

マイクロ RNA 制御異常に着目した筋萎縮性側索硬化症の 病態解明へのアプローチ

河原 行郎

(臨床神経 2010;50:979-981)

Key words : 筋萎縮性側索硬化症, マイクロ RNA, TDP-43, RNA代謝

1 : はじめに

筋萎縮性側索硬化症 (ALS) は、運動ニューロンの選択的脱落によって全身の筋力が低下する神経難病の 1 つである。これまで病態へ迫る手がかりは乏しかったが、2006 年に ALS および前頭側頭様変性症 (FTLD) の変性部位において、TDP-43 がユビキチン陽性封入体の構成タンパク質として同定された¹⁾。さらにその後、頻度はまれながら両疾患特異的に TDP-43 遺伝子点変異がみつき、ALS と FTLD は連続スペクトラム上にあり、両疾患の病態に TDP-43 が深く関連していることが明らかとなった²⁾³⁾。このため、TDP-43 の持つ生理的機能を同定することが ALS 病態解明に不可欠であるが、これまでのところ断片的にしか解析されていない。TDP-43 は不均一核内リボ核酸タンパク質 (hnRNP) の一種で、RNA 結合ドメインを有することから、RNA の安定化や転写後調節などに関与していると考えられている。これまで、幾つかの選択的スプライシングの調節に関与することが報告されているが⁴⁾、われわれは TDP-43 がマイクロ RNA 生成に必須の Drosha 複合体にふくまれること⁵⁾⁶⁾に着目し、TDP-43 がマイクロ RNA 生成に果たす役割と、その異常が ALS 病態にどのように関与しているのか明らかにすることを目指している。

2 : TDP-43 と Drosha 複合体との結合様式

はじめに、TDP-43 が Drosha 複合体にふくまれるかどうかを確認するため、完全長 TDP-43 遺伝子の N 末端に Flag タグを結合したベクターを作成し、これを HEK293T 細胞株に導入することにより、Flag-TDP-43 の安定発現細胞株を樹立した (Fig. 1)。この細胞株を大量培養後、核成分を分画して蛋白質を抽出、抗 Flag 抗体をもちいて免疫沈降をおこない、TDP-43 をふくむ核内蛋白質複合体を回収した。この複合体をもちいてウエスタンブロット解析した結果、Flag-TDP-43 は、内在性 TDP-43 や FUS などに加え、Drosha, DGCR8, p68 など Drosha 複合体構成因子と結合していることが明らかとなった。次に、Flag-Drosha 安定発現細胞株から抽出した Dro-

sha 複合体を解析したところ、Flag-Drosha が、DGCR8, FUS, p68 などに加え、TDP-43 と結合していることをみとめ、両方向性に TDP-43 と Drosha との結合を明らかにすることができた (Fig. 2)。

次に、TDP-43 と Drosha 複合体が RNA 依存的に結合しているのかどうかを解析するため、Flag-Drosha 複合体を RNase 処理し、TDP-43 が乖離するかどうかを解析した。この結果、一部 RNA を介して結合しているものの、大部分は蛋白質どうしの直接結合と考えられた。このため、現在結合に必須のドメインを解析中である。

3 : TDP-43 により制御されるマイクロ RNA 群

次に、TDP-43 を RNAi 法によってノックダウンし、発現量に変動のみとめられるマイクロ RNA をマイクロアレイ解析によりスクリーニングした。3 種類の細胞株 (Neuro2a, SH-SY5Y, HeLa) で実施したところ、すべての細胞株に共通して 10 種類程度のマイクロ RNA の発現が有意に低下していた。これらの結果は定量 RT-PCR 法でも再現された。

特定のマイクロ RNA の発現低下が、転写レベルでの発現量減少に起因するのか、転写後レベルでの生成量減少に起因するのか明らかにするため⁷⁾、これらマイクロ RNA の生成源となる原始マイクロ RNA (pri-miRNA) 量を定量した。この結果、原始マイクロ RNA 量にはとくに変動がみとめられず、転写後の生成効率低下が原因と考えられた。このため、現在 Drosha 複合体中に TDP-43 がある場合とない場合で、どの程度生成効率が変動するのか解析中である。

4 : おわりに

マイクロ RNA は、発生時期や細胞によって発現パターンがことなる。このため、運動ニューロン特異的で生存にきわめて重要なマイクロ RNA が存在し、その発現制御が、TDP-43 が核から喪失することによって異常を呈することが、ALS 病態に深く関与している可能性がある。今回 TDP-43 をノックダウンすることで発現量が低下したマイクロ RNA の一つ

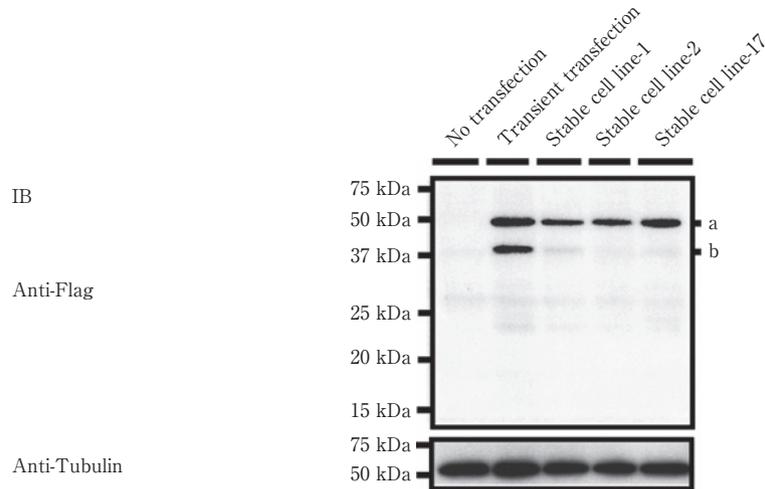


Fig. 1 Flag-TDP-43 安定発現細胞株の樹立.

Flag-TDP-43 発現ベクターを一過性に導入すると (Transient transfection), 完全長の Flag-TDP-43 (バンド a) に加え, 断片化 (バンド b) も強くみとめたが, 安定発現細胞株 (Stable cell line) 樹立後は, 断片化がほとんど検出されなくなった. このため, 安定発現細胞株中では, より生理的状态に近い条件で TDP-43 複合体解析が可能だと考えられる.

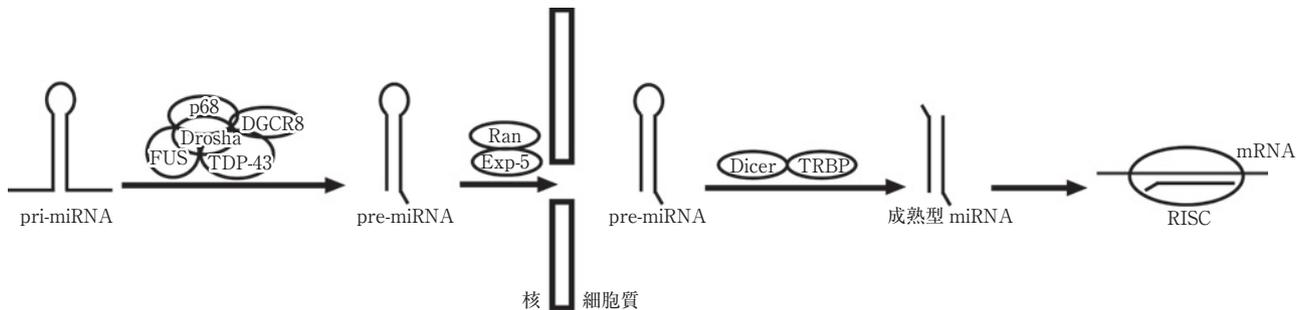


Fig. 2 マイクロ RNA 生成メカニズム.

原始マイクロ RNA (pri-miRNA) が転写されると, Drosha 複合体によって 5' 端が切断され, 前駆体 (pre-miRNA) となる. 前駆体は, Exportin-5 (Exp-5)/RanGTP (Ran) 複合体によって核から細胞質へと輸送され, ループ近傍を Dicer/TRBP 複合体によって切断されることにより, マイクロ RNA は生成される. マイクロ RNA はその後一本鎖となって RNA-induced silencing complex (RISC) へと取り込まれ, 標的となる mRNA へ結合する. Drosha 複合体には, DGCR8 や p68 に加え, TDP-43 や FUS などがふくまれ, 特定のマイクロ RNA の切断を制御していると考えられる.

は, 神経細胞に高発現しており, シナプス形成に重要な役割を果たしていることが知られている. 今後は, このようなマイクロ RNA が, TDP-43 による制御を介して神経細胞の機能維持に果たす役割を解明していく予定である.

文 献

- 1) Neumann M, Sampathu DM, Kwong LK, et al. Ubiquitinated TDP-43 in frontotemporal lobar degeneration and amyotrophic lateral sclerosis. *Science* 2006;314:130-133.
- 2) Sreedharan J, Blair IP, Tripathi VB, et al. TDP-43 mutations in familial and sporadic amyotrophic lateral sclerosis. *Science* 2008;319:1668-1672.
- 3) Benajiba L, Le Ber I, Camuzat A, et al. TARDBP muta-

tions in motoneuron disease with frontotemporal lobar degeneration. *Ann Neurol* 2009;65:470-473.

- 4) Ayala YM, Misteli T, Baralle FE. TDP-43 regulates retinoblastoma protein phosphorylation through the repression of cyclin-dependent kinase 6 expression. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2008;105:3785-3789.
- 5) Gregory RI, Yan KP, Amuthan G, et al. The Microprocessor complex mediates the genesis of microRNAs. *Nature* 2004;432:235-240.
- 6) Fukuda T, Yamagata K, Fujiyama S, et al. DEAD-box RNA helicase subunits of the Drosha complex are required for processing of rRNA and a subset of microR-

NAs. Nat Cell Biol 2007;9:604-611.

2010;61:308-314.

7) 河原行郎. microRNA 発現の転写後調節機構. 生体の科学

Abstract

Implications of microRNA dysfunction in the pathogenesis of ALS

Yukio Kawahara, M.D., Ph.D.

Laboratory of RNA Function, Graduate School of Medicine, Osaka University

Recent studies have identified mutations in the genes encoding TDP-43 and FUS/TLS in patients with amyotrophic lateral sclerosis (ALS). Both TDP-43 and FUS/TLS display all the characteristics of a heterogeneous nuclear ribonucleoprotein, which regulates various aspects of RNA processing. In addition, TDP-43 is partly cleared from the nuclei of neurons containing cytoplasmic aggregates, suggesting loss of normal TDP-43 function in the nucleus, leading to defects or alterations in RNA metabolism, plays, at least in part, a causative role in the pathogenesis of ALS.

TDP-43 has been reported to be involved in the Drosha complex required for the biogenesis of microRNAs. The high expression level of microRNAs and the exclusive expression of certain microRNAs in the central nervous system highlights their biological importance at all stages of neural development as well as in differentiated neurons. In addition, the altered expression of certain microRNAs has been implicated in the pathogenesis of neurodegenerative diseases. Therefore, elucidation of the role of TDP-43 in microRNA biogenesis as a component of the Drosha complex is indispensable to understanding pathophysiology of ALS. In addition, the identification of TDP-43-regulated microRNAs associated with motor neuron death is expected to further contribute to the development of novel therapeutic strategies for ALS treatment.

(Clin Neurol 2010;50:979-981)

Key words: ALS, microRNA, TDP-43, RNA metabolism
