

< Symposium 33-4 > TDP-43 の新展開

ALS における spliceosome 異常

石原 智彦¹⁾²⁾ 柿田 明美³⁾ 高橋 均⁴⁾ 小野寺 理²⁾ 西澤 正豊¹⁾

要旨：TDP-43 は RNA 代謝に関連する核内蛋白である。その機能低下による RNA 代謝異常が、代表的な成人運動ニューロン疾患である筋萎縮性側索硬化症 (Amyotrophic lateral sclerosis; ALS) 病態機序の一つとして提唱されている。われわれは ALS 罹患神経組織において、TDP-43 機能低下に由来した、核内小体の一種 GEM 小体数および機能性 RNA 蛋白複合体 minor spliceosomes の発現低下がみられる事を報告した。同様の現象は小児運動ニューロン疾患である脊髄性筋無力症 (spinal muscular atrophy) でもみとめられることから、運動ニューロン疾患における選択的神経変性において重要な役割をはたしている可能性がある。

(臨床神経 2014;54:1155-1157)

Key words : 筋萎縮性側索硬化症, 脊髄性筋萎縮症, GEM 小体, minor spliceosome

はじめに

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疾患であるが、その病態機序は未だに不明である。本症は残存運動神経細胞およびグリア細胞における TAR-DNA Binding Protein 43 kDa (TDP-43) の細胞質内封入体形成と核からの消失を病理学的特徴とする。TDP-43 は RNA 代謝に関連する核内蛋白であり、その機能低下による RNA 代謝異常が ALS 病態機序の一つとして提唱されている。われわれは ALS における spliceosome 異常に注目し、研究をおこなっている¹⁾。

GEM 小体と Spliceosome

Spliceosome は、messenger RNA 前駆体 (pre mRNA) のスプライシング反応を司る高分子複合体であり、機能性 RNA の一種、U small nuclear RNA (U snRNA) と複数の特異的蛋白より構成される²⁾。また spliceosome は対応する pre-mRNA の配列から、major/minor spliceosome に分類される。Major spliceosome には U1, 2, 4, 5, 6snRNA が、minor spliceosome には U11, 12, 4atac, 5, 6atac snRNA がそれぞれ属する。U5 snRNA は両者に共通である²⁾。U snRNA の成熟には、SMN 蛋白および、同蛋白を主要な構成成分とする核内小体である GEM 小体が重要である。ALS と同じく運動ニューロン疾患の脊髄性筋萎縮症 (spinal muscular atrophy; SMA) では、遺伝的に SMN 蛋白発現量が低下し、GEM 小体数が減少している。また SMA モデル動物では GEM 小体および minor spliceosome が減少していることが確認されている³⁾⁴⁾。

ALS における Spliceosome

興味深いことに TDP-43 と GEM 小体は核内で共局在を呈し、TDP-43 の発現量は GEM 小体数に影響する¹⁾⁵⁾。われわれは ALS において TDP-43 の機能低下から GEM 小体、minor spliceosome の発現低下が生じるという作業仮説に基づいて、これを検討した。その結果、ALS 患者由来組織において免疫染色で GEM 小体数および minor spliceosome 構成蛋白質の一種、59K snRNP 蛋白質の発現量に有意な低下をみとめた。また逆転写定量 PCR 法によって U12 snRNA を中心とする minor spliceosome U snRNA¹⁾ (Fig. 1) および minor spliceosome 構成蛋白質の一種、48K snRNP mRNA の有意な発現低下を確認した。以上の結果より ALS においても SMA 同様に、minor spliceosome の低下が示されたといえる。また TDP-43 の病理学的変化をともしなわなない SOD1 遺伝子変異をともしなう ALS 例では、GEM 小体数の低下はみとめられなかった。このことから、TDP-43 が spliceosome 発現には重要であることがより強く示唆される。SMA モデル動物においては、脊髄運動神経および介在ニューロンにおいて、minor spliceosome 依存性 splicing をうける Stasimon mRNA の splicing 異常および発現量低下が神経変性をきたすことが報告されている⁴⁾。われわれはヒトの Stasimon ホモログである TMEM41B mRNA 発現について逆転写定量 PCR 法により検討をおこなった。その結果 TDP-43 発現抑制細胞においては、TMEM41B mRNA の 30% の有意な発現低下がみられた。しかし ALS 脊髄組織での同様の検討では有意な変化はみいだせなかった。今後の課題として、in situ hybridisation や免疫染色をもちい、より運動神経細胞選択的な検討をおこなっていく必要がある。

¹⁾ 新潟大学脳研究所臨床神経科学部門神経内科学 [〒951-8122 新潟県新潟市中央区旭町通]²⁾ 新潟大学脳研究所生命科学リソース研究センター分子神経疾患資源解析学³⁾ 新潟大学脳研究所生命科学リソース研究センター脳疾患標本資源解析学⁴⁾ 新潟大学脳研究所病理学分野

(受付日：2014年5月24日)

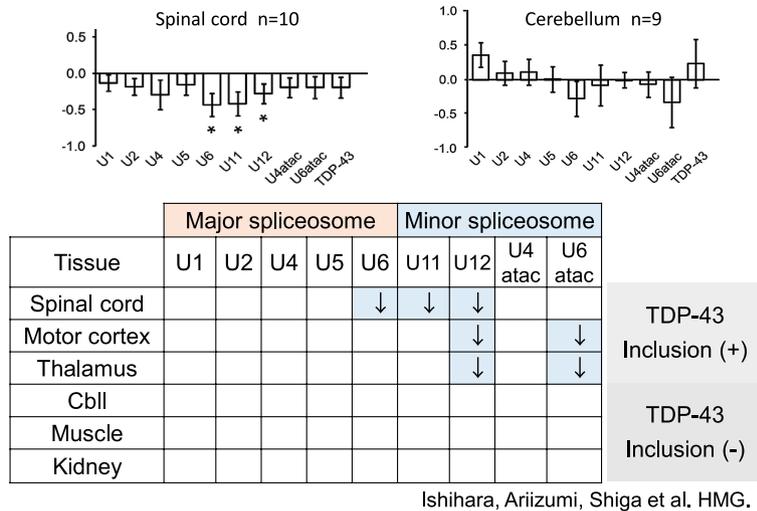


Fig. 1 ALS 罹患組織における U snRNA の減少.

対照群と比較した ALS 罹患組織における U snRNA の発現量の変化を示す。定量には逆転写定量 PCR 法をもちいた。U1, 2, 4, 5, 6 はそれぞれ major spliceosome に、U11, 12, 4atac, 6atac はそれぞれ minor spliceosome に属する U snRNA である。ALS 罹患組織において、minor spliceosome snRNA を中心とする有意な低下をみとめる。一方で非罹患組織ではこの変化はみとめられない。

Ribostasis による運動神経変性選択性

以上の結果からは、minor spliceosome の低下により生じる splicing 異常が、ALS, SMA という 2 つの運動ニューロン疾患に共通する原因であることが示唆される。しかし両者の発症年齢および罹患組織は同一でない。ALS では中高年以降に上位・下位運動ニューロンが、SMA では幼少期に下位運動ニューロンが選択的に障害される。minor spliceosome 低下による運動神経変性を提唱するにあたっては、この ALS と SMA の差異を説明する必要がある。われわれはそれぞれの運動神経細胞内の RNA の恒常性、ribostasis⁶⁾ の差異を一つの理由として挙げる。個々の細胞、組織がそれぞれの分化、代謝をおこなうにあたり、求められる ribostasis も細胞種・年齢、発達段階において、それぞれにことなる。SMA は SMN 蛋白質の遺伝的欠損により出生時より GEM 小体、minor spliceosome の低下がある。ALS では TDP-43 の機能低下により中高年以降に、GEM 小体、minor spliceosome が低下を来すと想定される。この発症年齢の違いにより、上位・下位運動ニューロンの RNA 代謝異常に対する脆弱性がそれぞれことなるために、両疾患はことなる表現型を呈すると考えることができる。

まとめ

ALS 罹患神経組織における、核内小体の一種 GEM 小体数および機能性 RNA 蛋白複合体 minor spliceosome の発現低下を報告した。これは TDP-43 機能低下に由来すると考えられ、

RNA 代謝異常による ALS 発症メカニズムを考察する上で重要である。同様の現象は小児運動ニューロン疾患である脊髄性筋無力症 (spinal muscular atrophy) でもみとめられ、運動ニューロン疾患における選択的神経変性において重要な役割を有する可能性がある。

※本論文に関連し、開示すべき COI 状態にある企業、組織、団体はいずれも有りません。

文 献

- 1) Ishihara T, Ariizumi Y, Shiga A, et al. Decreased number of Gemini of coiled bodies and U12 snRNA level in amyotrophic lateral sclerosis. *Hum Mol Genet* 2013;22:4136-4147.
- 2) Will CL, Luhrmann R. Spliceosome structure and function. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 2011;3.
- 3) Zhang Z, Lotti F, Dittmar K, et al. SMN deficiency causes tissue-specific perturbations in the repertoire of snRNAs and widespread defects in splicing. *Cell* 2008;133:585-600.
- 4) Lotti F, Imlach WL, Saieva L, et al. An SMN-dependent U12 splicing event essential for motor circuit function. *Cell* 2012; 151:440-454.
- 5) Tsuiji H, Iguchi Y, Furuya A, et al. Spliceosome integrity is defective in the motor neuron diseases ALS and SMA. *EMBO Mol Med* 2013;5:221-234.
- 6) Ramaswami M, Taylor JP, Parker R. Altered ribostasis: RNA-protein granules in degenerative disorders. *Cell* 2013;154: 727-736.

Abstract**Aberration of the spliceosome in amyotrophic lateral sclerosis**

Tomohiko Ishihara, M.D., Ph.D.¹⁾²⁾, Akiyoshi Kakita, M.D., Ph.D.³⁾, Hitoshi Takahashi, M.D., Ph.D.⁴⁾,
Osamu Onodera, M.D., Ph.D.²⁾ and Masatoyo Nishizawa, M.D., Ph.D.¹⁾

¹⁾Department of Neurology, Brain Research Institute, Niigata University

²⁾Department of Molecular Neuroscience, Center for Bioresource-based Researches, Brain Research Institute, Niigata University

³⁾Department of Pathological Neuroscience, Center for Bioresource-based Researches, Brain Research Institute, Niigata University

⁴⁾Department of Pathology, Bioresource-based Researches, Brain Research Institute, Niigata University

TDP-43 is a nuclear protein that plays a role in RNA metabolism, and its dysfunction has been implicated in the pathogenesis of amyotrophic lateral sclerosis (ALS), a typical adult-onset motor neuron disease. We investigated RNA metabolism in relation to TDP-43 function in neuronal tissues affected by ALS, and found a decrease in the number of nuclear GEM bodies, as well as reduced expression of minor spliceosomes, which are functional RNA-protein complexes. Similar features have been reported in spinal muscular atrophy (SMA), a motor neuron disease affecting infants. These findings, together with those reported in SMA, strongly suggest that reduction of minor spliceosomes has an important role in the pathomechanism underlying the selective degeneration of motor neurons characteristic of both ALS and SMA.

(Clin Neurol 2014;54:1155-1157)

Key words: amyotrophic lateral sclerosis, spinal muscular atrophy, GEM body, minor spliceosome
