



筋萎縮性側索硬化症 (ALS) での 神経細胞死を阻止する鍵となる RNA 分子を同定

研究成果のポイント

- ・ ALS 注¹ 関連タンパク質である TDP-43 注² の機能を阻害すると、核内低分子 RNA 注³ の一つである U6 snRNA の発現量が減少。
- ・ U6 snRNA 発現量の回復は、TDP-43 の機能阻害による遺伝子転写産物注⁴ のスプライシング状態の異常を一部正常化することを発見。
- ・ U6 snRNA 発現量を回復させると神経細胞死を抑制できたことから、ALS の治療戦略の進展に道。

研究成果の概要

筋萎縮性側索硬化症 (ALS) は、進行性の難病です。運動神経細胞が侵されることで筋肉を動かす信号が伝わらなくなり、体を動かしにくくなったり、筋肉がやせ細っていきます。ALS に関するしくみとしては、TDP-43 というタンパク質の機能が阻害されると運動神経細胞が死んでしまう (細胞死) ことが知られていました。

本研究では、RNA 干渉法を用いて TDP-43 の機能を阻害した細胞では、核内低分子 RNA の一つである U6 snRNA の発現量が減少していることを突き止めました。TDP-43 と U6 snRNA が実際に結合していることも確かめられました。この TDP-43 の機能を阻害した細胞に U6 snRNA の発現遺伝子を導入し U6 snRNA 量を回復させると、細胞生存率が上昇しました。さらに、TDP-43 の機能阻害により転写産物のスプライシング状態に異常が起こることが知られていますが、U6 snRNA 発現量を回復させると、正しいスプライシング状態の転写産物が増加することを発見しました。以上の点は、ALS 発症過程の神経細胞死について、細胞の中で何が起きているかを明らかにした重要な成果です。これらにより、U6 snRNA は TDP-43 の異常により引き起こされる ALS 病態の解明と進行抑制のための重要なターゲットであると考えられます。

本研究の成果は、北海道大学大学院先端生命科学研究院細胞機能科学分野 (教授: 金城政孝) において、北村 朗助教を中心に行われたものであり、PLOS ONE 誌で公開されました。

なお、本研究は、日本学術振興会科学研究費助成事業 (学術研究助成基金助成金) 基盤研究 C (課題番号: 26440090)、三井住友信託銀行公益信託「生命の彩」ALS 研究助成基金、日本 ALS 協会 ALS 基金研究奨励金、国立研究開発法人日本医療研究開発機構 (AMED) 医療分野研究成果展開事業先端計測分析技術・機器開発プログラム、公益財団法人秋山記念生命科学振興財団 研究助成【奨励】、及び公益財団法人中谷医工計測技術振興財団 技術開発研究助成【特別研究】の助成により行われました。

論文発表の概要

研究論文名 : U6 snRNA expression prevents toxicity in TDP-43-knockdown cells. (TDP-43 をノックダウンした細胞における U6 snRNA の発現は細胞毒性を下げる)

著者 : 矢原真郎¹, 北村 朗², 金城政孝² (¹北海道大学大学院生命科学院生命融合科学コース, ²北海道大学大学院先端生命科学研究院細胞機能科学分野)

公表雑誌 : PLOS ONE (Public Library of Science 社によるオープンアクセス誌)

公表日 : 米国太平洋時間 2017 年 11 月 10 日 (金) (オンライン公開)

研究成果の概要

(背景)

筋萎縮性側索硬化症 (ALS) を含む神経変性疾患は、ヒト体内の神経細胞が変性・脱落することにより生じる病気です。神経細胞が変性・脱落するとその神経が担っていた恒常的な機能に変調をきたすことから、認知症や筋肉制御機能の低下・消失などの症状が見られるようになります。アルツハイマー病、パーキンソン病など様々な神経変性疾患が知られている中で、ALS は筋肉に指令を与える役割を担う運動神経細胞が特異的に変性・脱落することにより、歩行や呼吸が困難となる病気です。

ALS の原因として、TDP-43 の機能損失が知られています。TDP-43 は、メッセンジャーRNA や低分子 RNA などの細胞内で重要な働きを持つ転写産物のスプライシング状態を制御し、それらを成熟させるのに不可欠なタンパク質であることが知られています。また、TDP-43 は細胞生存や神経発生などに欠かせない遺伝子であることがこれまでの研究から知られていましたが、実際の細胞内で TDP-43 の機能損失が起こってからどのような過程を介して細胞死が起こるのかについては明らかになっていませんでした。そこで北村助教らの研究グループは、TDP-43 の機能損失時、実際に細胞内で起こる変化の過程を調べることにしました。

(研究手法と成果)

内在性 TDP-43 タンパク質の発現量を減少させ機能を損失させるために、マウス神経芽細胞腫 (Neuro2A) に低分子干渉 RNA (siRNA)^{注5}を導入する RNAi ノックダウン法を用いました。その結果、TDP-43 タンパク質の発現量が 10%以下まで減少することを確認しました。

同条件下で細胞生存性を解析したところ、TDP-43 の発現量は siRNA 導入後 72 時間経過の時点で減少したにも関わらず、細胞死は siRNA 導入後 120 時間経過しないと現れないことがわかりました。48 時間のタイムラグがあったことから、TDP-43 の機能損失から細胞死までの間に、何らかの未知のステップが介在していることが予想されました。

この細胞内で起こる変化を調べるために、核内低分子 RNA の一つで RNA スプライシングに不可欠の U6 snRNA に着目し、その発現量を定量的 PCR 法^{注6}により求めたところ、TDP-43 の機能損失時、U6 snRNA の発現量が 50%減少していました。このとき、他の種類の核内低分子 RNA である U1, U2 及び U4 snRNA の発現量に有意な変化は見られませんでした。次に、TDP-43 を免疫沈降した共沈降物中に含まれる U6 snRNA の量を調べることで、TDP-43 と U6 snRNA が実際に相互作用することを確認しました。また、U6 snRNA を RNAi 法によりノックダウンすると、細胞死が引き起こされることも確認されました。これらのことから、U6 snRNA は TDP-43 の機能損失時、細胞死に至る過程で鍵となる分子であることが示唆されました。

次に、TDP-43 の機能損失時に減少した U6 snRNA の発現量を、発現遺伝子の導入により回復させたところ、細胞生存率も回復することを発見しました。さらに、TDP-43 の機能損失によりスプライシング異常を起こす *Sortilin 1* と *Dnajc1* 遺伝子の転写産物については、スプライシング状態をわずかに回復できることを発見しました。ただし、完全に元来のスプライシング状態まで回復させることはなく、またスプライシング異常状態を回復できない転写産物も見られ、U6 snRNA により校正できるスプライシング状態は限られることもわかりました。このことから、U6 snRNA による細胞死の阻止にはスプライシング状態の校正とは異なる他の機構が介在していることが考えられます。

以上の結果をまとめると、TDP-43 の機能が失われたときの緩衝作用を持つ分子として、U6 snRNA の存在が新たに提起されました。この U6 snRNA がスプライシング状態を維持すると共に、他の機構も介して、TDP-43 の機能損失による神経細胞死を防ぐと考えられます。

これまでの仮説モデル



本研究により明らかになったモデル

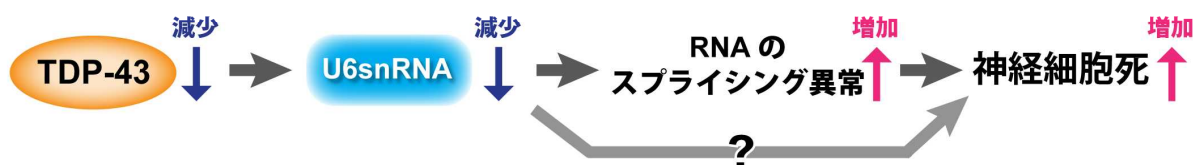


図 TDP-43 の機能損失から細胞死に至る過程のモデル

(今後への期待)

本成果は、ALS の原因である TDP-43 の機能損失時に起こる細胞死の過程を明らかにしたものです。U6 snRNA が TDP-43 機能損失時に起こる神経細胞死に対し緩衝作用を持つということは、将来的な ALS の治療戦略を立てる上で基盤となり得る基礎研究成果です。

細胞死の阻止には、U6 snRNA を介した RNA スプライシングの状態管理が重要であると考えられます。ただし、この過程には RNA のスプライシング状態の変化のみならず、他の経路が介在している可能性も考えられるため、この経路の詳細な解析は今後重要な研究対象となります。また、より生理的な環境である個体レベルの解析も進めることで、より具体的な病態の解明と治療への道筋を拓くと考えられます。

お問い合わせ先

北海道大学大学院先端生命科学研究院細胞機能科学分野 教授 金城 政孝 (きんじょう まさたか)
 TEL : 011-706-9005 FAX : 011-706-9045 E-mail : kinjo@sci.hokudai.ac.jp
 北海道大学大学院先端生命科学研究院細胞機能科学分野 助教 北村 朗 (きたむら あきら)
 TEL : 011-706-9542 FAX : 011-706-9045 E-mail : akita@sci.hokudai.ac.jp

【用語解説】

注1) ALS (筋萎縮性側索硬化症)

筋肉を制御する神経細胞 (運動ニューロン) が変性することで、歩行や呼吸が困難となっていく進行性の病気。日本では、約 9,000 人が罹患している。

注2) TDP-43 (TAR RNA/DNA-binding protein 43 kDa)

主に細胞の核内にあるタンパク質。TDP-43 の機能が失われることで神経細胞死が引き起こされることから、TDP-43 の機能損失が ALS の発症原因ではないかという仮説が提唱されている。

注3) 核内低分子 RNA (snRNA)

核内に存在する低分子の RNA であり、タンパク質を作り出すための配列を持たないノンコーディング RNA の一種。これら是对応するタンパク質と会合し、メッセンジャーRNA のスプライシング^{注4}に働く機能複合体を構成する。U6 snRNA の他に、U1, U2, U4, U5, U7, U11, そして U12 snRNA などが知られている。

注4) 遺伝子転写産物 (あるいは転写産物)

遺伝子 (DNA) に保存された遺伝情報からタンパク質を作り出すには、まず、遺伝情報を RNA として転写する必要がある。この各種 RNA を転写産物と呼ぶ。RNA には様々な種類があるが、遺伝子の配列情報を伝令するタイプの RNA 分子は、転写された後、タンパク質合成に必要な領域を取り除く「スプライシング」や、分子を化学的に変化させる「修飾」と呼ばれる過程を経て成熟する。この成熟した転写産物はメッセンジャーRNA と呼ばれる。

注5) 低分子干渉 RNA (siRNA)

細胞内で目的 RNA と相補的な対をなすことで目的 RNA を分解へと導く低分子 RNA のこと。細胞内のタンパク質や RNA などの発現量を減少させる方法の一つとして用いられ、RNA 干渉または RNAi 法と呼ばれる。この方法では遺伝子そのものは破壊 (ノックアウト) されず、分解効率によって目的分子の減少率が変化することから、RNA またはタンパク質を減少させることはノックダウンと呼ばれる。

注6) 定量的 PCR 法

PCR 法はポリメラーゼ連鎖反応とも呼ばれ、混合物や長大な対象配列 (鋳型と呼ばれる) から目的配列のみを特異的に増幅できる技術である。

定量的 PCR 法では、反応過程で生成する増幅産物量に応じて変化する反応液内蛍光を逐一検出することで、増幅過程をリアルタイムに把握できる。これにより、最初に存在していた鋳型の量を定量的に求めることが可能となる。