

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成25年5月31日現在

機関番号：82401
 研究種目：若手研究(B)
 研究期間：2011～2012
 課題番号：23700455
 研究課題名（和文） 筋萎縮性側索硬化症で異常蓄積するTDP-43によるRNA代謝制御の解析
 研究課題名（英文） Defective RNA metabolism in motor neurons from Amyotrophic Lateral Sclerosis patients
 研究代表者
 築地 仁美 (TSUIJI HITOMI)
 独立行政法人理化学研究所・運動ニューロン変性研究チーム・研究員
 研究者番号：40455358

研究成果の概要（和文）：

筋萎縮性側索硬化症（ALS）は脊髄運動神経細胞が特異的に変性し脱落する成人発症の神経変性疾患であり、運動神経細胞において、通常は主に核に局在する TDP-43 が細胞質へ移行し異常な凝集体が形成される。一方脊髄性筋萎縮症（SMA）は、small nuclear ribonucleoprotein (snRNPs) のアセンブリーに必須である RNA 制御因子 SMN の発現減少により、運動神経細胞が異常となり発症する。我々は TDP-43 や FUS が SMN と複合体を形成し、核内の構造体 Gem へ局在すること、ALS 患者の変性した運動神経細胞では TDP-43 が異常となるに伴い Gem が消失すること、snRNPs が核内に異常に凝集蓄積することを見いだした。SMA と ALS で変性する運動ニューロンに共通したスプライソソーム異常を見つけ、運動神経がスプライソソーム異常に脆弱である可能性を示した。

研究成果の概要（英文）：

Neurodegenerative diseases are characterized by the death of specific type of neurons. The motor neuron diseases amyotrophic lateral sclerosis (ALS) and spinal muscular atrophy (SMA) are caused by dysfunction of TDP-43, RNA-binding protein and SMN, essential for biogenesis of spliceosomal component snRNPs, respectively. However, the defects in RNA metabolism common to these diseases remain unclear. We show that TDP-43 localizes in nuclear gems through association with the SMN complex, and is involved in spliceosome maintenance. Moreover, gems are lost, U snRNA levels are up-regulated and spliceosomal U snRNPs abnormally and extensively accumulate in the nuclei of ALS motor neurons but not in the temporal lobe of FTLD with TDP-43 pathology. Together, these findings indicate that collapse of spliceosome stability is the critical process common to neurodegeneration in ALS and SMA, and may explain cell-type specific vulnerability of motor neurons.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：脳神経科学・神経化学・神経薬理学

キーワード：ALS, spliceosome, snRNP, TDP-43, RNA

1. 研究開始当初の背景

脊髄性筋萎縮症 spinal muscular atrophy (SMA) は、*survival of motor neuron 1* (*SMN1*) 遺伝子の欠損により脊髄前角の下位

運動ニューロンが選択的に脱落する運動ニューロン疾患である。*SMN2* 遺伝子にコードされた産物には不安定な splicing variant が

あるため、全長の機能的 SMN 蛋白質は少量しか産生されず、SMA 患者では全身における SMN 蛋白質量の減少が認められる。劣性遺伝であり保因者は欧米で約 100 人に一人、日本では欧米より少ないと考えられている。特に I 型は重篤な小児発症疾患であり、小児死亡原因の一位であり、早急な治療法開発が求められている。しかし欧米と比較し日本における SMA 研究および治療開発は立ち遅れているのが現状である。SMN はスプライシング反応を担う U-rich small nuclear ribonucleoprotein (U snRNP) のアセンブリーに必須であるため、SMA では SMN 減少に伴い U snRNPs 量が減少し不十分となり一部のスプライシング反応が阻害され、発症に至ると考えられている ()。

一方、筋萎縮性側索硬化症 amyotrophic lateral sclerosis (ALS) は、成人発症の運動神経変性疾患であり、上位および下位運動ニューロンが選択的に脱落し、全身の骨格筋麻痺が起こり、発症後 1-5 年で呼吸筋の麻痺により死に至る。日本における罹患者は人に及ぶが、有効な治療薬は無く、発症後認知機能が正常に保たれた状態で確実に死に至ることから、患者の精神的負担は多大なものであり、早急な病態解明が望まれている。

2006 年、ほぼすべての ALS 患者病巣の運動神経細胞においてみられる細胞質内の異常凝集体の主要構成成分が、RNA 結合蛋白質 TDP-43 であることが同定され、更に家族性 ALS で TDP-43 の変異が同定され、ALS 研究に旋風を巻き起こした。2009 年には TDP-43 と類似構造を持つ RNA 結合蛋白質 FUS/TLS の変異が家族性 ALS で同定され、細胞質での凝集体にも FUS/TLS が含まれることが示され、TDP-43 と FUS/TLS が ALS 発症の原因遺伝子であり直接の危険因子であることが判明した。両分子が RNA 結合蛋白質であることから、ALS は RNA 代謝の異常により発症する可能性が考えられ、TDP-43 と FUS/TLS による ALS 発症メカニズムの解析は全世界で精力的に進められてきたが、未だ発症メカニズムはわかっていない。

2. 研究の目的

筋萎縮性側索硬化症 (ALS) は脊髄運動神経細胞が特異的に変性し脱落する成人発症の神経変性疾患であり、家族性 ALS の原因遺伝子として RNA 結合蛋白質である TDP-43 や FUS/TLS が報告されている。また孤発性 ALS 患者の運動神経細胞では、通常は主に核

に局在する TDP-43 が細胞質へ移行し異常な凝集体が形成される。一方小児発症の脊髄運動神経変性疾患である脊髄性筋萎縮症

(SMA) は、small nuclear ribonucleoprotein (snRNPs) のアセンブリーに必須である RNA 制御因子 SMN の発現減少により発症する。ALS および SMA は RNA 代謝に関与する蛋白質の異常により発症するにも関わらず、共通の RNA 代謝異常の報告は皆無である。よって我々は、両疾患の原因蛋白質 TDP-43、FUS、SMN の関連性、および両疾患に共通する RNA 代謝異常について検討した。

3. 研究の方法

TDP-43 病理を呈する孤発性 ALS 患者 6 名、対照患者 5 名の脊髄組織を用い、免疫染色、蛍光免疫染色、更に RNA を抽出し定量 RT-PCR にて RNA 量を定量した。また TDP-43 病理を呈する前頭側頭葉変性症 (FTLD-TDP) 患者 4 名、対照患者 4 名の側頭葉に対して同様の検討を行った。生化学的手法を用い、TDP-43、FUS/TLS、SMN の蛋白質相互作用を検討した。

4. 研究成果

TDP-43 が、SMN の濃縮している Cajal body/Gem と呼ばれる核内構造体へ局在すること、また生化学的手法を用い TDP-43、FUS、SMN の 3 者が複合体を形成することを明らかにした (図 1)。

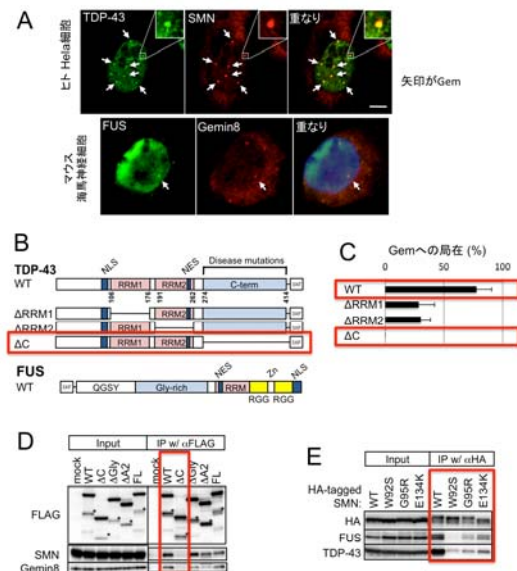


図1 TDP-43、FUS、SMNは核内でGemに共局在し、互いに結合している

更に ALS 脊髄運動神経細胞では、TDP-43 陽性 Gem の数が減少していた (図 2)。

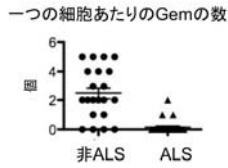


図2 ALS患者の脊髄運動神経細胞ではGemが減少している

更に snRNPs に対する抗体での免疫染色により、ALS 患者の脊髄運動神経細胞では、TDP-43 の異常凝集に伴い、snRNPs 量が上昇し核内に異常に凝集していることが判明した (図3)。

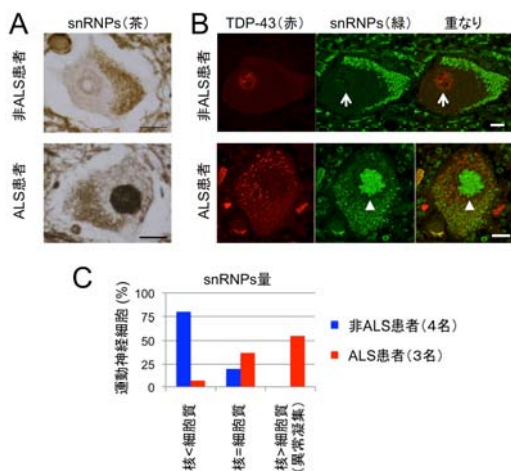


図3 ALS患者の脊髄運動神経細胞における snRNPs の核内異常蓄積

更に脊髄組織の RNA 定量でも ALS 脊髄における snRNA 量の上昇が確認され、snRNPs の RNA 成分である small nuclear RNA に対する抗体でも、同様に異常凝集が示された (図4)。

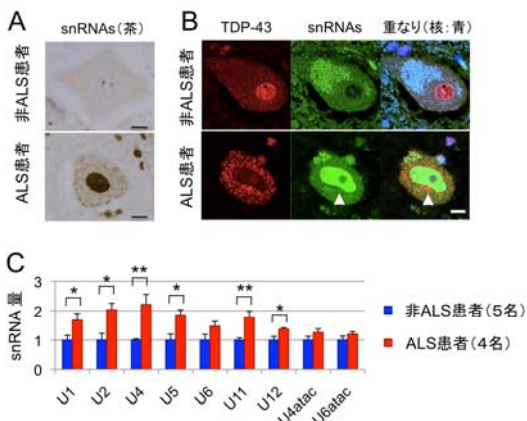


図4 ALS患者の脊髄運動神経細胞における snRNAs の異常蓄積

FTLTD-TDP 患者の側頭葉では上記の変化は認められず、snRNPs 異常は脊髄運動神経細胞に特徴的であると考えられた。以上より、ALS 運動神経細胞において snRNPs の発現上昇と異常凝集が認められた。snRNPs はスプライシング反応を担うスプライソソムの本体であり、この異常はスプライシング反応の破綻を来すと考えられる。snRNPs 量減少が SMA の原因であることを考え合わせると、運動神経細胞は snRNPs 異常に脆弱であること、更に snRNPs 異常によるスプライソソムの破綻が ALS と SMA に共通する運動神経変性メカニズムの一端を担うと考えられる (図5)。

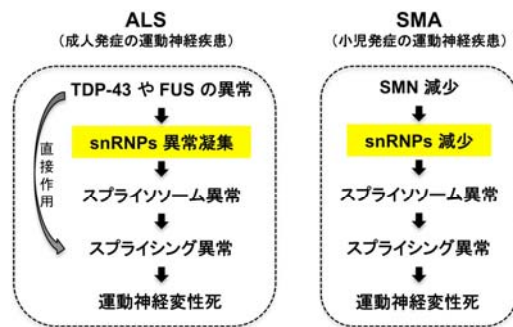


図5 概念図

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1件)

- ① Tsuiji H*, Iguchi Y., Furuya A., Kataoka A., Hatsuta H., Atsuta N., Tanaka F., Hashizume Y., Akatsu H., Murayama S., Sobue G., Yamanaka K.* Spliceosome integrity is defective in motor neuron disease ALS and SMA. **EMBO Molecular Medicine**, 5(2):221-34. (2013) (*: corresponding authors) (査読有)

[学会発表] (計11件)

招待講演

- ① 築地仁美: 運動神経変性疾患に共通するスプライシング経路の破たん、京都大学医学部 (2013年1月25日/京都)
- ② Tsuiji H., Integrity of Spliceosome is a Common Target for Motor Neuron Disease. 新学術領域「脳内環境」主催・

第1回国際若手シンポジウム (2012年
11月17日/京都) (英語)

- ③ **Tsuiji H.** and Yamanaka K.,
Spliceosome Integrity is a Common
Target for Motor Neuron Disease. **第3
5回日本神経科学大会 シンポジウ
ム:RNA 結合蛋白質と病態** (2012年9月
/名古屋) (英語)

国際学会

- ① **Tsuiji H.**, Iguchi Y., Furuya A.,
Kataoka A., Hatsuta H., Atsuta N.,
Tanaka F., Hashizume Y., Akatsu H.,
Murayama S., Sobue G., Yamanaka K.,
Spliceosome integrity is defective in
motor neuron disease ALS and SMA.
**Cold Spring Harbor Meeting:
Neurodegenerative Disorders** (2012年
11月/Cold Spring Harbor/NY/USA) (英
語)
(口頭発表)
- ② **Tsuiji H.**, Iguchi Y., Furuya A.,
Kataoka A., Atsuta N., Tanaka F.,
Sobue G., Yamanaka K., TDP-43
maintains proper U snRNA levels
through association with SMN in
Cajal/Gem body. **Keystone Symposia on
Molecular and Cellular Biology:
Protein-RNA Interaction in Biology
and Disease** (2012.3.4-6/Santa Fe, New
Mexico/USA) (英語)
- ③ **Tsuiji H.**, Kataoka A., Yamanaka K., A
Role of TDP-43 in Regulation of U
snRNP Formation. **Cold Spring Harbor
Laboratory Meeting: Eukaryotic mRNA
Processing** (2011.8.23-27, Cold Spring
Harbor, New York, USA) (英語)
- ④ **Tsuiji H.**, Kataoka A., Yamanaka K.
A Role of TDP-43 in The Regulation of
spliceosomal U snRNPs. **The 16th
Annual Meeting of the RNA Society
and The 13th Annual Meeting of the
RNA Society of Japan** (2011.6.14-18,
Kyoto, Japan) (英語)

国内学会

- ① 永津真司、**築地仁美**、木下専、三澤日出
巳、山中宏二: 遺伝性 ALS モデルにおけ

る SIRT1 の関与、**第85回日本生化学会
年会** (2012年12月/福岡)

- ② **築地仁美**、井口洋平、古屋亜佐子、片岡
礼音、村山繁雄、祖父江元、山中宏二:
運動神経変性疾患に共通するスプライソ
ソーム異常、**第14回RNA学会年会**(2012
年7月/仙台) (口頭発表)
- ③ **築地仁美**、片岡礼音、山中宏二: U snRNP
形成における筋萎縮性側索硬化症(ALS)
原因遺伝子 TDP-43 の役割、**第34回日本
分子生物学会年会** (2011年12月/横浜)
(口頭発表)
- ④ **Tsuiji H.**, Kataoka A., Yamanaka K.,
Regulation of spliceosome by
ALS-causative gene TDP-43. **第34回日
本神経科学大会** (2011年9月/横浜) (英
語) (口頭発表)

[その他]
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

築地 仁美 (TSUIJI HITOMI)

独立行政法人理化学研究所・運動ニューロン
変性研究チーム・研究員

研究者番号: 40455358