
 原 著

筋萎縮性側索硬化症における small nuclear RNAs の減少

石原智彦

新潟大学医歯学総合研究科分子細胞医学専攻

分子情報医学講座神経内科学分野専攻

(主任：西澤正豊教授)

Alteration of snRNAs in Amyotrophic Lateral Sclerosis

Tomohiko ISHIHARA

Niigata University Graduate School of Medical and Dental Science/

Course for Molecular and Cellular Medicine/

Molecular Neuroscience and Brain Disease/Neurology

(Director: Prof. Masatoyo NISHIZAWA)

要 旨

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り, 病理学的特徴として残存運動神経細胞において TAR DNA binding protein of 43 kDa 蛋白 (TDP-43) 陽性の細胞質内封入体と核蛋白である TDP-43 の核からの消失を認める. ALS の 10% は家族性であるが, そのうち 5-10% で TDP-43 遺伝子変異を伴う. これらのことから TDP-43 は ALS の病態に深く関わっていると推察される. TDP-43 は不均一核内リボ核酸蛋白のひとつであり, 核内小体を形成し, survival of motor neurons (SMN) 蛋白と共局在する. SMN 蛋白を産生する SMN1 遺伝子は, 劣性遺伝性の運動ニューロン病である脊髄性筋萎縮症 (spinal muscular atrophy: SMA) の原因遺伝子である. SMA は SMN1 遺伝子コピー数の減少により発症し, 下位運動神経細胞優位の運動神経疾患をきたす. SMN 蛋白はメッセンジャー RNA 前駆体のスプライシングを行う small nuclear RNAs (snRNAs) を成熟, 安定化させる. snRNAs は major spliceosome と minor spliceosome を構成するものに大別される. SMA 蛋白を減少させた SMA モデルマウスでは minor spliceosome を構成する snRNAs が減少し, 広範なスプライシング異常をきたすことが報告されている. SMA の解析より, snRNAs 特に minor spliceosome は, 運動神経細胞死に密接に関与してい

Reprint requests to: Tomohiko ISHIHARA
Department of Neurology
Brain Research Institute Niigata University
1-757 Asahimachi - dori Chuo - ku,
Niigata 951 - 8585 Japan

別刷請求先: 〒951-8585 新潟市中央区旭町通1-757
新潟大学脳研究所神経内科学教室 石原智彦

ると考えられる。著者は、TDP-43が直接 snRNAs の成熟に関与する、もしくは共局在する SMN 蛋白と共同して snRNAs の成熟に関与する可能性を考えた。この仮説を検証するため、TDP-43 発現抑制細胞、もしくは ALS 患者の神経組織にて snRNAs 量を検討した。その結果、TDP-43 発現抑制ヒト培養細胞において、minor spliceosome を中心とする一部の snRNAs の減少を見いだした。また ALS 患者の神経組織にて minor spliceosome の一つである U12 snRNA の有意な低下を明らかにした。今回の実験結果から著者は、ALS の病態機序として、U12 snRNA の減少による minor splicing pathway の異常を提唱する。

キーワード：筋萎縮性側索硬化症, TDP-43, 脊髄筋萎縮症, SMN, snRNAs

はじめに

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。中年以降に発症する進行性の四肢筋力低下、球麻痺ならびに呼吸筋力の低下を臨床的特徴とし、3-5年の経過で呼吸不全により死の転帰をとる。病理学的特徴として、残存運動神経細胞に TAR DNA binding protein of 43kDa (TDP-43) 蛋白陽性の細胞質内封入体を認める¹⁾²⁾。ALS の10%は家族性であるが、そのうち5-10%で TDP-43 遺伝子変異を伴う。現在までに30種類を超える TDP-43 遺伝子変異が家族性あるいは孤発性 ALS にて同定されている³⁾⁴⁾。これらのことから、TDP-43 は ALS の病態に深く関わっていると推察される。

TDP-43 は不均一核内リボ核酸蛋白 heterogeneous nuclear ribonucleoproteins (hnRNPs) の一種であり、核蛋白である。しかし、TDP-43 陽性の細胞質内封入体を認める ALS 患者の運動神経細胞では、TDP-43 の核における染色性が失われる。核蛋白である TDP-43 が核から消失するという事実は、ALS の病態機序において、TDP-43 の核における機能低下に関与する可能性を示唆する。

TDP-43 は414個のアミノ酸からなり、2つの RNA 認識モチーフを持つ。メッセンジャー RNA (messenger RNA: mRNA) のスプライシング⁵⁾ や RNA の安定化など⁶⁾、RNA 代謝に関連していることが知られているが、その詳細は不明である。

TDP-43 は核内構造物のひとつである核内小体を形成する。さらに survival of motor neurons (SMN) 蛋白と共局在する⁷⁾。しかし核内小体での TDP-43 の機能や、SMN との共局在の意義については明らかになっていない。

SMN 蛋白を産生する SMN1 遺伝子は、劣性遺伝性の運動ニューロン病である脊髄性筋萎縮症 (spinal muscular atrophy: SMA) の原因遺伝子である⁸⁾⁹⁾。SMA は SMN1 遺伝子コピー数の減少により発症し、下位運動神経に選択的な運動ニューロン病をきたす。また SMN1 遺伝子コピーの総数には、正常者でも1から3個の多型が存在する。SMN1 遺伝子コピー数の低下は ALS の発症の危険因子として報告されている¹⁰⁾。このことは SMN の機能が ALS においても運動神経細胞の機能維持に重要な役割を果たしていることを示している。

SMN 蛋白の重要な機能は small nuclear RNAs (snRNAs) を成熟、安定化させることである¹¹⁾。snRNAs は200bp前後の短い非翻訳領域由来の RNA で、U1, U2, U4, U5, U6, U11, U12, U4atac, U6atac の9種類がある。これらは 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¹²⁾¹³⁾。スプライシングには、多くの遺伝子のスプライシングに寄与する major splicing pathway と、数は少ないが、イオンチャネルサブユニット蛋白、DNA 修復、RNA 転写や翻訳に関連する遺伝子のスプライシングを制御する minor splicing pathway が知られている¹³⁾¹⁴⁾。両者は異なったドナー、アクセプター、ブランチ部

位のコンセンサ配列を持ち、この配列の認識は spliceosome といわれる核酸蛋白複合体により行われる¹²⁾。major splicing pathway のスプライシングを行う major spliceosome には U1, U2, U4, U5, U6 の5種類の snRNAs が含まれる。一方、minor splicing pathway のスプライシングを行う minor spliceosome には U11, U12, U4atac, U5 (共通), U6atac の5種類の snRNAs が含まれる¹²⁾。

SMN 蛋白量の低下を伴う SMA のモデルマウスでは、minor spliceosome の snRNAs の減少を引き起こし¹⁵⁾¹⁶⁾、広汎なスプライシング異常を引き起こすことが報告されている¹⁶⁾。広汎なスプライシング異常により、脊髄運動神経細胞の選択的な変性が引き起こされるという事実は、運動神経細胞が minor spliceosome の機能低下の影響をより強く受けることを示唆する。

SMA の解析より、snRNAs 特に minor spliceosome は運動神経細胞死に密接に関与していることが考えられる。著者は、TDP-43 が直接 snRNAs の成熟に関与する、もしくは共局在する SMN 蛋白と共同して snRNAs の成熟に関与する可能性を考えた。この仮説を検証するために、TDP-43 発現抑制細胞、もしくは ALS 患者の神経組織にて snRNAs 量を検討した。その結果、TDP-43 発現抑制ヒト培養細胞において一部の snRNAs の減少を見いだした。また ALS 患者由来神経組織にて U12 snRNA の有意な低下があることを明らかにした。

材料と方法

1. 培養細胞への低分子干渉 RNA (small interfering RNA : siRNA) 導入

本研究では HeLa 細胞 (ヒト子宮頸癌由来)、SHSY-5Y 細胞 (ヒト神経芽細胞腫由来)、U87-MG 細胞 (ヒト膠芽腫由来) の3種類の培養細胞を使用した。各細胞は、ウシ胎児血清 (Invitrogen) 10% を添加した DMEM (Invitrogen) を使用し、37℃、二酸化炭素濃度 5% の条件下で培養した。対象とする mRNA を選択的に抑制するため、低分子 RNA 干渉法 (siRNA 法) を用いた。TDP-

43mRNA に対して On Targeting plus TDP-43 Pool (ID: E-012394-00-0020, Dharmacon), SMN mRNA に対して On Targeting plus SMN Pool (ID: L-011108-00, Dharmacon), 対照として On Targeting plus non-Target Pool (ID: D-001810-10-20, Dharmacon) の siRNA を使用した。siRNA 導入には Lipofectamin RNAi MAX (Invitrogen) を用いた。35 mm 培養皿 1 皿につき siRNA 100pmol, RNAi Max7.5ul, OptiMEM (Invitrogen) 500ml を混和し、常温で 20 分反応させたのち、培養皿に滴下した。siRNA 導入後、SMN siRNA 処理 HeLa 細胞群は 3 日、SMN siRNA 処理 U87-MG 細胞および TDP-43 siRNA 処理群は 6 日後に細胞を回収した。

2. 培養細胞からの RNA 回収と RNA 品質の確認

培養細胞ペレットより total RNA を抽出した。通常の RNA 回収法では、今回測定対象とする 200bp 前後の small RNA の回収は困難なため、mirVana miRNA isolation kit (ID: AM1560, Ambion) を使用した。同キットの total RNA 回収プロトコールに基づき、各検体から 20-100 μg の RNA をそれぞれ抽出した。RNA の品質確認には Agilent RNA 6000 Nano Kit (Agilent Technologies), Bioanalyzer 2100 (Agilent Technologies) を用い、RNA Integrity Number (RIN) を測定した。培養細胞より抽出した RNA の RIN は SMN siRNA 処理群では 8.9-10.0, TDP-43 siRNA 処理群では 9.3-10.0, control siRNA 処理群では 8.7-10.0 と良好であった。また 200nt 以下の small RNA 分画を回収できていることを確認した (図 1A)。

3. ヒト剖検組織からの RNA 回収と RNA 品質確認

ヒトでの解析部位として、脊髄、大脳皮質運動野、視床を対象とした。脊髄では ALS 5 例 (平均年齢 70.2 歳)、対照群 6 例 (平均年齢 71.3 歳) について、大脳皮質運動野、視床では ALS 4 例 (平均年齢 72.5 歳)、対照群 5 例 (平均年齢 71.0 歳)

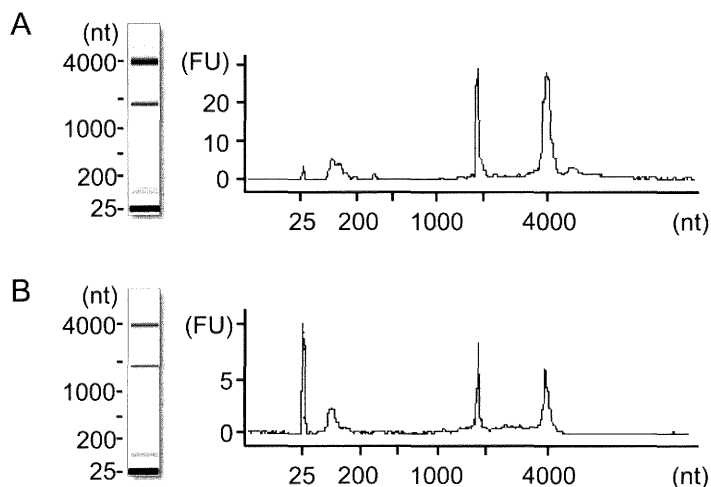


図1 BioanalyzerによるRNAの品質の検討

実験に用いたRNAの代表的な電気泳動図(左)とその波形図(右)を示す。波形図の縦軸は蛍光値(FU)、横軸は推定核酸サイズ(nt)を現す。25 ntのピークはサイズマーカー、50から200 ntのピークはsmall RNA分画、約2000 ntのピークは18SリボソームRNA、約4000 ntのピークは28SリボソームRNAを示す。波形からRNA Integrity Number(RIN)を算出しRNAの品質を検討した。RINスコアで培養細胞では8点以上、神経組織では6.5点以上のRNAを実験に使用した。(A)対照siRNAで処理を行ったHeLa細胞由来RNAの電気泳動波形を示す。RINは9.8点である。small RNA分画も良好に抽出されている。(B)対照脊髄由来のRNA電気泳動波形を示す。RINは8.8点でsmall RNA分画も良好に抽出されている。

について検討した(表2)。対象としたALS群では脊髄では5例全例にTDP-43陽性の細胞質内封入体形成を認め、大脳皮質運動野、視床では4例中3例で封入体形成を認め、1例では封入体を認めなかった。凍結組織80-150mgよりmirVana miRNA isolation kitを使用し、total RNA回収プロトコールに基づき、各検体から20-80 μ gのRNAをそれぞれ抽出した。抽出したRNAのRINはALS患者脊髄で7.6-9.6(平均8.5, 標準偏差0.48)、対照脊髄で6.9-8.8(平均8.0, 標準偏差0.68)、ALS患者大脳皮質運動野で7.7-8.8(平均8.3, 標準偏差0.46)、対照大脳皮質運動野で7.2-7.7(平均7.5, 標準偏差0.17)、ALS患者視床で7.1-7.9(平均7.6, 標準偏差0.36)、対照視床で7.0-8.3(平均7.7, 標準偏差0.51)であった。ま

た、神経組織のRNA抽出においてもsmall RNA分画を回収できていることを確認した(図1B)。

4. 逆転写定量PCRによるsnRNAsおよびmRNAの定量。

回収したRNAを200ngずつSuperScriptR VILO™ cDNA Synthesis Kit(Invitrogen)を用い、ランダムプライマーにて逆転写を行い、相補的DNA(complementary DNA:cDNA)を作成した。得られたcDNAはnuclease free waterにて逆転写前のRNA量が1 ng/ μ lとなるように調整した。

逆転写定量PCR(polymerase chain reaction)はガイドライン(The MIQE Guidelines¹⁷⁾)に従い、条件設定を行った。9種類のsnRNAsおよび

表 1 逆転写定量 PCR に用いたプライマー配列一覧

名称	塩基配列 (5'→3')	増幅産物 サイズ (bp)	増幅効 率
U1 snRNA	For GATACCATGATCACGAAGGTGGTT	109 bp	1.07
	Rev AAATTATGCAGTCGAGTTTCCCAC		
U2 snRNA	For TTTGGCTAAGATCAAGTGTAGTATCTGTTC	84 bp	0.94
	Rev AATCCATTTAATATATTGTCCTCGGATAGA		
U4 snRNA	For GCGCGATTATTGCTAATTGAAA	76 bp	0.99
	Rev AATTGCCAATGCCGACTATAT		
U5 snRNA	For GGTTTCTTTCAGATCGCATAAAATC	87 bp	1.10
	Rev AAAAAATTGGGTTAAGACTCAGAGTT		
U6 snRNA	For GCTTCGGCAGCACATATACTAAAAT	80 bp	1.08
	Rev AATTTGCGTGTTCCTTGGC		
U11 snRNA	For GTGCGGAATCGACATCAAGAG	75 bp	0.92
	Rev CGGGACCAACGATCAC		
U12 snRNA	For AACTTATGAGTAAGGAAAATAACGATTTCG	85 bp	1.00
	Rev CCTTACCCTGCTCAAAAATT		
U4atac snRNA	For GCGCATAGTGAGGGCAGTACT	74 bp	1.04
	Rev CCAAAAATAAAGCAAAAAGCTCTAGTT		
U6atac snRNA	For AGGTTAGCACTCCCCTTGACAA	72 bp	0.98
	Rev CAATGCCTTAACCGTATGACG		
TDP43	For TGCTTCGGTGCCTGTGC	93 bp	0.99
	Rev TCGTTCTCATCTTCGGTTAC		
SMN	For GCTGATGCTTTGGGAAGTATGTTA	98 bp	1.03
	Rev CACCTTCCTCTTTTGTATTTGTC		
5S rRNA	For CGGCCATACCACCCTGAAC	86 bp	1.10
	Rev GTCTCCCATCCAAGTACTAA		
PPIA	Takara 社より購入 ID:HA067810	200 bp	
TBP	Takara 社より購入 ID:HA067808	170 bp	
RPLP1	Takara 社より購入 ID:HA067802	160 bp	
RPS18	Takara 社より購入 ID:HA067807	89 bp	

TDP-43, SMN mRNA を測定対象とした。qRT-PCR 用の設計にあたっては、snRNAs および内在性コントロール候補の 5S リボソーム RNA については既報を参考に作成した¹⁶⁾。TDP-43, SMN については Primer3 (<http://frodo.wi.mit.edu/primer3/>) を用いて設計した (表 1)。それぞれのプライマーについて、BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) を用い in silico での特異性検討を行い、PCR 産物のサイズを算出した (表 1)。

HeLa 細胞由来の cDNA をもとに 1 ng/ul, 1×10^{-1} ng/ul, 1×10^{-2} ng/ul, 5×10^{-3} ng/ul, 1×10^{-3} ng/ul の希釈系列を作成した。希釈系毎に逆転写定量 PCR を行い、得られた結果を基にそ

れぞれのプライマーの増幅効率を算出し、増幅効率が 0.90-1.10 の範囲に入る物を選択した (表 1)。また PCR 産物を 2% アガロースゲルに電気泳動し、増幅産物が単一であり、予測通りのサイズであることを確認した (図 2)。

内在性コントロールは次のように設定した。まず個々の培養細胞、もしくは組織毎に 16 種類の候補遺伝子 (Human Housekeeping gene Primer set (ID3790, Takara) に含まれる 15 種類 および 5S リボソーム RNA) について逆転写定量 PCR を行った。その定量結果 (Threshold Cycle 値: CT 値) をもとに内在性コントロール選定アプリケーション GeNorm (<http://medgen.ugent.be/~jvdesomp/genorm/>) を用いて、安定して発現し

表2 病理検体一覧

ALS 患者群					
年齢	性別	疾患(全経過:月)	脊髄	大脳皮質運動野	視床
83	男性	ALS(15)	+	+	+
61	男性	ALS(84)	+	-	-
63	男性	ALS(14)	+	+	+
61	女性	ALS(46)	+	+	+
83	女性	ALS(8)	+	+	+
平均年齢(標準偏差)			70.2±10.4	72.5±10.5	72.5±10.5
対照群					
年齢	性別	疾患(全経過:月)	脊髄	大脳皮質運動野	視床
55	女性	成人T細胞白血病	+	+	+
67	男性	血球貪食症候群	-	+	+
76	男性	消化管出血	+	+	+
82	女性	重症筋無力症	+	+	+
75	女性	クッシング症候群	+	+	+
64	男性	腎不全	+	-	-
80	男性	腹部出血	+	-	-
平均年齢(標準偏差)			72.0±9.5	71.0±9.3	71.0±9.3

+:解析した検体

ている内在性コントロール遺伝子の mRNA を 2 種類選定した (geNorm manual: http://medgen.ugent.be/~jvdesomp/genorm/geNorm_manual.pdf). SMN siRNA 処理群 HeLa 細胞での内在性コントロールは RPLP1 (60S acidic ribosomal protein P1), RPS18 (40S ribosomal protein S18) に設定した. SMN siRNA 処理群 U87-MG 細胞では内在性コントロールとして PPIA (peptidyl-prolyl isomerase A), TBP (TATA binding protein) を選出した. TDP-43 siRNA 処理群の HeLa 細胞の内在性コントロールは PPIA, TBP を, SHSY-5Y 細胞, U87-MG 細胞では RPLP1, RPS18 を用いた. 脊髄, 大脳皮質運動野, 視床では RPLP1, RPS18 とした.

逆転写定量 PCR には Thermal Cycler Dice[®] Real Time System Single (TP850, Takara) を, 試薬は SYBR Premix Ex Taq[™] (ID: RR041A, Takara) を使用した. PCR の条件は 1) 95 度, 30

秒, 2) 95 度, 15 秒, 3) 60 度, 30 秒, 2)-3) 40 サイクルとした. PCR 1 反応あたり 1 ng/ul cDNA 溶液を 0.33 ul ずつ使用し, 最終プライマー濃度は 0.2uM とした. qRT-PCR の定量は $\Delta\Delta$ CT 法で算出した. これは対象とする 2 検体間の濃度差を Normalization Factor (NF) で補整したのち (Δ CT), 両者の Δ CT 値の差 ($\Delta\Delta$ CT) を算出する方法である. NF は以下の計算式で求めた. 遺伝子 A, B を内在性コントロールとして, その CT 値を CTa, CTb とすると $NF = \sqrt{CTa * CTb}$ として算出した (geNorm manual:http://medgen.ugent.be/~jvdesomp/genorm/geNorm_manual.pdf).

統計解析はスチューデントの t 検定にて行い, $p < 0.05$ を有意差ありとした. グラフ表記は対照群の平均を 1 としたときの目的群の平均値を記載した. エラーバー表記は既報¹⁶⁾ を参考にし, 以下の計算式で求めた. A 群・B 群の 2 群間で遺伝子 X について測定する場合, それぞれの群内の遺

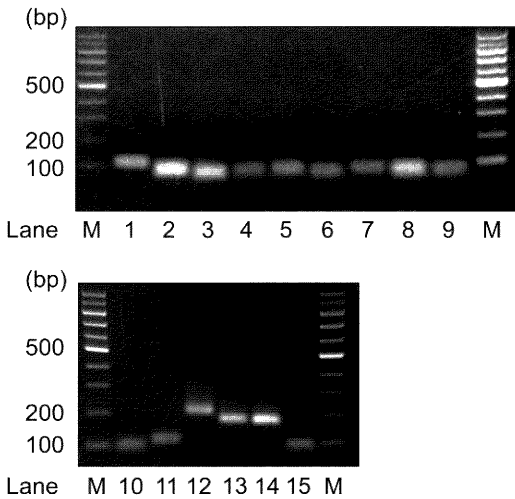


図2 逆転写定量 PCR に用いたプライマーによる PCR 産物の電気泳動像

HeLa 細胞 cDNA を用い、今回の逆転写定量 PCR に用いた各々のプライマー (表 1) にて PCR を行った。その増幅産物のアガロース 2 % ゲルでの電気泳動像を示す。M は 100 bp ラダーを示す。上段は 1. U1 snRNA, 2. U2 snRNA, 3. U4 snRNA, 4. U5 snRNA, 5. U6 snRNA, 6. U11 snRNA, 7. U12 snRNA, 8. U4atac snRNA, 9. U6atac snRNA, 下段は 10. TDP-43, 11. SMN, 12. PPIA, 13. TBP, 14. RPLP1, 15. RPS18 の定量に用いたプライマーによる増幅産物を示す。各増幅産物は単一であり、予測された大きさと一致する (表 1)。

伝子 X の ΔCT 値の標準偏差を求め、A 群の標準偏差を SEa, B 群の標準偏差を SEb とし、エラーバーを $\sqrt{SEa^2 + SEb^2}$ として算出した。

結 果

1. 逆転写定量 PCR 法による snRNAs 定量方法の確立

SMN の減少は HeLa 細胞 (ヒト子宮頸癌由来細胞)¹⁶⁾ およびマウス組織において snRNAs の低下を引き起こす¹⁵⁾¹⁶⁾。そこで著者は、SMN siRNA により SMN の発現を抑制した HeLa 細胞において、逆転写定量 PCR 法による snRNAs の

定量方法を検討した。SMN mRNA は SMN siRNA 処理群では、対照群の平均と比較して 17 % まで減少した ($p < 0.005$)。また対照群に比し、U11 snRNA は 83 % ($p = 0.055$)、U12 snRNA は 82 % ($p = 0.21$) と低下傾向を認めた (図 3A)。次に SMN siRNA 処理した U87-MG 細胞 (ヒト膠芽腫由来) にても検討した。SMN siRNA 処理をした U87-MG 細胞では、対照群と比して SMN mRNA は 6 % ($P < 0.005$) まで減少した (図 3B)。snRNAs は U5, U6, U11 を除く 6 種類にて、対照群と比して統計学的に有意な低下を認めた。特に U12 snRNA は 31 % ($P < 0.005$)、U4atac snRNA は 33 % ($P < 0.005$) と高度な低下を認めた (図 3B)。U12, U4atac snRNAs の低下は SMA モデルマウス由来の神経組織でも示されている¹⁶⁾。以上の実験結果から、本方法がヒト snRNAs の定量方法として妥当であると結論した。

2. TDP-43 発現抑制下のヒト培養細胞における snRNAs 量の検討

TDP-43 の発現抑制が snRNAs 量に与える影響を、HeLa 細胞、SHSY-5Y 細胞、U87-MG 細胞にて検討した。それぞれ TDP-43 siRNA もしくは control siRNA で処理後、snRNAs 量を対照群と比較して定量した。HeLa 細胞では TDP-43 siRNA により TDP-43 mRNA が 10 % に減少した ($p < 0.005$)。U5, U12 snRNAs は約 70 % に低下する傾向を認めたが、有意差はなかった ($p > 0.05$) (図 4A)。SHSY-5Y 細胞では TDP-43 mRNA が 54 % に低下した ($p < 0.005$)。さらに U4atac snRNA に 61 % ($p < 0.005$)、U6atac snRNA に 85 % ($P < 0.005$) の低下を認めた (図 4B)。U87-MG 細胞では TDP-43 が 8 % に低下した ($p < 0.005$)。snRNAs では U12 snRNA に 55 % の低下を認めた ($P < 0.05$)。一方で U1, U2, U6, U11 snRNAs には 130 から 170 % の優位な増加を認めた ($p < 0.05$) (図 4C)。

3. ALS 患者神経組織における snRNAs 量の検討

続いて ALS 患者の神経組織において TDP-43

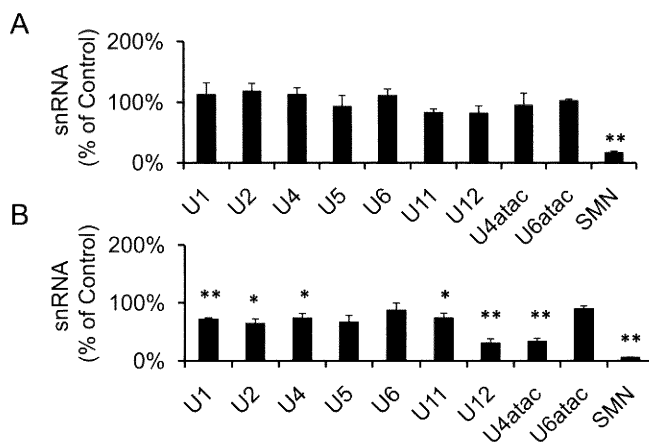


図3 ヒト培養細胞でのSMNの低下によるsnRNAsの減少

SMN siRNA 処理 (n = 3) ないし control siRNA 処理 (n = 3) を行った HeLa 細胞および U87-MG 細胞より total RNA を回収し、逆転写定量 PCR 法にて snRNAs を定量した。SMN siRNA 処理細胞群における各 snRNA の量を対照細胞群の各 snRNA 量と比較して%表示で図示している。a) HeLa 細胞, b) U87-MG 細胞での結果を示す。エラーバー表記は既報¹⁶⁾を参考にし、以下の計算式で求めた。A 群・B 群の 2 群間で遺伝子 X について測定する場合、それぞれの群内の遺伝子 X の Δ CT 値の標準偏差を求め、A 群の標準偏差を SEa, B 群の標準偏差を SEb とし、エラーバーを $\sqrt{SEa^2 + SEb^2}$ として算出した。(* p<0.05, ** P<0.005)。

の封入体形成が好発する脊髄(胸髄)と大脳皮質運動野、視床において snRNAs の量的変化を検討した。対照群に比して ALS 患者神経組織群ではいずれの組織においても、U12 snRNA の有意な低下を認め、対照群と比較して脊髄では 56%、大脳皮質運動野では 46%、視床では 49% に低下していた (p < 0.05)。加えて背髄では U1 snRNA に 83% (p < 0.05)、U6 snRNA に 72% (p < 0.05) の有意な低下を認めた(図 5A)。大脳皮質運動野では U4 snRNA に 69% (p < 0.05)、U4atac snRNA に 62% (p < 0.05) の有意な低下を認めた(図 5B)。視床では U6atac snRNA の 70% と有意な低下を認めた (p < 0.05)(図 5C)。

考 察

TDP-43 は ALS の残存運動神経細胞において細胞質内封入体に含まれる¹⁾²⁾、またその遺伝子変異により家族性、孤発性 ALS を引き起こす³⁾⁴⁾。

これらの事実は TDP-43 が ALS の病態に大きく寄与していることを示す。ALS の病理学的特徴として TDP-43 陽性の封入体の形成に加え、核蛋白である TDP-43 の核からの消失が挙げられる。TDP-43 は不均一核内リボ核酸蛋白である hnRNPA や hnRNPH と結合し⁵⁾¹⁸⁾、核内で mRNA 前駆体のスプライシング等、RNA 代謝に関与する⁶⁾。TDP-43 の正常の作用部位である核からの消失により、TDP-43 が本来担っている RNA 代謝に関する機能が低下している可能性が推察される。実際に ALS で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¹⁹⁾²⁰⁾。しかしこれらの遺伝子と TDP-43 との関連は不明である。一方、培養細胞系で TDP-43 が直接スプライシングに関与することが示されている cystic fibrosis transe-membrane conductance regulator²¹⁾ やアポリポ蛋白 A-II²²⁾ 遺伝子では、ALS 患者においてスプライシング異常は報告されていない¹⁹⁾。TDP-43 のどのような機能の低下が

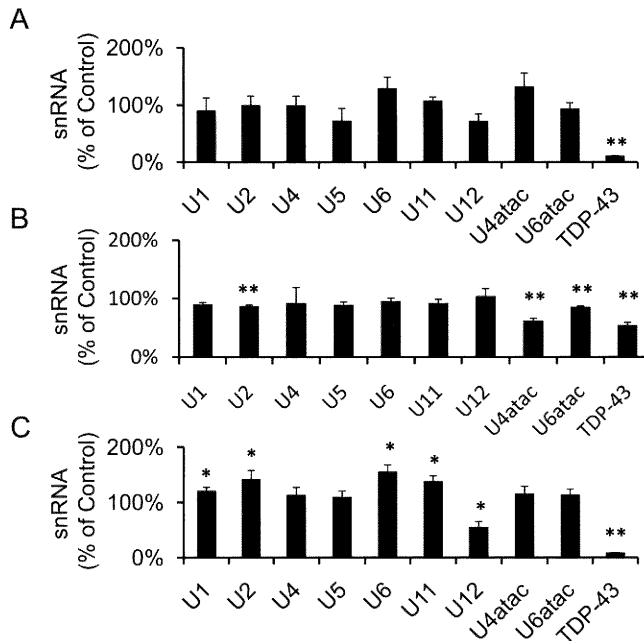


図4 ヒト培養細胞での TDP-43 の低下による snRNAs の減少

TDP-43 siRNA 処理 (n = 3) ないし control siRNA 処理 (n = 3) を行った HeLa 細胞, SHSY-5Y 細胞, U87-MG 細胞より total RNA を回収し, 逆転写定量 PCR 法にて snRNAs を定量した. TDP-43 siRNA 処理細胞群における各 snRNA の量を対照細胞群の各 snRNA 量と比較して%表示で図示している. (A) HeLa 細胞, (B) SHSY-5Y 細胞, (C) U87-MG 細胞での結果を示す. エラーバーは図3と同様に記載している. (*p<0.05, **P<0.005).

ALS での運動神経細胞死に関与するかは明かではなかった.

TDP-43 は SMN と共局在し, 核内小体を形成する⁷⁾. SMN の核内小体での機能は mRNA 前駆体のスプライシングに関与する snRNAs の成熟である¹¹⁾. このことから著者は, TDP-43 の機能として snRNAs の成熟を想定し, これを検証した結果, ヒト神経組織由来細胞で TDP-43 の発現を抑制すると, snRNAs が低下することを示した. さらに ALS 由来の, 脊髄, 大脳皮質運動野, 視床において minor spliceosome の一員である U12 snRNA を始めとする snRNAs の低下を見いだした. スプライシングはイントロン中の, 5' 側のドナー配列, 3' 側のアクセプター配列, さらにアク

セプター配列の 10-40 bp 上流のブランチ配列により制御される¹²⁾. スプライシング制御機構の中で minor spliceosome はドナー配列, アクセプター配列の選択は比較的ルーズであるが, ブランチ配列 (UCCUUAACU) の認識は厳密である¹²⁾. U12 snRNA はこのブランチ配列の認識に寄与し¹²⁾, この snRNA の低下は minor splicing pathway に由来するスプライシングの停滞を引き起こすと考えた. 今回の実験結果から著者は, ALS の病態機序として, U12 snRNA 減少による minor splicing pathway のスプライシング異常を提唱する. 同様に運動神経細胞の選択的脱落をきたす SMA モデルマウスにおいても, U4atac, U12 snRNA を含めた minor spliceosome を構成する snRNAs の低下

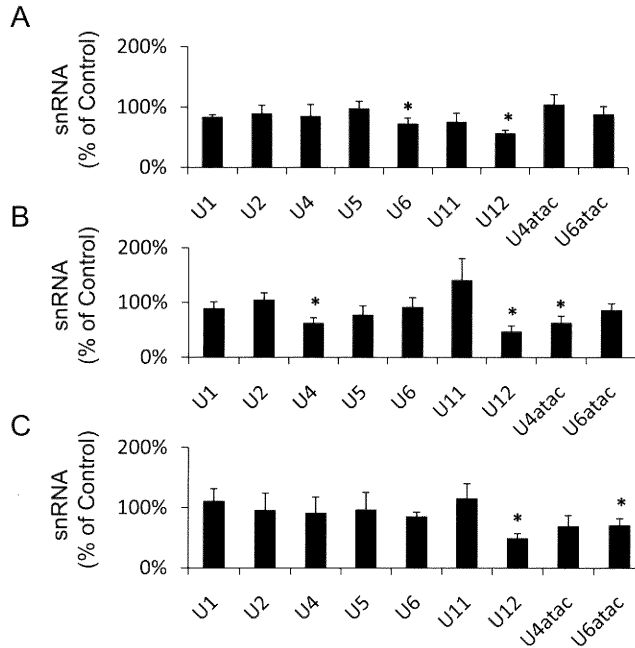


図5 ALS患者の神経組織におけるsnRNAsの減少

ALS患者群または対照群の脊髄 (ALS患者群 $n = 5$, 対照群 $n = 6$), 大脳皮質運動野 (ALS患者群 $n = 4$, 対照群 $n = 5$), 視床 (ALS患者群 $n = 4$, 対照群 $n = 5$) より total RNA を回収した. 逆転写定量PCR法にてそれぞれの組織におけるsnRNAsを定量した. ALS患者群の組織における各snRNAの量を対照群組織の各snRNAと比較して%表示で図示している. (A) 脊髄, (B) 大脳皮質運動野, (C) 視床での結果を示す. エラーバーは図3と同様に記載している. (* $p < 0.05$).

を認めることは, minor splicing pathway と運動神経細胞死との関連を支持する¹⁵⁾¹⁶⁾. 今後, ALS患者組織にて, 実際に minor splicing pathway に関与するスプライシング異常が起きているかを検証する必要がある.

スプライシングには major と minor の2つの pathway があり, それぞれ major spliceosome, minor spliceosome という核酸蛋白複合体により制御される. snRNAs は spliceosome の主要因子であり, 各 snRNA に共通の Sm 蛋白7量体および各 snRNA に固有な複数の蛋白と結合している. SMN 蛋白は snRNAs と Sm 蛋白との結合に必須である¹¹⁾. U1, U2, U4, U5, U6 の5種類の snRNAs は major spliceosome を構成し, 一方,

U11, U12, U4atac, U5 (major spliceosome と共通), U6atac の5種類の snRNAs は minor spliceosome を構成する¹²⁾. minor pathway で処理されるイントロンは全体の約1%にすぎないが¹⁴⁾ DNA の複製や修復, RNA の転写, 翻訳などの機能を司る重要な遺伝子や¹²⁾, イオンチャネルサブユニット蛋白の遺伝子を制御している (U12DB: <http://genome.crg.es/cgi-bin/u12db/u12db.cgi>). また同一遺伝子に, 両者で制御されるイントロンがしばしば混在し, minor splicing pathway のスプライシングがその遺伝子全体のスプライシング速度や蛋白合成速度の律速段階となる²³⁾²⁴⁾. さらに, 両方の spliceosome pathway を使い分け, 選択的スプライシングを行うことにより, 組織特

異的な蛋白を産生する機構も知られている²⁵⁾。これらの事実は minor pathway の異常が細胞機能に重篤な障害をきたすことを示唆する。

TDP-43 の発現抑制、核からの消失が snRNAs の減少を引き起こすメカニズムとしては、TDP-43 が SMN を介し間接的に機能低下を引き起こす可能性と、TDP-43 が直接 snRNAs の成熟に関わる可能性とが考えられる。前者を支持する事実として、前述したように SMN の低下は snRNAs の減少をきたす。また TDP-43 は核内小体において SMN と共局在する⁷⁾。さらに TDP-43 は SMN mRNA のスプライシングに寄与する。SMN には SMN1 遺伝子と SMN2 遺伝子という 2 種類の相同遺伝子があり、両者の違いはわずか 5 塩基のみであるが、SMN2 mRNA の 90 % は exon7 のスプライシングを受け、不安定な SMN Δexon7 蛋白を産生する²⁶⁾²⁷⁾。TDP-43 は SMN2 mRNA の intron7 の取り込みを促進し、SMN2 遺伝子由来の産物を安定化させ、SMN 蛋白量を増加させることが示唆されている²⁸⁾。よって、TDP-43 蛋白の欠乏は SMN の蛋白量を低下させる可能性がある。一方現時点で snRNAs の成熟に直接関わるような TDP-43 の機能は想定されていない。また snRNAs はイントロンを持たないため、TDP-43 のスプライシング調節機能も関与しない。以上から著者は ALS における snRNAs の減少は、TDP-43 の局在変化、機能低下を介した SMN の機能低下に由来すると推察している。今後、TDP-43 蛋白が SMN 蛋白に与える影響を確認するために、TDP-43 siRNA 細胞における SMN 蛋白、SMN 複合体蛋白量の定量、核内小体数の計測を行う必要がある。さらに ALS 患者組織においても培養細胞同様の検討を行う必要がある。

ALS の病態機序を SMN 蛋白の機能を介した snRNAs の減少で説明する場合、2 つの問題が挙げられる。まず一つは、SMA モデルマウスの神経組織と ALS 患者の神経組織で減少を認めた snRNAs の種類が必ずしも一致しない点である (図 5)¹⁵⁾¹⁶⁾。第一の問題点に対する説明としては、著者の解析はヒト成人例であり、既報は若年マウスであるという種と年齢の違いが影響する可

能性が考えられた。実際、SMA モデルマウスの神経組織における snRNAs 低下パターンは、生後 6 日と 11 日のわずかな間でも変化していること¹⁶⁾から、snRNAs の成熟に關与する SMN の役割は年齢に応じて能動的に変化する可能性がある。もう一つの問題は SMA と ALS の組織選択性の違いである。両者は共に運動ニューロン病に分類されるが、前者は下位運動神経細胞の選択的障害であり、後者は上位下位運動神経細胞共に障害を来す。SMN モデルマウスでは、上位神経細胞でも snRNAs の低下とスプライシング異常を認めるが、神経変性は下位運動神経に局限する¹⁶⁾。第二の問題点に対しても、snRNAs の低下がもたらすスプライシングへの影響が年齢により異なる可能性が予想される。mRNA 前駆体の 70 % 以上は胎生期、幼児期、成人期の各発生段階や組織特異的に異なるスプライシングを受ける²⁹⁾。発達期には snRNAs の低下は二次運動神経細胞により大きな影響を与え、成人期では一次、二次運動神経細胞の両者に影響を与える可能性を考えた。今後 TDP-43 や SMN のコンディショナル発現抑制モデルマウスにて、発現抑制を誘導する時期を替えて運動神経細胞への影響を検討することにより、この仮説が明らかになると考える。

本研究では非神経系細胞である HeLa 細胞では、TDP-43 siRNA にて有意な snRNAs の低下は認めなかった (図 4A)。神経系の培養細胞である SHSY-5Y 細胞とグリア細胞である U87-MG 細胞では、snRNAs の低下は顕著であったが、両細胞でその低下のパターンは異なっていた (図 4B, C)。ALS 患者の神経組織間においても U12 以外の snRNAs の挙動は異なっていた (図 5)。この事実は細胞、組織毎に snRNAs の成熟のメカニズムや、TDP-43 関与の重要性が異なること、神経細胞は TDP-43 低下による snRNAs の低下をきたしやすいことを推察させる。今後さらに多種類の TDP-43 siRNA 培養細胞および神経組織において、snRNAs の定量を行う必要がある。

今回筆者が見いだした ALS 患者の神経組織での U12 snRNA をはじめとする minor spliceosome の減少は mRNA のスプライシング異常をきたす。

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。minor splicing pathwayが寄与し、ALSの病態に関わる可能性のある遺伝子としてはALSの原因遺伝子の一つであるfused in sarcoma蛋白の関連蛋白であるFUS interacting proteinやグリア成熟因子等があげられる。TDP-43の核からの消失を認める運動神経細胞において、実際にこれらの遺伝子のスプライシングに異常が生じているか、今後の検討が重要である。

謝 辞

本研究全般にわたり、御指導御助言をいただきました、新潟大学脳研究所脳疾患リソース研究部門分子神経疾患資源解析学分野 小野寺理先生、新潟大学脳研究所神経内科 西澤正豊教授、日本学術振興会特別研究員志賀 篤先生、脳研究所生命科学リソース研究センター遺伝子機能解析学 宮下哲典先生、貴重な病理組織をご提供いただきました脳研究所病態神経科学部門病理学豊島靖子先生、高橋 均教授、脳研究所脳科学リソース研究部門脳疾患標本資源解析学柿田明美先生に心より深謝申し上げます。

参 考 文 献

- 1) Arai T, Hasegawa M, Akiyama H, Ikeda K, Nonaka T, Mori H, Mann D, Tsuchiya K, Yoshida M, Hashizume Y and Oda T: TDP-43 is a component of ubiquitin-positive tau-negative inclusions in frontotemporal lobar degeneration and amyotrophic lateral sclerosis. *Biochem Biophys Res Commun* 351: 602-611, 2006.
- 2) Neumann M, Sampathu DM, Kwong LK, Truax AC, Micsenyi MC, Chou TT, Bruce J, Schuck T, Grossman M, Clark CM, McCluskey LF, Miller BL, Masliah E, Mackenzie IR, Feldman H, Feiden W, Kretschmar HA, Trojanowski JQ and Lee VM: Ubiquitinated TDP-43 in frontotemporal lobar degeneration and amyotrophic lateral sclerosis. *Science* 314: 130-133, 2006.
- 3) Yokoseki A, Shiga A, Tan CF, Tagawa A, Kaneko H, Koyama A, Eguchi H, Tsujino A, Ikeuchi T, Kakita A, Okamoto K, Nishizawa M, Takahashi H and Onodera O: TDP-43 mutation in familial amyotrophic lateral sclerosis. *Ann Neurol* 63: 538-542, 2008.
- 4) Lagier-Tourenne C, Polymenidou M and Cleveland DW: TDP-43 and FUS/TLS: emerging roles in RNA processing and neurodegeneration. *Hum Mol Genet*, 19: 46-64, 2010.
- 5) Buratti E, Brindisi A, Giombi M, Tisminetzky S, Ayala YM and Baralle FE: TDP-43 binds heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A/B through its C-terminal tail: an important region for the inhibition of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator exon 9 splicing. *J Biol Chem* 280: 37572-37584, 2005.
- 6) Strong MJ: The evidence for altered RNA metabolism in amyotrophic lateral sclerosis (ALS). *J Neurol Sci* 288: 1-12, 2010.
- 7) Wansg IF, Reddy NM and Shen CK: Higher order arrangement of the eukaryotic nuclear bodies. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99: 13583-13588, 2002.
- 8) Lefebvre S, Burglen L, Reboullet S, Clermont O, Burlet P, Viollet L, Benichou B, Cruaud C, Millasseau P, Zeviani M, Denis L, Paslier, Jean F, Daniel C, Jean W, Arnold M and Judith M: Identification and characterization of a spinal muscular atrophy-determining gene. *Cell* 80: 155-165, 1995.
- 9) Coovert DD, Le TT, McAndrew PE, Strasswimmer J, Crawford TO, Mendell JR, Coulson SE, Androphy EJ, Prior TW and Burghes AH: The survival motor neuron protein in spinal muscular atrophy. *Hum Mol Genet* 6: 1205-1214, 1997.
- 10) Corcia P, Camu W, Halimi JM, Vourc'h P, Antar C, Vedrine S, Giraudeau B, de Toffol B and Andres CR: SMN1 gene, but not SMN2, is a risk factor for sporadic ALS. *Neurology* 67: 1147-1150, 2006.
- 11) Pellizzoni L: Chaperoning ribonucleoprotein biogenesis in health and disease. *EMBO Rep* 8: 340-345, 2007.

- 12) Will CL and Luhrmann R: Splicing of a rare class of introns by the U12 - dependent spliceosome. *Biol Chem* 386: 713 - 724, 2005.
- 13) Pessa HK, Ruokolainen A and Frilander MJ: The abundance of the spliceosomal snRNPs is not limiting the splicing of U12 - type introns. *RNA* 12: 1883 - 1892, 2006.
- 14) Levine A and Durbin R: A computational scan for U12 - dependent introns in the human genome sequence. *Nucleic Acids Res* 29: 4006 - 4013, 2001.
- 15) Gabanella F, Butchbach ME, Saieva L, Carissimi C, Burghes AH and Pellizzoni L: Ribonucleo - protein assembly defects correlate with spinal muscular atrophy severity and preferentially affect a subset of spliceosomal snRNPs. *PLoS One* 2: e921, 2007.
- 16) Zhang Z, Lotti F, Dittmar K, Younis I, Wan L, Kasim M and Dreyfuss G: SMN deficiency causes tissue - specific perturbations in the repertoire of snRNAs and widespread defects in splicing. *Cell* 133: 585 - 600, 2008.
- 17) Bustin SA, Benes V, Garson JA, Hellemans J, Huggett J, Kubista M, Mueller R, Nolan T, Pfaffl MW, Shipley GL, Vandesompele J and Wittwer CT: The MIQE guidelines: minimum information for publication of quantitative real - time PCR experiments. *Clin Chem* 55: 611 - 622, 2009.
- 18) Freibaum BD, Chitta RK, High AA and Taylor JP: Global analysis of TDP - 43 interacting proteins reveals strong association with RNA splicing and translation machinery. *J Proteome Res* 9: 1104 - 1120, 2010.
- 19) Rabin SJ, Kim JM, Baughn M, Libby RT, Kim YJ, Fan Y, La Spada A, Stone B and Ravits J: Sporadic ALS has compartment - specific aberrant exon splicing and altered cell - matrix adhesion biology. *Hum Mol Genet* 19: 313 - 328, 2010.
- 20) Xiao S, Tjostheim S, Sanelli T, McLean JR, Horne P, Fan Y, Ravits J, Strong MJ and Robertson J: An aggregate - inducing peripherin isoform generated through intron retention is upregulated in amyotrophic lateral sclerosis and associated with disease pathology. *J Neurosci* 28: 1833 - 1840, 2008.
- 21) Buratti E, Dork T, Zuccato E, Pagani F, Romano M and Baralle FE: Nuclear factor TDP - 43 and SR proteins promote in vitro and in vivo CFTR exon 9 skipping. *EMBO J* 20: 1774 - 1784, 2001.
- 22) Mercado PA, Ayala YM, Romano M, Buratti E and Baralle FE: Depletion of TDP 43 overrides the need for exonic and intronic splicing enhancers in the human apoA - II gene. *Nucleic Acids Res* 33: 6000 - 6010, 2005.
- 23) Singh J and Padgett RA: Rates of in situ transcription and splicing in large human genes. *Nat Struct Mol Biol* 16: 1128 - 1133, 2009.
- 24) Patel AA, McCarthy M and Steitz JA: The splicing of U12 - type introns can be a rate - limiting step in gene expression. *EMBO J* 21: 3804 - 3815, 2002.
- 25) Scamborova P, Wong A and Steitz JA: An intronic enhancer regulates splicing of the twintron of *Drosophila melanogaster prospero* pre - mRNA by two different spliceosomes. *Mol Cell Biol* 24: 1855 - 1869, 2004.
- 26) Lorson CL, Strasswimmer J, Yao JM, Baleja JD, Hahnen E, Wirth B, Le T, Burghes AH and Androphy EJ: SMN oligomerization defect correlates with spinal muscular atrophy severity. *Nat Genet* 19: 63 - 66, 1998.
- 27) Burnett BG, Munoz E, Tandon A, Kwon DY, Sumner CJ and Fischbeck KH: Regulation of SMN protein stability. *Mol Cell Biol* 29: 1107 - 1115, 2009.
- 28) Bose JK, Wang IF, Hung L, Tarn WY and Shen CK: TDP - 43 overexpression enhances exon 7 inclusion during the survival of motor neuron pre - mRNA splicing. *J Biol Chem* 283: 28852 - 28859, 2008.
- 29) Maniatis T and Tasic B: Alternative pre - mRNA splicing and proteome expansion in metazoans. *Nature* 418: 236 - 243, 2002.

(平成 23 年 1 月 17 日受付)