

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 9 日現在

機関番号：13101

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2014

課題番号：25860703

研究課題名(和文) ALS 罹患組織における GEM小体減少機序の検討

研究課題名(英文) The pathogenesis of GEM bodies reduction in ALS affected tissues.

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

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)：我々は筋萎縮性側索硬化症(ALS)の病態機序解明を最終的な目的とし、既にRNA代謝異常に注目し、ALS罹患組織にて、mRNAのスプライシングに關与する minor spliceosomal U snRNA が低下する事、U snRNAs の成熟に重要なGEM小体が減少する事を見出している。本研究はGEM小体減少の機序および罹患組織でのスプライシング異常を明らかにする事を目的とした。本研究ではTDP-43発現抑制細胞において、GEM小体の主要構成蛋白質 SMN の発現低下を認めた。さらにALS患者組織において、minor spliceosome 依存性のスプライシング異常を見出した。

研究成果の概要(英文)：Our object is the elucidation of ALS pathogenesis. We have already found the reduction of minor spliceosomal U snRNA and GEM bodies in ALS affected tissues. U snRNA is main component of the splicing machinery and GEM bodies have important role in the maturation of U snRNAs. We intended to clarify the pathogenesis of GEM bodies reduction and aberrant splicing in ALS affected tissues. In this study, we found the reduction of SMN mRNA in TDP-43 depleted cells. SMN protein is main component of GME bodies. And there were minor spliceosome dependent splicing aberrations in ALS affected tissues.

研究分野：医歯薬学

キーワード：ALS U snRNAs GEM小体 スプライシング

1. 研究開始当初の背景

筋萎縮性側索硬化症 (amyotrophic lateral sclerosis: ALS) は上位および下位運動神経細胞が選択的に障害される代表的な運動ニューロン病である。核蛋白の一種である TAR DNA binding protein of 43kDa(TDP-43) 蛋白陽性封入体形成は ALS の病理学的マーカーである。家族性・孤発性 ALS 症例にて 30 種類を超える TDP-43 遺伝子変異が同定されている。これらの事実からは同蛋白が ALS の発症に関与することが強く示唆される。その機序として TDP-43 の機能低下 (loss of function) による RNA 代謝異常を介した神経変性が提唱されている。

TDP-43 は核内で核小体である GEM 小体と共局在を呈する。GEM 小体の主要構成蛋白質は survival of motor neurons (SMN) である。重要なことに 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。GEM 小体の機能としてスプライシングに関連する機能的 RNA, U small nuclear RNAs (U snRNAs) の成熟がある。U 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 といわれる巨大な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 により遂行され, minor pathway は U11, U12, U4atac, U5 (共通), U6atac の 5 種類の U 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, モデルマウスにおいて U 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 (Zhang, Z. et al. Cell 2008)。さらに SMN モデル動物において, U12 snRNA の関与する, minor pathway によるスプライシングが, 運動神経の発達に重要であることが報告された (Lotti et al. Cell, 2012)。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。申請者は既に ALS 罹患神経組織における U12 snRNA を中心とする U snRNA の低下を確認している (図 1)。

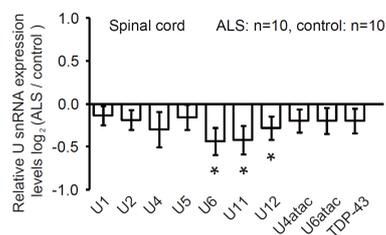


図 1: ALS 脊髄における U snRNA の低下

そこで ALS においても SMA 同様に minor spliceosome の機能低下によるスプライシングの異常が生じ, それが運動神経選択的障害の原因の一つであると仮定し, 検討を進めている。

2. 研究の目的

申請者らは TDP-43 機能低下により minor spliceosome に関連する U snRNAs が低下する事, および U snRNAs の成熟に重要な核内小体, GEM 小体が ALS 患者組織にて低下している事を既に見出し, その研究に従事している。本研究の目的は GEM 小体減少の具体的機序, および snRNA の低下による罹患組織での mRNA 代謝異常を明らかにし, ALS の病態生理の解明を進めることである。

3. 研究の方法

(1) TDP-43 発現低下培養細胞における SMN および複合体形成蛋白質の定量。
TDP-43 発現低下培養細胞および対照群における, SMN および複合体形成蛋白質の発現量の差異についてウェスタンブロット法を用いて検討した。測定対象は TDP-43, SMN およびその複合体形成蛋白である gemin 2, 3, 4, 6, 8 の 7 種類とした。培養細胞を RIPA バッファーで溶解, 遠心しその上清を使用した。泳動量を一定にするために, 蛋白濃度を BCA アッセイキットで測定し, SDS ポリアクリルアミドゲルで電気泳動を行った。個々の蛋白の同定, 定量に対しては先行論文 (Zhang et al. cell, 2008) で使用されている特異的抗体を使用した。

(2) TDP-43 発現低下培養細胞における SMN および複合体形成蛋白 mRNA 発現量の定量。
TDP-43 発現低下培養細胞および対照群における, SMN および複合体形成蛋白の mRNA 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。逆転写定量 PCR 法の条件設定は, 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て行った。測定対象は TDP-43, SMN および, 複合体形成に際して SMN と直接結合する Gemin 2, 3, 8 の mRNA の発現量とした。また SMN mRNA は exon 5, 7 の有無により 4 種類の選択的スプライシングを有するので, これをあわせた 8 種類の mRNA を測定対象とした。

(3) ALS 患者由来の罹患神経組織における SMN および複合体形成蛋白 mRNA 発現量の定量。
ALS 患者由来組織および対照群における, SMN および複合体形成蛋白の mRNA 発現量の差異についても逆転写定量 PCR 法を用いて検討を行った。実験の手法は培養細胞でのものと同一である。

(4) TDP-43 発現低下培養細胞および ALS 罹

患組織におけるスプライシング異常の検討 . 実際 ALS においては複数の遺伝子のスプライシング異常が報告されているが (Rabin SJ et al. HMG 2010), TDP-43 の直接的なスプライシング調節機能の低下によるものか, U snRNAs の低下を介した変化かは明らかでないものが多い . 一部の遺伝子については TDP-43 のスプライシングへの直接的関与が明らかとなっている (Polymenidou et al. nat neurosci. 2011, Shiga et al. PLoS One.2012). minor pathway の機能低下の ALS 病態への関与を示すためには, minor spliceosome により制御される遺伝子のスプライシング異常の有無を示す必要がある . Minor spliceosome の関与するスプライシングはスプライシング全体の 1%以下にすぎないと推測されている (Levine A et al. Nucleic Acids Res 2001). 対象となる遺伝子はデータベース化されており (U12 DB : <http://genome.crg.es/cgi-bin/u12db/u12db.cgi>), 膨大な遺伝子群の中から, 測定対象とする遺伝子を絞り込むことが比較的容易に行える . 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事が可能である . Gars, Importin 1, IFT-40 など (Pessa KJ et al. RNA 2006) の mRNA を選定する .

4 . 研究成果

本研究では培養細胞および ALS 罹患組織において GEM 小体関連蛋白と同 mRNA の定量を行った . siRNA 法による TDP-43 発現抑制培養細胞では, 逆転写定量 PCR 法にて, GEM 小体の主要構成蛋白質である SMN の mRNA および蛋白質の低下を認めた . さらに SMN と複合体を形成する Gemin 3,4,6,8 についても複数の細胞系で低下を確認した (図 2).

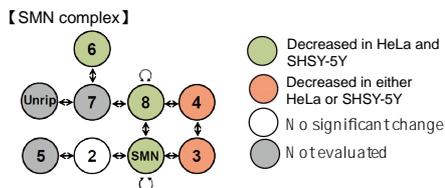


図 2 : TDP-43 発現抑制細胞での SMN 複合体蛋白の低下パターン
矢印は蛋白間の結合を表す .

しかし, ALS 罹患組織では SMN mRNA の低下は認めなかった . ALS 罹患組織における GEM 小体数の低下は, SMN 蛋白質の直接的な低下のみでは説明が困難である . これに関して我々は核内での GEM 小体の形成, 安定化に TDP-43 蛋白質が寄与する可能性を考えている .

また TDP-43 発現抑制培養細胞および ALS

罹患組織におけるスプライシング異常の検討を行い, IPO-4, IFT80 など複数の mRNA での splicing 異常を認めた (図 3).

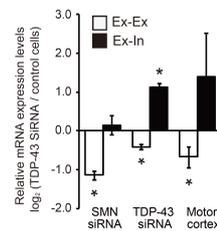


図 3 : IPO-4 mRNA の培養細胞, ALS 罹患組織におけるスプライシング変化 . Ex-Ex は正常のスプライシングを, Ex-In は U12 type イントロンが残存した mRNA

を示す .

これらの単独, あるいは複数のスプライシング異常が ALS の原因となりうるのかについては確定的でない . この点を明らかにするために, 運動神経選択的な mRNA 発現解析やモデル動物の作成などが, 今後の課題として挙げられる .

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 3 件)

石原 智彦, 柿田 明美, 高橋 均, 小野寺理, 西澤 正豊 <Symposium 33-4> TDP-43 の新展開 ALS における spliceosome 異常 . 臨床神経 . 2014;12(54) : 査読なし

Onodera O, Ishihara T, Shiga A, Ariizumi Y, Yokoseki A, Nishizawa M. Minor splicing pathway is not minor any more: implications for the pathogenesis of motor neuron diseases.

Neuropathology. 2014;34(1) : 査読有り

Ishihara T, Ariizumi Y, Shiga A, Onodera O. et.al. (他 11 人 . 筆頭著者)

Decreased number of Gemini of coiled bodies and U12 snRNA level in amyotrophic lateral sclerosis. Hum Mol Genet . 2013;22(20) : 査読有り

〔学会発表〕(計 4 件)

発表者名 : 石原 智彦,

演題名 : The reduction of minor spliceosome and aberrant splicing in ALS.

学会名 : Cell symposia Regulatory RNAs

発表年月日 : 2014 年 10 月 21 日

場所 : バークリー (USA)

発表者名 : 石原 智彦,

演題名 : Reduction of U11/U12 small nuclear ribonucleoprotein in amyotrophic lateral sclerosis

学会名 : the 24th International Symposium on ALS/MND

発表年月日 : 2013 年 12 月 8 日

場所：ミラノ（イタリア）

〔招待講演〕

発表者名：石原 智彦，
演題名：ALSにおける spliceosome 異常
学会名：第 54 回日本神経学会学術大会 シ
ンポジウム 33 TDP-43 の新展開
発表年月日：2014 年 5 月 24 日
場所：福岡国際会議場，(福岡・福岡)

発表者名：石原 智彦，
演題名：The Minor splicing pathway is not
a minor any more: Implication for motor
neuron disease.
学会名：第 4 回新潟大学脳研究所共同研究拠
点国際シンポジウム RNA WORLD IN BRAIN
発表年月日：2013 年 7 月 27 日
場所：新潟大学脳研究所，統合脳機能研究セ
ンター，(新潟・新潟)

〔図書〕(計 1 件)

著者名：酒井 直子，石原 智彦，小野寺 理，
西澤 正豊．
出版社名：日本臨牀社
書名：別冊日本臨床 .新 領域別症候群 No.27 .
タイトル：ALS10 (TARDBP 遺伝子変異による
ALS.
発行年：2014 年 ページ：491-495

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 助教
研究者番号：70612232