

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 25 年 5 月 20 日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究（B）

研究期間：2010～2012

課題番号：22390176

研究課題名（和文） TDP-43 による microRNA 制御機構に着目した ALS 病態機序の解明

研究課題名（英文） Elucidation of the role of TDP-43 in microRNA biogenesis and ALS pathogenesis

研究代表者

河原 行郎（KAWAHARA YUKIO）

大阪大学・大学院医学系研究科・特任准教授（常勤）

研究者番号：80542563

研究成果の概要（和文）：筋萎縮性側索硬化症（ALS）の病態に深く関与する TDP-43 の生理的機能の解析を行った。TDP-43 は、核内で Drosha 複合体と、細胞質では Dicer 複合体と結合し、特定のマイクロ RNA の生成を促進することを解明した。TDP-43 の発現を抑制すると、neurite の伸長が障害され、ここに TDP-43 が制御するマイクロ RNA の一つ miR-132 を共発現させると、伸長障害が改善された。この結果から、TDP-43 によるマイクロ RNA 制御は、neurite の伸長促進に関与していることを解明した。

研究成果の概要（英文）：TDP-43 is a RNA binding protein and associated with the pathogenesis of ALS. However, the physiological functions of TDP-43, especially related to the disease pathogenesis are not fully understood. In this study, we show that TDP-43 facilitates the production of a subset of pre-miRNAs by both interacting with the Drosha complex and binding directly to the relevant pri-miRNAs. Furthermore, cytoplasmic TDP-43, which interacts with the Dicer complex, promotes the processing of some of these pre-miRNAs. Finally, we show that involvement of TDP-43 in miRNA biogenesis is indispensable for neuronal outgrowth. These results support a previously uncharacterized role for TDP-43 in post-transcriptional regulation of miRNA expression.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	6,200,000	1,860,000	8,060,000
2011年度	4,100,000	1,230,000	5,330,000
2012年度	4,100,000	1,230,000	5,330,000
年度			
年度			
総計	14,400,000	4,320,000	18,720,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・神経内科学

キーワード：神経分子病態学・ALS・RNA・神経変性疾患

1. 研究開始当初の背景

ALS は、運動ニューロンの選択的脱落によって全身の筋力が低下する神経難病の 1 つである。発症すると数年以内に死に至るが、依然として有効な治療法がなく、一日も早い

病態解明が急務である。これまで病態へ迫る手がかりは乏しかったが、2006 年に ALS 及び前頭側頭様変性症（FTLD）の変性部位において、TDP-43 がユビキチン陽性封入体の構成タンパク質として同定された（Neumann et al,

Science, 2006). さらにその後、頻度は稀ながら両疾患特異的に TDP-43 遺伝子点変異が見つかり、ALS と FTLD は連続スペクトラム上にあり、両疾患の病態に TDP-43 が深く関連していることが明らかとなった (Sreedharan et al, Science, 2008; Benajiba et al, Ann Neurol, 2009).

TDP-43 は不均一核内リボ核酸タンパク質 (hnRNP) の一種で、RNA 結合ドメインを有することから、RNA の安定化や転写後調節などに関与していると考えられている。これまで、選択的スプライシングの調節などを制御することが明らかにされたが (Ayala et al, PNAS, 2008)、その生理的役割についてはほとんど知られていないのが現状である。我々は、マイクロ RNA と呼ばれる 22 塩基前後の小分子 RNA が生成されるメカニズムを研究する中で、TDP-43 がマイクロ RNA 生成に必須の Drosha 複合体に含まれること (Gregory et al, Nature, 2004) に着目し、TDP-43 はマイクロ RNA 生成に重要な役割を果たしているのではないかとこの着想に至った。マイクロ RNA は、現在ヒトで約 700 種類程度同定され、自身の配列と相補性をもつ標的遺伝子に結合することによって、遺伝子発現を転写後レベルで調節する機能性 RNA である (Chendrimada et al, Nature, 2005)。microRNA は、細胞の分化や固有の機能維持に必須であるばかりでなく、ガンや神経変性疾患など様々な病気と関連している (Lujambio et al, Cancer Cell, 2007; Kim et al, Science, 2007)。これらの背景から、我々は、核内 TDP-43 の機能喪失によって、生存に必須のマイクロ RNA の発現異常が生じることが、ALS 運動ニューロンの変性を引き起こしているのではないかと着想した。

2. 研究の目的

TDP-43 が、細胞の恒常性を制御するマイクロ RNA の生成に必須である Drosha 複合体の 1 構成因子であることに着目し、TDP-43 がマイクロ RNA 発現制御において果たす役割の重要性を明らかにすること。同時に、TDP-43 の機能喪失によるマイクロ RNA 代謝異常が、神経細胞の恒常性維持に与える影響を解析し、ALS 病態の解明に繋げること。

3. 研究の方法

(1) TDP-43 と、マイクロ RNA 生成に必須の核内 Drosha 複合体および細胞質 Dicer 複合体との結合様式を明らかにするため、HEK293T 細胞を用いた FLAG-TDP-43 の安定発現細胞株を樹立した。また FLAG-Drosha および FLAG-Dicer 安定発現細胞株を米国ウイスター研究所から入手した。これらの細胞株を大量培養後、核と細胞質成分に分画し、各分画から抗 FLAG 抗体を用いて免疫沈降し、各お

抗体を用いてウェスタンブロット解析を行った。

(2) TDP-43 と Drosha 複合体および Dicer 複合体の結合様式を明らかにするため、FLAG-Drosha 複合体および FLAG-Dicer 複合体を RNase V1 または RNase A で処理し、RNA 依存性を解析した。また、TDP-43 の N 端に Myc タグを付加した上で、様々な deletion mutant を作成し、これらを FLAG-Drosha および FLAG-Dicer 安定発現細胞株に導入した。核成分または細胞質成分抽出後、抗 FLAG 抗体で免疫沈降し、抗 Myc 抗体でウェスタンブロット解析した。

(3) TDP-43 により制御されるマイクロ RNA を同定するため、SH-SY5Y (Human), HeLa (Human), Neuro2a (Mouse) の 3 細胞株で TDP-43 をノックダウンした。siRNA 導入 72 時間後には TDP-43 はほぼ完全に消失したので、このタイミングで抽出した RNA を用いてマイクロ RNA マイクロアレイ解析を行った。次に、アレイの結果を定量 RT-PCR 法で検証した。

(4) SH-SY5Y 細胞株から抽出した蛋白質を用いて、抗 TDP-43 抗体による免疫沈降を行い、TDP-43 結合 RNA を回収した。この RNA をテンプレートにして、RT-PCR 法により、特定の pri-miRNA との結合を確認した。次に、FLAG-TDP-43 安定発現細胞株の核および細胞質成分から FLAG-TDP-43 複合体を抽出し、TDP-43 結合 RNA を回収した。RT-PCR を行い、pri-miRNA や pre-miRNA との結合を確認した。更に、組換え TDP-43 (recTDP-43) を大腸菌に発現後精製し、アイソトープラベルした pri-miRNA との結合解析 (EMSA) を行った。

(5) TDP-43 が特定の pri-miRNA や pre-miRNA と結合することが、マイクロ RNA 生成に及ぼす効果を解析するため、FLAG-Drosha 及び FLAG-Dicer 安定発現細胞株中の TDP-43 をノックダウンし、その後核成分を抽出した。免疫沈降で得た FLAG-Drosha 及び FLAG-Dicer 複合体には TDP-43 が含まれないことを確認した。今後、これら複合体と RI ラベルした pri-miRNA 及び pre-miRNA を用いて in vitro microRNA processing assay を行った。

(6) TDP-43 が特定のマイクロ RNA 生成を促進する意義を in vivo で解析した。具体的には、Neuro2a 細胞にレチノイン酸を添加し、neurite を伸張させた。この際、TDP-43 をノックダウンすると伸張抑制が生じることが知られている (Iguchi et al, JBC, 2009)。ここに、軸索伸張に関与し、TDP-43 が生成制御しているいくつかのマイクロ RNA を共発現させ、伸長抑制が解除されるかどうかを定量

評価した。

4. 研究成果

(1) TDP-43 は、核内で DGCR8 を含む Drosha 複合体と結合する： FLAG-Drosha 安定発現細胞株の核成分から FLAG-Drosha 複合体を免疫沈降法により回収した。ウエスタンブロット解析したところ、FLAG-Drosha は、DGCR8、FUS、p68 に加え TDP-43 と結合していることを確認した (図 1A)。次に、FLAG-TDP-43 安定発現細胞株の核成分から FLAG-TDP-43 複合体を回収した。この複合体には、内在性 TDP-43、p68、FUS に加え、Drosha、DGCR8 が含まれていることを確認し、この結果から、両方向性に TDP-43 と Drosha 複合体との結合を明らかにした (図 1B)。

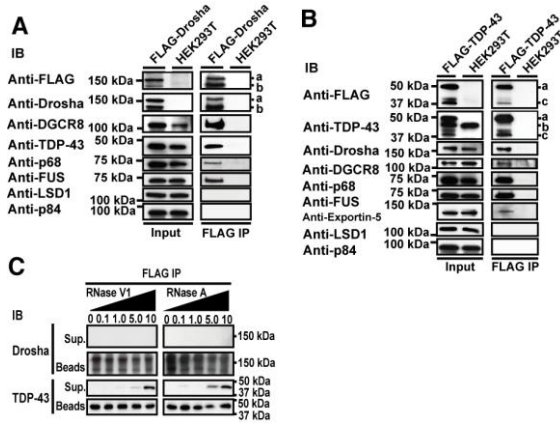


図 1. TDP-43 と Drosha 複合体との結合様式

A. FLAG-Drosha 安定発現細胞株の核成分から抽出した FLAG-Drosha 複合体は、TDP-43、DGCR8、p68、FUS と結合していた。Drosha には a, b 2つのアイソフォームが確認された。B. 核内 FLAG-TDP-43 複合体は、Drosha、DGCR8、p68、FUS と結合していた。a; FLAG-TDP-43, b; 内在性 TDP-43, c; 断片化 FLAG-TDP-43。C. FLAG-Drosha 複合体を RNase V1 または RNase A で処理したところ、通常の 10 倍量を投与した時に、TDP-43 の約 20%程度が複合体から解離した。

(2) TDP-43 と Drosha 複合体は、RNA 依存的及び非依存的に結合する： TDP-43 と Drosha 複合体の結合様式を明らかにするため、FLAG-Drosha 複合体を RNase V1 または RNase A で処理した。この結果、約 20%の TDP-43 しか Drosha 複合体から解離しなかったことから、TDP-43 は一部 RNA 依存的に Drosha 複合体と結合しているが、大部分は蛋白質どうしの直接結合と考えられた (図 1C)。このため、TDP-43 の様々な deletion mutant を作成し、FLAG-Drosha 安定発現細胞株に導入した (図 2A)。核成分抽出後、抗 FLAG 抗体で免疫沈降した結果、TDP-43 の C 端の一部 (aa316-401) が Drosha 複合体との結合に必須であること

が分かった (図 2B)。

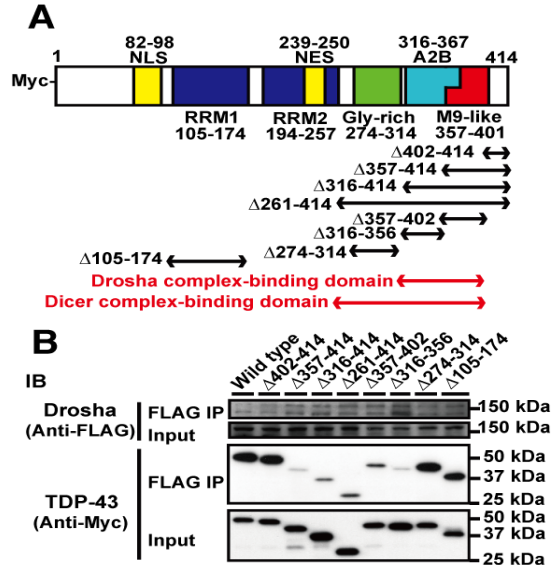


図 2. Drosha 複合体との結合に 必須のドメイン TDP-43 遺伝子の N 端に Myc タグを付加した様々な deletion mutant を作成 (A)。これを FLAG-Drosha 安定発現細胞株に導入し、核成分を抽出後、抗 FLAG 抗体で免疫沈降した。この結果、aa316-401 が欠損した場合、Drosha 複合体との結合が著明に失われた (B)。

(3) TDP-43 ノックダウンにより発現の低下するマイクロ RNA の同定： SH-SY5Y、HeLa、Neuro2a の 3 細胞株で TDP-43 をノックダウンした後 RNA を抽出し、microRNA マイクロアレイ解析を行った。この結果、miRNA-132-5p、miRNA-143-3p など約 10 種類の microRNA がすべての細胞株で発現低下していた。この結果は、定量 RT-PCR 法でも再現された (図 3A)。一方、これらの生成源となる pri-miRNA 発現量には変動を認めなかったことから、microRNA 発現量の低下は転写後調節障害が原因だと考えられた (図 3B)。

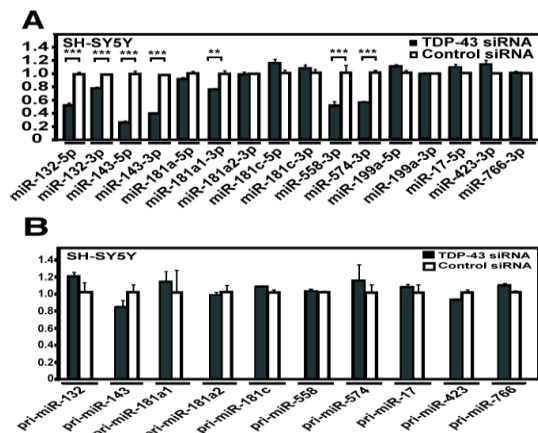


図 3. TDP-43 が発現を制御する microRNA の同定。SH-SY5Y 細胞で TDP-43 をノックダウンすると、miR-132-5p、miR-132-3p、

miR-143-5p, miR-143-3p, miR-181a1-3p, miR-558-3p, miR-574-3p など特定の microRNA の発現が有意に低下した (A). 一方、これらの pri-miRNA の発現には変動を認めなかった (B).

(4) 核内 TDP-43 は特定の pri-miRNA に結合し、細胞質 TDP-43 も特定の pre-miRNA の terminal loop に結合する: TDP-43 ノックダウンによって発現量低下を認めたマイクロ RNA 群が TDP-43 によって制御される機構を明らかにするため、SH-SY5Y 細胞株の cell lysate から抗 TDP-43 抗体を用いた免疫沈降法を介して TDP-43 結合 RNA を回収した. RT-PCR を行った結果、TDP-43 は、pri-miRNA-132, pri-miRNA-143, pri-miRNA-558, pri-miRNA-574 に直接結合していた (図 4A). この結果は、核内 FLAG-TDP-43 に結合する RNA で解析しても再現された (図 4B). 更に、細胞質中の FLAG-TDP-43 に結合する pre-miRNA を定量解析したところ、pre-miRNA-143 と pre-miRNA-574 に結合していることを発見した (図 4B). 次に、TDP-43 のよるマイクロ RNA 前駆体中の認識部位を同定するため、組換え TDP-43 を用いた in vitro binding assay (EMSA) を行った. この結果、組換え TDP-43 は、高率かつ選択的に特定の pri-miRNA 群に結合した. また、同様のアッセイを pre-miRNA で行ったところ、TDP-43 は二重鎖部分ではなく、terminal loop を認識することが分かった.

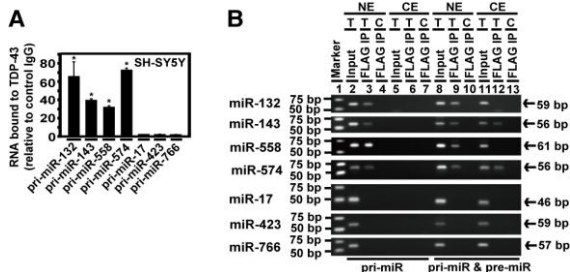


図 4. TDP-43 は特定の pri-miRNA 及び pre-miRNA に結合する. A. SH-SY5Y 細胞株から蛋白質を抽出し、抗 TDP-43 抗体で免疫沈降した. Proteinase K 処理後 TDP-43 結合 RNA を回収し、各 pri-miRNA が結合しているかどうかを RT-PCR 法で解析した. その結果、TDP-43 は pri-miRNA-132, pri-miRNA-143, pri-miRNA-558, pri-miRNA-574 に結合しているが、pri-miR-17, pri-miR-423, pri-miR-766 には結合していなかった. B. HEK293T 細胞を核と細胞質成分に分画し、各分画の FLAG-TDP43 に結合する RNA を回収した. 核で pri-miR-132, pri-miRNA-143, pri-miRNA-558, pri-miRNA-574 に結合していたが、pri-miR-17 には結合していなかった. さらに細胞質で pre-miR-143, pre-miR-574 に結合していた.

(5) TDP-43 は細胞質で Dicer 複合体と結合する: TDP-43 が細胞質で特定の pre-miRNA に結合していたことから、TDP-43 が Dicer 複合体にも結合しているのかどうか解析した. FLAG-Dicer 複合体を免疫沈降し、その構成因子を解析した結果、Ago2 や TRBP などの既知の因子に加え、TDP-43 と結合していることを発見した (図 5A). TDP-43 は Dicer 複合体と RNA 依存적および非依存적の両方の様式で結合しており、Drosha 複合体との結合よりも広い C 端領域 (aa261-401) が必要であることが分かった (図 2A, 5B, 5C).

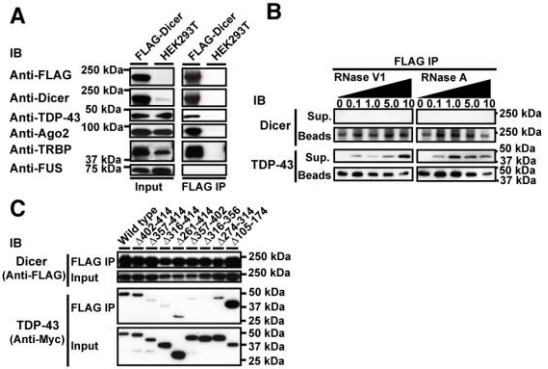
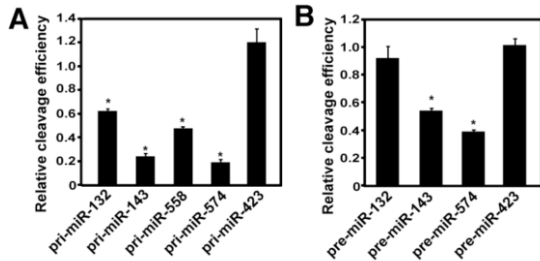


図 5. TDP-43 と Dicer 複合体との結合様式. A. FLAG-Dicer 安定発現細胞株の細胞質成分から抽出した FLAG-Dicer 複合体は、TDP-43, Ago2, TRBP と結合していた. B. FLAG-Dicer 複合体を RNase V1 または RNase A で処理したところ、通常の 10 倍量を投与した時に、TDP-43 の約 50%程度が複合体から解離した. C. TDP-43 遺伝子の様々な deletion mutant を FLAG-Dicer 安定発現細胞株に導入し、細胞質成分を抽出後、抗 FLAG 抗体で免疫沈降した. この結果、aa261-401 が欠損した場合に、Dicer 複合体との結合が著明に失われた.

(6) TDP-43 は、Drosha 複合体による特定の pri-miRNA の切断を促進する: TDP-43 が特定の pri-miRNA と結合することが、マイクロ RNA 生成に及ぼす効果を解析するため、FLAG-Drosha 安定発現細胞株中の TDP-43 をノックダウンし、TDP-43 を含まない FLAG-Drosha 複合体を回収した. EMSA を行ったところ、この複合体は、TDP-43 を含む FLAG-Drosha 複合体と比較し、有意に pri-miRNA-132, pri-miRNA-143, pri-miRNA-558, pri-miRNA-574 への結合能が低下することが判明した. さらに、これら複合体を用いて pri-miRNA から pre-miRNA へのプロセッシングアッセイを行ったところ、結合能低下を反映し、有意に切断効率が低下することを確認した (図 6A).

図 6. TDP-43 による microRNA 生成制御.



Drosha 及び Dicer 安定発現細胞株に TDP-43 siRNA または Control siRNA を導入し、その蛋白質抽出液から Drosha (A) および Dicer 複合体 (B) を免疫沈降で精製した. この免疫沈降物を用いて、TDP-43 の複合体中の有無が、microRNA 生成に与える影響を microRNA processing assay で検討した. その結果、TDP-43 が直接結合する pri-miRNA では、TDP-43 が複合体中から消失すると有意に Drosha による切断活性が低下した (A). 同様に、TDP-43 が直接結合する pre-miRNA では、TDP-43 が複合体中から消失すると有意に Dicer による切断活性が低下した (B).

(7) TDP-43 は、Dicer 複合体による特定の pre-miRNA の切断を促進する: 細胞質 TDP-43 が特定の pre-miRNA と結合することが、マイクロ RNA 生成に及ぼす効果を解析するため、TDP-43 を含む Dicer 複合体と含まない複合体を用意し、pre-miRNA からマイクロ RNA へのプロセッシングアッセイを行った. その結果、TDP-43 が存在しなくても Dicer による切断は生じるものの、TDP-43 が複合体に含まれると、有意に切断効率が高まることを明らかにした (図 6B).

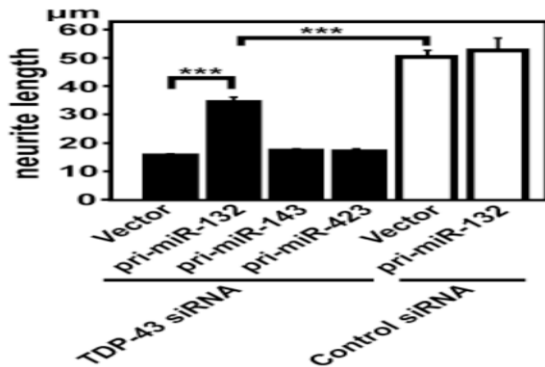


図 7. TDP-43 による neurite 伸張制御. Neuro2a 細胞において TDP-43 をノックダウンすると、neurite 伸張が有意に抑制されるが、TDP-43 が生成を制御する miR-132 を導入すると、伸張抑制が部分的に改善した. miR-143 や miR-423 にはその効果はなかった.

(8) TDP-43 によるマイクロ RNA 生成促進機構は neurite の伸張を促進する: Neuro2a 細胞にレチノイン酸を添加すると neurite を伸張するが、TDP-43 をノックダウンすると伸張抑

制が生じる (Iguchi et al, JBC, 2009). ここに、軸索伸張に関与し、TDP-43 が生成制御していることが明らかになった miRNA-132 を発現させると、この伸張抑制が一部解除された (図 7). TDP-43 をノックダウンしていない状態では、miRNA-132 は更なる伸張促進効果を示さなかったことや、miRNA-143 や miRNA-423 など他の microRNA では抑制の解除が認められなかったことから、TDP-43 による miR-132 の生成促進が、neurite の伸張を少なくとも一部調節していると結論づけた (図 7).

(9) 考察と今後の展望: 本研究を通じて、TDP-43 が特定のマイクロ RNA の発現を促進していることが明らかになった. このうち、miRNA-132 は中枢神経系に高発現しており、シナプス形成に重要な働きをしていることが知られている (Magill et al. PNAS 2010). また、最近になって FTLD 剖検脳中で miRNA-132 の発現が有意に低下していることも報告されている (Chen-Plotkin et al. J. Neurosci. 2012). 運動神経細胞の生存にはマイクロ RNA の存在が必須である (Haramati et al., PNAS, 2010) ことから、TDP-43 の機能喪失により、miRNA-132 発現が低下することが、ALS 病態に関与している可能性が示唆される. 今後は、モデル動物などを用いて、更に TDP-43 によるマイクロ RNA 発現制御と ALS 病態との関連解析を進めていきたい.

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 9 件)

- ① Kawahara Y. Quantification of A-to-I editing of microRNAs using a conventional method. *Nature Protocols*, 7(7), 1426-1437, 2012. 査読有
- ② Kin K, Miyagawa S, Fukushima S, Shirakawa Y, Torikai K, Shimamura K, Kawahara Y., Daimon T, Kuratani T, Sawa Y. Tissue- and plasma-specific microRNA signatures for atherosclerotic abdominal aortic aneurysm. *Journal of the American Heart Association*, 1, e000745, 2012. 査読有
- ③ Matsumoto S, Sakata Y, Nakatani D, Suna S, Mizuno H, Shimizu M, Usami M, Sasaki T, Sato H, Kawahara Y., Hamasaki T, Nanto S, Hori M and Komuro I. A Subset of Circulating MicroRNAs are Predictive for Cardiac Death After Discharge for Acute Myocardial Infarction. *Biochemical and Biophysical Research*

Communications, 427(2), 280-284, 2012.
査読有

- ④ 河原行郎. microRNA. *分子脳血管病*, 11(4), 431-434, 2012. 査読無
- ⑤ 余越萌, 河原行郎. microRNA の機能とその修飾. *実験医学(増刊)*, 31(7), 160-167, 2013. 査読無
- ⑥ Kawahara Y and Mieda-Sato I. TDP-43 promotes microRNA biogenesis as a component of the Drosha and Dicer complexes. *Proceedings of the National Academy of Sciences U. S. A.*, 109(9), 3347-3352, 2012. 査読有
- ⑦ 河原行郎. マイクロ RNA. *分子精神医学*, 11(3), 172-177, 2011. 査読無
- ⑧ 河原行郎. RNA 編集の異常と関連する疾患. *実験医学(増刊)*, 28, 1628-1635, 2010. 査読無
- ⑨ 河原行郎. microRNA 発現の転写後調節機構. *生体の科学*, 61(4), 308-314, 2010. 査読無

[学会発表] (計3件)

- ① Kawahara Y. Small RNAs. The 7th Japanese-French Frontiers of Science Symposium, Shiga, Japan, January 25-27, 2013.
- ② Kawahara Y. TDP-43 promotes neurite outgrowth through the regulation of microRNA biogenesis. The 35th Annual Meeting of the Japan Neuroscience Society, Nagoya, Japan, September 18-22, 2012.
- ③ 河原行郎, 佐藤愛: ALS 関連蛋白質 TDP-43 は転写後のマイクロ RNA 生成を促進する. 第53回日本神経学会学術大会, 東京, 2012年5月23日

○出願状況 (計0件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
出願年月日:
国内外の別:

○取得状況 (計0件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
取得年月日:
国内外の別:

[その他]

ホームページ等
<http://www.med.osaka-u.ac.jp/pub/rna/index.html>

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・特任准教授 (常勤)
研究者番号: 80542563

(2) 研究分担者

該当者なし

(3) 連携研究者

該当者なし