

平成 22 年 5 月 1 日現在

研究種目：基盤研究(B)  
研究期間：2007～2008  
課題番号：19390237  
研究課題名（和文）神経筋接合分子欠損症および他の筋疾患における mRNA 病態研究と治療法開発研究  
研究課題名（英文）Molecular bases and their regulations of mRNA aberrations in neuromuscular transmission defects and other muscular diseases  
研究代表者  
大野 欽司 (OHNO KINJI)  
名古屋大学・大学院医学系研究科・教授  
研究者番号：80397455

研究成果の概要（和文）：先天性筋無力症候群の原因となる *CHRNA1* IVS3-8G>A 遺伝子変異は、スプライシングトランス因子 hnRNP H とシス因子との結合を 100 倍減弱することを明らかにした。この研究の過程で IVS3-8G 上流領域にスプライシング抑制因子 PTBP1 が結合することを同定し、960 種類の FDA 既認可薬を用いたスクリーニングにてタンニン酸が濃度依存性に PTBP1 プロモータを活性化させ IVS3-8G>A による異常スプライシングを是正することを見出した。

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	7,600,000	2,280,000	9,880,000
2008年度	6,800,000	2,040,000	8,840,000
総計	14,400,000	4,320,000	18,720,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・神経内科学

キーワード：先天性筋無力症候群、スプライシング異常、タンニン酸

## 1. 研究開始当初の背景

先天性筋無力症候群は神経筋接合部分子の先天的な欠損により発症する疾患群である。アセチルコリン受容体各種サブユニットはその原因遺伝子となる。研究代表者らは本症候群において同定を行った *CHRNA1* 遺伝子 IVS3-8G>A 変異は、機能を有さないアミノ酸をコードする 75 塩基からなるエクソン P3A の上流に存在する遺伝子変異であり、

IVS3-8G>A によりエクソン P3A が常に認識をされ、機能を有さないアセチルコリン受容体  $\alpha$  サブユニット(*CHRNA1* 遺伝子産物)が作られることを見出していたが、その分子病態機構は不明であった。

## 2. 研究の目的

本研究の目的は、*CHRNA1* IVS3-8G>A 遺伝子変異がエクソン P3A のスプライシング異

常を惹起する分子機構を明らかにし、FDA 既認可薬による制御を試みることである。ヒトは 22,000 種類という予期よりもはるかに少ない数の遺伝子しか持たないことが判明しているが、組織特異的・発達段階特異的にスプライシングを制御することにより数少ない遺伝子から 10 万種類以上と推定される多様なタンパク質を実現している。このスプライシング機構の破綻は数多くの疾患の原因となるが、その分子機構は多くの場合知られていない。また、アスピリンの抗血小板作用、プロプラノロールの抗交感作用など既認可薬には予期せぬオフラベル薬効があり、先天性筋無力症候群のように多大な研究開発費を投入できない希少疾患に対する治療戦略として有用であると期待をされる。

### 3. 研究の方法

*CHRNA1* インترون 3 の IVS3-8G>A 変異部位に結合をするスプライシングトランス因子を UV クロスリンキングならびに RNA アフィニティー精製後の候補分子に対するウェスタンブロットティングにより同定を行った。候補スプライシングトランス因子が標的 RNA 配列に作用することを過剰発現系ならびに siRNA ノックダウン系を用いて検証した。さらに、スプライシングトランス因子を免疫沈降により除去した後の核抽出液を用いて UV クロスリンキングならびに RNA アフィニティー精製を行い、候補スプライシングトランス因子が消失をすることを証明した。MS2 コート遺伝子と候補スプライシングトランス因子のフュージョン遺伝子産物を作成し、一方、標的 RNA 配列を除去し MS2 配列を挿入したコンストラクトに対する影響を調べることで、候補スプライシングトランス因子の結合部位に対する検討を行った。

IVS3-8G>A 遺伝子変異を有する *CHRNA1* エクソン P3A ならびにその両側イントロンを firefly luciferase cDNA の中心部に挿入し、キメラミニ遺伝子を作成し、HEK293 細胞に導入した。米国 Microsource Discovery 社より購入した 960 種類の FDA 既認可薬パネル 10  $\mu$ M 存在下に培養を行い、firefly luciferase 活性を上昇させる薬剤のスクリーニングを行った。この実験系ではエクソン P3A のスキッピングが誘導されることにより firefly luciferase cDNA からエクソン P3A がはずれるシフェラーゼ活性が上昇をする。さらに道程をした薬剤の上記にて同定をしたスプライシングトランス因子発現に与える影響をプロモータアッセイにより検討を行った。

### 4. 研究成果

*CHRNA1* IVS3-8G>A 遺伝子変異を用いた UV クロスリンキングならびに RNA アフィニティー精製によりスプライシング制御因子 hnRNP H (heterogeneous nuclear ribonucleoprotein H) と PTBP1 (polypyrimidine tract binding protein) が IVS3-8G 近傍に結合することを明らかにした。表面プラズモンレゾナンス法による RNA-タンパク質相互作用の定量にて IVS3-8G>A は hnRNP H との結合を約 100 倍減弱させることが判明した。MS2 コートタンパク質とのフュージョン遺伝子産物を用いた検討で hnRNP H は IVS3-8G 近傍に結合することにより下流エクソン P3A のスキッピングを誘導することを明らかにした。さらに、hnRNP H の siRNA ノックダウンにてエクソン P3A の認識が増強され hnRNP H はスプライシング抑制因子として作用していることを確認した。960 種類の FDA 既認可薬を用いたスクリーニングにてタンニン酸が濃度依存性に IVS3-8G>A による異常スプライシングを是正することを見出した。タン

ニン酸は PTBP1 プロモータを濃度依存性に活性化させたが、hnRNP H 発現に対する効果は認めなかった。

#### 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 8 件)

1. Masuda A, Shen XM, Ito M, Matsuura T, Engel AG, Ohno K. hnRNP H enhances skipping of a nonfunctional exon P3A in *CHRNA1* and a mutation disrupting its binding causes congenital myasthenic syndrome. *Hum Mol Genet* 査読有 2008, 17: 4022-4035.
2. Shen X-M, Fukuda T, Ohno K, Sine SM, Engel AG. Congenital myasthenia-related AChR delta subunit mutation interferes with intersubunit communication essential for channel gating. *J Clin Invest* 査読有 2008, 118: 1867-1876.
3. Gao K, Masuda A, Matsuura T, Ohno K. Human branch point consensus sequence is yUnAy. *Nucleic Acids Res* 査読有 2008, 36: 2257-2267.
4. Kurosaki T, Matsuura T, Ohno K, Ueda S. Long-range PCR for the diagnosis of spinocerebellar ataxia type 10. *Neurogenetics* 査読有 2008, 9: 151-152.
5. Saito T, Amakusa Y, Kimura T, Yahara O, Aizawa H, Ikeda Y, Day JW, Ranum LPW, Ohno K, Matsuura T. Myotonic dystrophy type 2 in Japan: ancestral origin distinct from Caucasian families. *Neurogenetics* 査読有 2008, 9:61-63.

6. Ichihara M, Murakumo Y, Masuda A, Matsuura T, Asai N, Jijiwa M, Ishida M, Shinmi J, Yatsuya H, Qiao S, Takahashi M, Ohno K. Thermodynamic instability of siRNA duplex is a prerequisite for dependable prediction of siRNA activities. *Nucleic Acids Res* 査読有 2007, 35:e123.
7. Sahashi K, Masuda A, Matsuura T, Shinmi J, Zhang Z, Takeshima Y, Matsuo M, Sobue G, Ohno K. In vitro and in silico analysis reveals an efficient algorithm to predict the splicing consequences of mutations at the 5' splice sites. *Nucleic Acids Res* 査読有 2007, 35:5995-6003.
8. Masuda A, Hashimoto K, Yokoi T, Doi, T, Kodama, T, Kume, H, Ohno, K, Matsuguchi, T. Essential role of GATA transcriptional factors in the activation of mast cells. *J Immunol* 査読有 2007, 178:360-368.

[学会発表] (計 9 件)

1. Ito M, Suzuki Y, Okada T, Fukudome T, Masuda A, Yoshimura T, Takeda S, Krejci E, Ohno K. rAAV8-mediated protein anchoring of asymmetric acetylcholinesterase (AChE) to the synaptic basal lamina at the neuromuscular junction (NMJ). 48th Annual Meeting of the American Society for Cell Biology, San Francisco, USA. Dec 13-17, 2008.
2. Ito M, Suzuki Y, Okada T, Fukudome T, Masuda A, Yoshimura T, Takeda S, Krejci E, Ohno K. Adeno-associated virus serotype 8-mediated targeting of asymmetric acetylcholinesterase to

- the synaptic basal lamina at the neuromuscular junction. 38th Annual Meeting, Society for Neuroscience, Washington DC, USA. Nov 15-19, 2008
3. Milone M, Shen X-M, Selcen D, Ohno K, Brengman JM, Iannaccone S, Engel AG. CMS due to Defects in Rapsyn: Clinical and Molecular Findings of a Large Cohort. 55th Annual Meeting of the American Association of Neuromuscular and Electrodiagnostic medicine, Rhode Island, USA. Sep 17-20, 2008
  4. Suzuki Y, Ito M, Okada T, Takeda S, Fukudome T, Yoshimura T, Krejci E, Ohno K. Recombinant extracellular matrix protein expressed in a limited number of cells propagates to the target organ throughout the body using its nascent tissue-targeting signal. 13th Congress of the International Federation of Societies for Histochemistry and Cytochemistry, Gdansk, Poland. Aug 23-27, 2008.
  5. Milone M, Shen X-M, Selcen D, Ohno K, Brengman JM, Iannaccone S, Engel AG. CMS due to defects in rapsyn: clinical and molecular findings of a large cohort. 12th Congress of the European Federation of Neurological Societies, Madrid, Spain. Aug 23-26, 2008.
  6. Yamashita Y, Matsuura T, Shinmi J, Ibi T, Kinoshita M, Kimura T, Yahara O, Sahashi K, Ohno K. Comprehensive analysis of aberrantly spliced exons in myotonic dystrophy type 1 using Affymetrix Exon Array. 57th Annual Meeting of the American Society of Human Genetics, San Diego, California, USA. Oct 23-27, 2007
  7. Ohno K, Ichihara M. Unstable siRNA duplex is a prerequisite for accurate prediction of siRNA efficiency – Proposal of a new parameter based on the linear regression model. 57th Annual Meeting of the American Society of Human Genetics, San Diego, California, USA. Oct 23-27, 2007
  8. Amakusa Y, Matsuura T, Saito T, Kimura T, Yahara O, Aizawa H, Ikeda Y, Day JW, Ranum LPW, Ohno K. Myotonic dystrophy type 2 in Japan: distinct ancestral origin from Caucasian families. 57th Annual Meeting of the American Society of Human Genetics, San Diego, California, USA. Oct 23-27, 2007
  9. Ito M, Masuda A, Jinno S, Katagiri T, Krejci E, Ohno K. Gene Therapy for Collagen Q defects in congenital myasthenic syndromes. The IXth International Meeting on Cholinesterases, Shuzou, China. May 10, 2007
6. 研究組織  
 (1) 研究代表者  
 大野 欽司 (OHNO KINJI)  
 名古屋大学・大学院医学系研究科・教授  
 研究者番号：80397455
- (2) 研究分担者  
 松浦 徹 (MATSUURA TOHRU)  
 岡山大学・大学院医歯薬学総合研究科・准教授  
 研究者番号：90402560

増田 章男 (MASUDA AKIO)  
名古屋大学・大学院医学系研究科・助教  
研究者番号：10343203