

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 05 月 01 日現在

機関番号：13101

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2011～2012

課題番号：23890060

研究課題名（和文）ALS における snRNA 異常の患者組織毎の検討

研究課題名（英文）Alteration of snRNAs in amyotrophic lateral sclerosis.

研究代表者 石原 智彦（ISHIHARA TOMOHIKO）

新潟大学・脳研究所・助教

研究者番号：70612232

研究成果の概要（和文）：

筋萎縮性側索硬化症（ALS）神経組織における TDP-43 蛋白の機能異常がスプライシング調節因子 snRNAs の発現低下を来たすという仮説を提唱し、これを検討した。逆転写定量 PCR 法を用いた検討にて、1) snRNAs の一種である U12 snRNA が ALS 神経組織で低下するが、非神経組織では低下しないこと、2) ALS 患者組織および TDP-43 発現抑制培養細胞における U12 snRNA 依存性スプライシング異常を見出した。これらは ALS における TDP-43 の機能低下の具体的な影響を明らかにしたものとして重要である。

研究成果の概要（英文）：

We stated and investigated the hypothesis that the dysfunction of TDP-43 causes reduction of snRNAs in amyotrophic lateral sclerosis (ALS). We revealed the downregulation of U12 snRNA in the tissues affected with ALS and not in non-affected tissues. Several U12-type intron splicing tended to be downregulated in ALS affected tissues and culture cells with depleted TDP-43.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
平成 23 年度	1,300,000	390,000	1,690,000
平成 24 年度	1,200,000	360,000	1,560,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,500,000	750,000	3,250,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：神経内科学

キーワード：ALS, snRNA, U12 snRNA, スプライシング, 逆転写定量 PCR

1. 研究開始当初の背景

筋萎縮性側索硬化症 (amyotrophic lateral sclerosis: ALS) は代表的な運動ニューロン病(MND)であり、病理学的特徴、遺伝学的特徴から TDP-43 蛋白が病態に深く関連する事が確実である。TDP-43 は RNA 代謝に関連する核内蛋白で、核内小体を形成し、survival of motor neurons (SMN) 蛋白と共局在する。

SMN 蛋白の減少は MND の一つの脊髄性筋萎縮症を引き起こす。SMN 蛋白の機能としてスプライシングに関連する機能的 RNA, small nuclear RNAs (snRNAs) の成熟がある snRNAs は 200 bp 前後の非翻訳領域由来の機能的 RNA で、U1, U2, U4, U5, U6, U11, U12, U4atac, U6atac の 9 種類が存在する。これらは spliceosome といわれる

核酸蛋白複合体を形成し、mRNA 前駆体のスプライシングにおいて、切断されるイントロンの 5'側のドナー、3'側のアクセプター部位の決定を行う (Will CL et al. Biol Chem 2005). スプライシングは major pathway と minor pathway に大別される. major pathway は U1, U2, U4, U5, U6 の 5 種類の snRNAs が関与する major spliceosome にて、minor pathway は U11, U12, U4atac, U5 (共通), U6atac の 5 種類の snRNAs が関与する minor spliceosome にて司られる. SMN 蛋白の低下は、培養細胞、モデル動物において snRNAs の減少を来し、脊髄組織においては U11, U12 snRNA の低下が中心にみられる. さらに組織特異的なスプライシング異常を引き起こす事が報告されている. (Zhang, Z. et al. Cell 2008). この事実は、背髄前角の運動神経細胞が minor pathway の機能低下の影響をより強く受けることを示唆する.

2. 研究の目的

ALS における運動神経特異的変性の病態生理解明を目指す. 申請者は、ALS 残存運動神経でみられる TDP-43 の局在変化により生じる機能異常が U12 snRNA を含む minor spliceosome に関連する snRNAs の発現低下を来すという仮説を提唱した. 実際に ALS 由来神経組織にて U12 snRNA の共通した低下を確認している (62nd AAN, 第 51 回神経学会総会、第 33 回分子生物学会発表、図 1). この低下が TDP-43 の機能低下に由来することを示すためには、ALS における非障害組織、すなわち TDP-43 の病理学的異常を伴わない非神経組織での検討が必要となる. 本研究は、ALS 由来の非神経組織における snRNAs の発現量の変化を逆転写定量 PCR で測定すること、さらには本症にて minor spliceosome の機能低下により引き起こされるスプライシング異常を明らかにすることを目的とする.

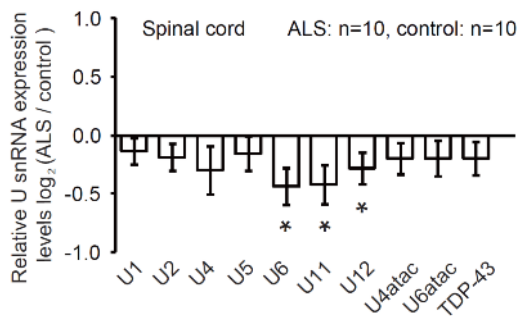


図 1 ALS 脊髄における snRNA の低下

3. 研究の方法

) ALS 患者および対照群の非神経組織での内在性コントロールの選定.

ALS 患者群および対照群における、非神経組織での snRNAs 発現量の差異について逆転写定量 PCR 法を用いて検討した. 正確な定量を行うために対象臓器ごとに、ALS 群および対照群双方で安定して発現する内在性コントロール遺伝子を選定する必要がある. 選定に際しては、TaKaRa 社のハウスキーピング遺伝子プライマーセットを使用して、Actin, GAPDH, RPLP1, RPS18 など、安定して大量に発現していることが予想される、16 種類の内在性コントロール候補遺伝子の発現を検体ごとに逆転写定量 PCR 法にて定量した. その結果をもとに専用アプリケーション GeNorm (<http://medgen.ugent.be/~jvdesomp/genorm/>) (図 2) を用いて内在性コントロール遺伝子を選定した.

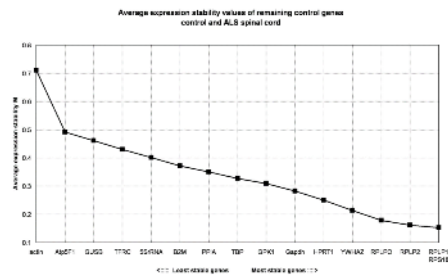


図 2 GeNorm 結果の例

) ALS 患者および対照群の非神経組織での snRNA の定量

非神経組織として肝臓、腎臓、筋肉を用いて、逆転写定量 PCR 法にて snRNAs の定量を行った. 条件設定については、国際的な実験ガイドラインである MIQE ガイドラインに準じた (Bustin, S.A. et al. Clin. Chem. 2009). 測定対象は U1, U2, U4, U5, U6, U11, U12, U4atac, U6atac の 9 種類の snRNA とした. 対象凍結組織からの RNA 抽出は mirVana small RNA Isolation Kit を使用し、RNA の品質確認には RNA Integrity number (RIN) を用いた. 逆転写反応には Invitrogen 社の SuperScriptR VIL0™ cDNA Synthesis KitSMA を、定量 PCR には TaKaRa 社の SYBR Green を使用した. 定量 PCR に用いる各 Primer については過去の実験にて特異性、増幅効率を確認済みである.

) ALS 患者神経組織においてスプライシング異常を来す遺伝子群の同定

申請者は ALS 神経組織において U12 snRNA を中心とする minor spliceosome の低下を確認している. このことが ALS の病態と関与することを示すためには、minor spliceosome により制御される遺伝子の splicing 異常の有無、またそれによる運動神経細胞機能障害の有無について検討を加える必要がある. プライマーを対象遺伝子のエクソン、イントロンの適切な位置に設定することにより、スプラ

イシングの異常を特異的に定量することが可能である(図3). この方法を用いて, ALS 神経組織におけるスプライシング異常の定量を行った. 測定対象遺伝子については, 既報にて minor spliceosome の低下によりスプライシング異常が起きることが報告されている *Importin 4*, (Pessa KJ et al. RNA 2006) の mRNA を選定した.

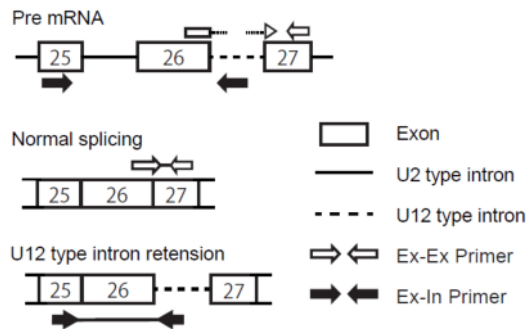


図3 スプライシング異常を検出する Primer の設定

4. 研究成果

内在性コントロール選定ソフト GeNorm を用いて, 16 種類の候補遺伝子より各組織について対照群, ALS 群で最も安定して発現する mRNA を 2 つずつ選定した. 肝臓・腎臓では RPLP0 (ribosomal protein, large, P0), RPS18 (ribosomal protein S18) を, 筋肉では RPLP0, RPLP2 (ribosomal protein, large, P2) の各 mRNA をそれぞれ内在性コントロールとして設定した.

続いて ALS および対照例の非神経組織における snRNAs の発現量を肝臓, 腎臓, 筋肉の 3 組織で逆転写定量 PCR 法にて定量した.

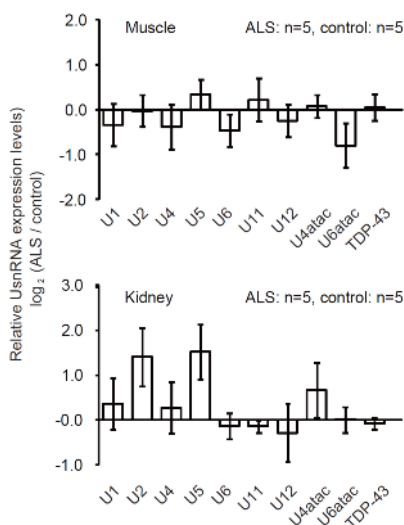


図4 非神経組織の snRNAs 測定結果

各検体間の RNA 濃度補正には, 上記の内在性コントロール mRNA の発現量をもとにした. いずれの ALS 非神経組織においても, 対照群と比較して U12 snRNA の有意な低下は見られなかった(図4).

続いて, TDP-43 発現抑制 U87MG 培養細胞および ALS 患者由来, 大脳皮質運動野神経組織においてスプライシング異常の検討を行った. 測定対象として U12 snRNA 依存性イントロンを有する *IPO-4* mRNA を選定した. その結果, ALS 大脳皮質運動野で *IPO-4* mRNA の U12 snRNA 依存性イントロンのスプライシングの低下を認めた. また同様の変化を TDP-43 発現抑制培養細胞でも確認した(図3, 5). この結果は ALS における TDP-43 の機能低下とスプライシング異常の関連を支持するものとして重要である. 今後の検討課題として, 他臓器での同イントロンのスプライシング変化や, U12 snRNA の関連しないイントロンのスプライシング異常について検討する必要がある.

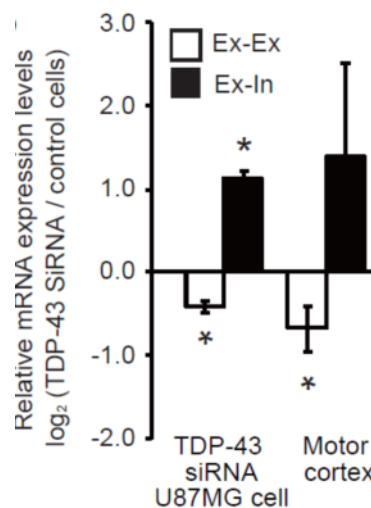


図5 *IPO-4* mRNA スプライシング変化

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)

Shiga, A. Ishihara, T. Onodera, O. et al. Alteration of POLDIP3 splicing associated with loss of function of TDP-43 in tissues affected with ALS, PLoS One, 査読有, vol.2, 2012, e43120

[学会発表](計3件)

石原 智彦 「Reduction of U12 snRNAs in nervous tissues with TDP-43 pathology in amyotrophic lateral

sclerosis」

第 42 回 米国神経科学会

2012 年 10 月 15 日

石原 智彦 「ALS 患者神経組織ではス
プライシング関連 機能性 RNA が低下
する」第 53 回 神経学会総会

2012 年 5 月 23 日

石原 智彦 , 「Alteration of snRNAs in
amyotrophic lateral sclerosis」

第 41 回 米国神経科学会,

2011 年 11 月 12 日

6 . 研究組織

(1)研究代表者

石原智彦 (ISHIHARA TOMOHIKO)

新潟大学 脳研究所 神経内科 助教

研究者番号 : 7 0 6 1 2 2 3 2