

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 14 日現在

機関番号：12602

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2015～2016

課題番号：15H06181

研究課題名(和文) 脊髄小脳失調症31型における環状RNA生成とその機能の解析

研究課題名(英文) Analysis on circular RNAs potentially related to spinocerebellar ataxia type 31.

研究代表者

佐藤 望 (Sato, Nozomu)

東京医科歯科大学・大学院医歯学総合研究科・助教

研究者番号：30754551

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,300,000円

研究成果の概要(和文)：環状RNA(circRNA)は少数の例外を除きその機能は未解明である。circRNAの形成にはイントロン内のリピート配列が重要であり、本研究では脊髄小脳失調症31型(SCA31)を例に、イントロン内のAluから生じた変異がcircRNAに与える影響を明らかにすることを目指した。SCA31剖検小脳検体、およびヒト変異型BEAN1遺伝子BACトランスジェニックマウス検体を用いてSCA31変異が存在するBEAN1/TK2遺伝子特異的なcircRNA発現を検索した。しかしながらcircRNA由来のDNAフラグメントは得られず、SCA31病態へのcircRNAの関与を示唆する結果は得られなかった。

研究成果の概要(英文)：Circular RNAs (circRNAs) are a type of non-coding RNAs whose functions are yet to be unveiled. Intronic Alu sequences have been shown to be important for the synthesis of circRNAs. We aimed to clarify the effect of microsatellite expansions associated with Alu, which sometimes result in neurodegenerative disorders, on the synthesis and metabolism of circRNAs. The mutation responsible for spinocerebellar ataxia type 31 (SCA31) is an example of such microsatellite expansions, and we tried to identify the effect of the SCA31 mutation on potential circRNAs originating from BEAN1 and TK2, the genes harboring the SCA31 mutation. We conducted RT-PCR on brain specimens of SCA31 autopsy samples and of mutant human BEAN1 transgenic mice in various conditions, but we could not find DNA fragments resulting from potential circRNAs of BEAN1 and TK2. We could not obtain findings suggesting the involvement of circRNA(s) in the pathogenesis of SCA31.

研究分野：神経内科学、神経変性疾患、遺伝性神経筋疾患

キーワード：環状RNA Non-coding RNA 神経変性疾患 脊髄小脳失調症31型 Alu microsatellite

## 1. 研究開始当初の背景

ヒトゲノムの大半が転写され、その多くは non-coding RNA (ncRNA) として存在しているが、これらの機能についてはごく少数のものを除いて充分解明されていない。様々な ncRNA のうち、長鎖 ncRNA の一つである環状 RNA (circRNA) はここ数年の間にその存在が広く認識されるようになったものである。circRNA は真核細胞内に数多く存在することが知られているが、いくつかの例外を除いてその機能は殆ど未解明である。

circRNA の形成にはイントロン内のリピート配列が重要であることが示されている。他方、遺伝性神経変性疾患の一部はゲノム内の主要なリピート配列である *Alu* に関連した VNTRs (variable number of tandem repeats) の異常伸長 (expSat) が原因変異であることが知られている。これらの疾患の発症機序として現在のところ expSat の転写産物が RNA 代謝に関わるタンパクに結合しその機能を阻害する、expSat の転写産物が ATG 非依存性にタンパクに翻訳されて毒性を呈する、の二説が有力とされている。一方 expSat が circRNA 形成・代謝やその機能に与える影響については筆者の知る限り全く検討されていない。

## 2. 研究の目的

筆者らのグループが原因変異を同定した脊髄小脳失調症 31 型 (SCA31) は本邦で頻度の高い神経変性疾患であるが、前述の変異カテゴリーに属する疾患の一例である。互いに逆方向に転写される *BEAN1/TK2* 遺伝子が共有するイントロン内に存在する *AluSx* の 3' -poly(A) tail 部に現れた (TGGA)<sub>n</sub> を含む複雑な配列からなる伸長した VNTRs が疾病の原因である。本研究では SCA31 変異を例に expSat が circRNA 生成・分布・代謝に与える影響を検討し、circRNA の生成とその疾患における役割の一端を明らかにし、治療法開発

のシードとなる知見を得ることを目的とした。

## 3. 研究の方法

脳組織における *BEAN1/TK2* 由来 circRNA の検出の試み

circRNA のデータベースの構築が始まっており (circBase; <http://www.circbase.org/>)、*BEAN1* 由来の circRNA は 2 種類、*TK2* 由来の circRNA は重複の可能性を含めて 10 種類登録されている。ただし circBase で参照されている論文はいずれもゲノムワイドに網羅的に得られたデータを解析しているに過ぎない。

我々は SCA31 剖検小脳検体、および変異型 *BEAN1* 遺伝子の全ゲノム領域を包含する BAC clone から作成したトランスジェニックマウス (図 1) を有しており、これらを用いて遺伝子 (*BEAN1/TK2*) 特異的な circRNA 発現解析を行い、SCA31 変異が存在する *BEAN1/TK2* 遺伝子から派生する circRNA を脳検体から検出することを目指した。

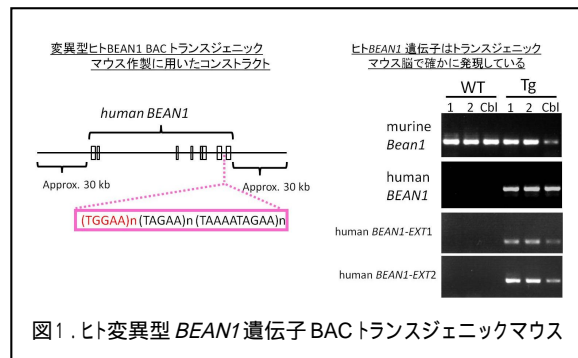


図 1. ヒト変異型 *BEAN1* 遺伝子 BAC トランスジェニックマウス

また他方、平行して行っていた SCA31 変異由来 RNA とタンパクとの相互作用 (1. 「研究開始当初の背景」で述べた)、SCA31 剖検脳における expSat 由来の "unconventional translation" 産物であるポリペプチドの検出 (1. 「研究開始当初の背景」で述べた) の検索結果と併せて circRNA 検索結果について考察した。

## 4. 研究成果

脊髄小脳失調症 31 型 (SCA31) 変異が存在する *BEAN1/TK2* 遺伝子の環状 RNA を検出すべく、

ヒトおよびマウス脳由来の total RNA サンプルを用いて RT-PCR 法により環状 RNA 由来の cDNA の増幅を図った。データベースに収載されているものだけでなく、*BEAN1* および *TK2* の各エクソン(エクソン由来の circRNA の検出のため)等に設計したプライマーペア(ゲノム上で互いに隣接し逆向き)を用いた PCR により circRNA 由来の cDNA を特異的に増幅することを試みた。PCR 条件の検討が重要であると考え 特に *BEAN1* 遺伝子は GC rich である 網羅的解析(RNA-Seq)では見落とされがちな circRNA についても検出を試みた。しかしながら現在までに circRNA 由来の DNA フラグメントは得られなかった。この原因としては(1)*BEAN1/TK2* 由来の環状 RNA はごく微量であること、(2)*BEAN1* 遺伝子は GC rich であり、これ由来の circRNA は条件の調整によっても増幅されにくかったこと、などが考えられた。

本研究と平行して行っていた、従来 of 学説に基づいた SCA31 変異転写産物とタンパク質との相互作用の解析においては、*BEAN1* 方向の転写産物 (UGGAA)<sub>n</sub> が TDP-43 や FUS, hnRNPA2/B1 等に結合することを証明し、さらに (UGGAA)<sub>n</sub> の毒性がこれらのタンパク質によって抑制されること、また逆に変異型 TDP-43 の毒性が (UGGAA)<sub>n</sub> によって抑制されることが示された。

また、SCA31 変異由来の "unconventional translation" の検索においては、(UGGAA)<sub>n</sub>

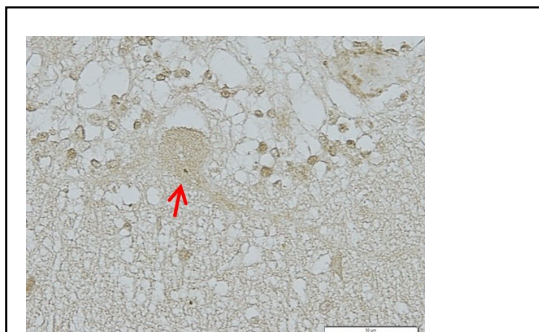


図2. SCA31 患者剖検小脳検体における SCA31 変異由来の "unconventional translation" 産物の凝集物

の翻訳産物である (MEWNG)<sub>n</sub> に対する抗体を作製し SCA31 剖検小脳検体の検索を行ったところ、Purkinje 細胞の細胞質や樹状突起内に凝集物様の染色像を認めた。

以上の結果からは、SCA31 の病態に *BEAN1* または *TK2* 由来の circRNA が関与していることを積極的に示唆する結果は得られなかった。一方従来 of 学説に基づいた研究ではさらに病態の一端を示唆するデータが出ており、従来学説を補強する結果となった。

最近、RNA-binding protein の一つ MBL/MBNL1 の遺伝子由来の環状 RNA は *MBL/MBNL1* の mRNA 生成と競合的に生成されることが示されている (Ashwal-Fluss R et al, Mol Cell 2014)。即ち、あるタンパク質が遺伝子の転写・翻訳を経て合成される方向にあるときは環状 RNA 生成が抑制され、タンパク質が充分ある時には mRNA 生成が抑制される一方で環状 RNA 生成が増加するのである。この知見からは SCA31 変異の転写産物が、その結合する RNA-binding protein 由来の circRNA 生成に影響していることが考えられる。今後はこの可能性についてさらに検討していく予定である。

## 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 1 件)

Ishiguro T, Sato N, Ueyama M, Fujikake N, Sellier C, Kanegami A, Tokuda E, Zamiri B, Gall-Duncan T, Mirceta M, Furukawa Y, Yokota T, Wada K, Taylor JP, Pearson CE, Charlet-Berguerand N, Mizusawa H, Nagai Y, Ishikawa K. Regulatory Role of RNA Chaperone TDP-43 for RNA Misfolding and Repeat-Associated Translation in SCA31. *Neuron*. 査読あり、2017; 94(1): 108-124. e7. doi: 10.1016/j.neuron.2017.02.046. Epub

2017 Mar 23.

〔学会発表〕(計 1件)

Nozomu Sato, Kinya Ishikawa,  
Hidehiro Mizusawa, Takanori Yokota.  
Variations in the mutation for  
spinocerebellar ataxia type 31 require  
cautious genetic testing. 第57回日本神経学  
会学術大会、2016年5月19日、神戸コンベ  
ンションセンター(兵庫県、神戸市)。

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

佐藤 望 (Nozomu Sato)

東京医科歯科大学・大学院医歯学総合研究  
科・助教

研究者番号：30754551