカスパーゼについて、実際に *in vivo* 系で活性化しているかどうかを解析した。その結果、SNAP-TDP-43-Halo 誘導発現後のクリアランス過程で、カスパーゼ 6, 8, 10 の活性化は認められなかった。一方で、カスパーゼ 3, 4, 7 については活性化が認められた。このうち、カスパーゼ 3, 7 については、SNAP-TDP-43-Halo 誘導発現後 24 時間くらいから活性化し、その活性化時間は CTF35 の出現時間とよく合致した。一方で、カスパーゼ 4 は、誘導発現直後から活性化し、72 時間後には活性は消失した。これは CTF25 の発現パターンと良く合致した。更に、カスパーゼ 3, 7 インヒビターを添加したところ、SNAP-TDP-43-Halo 誘導発現直後の CTF25 産生には影響しなかったが、36 時間後の CTF35 と CTF25 の産生を有意に減少させた。これに対して、カスパーゼ 4 インヒビターを添加したところ、SNAP-TDP-43-Halo 誘導発現直後の CTF25 産生も、36 時間後の CTF35 と CTF25 の産生も、有意に減少した。これに合致して、カスパーゼ 4 インヒビターを添加すると、D174A 点変異を挿入した場合と同様に、早期から遷延する細胞死が観察された。これらの結果から、初期的な D174 切断による CTF25 の産生は、カスパーゼ 4 によって触媒されており、その後カスパーゼ 3, 7 が活性化し、D89 を中心としてさらに切断を加速させるものと考えられた。

更に、点変異挿入がカスパーゼの活性化に及ぼす影響について解析した。D89E 点変異挿入は、カスパーゼ 3, 4, 7 の活性化パターンに影響しなかった (図 6A)。一方で、D174A 点変異を挿入すると、単一であっても、D89E や D169G

との二重点変異であっても、カスパーゼ 4 の活性化は検出できなくなった (図 6A, 6B)。更に、カスパーゼ 3, 7 の活性化は検出されたが、その程度は野生型と比較して著明に減弱していた

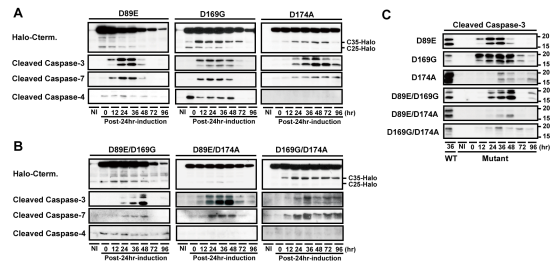


図 6 断片化を阻止する点変異の挿入によるカスパーゼ活性化の変化 A: 切断点に単一点変異を挿入した SNAP-TDP-43-Halo (D89E, D169G, D174A) を 24 時間誘導発現し、その後の各カスパーゼの活性化を経時的に観察した。B: 切断点に二重点変異を挿入した SNAP-TDP-43-Halo (D89E/D169G, D89E/D174A, D169G/D174A) を 24 時間誘導発現し、その後の各カスパーゼの活性化を経時的に観察した。C: 各点変異挿入型 SNAP-TDP-43-Halo の発現に伴うカスパーゼ 3 の活性化の程度を、野生型の誘導発現後 36 時間における活性化の程度と定性的に比較した。

(図 6C)。これらの結果は、カスパーゼ 4 が D174 切断の責任酵素であること、特に早期の CTF25 産生はカスパーゼ 4 が触媒していることを示唆している。また、カスパーゼ 4 が活性化しないとその後のカスパーゼ 3, 7 の活性化も減弱することや、D89E 点変異があってもカスパーゼ 3, 7 の活性化には影響しないことから、カスパーゼ 4 がカスパーゼ 3, 7 の活性化に関わっていると考えられた。

⑥ 過剰な TDP-43 によって誘導される初期的な細胞死はネクローシスである: カスパーゼ 3/7 の活性化前から細胞死が観察されること、D174A の点変異挿入はカスパーゼ経路の活性化を抑制するにもかかわらず細胞死を増強することなどから、これら細胞死はアポトーシスとは別のメカニズムによるものと推定された。このため、SNAP-TDP-43-HTC を発現誘導後、経時的に Annexin V と EthDIII で細胞を染色し観察した。その結果、初期的には EthDIII 陽性細胞は観察されたが、Annexin V 陽性細胞はほとんど観察されず、細胞死がネクローシスを介して生じていると考えられた。また、D174A 点変異を挿入した方がより増強されることが確認できた。野生型 TDP-43 誘導 48 時間後にはわずかに Annexin V 陽性細胞が確認され、アポトーシスも生じてきていると考えられたが、D174A 点変異を挿入した場合には予想通り Annexin V 陽性細胞は誘導後期でもほとんど観察されなかった。さらにネクローシスのインヒビターである NecroX-2 を添加したところ有意に細胞死が抑制されたことも、初期的な細胞死がネクローシスを介して生じていることを裏付けていると考えられた。

⑦ 考察と今後の展望: 本研究を通して、TDP-43 の主要な切断点を同定し、また切断を触媒する責任酵素を確定した。この中でも、D174 は新規の切断部位であり、主にカスパーゼ 3, 7 によって切断される D89 や D169 よりも先に、カスパーゼ 4 によって切断されることを明らかにした。更に、D174 に点変異を挿入したり、カスパーゼ 4 インヒビターを添加すると、TDP-43 のクリアランスが著しく低下し、その結果、細胞死が促進されることを明らかにした。これら

でも、CTF35 や D169 で切断された CTF25 だけを過剰発現させても、細胞死はほとんど生じないことが報告されている (Suzuki et al, JBC, 2011)。また、野生型ヒト TDP-43 を過剰発現するトランスジェニックマウスは ALS 様症状を呈し、TDP-43 の発現量が多いものほど重篤化する (Wils et al, PNAS, 2010)。更に、完全長ヒト TDP-43 をショウジョウバエの眼に発現させると神経変性が誘導されるが、CTF だけを発現させても誘導されない (Li et al, PNAS, 2010)。本研究においても、細胞死は、CTF の量よりも、完全長 TDP-43 のクリアランス速度に相関することが明らかになった。これらの結果を統合すると、CTF を産み出す断片化は、過剰な TDP-43 によってもたらされる毒性を回避するための生理的防御機構であり、特に CTF25 を初期的に産み出すカスパーゼ 4 による D174 の切断は、TDP-43 のクリアランス開始に必要な不可欠なメカニズムであると考えられた。

今回、TDP-43 がクリアランスする過程を経時的に追ったが、どの時間帯においても、完全長 TDP-43 に対して、CTF35 や CTF25 の量は比較的少量であった。これら CTF は、実際に観察されているものは極一部であって、大部分は急速に分解消失している可能性は排除できないが、恐らくは、カスパーゼを介した断片化だけが、TDP-43 クリアランスを担っているわけではないと考えられた。実際、これまでに、ユビキチンプロテオソーム系 (UPS) やオートファジー系の関与が報告されている (Watanabe et al, JBC, 2013)。可溶性 TDP-43 は、比較的 UPS によって分解される一方で、不溶性 TDP-43 はオートファジー系で代謝される (Scotter et al, J Cell Sci, 2014)。また、マウスにおいて、運動ニューロン選択的に UPS の機能を遮断すると、進行性の運動ニューロン脱落と TDP-43 陽性封入体が観察されるとの報告もある (Tashiro et al, JBC, 2012)。更に最近になって、UPS やオートファジーによる TDP-43 の分解には、カスパーゼによる初期的な断片化が必要不可欠であることが報告された (Huang et al, J Cell Sci, 2014)。これらの結果から、TDP-43 クリアランスの開始を規定する因子は、カスパーゼ 4 による D174 の切断であることを示唆しており、今後は、ALS や FTLD において、カスパーゼ 4 の活性化に異常が認められるのかどうか、もし異常であれば、その原因は何であるのかを明らかにする必要がある。

## 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 11 件)

- ① \*Kawahara, Y. (2014). Human diseases caused by germline and somatic abnormalities in microRNA and microRNA-related genes. *Congenital Anomalies*: 54(1): 12-21. doi: 10.1111/cga.12043.
- ② Li, Q., Yokoshi, M., Okada, H., \*Kawahara, Y. (2015). The cleavage pattern of TDP-43 determines its rate of clearance and cytotoxicity. *Nature Communications*: 6: 6183. doi: 10.1038/ncomms7183.
- ③ Li, Q., Uemura, Y., \*Kawahara, Y. (2015). Cross-Linking and Immunoprecipitation of Nuclear RNA-Binding Proteins. *Methods in Molecular Biology*: 1262: 247-263. doi: 10.1007/978-1-4939-2253-6\_15.
- ④ Yokoshi, M., Li, Q., Yamamoto, M., Okada, H., Suzuki, Y., \*Kawahara, Y. (2014). Direct binding of Ataxin-2 to distinct elements in 3'UTRs promotes mRNA stability and protein

expression. *Molecular Cell*: 55(2): 186-198. doi: 10.1016/j.molcel.2014.05.022.

- ⑤ 河原行郎, 「ノンコーディングRNAと神経変性疾患」, 医学のあゆみ, 2013, 247, 421-426 医歯薬出版.
- ⑥ 河原行郎, 「筋萎縮性側索硬化症とRNA結合タンパク質」, 領域融合レビュー, 2013, e010.
- ⑦ 余越萌, 河原行郎, 「microRNAの修飾とその機能」, 実験医学(増刊), 2013, 31, 1124-1131 羊土社.
- ⑧ 余越萌, 河原行郎, 「RNA代謝異常を介した神経変性疾患の発症病態」, ファルマシア, 2015, 51(1), 37-41 日本薬学会.
- ⑨ 余越萌, 河原行郎, 「神経変性疾患関連タンパク質Ataxin-2は3'非翻訳領域にある特定の配列に直接結合することによって、mRNAの安定性を促進しタンパク質発現を増加させる」, 新着論文レビュー, 2014, e9044.
- ⑩ 植村有里, 河原行郎, 「RNA代謝と神経変性」, Brain Medical, 2014, 26(3), 209-215 メディカルレビュー社.
- ⑪ 河原行郎, 塩見美喜子, 「RNA疾患研究の新展開」, Medical Science Digest, 2014, 40(7), 324-325 北隆館.

[学会発表] (計 5 件)

- ① Li, Q., Yamamoto, M., Yokoshi, M., Suzuki, Y., Kawahara Y., Identification of common targets of TDP-43 and FUS by PAR-CLIP. New Frontier of Molecular Neuropathology 2014, Tokyo Medical and Dental University, 2014. 3. 16-17 (ポスター)
- ② 山本 宗隆, 李 全, 鈴木 穰, 河原行郎 「PAR-CLIP 法を用いた TDP-43 と FUS に共通するターゲットの同定」 第 15 回 RNA ミーティング 愛媛県・県民文化会館・ひめぎんホール 愛媛 2013.7.24-26 (ポスター)
- ③ Li, Q., Yamamoto, M., Seno, S., Matsuda, H., Suzuki, Y., Kawahara Y., 「Comprehensive analysis of the roles of TDP-43 and FUS in RNA processing」 第 36 回日本神経科学大会 京都国際会議場 京都 2013. 6. 20-23 (ポスター)
- ④ 河原行郎 「神経変性疾患に関連する TDP-43 の断片化機構とその生理的意義について」 第 5 回神経科学と構造生物学の融合研究会 吹田 大阪 2014. 12. 4 招待講演)
- ⑤ 河原行郎 「TDP-43 断片化の生理的意義について」 第 55 回日本神経学会学術大会 博多 福岡 2014. 3. 24 (招待講演)

[その他]

ホームページ等

[http://resou.osaka-u.ac.jp/ja/research/2015/20150129\\_1](http://resou.osaka-u.ac.jp/ja/research/2015/20150129_1) (大学からの成果発表, 日本語)

[http://resou.osaka-u.ac.jp/en/research/2015/20150129\\_1](http://resou.osaka-u.ac.jp/en/research/2015/20150129_1) (大学からの成果発表, 英語)

## 6. 研究組織

(1) 研究代表者

河原 行郎 (KAWAHARA YUKIO)  
大阪大学・大学院医学系研究科・教授  
研究者番号: 8 0 5 4 2 5 6 3

(2) 研究分担者 該当無し

(3) 連携研究者 該当無し