

機関番号：87401

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2008～2010

課題番号：20591015

研究課題名（和文） mRNA 監視機構に起因する神経疾患の病態と治療に関する研究

研究課題名（英文） Research on the pathophysiology and treatment of neurological disorders modified by nonsense-mediated mRNA decay (NMD)

研究代表者 臼杵 扶佐子 (USUKI FUSAKO)

国立水俣病総合研究センター・臨床部・室長

研究者番号：50185013

研究成果の概要（和文）：mRNA 監視機構（NMD）が疾患遺伝子の発現に影響する疾患の中には、NMD 抑制で病態が回復するものがある。そのひとつウールリッヒ病患者繊維芽細胞をモデル細胞として、NMD 抑制が細胞生理機能に及ぼす影響について検討した。NMD 構成分子の発現を低下させた NMD 抑制下では細胞周期への影響および小胞体ストレスの発生はなかったが、細胞増殖が SMG-8 以外の NMD 関連因子の発現低下で抑制された。また、化学物質曝露によるセレン欠乏下でセレン含有酸化還元系酵素が NMD により障害され、酸化ストレスが生じることが明らかになった。

研究成果の概要（英文）：Nonsense-mediated mRNA decay (NMD), an mRNA quality surveillance mechanism, affects disease condition by modifying post-transcriptionally the expression of disease-related gene carrying premature termination codons (PTCs). Among them some disease conditions are recovered by NMD suppression, which up-regulates the mutant mRNA and restores partially the defect of protein and cellular function. Using Ullrich's disease fibroblasts as a model cell line of PTC-harbored genetic diseases exacerbated by NMD, we investigated effects of NMD suppression on cellular physiological functions. NMD suppression by siRNAs targeted to NMD components neither affects cellular cycle nor causes ER stress. However, knockdown of 6 NMD components except SMG-8 suppressed cell growth although the effects were much milder than those on epithelial carcinoma cell line (HeLa cells). In addition, we clarified that selenoenzymes were affected by NMD execution and oxidative stress was induced under selenium deficiency by exposure to a chemical toxin.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2008 年度	1, 500, 000	0	1, 500, 000
2009 年度	1, 000, 000	0	1, 000, 000
2010 年度	1, 000, 000	0	1, 000, 000
年度			
年度			
総計	3, 500, 000	0	3, 500, 000

研究代表者の専門分野：分子病態学

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：

Nonsense-mediated mRNA decay (NMD), NMD 構成分子, siRNA, NMD 抑制, Ullrich 病繊維芽細胞, 腫瘍細胞, 細胞生理機能, 生体ストレス応答

1. 研究開始当初の背景

mRNA 監視機構とされる nonsense-mediated mRNA decay (NMD) は、遺伝子のリーディングフレーム途中で異常な早期終止コドン PTC が生じた変異 mRNA を排除する生体機構である。NMD の作動は PTC の位置に依存するが、これまで公開された遺伝子情報を基に検討した報告結果によると、遺伝子疾患やがんの全変異の約三分の一は NMD が関与するとされている。PTC を有する変異 mRNA は NMD により分解されるため、その変異蛋白質は作られないことが多い。これまでの研究で、PTC が生じた先天性筋ジストロフィー-Ullrich 病患者繊維芽細胞をモデル細胞として、NMD がその病態に負に関与し、NMD を薬理的あるいは分子生物学的に制御することでその細胞機能が部分的に回復することを明らかにし、NMD を標的とした治療戦略の可能性を示してきた。PTCを有する疾患において、NMD 作動の有無は変異蛋白質の発現を左右し、その病態に大きく影響するが、NMD 機構を変動させる因子および NMD 変動の生体機能への影響についてはなお不明なことが多く、NMD 機構を臨床応用へと展開するためには未だ多くの課題が残されている。

2. 研究の目的

NMD 機構の変動が PTC を有する神経疾患の病態に与える影響についてさらに知見を得る。NMD を標的とした治療を開発するために *in vivo* への応用をめざしてマウスにおける NMD 抑制系を開発するとともに、中期的、長期的な NMD 抑制が細胞生理機能に与える影響について明らかにする。具体的には、下記の4項目を目的とした。

(1) NMD 抑制が細胞生理機能に及ぼす影響に関する検討

① Cell cycle, ER stress 発生, cell growth への影響

② 細胞腫における NMD 機構の差

③ NMD 構成分子の NMD 機能への寄与差

④ 腫瘍細胞と非腫瘍細胞における NMD 機構の差

(2) NMD の長期抑制が細胞生理機能に及ぼす影響に関する検討

(3) 筋肉特異的に NMD を抑制させるための siRNA 発現ベクター作成の試み

(4) 生体ストレス応答系への NMD の関与

3. 研究の方法

(1) PTCを有し、NMD がその病態に負に作用する NMD 関連疾患のモデル細胞として、Ullrich 病患者繊維芽細胞を用いた。本細胞では、collagen VI $\alpha 2$ 鎖 (COL $\alpha 2$ (VI)) の triple helical domain をコードする exon 内の遺伝子異常により PTC が出現すること、collagen VI の三鎖構造を認識する抗 collagen VI 抗体による免疫染色で collagen VI が欠損していること、この collagen VI 蛋白質の欠損に NMD が関与して NMD 抑制により collagen VI 蛋白質の回復がみられることがすでに明らかになっている。NMD の長期抑制が細胞機能に及ぼす影響に関する検討では、ヒト正常骨格筋より得られた筋芽細胞株を用いて、NMD 抑制因子を標的とした siRNA 安定発現細胞株の作成を試みた。腫瘍細胞と非腫瘍細胞における NMD 機構の差に関する検討では、腫瘍細胞として HeLa 細胞及びヒト glioblastoma 細胞株である A172 を用いた。NMD が生体ストレス応答に及ぼす影響に関する検討では、環境ストレス感受性の高い細胞株としてこれまで明らかにしてきた C2C12-DMPK160 を用いた。siRNA 導入は、HiPerFect Transfection Reagent (QIAGEN) あるいは LipofectaminTM RNAiMAX (Invitrogen) を用いて行った。siRNA 発現ベクターの導入には、Lipofectamine 2000 (Invitrogen) あるいは NucleofectorTM (amaxa) を用いた。

(2) NMD 抑制因子の検討では、collagen VI 蛋

白質の回復が認められた Upf1、SMG-1、SMG-8、SMG6、SMG7、MAGOH、Btz、RNPS1 を標的に siRNA 発現ベクターおよび合成 siRNA を作成した。

(3) 細胞周期の検討は、フローサイトメーターで行い、細胞増殖は Cell Counting Kit (DOJINDO)を用いて行った。

(4) ER stress 発生に関する検討では、Western blot 解析により ER stress 関連蛋白質である eIF2 α リン酸化、ATF4、GRP78 の発現について検討した。

4. 研究成果

(1) NMD 抑制が細胞生理機能に及ぼす影響に関する検討

collagen VI 蛋白質の回復が認められた Upf1、SMG-1、SMG-8、SMG6、SMG7、MAGOH、Btz、RNPS1 を標的とした合成 siRNA を用いて、細胞周期、細胞増殖能、および NMD 抑制によって発現が予想される aberrant protein 蓄積による ER stress の発生について検討した。本研究における条件下では、7 種の NMD 関連分子のノックダウンによる NMD 抑制で細胞周期への影響は認められず、また ER stress の発生も認められなかった。しかしながら、細胞増殖に関しては、標的とした NMD 関連分子および対象とした細胞により差があることが判明した。すなわち、NMD 構成分子では SMG-8 のノックダウンでは細胞増殖は抑制されなかったが、その他の因子のノックダウンでは程度の差はあるものの細胞増殖は抑制され、NMD 関連分子の NMD 機能への寄与には差があることが示唆された。また、NMD 抑制による増殖への影響は、非腫瘍細胞に比し、腫瘍細胞で非常に大きく、細胞生理機能における NMD 機構の役割は、非腫瘍細胞と腫瘍細胞では差があることが考えられた。

(2) NMD の長期抑制が細胞機能に及ぼす影響に関する検討

NMD 構成分子である SMG-1、SMG-8 を標的とした siRNA 安定発現細胞株を正常筋芽細胞株で確立した。この siRNA 安定発現細胞株を用いて NMD の長期抑制が細胞機能に及ぼす影響に関して検討したが、NMD の長期抑制によって予想された変異蛋白質増加による ER stress は、いずれの細胞株でも確認されなかった。

(3) 筋肉特異的に NMD を抑制させるための siRNA 発現ベクター作成の試み

NMD 抑制による遺伝子疾患の治療を *in vivo* へ応用するためには、組織特異的に siRNA を発現させる必要がある。そこで、筋肉特異的に NMD を抑制させるために、筋特異的なプロモーターを利用した siRNA 発現ベクターの確立を試みた。そのためにまず、マウス細胞系の NMD を抑制可能な siRNA について検討し、NMD 構成分子である SMG-1、SMG-7 のマウス配列を標的とした合成 siRNA を作成した。これらの siRNA をマウス筋芽細胞株に導入したところ、それぞれの蛋白分子のノックダウンと NMD 抑制が確認できた。現在、筋特異的なプロモーターを選択して、siRNA 発現ベクターの作成を試みている。

(4) 生体ストレス応答系への NMD 作動の影響

セレン欠乏下ではセレノシステインをコードする UGA コドンはストップコドンとしてよまれるため、セレノシステインを含む蛋白質では NMD が作動し、mRNA は低下することが考えられる。セレノシステインを含む酵素の中には、生体レドックス系の酵素であるグルタチオンペルオキシダーゼ (GPx1) やチオレドキシニンリダクターゼ (TR) が含まれる。そこで、マウス筋芽細胞株を用いて、メチル水銀を用いた化学物質曝露による環境ストレス下における GPx1、TR1 の発現について検討した。メチル水銀曝露下ではセレン低下が起こるが、他の抗酸化酵素群の発現が増加するにもかかわらず、GPx1 mRNA の発

現は低下することが明らかになった。NMD 構成分子である SMG-1, SMG-7 のマウス配列を標的とした合成 siRNA を用いた検討では、GPx1 mRNA の発現が回復したことから、このメチル水銀曝露によるセレン欠乏がもたらす環境ストレス下における GPx1 mRNA の発現低下は、転写後の NMD の作動によるものであることが証明された。一方、TR1 mRNA の発現低下は認められなかったが、これはセレノシステインをコードする配列が NMD の作動しない最終エクソンに存在するためと考えられた。しかしながら、TR1 mRNA の発現増加があるにもかかわらず、その活性は低下しており、aberrant enzyme が生成されていることが考えられた。さらに、フローサイトメーター解析から、活性酸素群が増加することが明らかになった。このように、化学物質曝露によるセレン欠乏がもたらす環境ストレス下では、NMD が作動することにより、代表的なセレン含有生体レドックス系酵素である GPx1 mRNA が分解され、また aberrant TR1 が生成されることで、生体内酸化還元系が攪乱され、酸化ストレスが生じることが明らかになった。

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 5 件)

- ① Usuki F, Yamashita A, Fujimura M: Post-transcriptional defects of antioxidant S selenoenzymes cause oxidative stress under methylmercury exposure. J Biol Chem 286: 6641-9, 2011 (査読有)
- ② Fujimura M, Usuki F, Kawamura M, Izumo S: Inhibition of the Rho/ROCK pathway prevents neuronal degeneration *in vitro* and *in vivo* following methylmercury exposure. Toxicol Appl Pharm 250: 1-9, 2011 (査読有)

③ 臼杵扶佐子、山下暁朗 :

NMD による変異 mRNA 排除と疾患. 細胞工学 29, 155-160, 2010 (査読無)

④ Fujimura M, Usuki F, Sawada M,

Takashima A: Methylmercury induces neuropathological changes with tau hyperphosphorylation mainly through the activation of c-jun-N-terminal kinase pathway in the cerebral cortex, but not in the hippocampus of the mouse brain. NeuroToxicology, 30: 1000-1007, 2009

(査読有)

⑤ Fujimura M, Usuki F, Sawada M,

Rostene W, Godefroy D, Takashima A: Methylmercury exposure down-regulates the expression of Rac 1 and leads to neuritic degeneration and ultimately apoptosis in cerebrocortical neurons. NeuroToxicology, 30: 16-22, 2009 (査読有)

[学会発表] (計 5 件)

- ① Usuki F: Posttranscriptional defects of antioxidant selenoenzymes cause oxidative stress under methylmercury exposure. NIMD FORUM 2011, Minamata, Jan, 2011
- ② Usuki F, Yamashita A, Fujimura M: Methylmercury causes oxidative stress through its posttranscriptional effect on antioxidant selenoenzymes. XVIIth International Congress of Neuropathology, Austria, Salzburg, Sep. 2010
- ③ Fujimura M, Usuki F, Takashima A: Methylmercury induces neuropathological changes with tau hyperphosphorylation mainly through the activation of the c-jun N-terminal kinase pathway in the cerebral cortex, but not in the hippocampus of the mouse brain. XVIIth International Congress of Neuropathology, Austria, Salzburg, Sep. 2010
- ④ 臼杵扶佐子 : メチル水銀による酸化ストレ

ス発生. 北陸大学サテライトミーティング
2010.2 水俣

- ⑤ Usuki F: Disease conditions associated with nonsense-mediated mRNA decay (NMD)
シンポジウム 「ナンセンス変異と疾患;
mRNA サーベイランス機構 NMD を介した
疾病発症のメカニズムと新規治療薬」 第
82 回日本薬理学会年会 2009.3 横浜

[図書] (計 2 件)

- ① 山下暁朗、臼杵扶佐子: mRNA 監視機構の
生命現象、疾患への寄与とその分子機構.
実験医学増刊 「拡大・進展を続ける RNA
研究の最先端」 (塩見春彦、塩見美喜子、
稲田利文、廣瀬哲郎編集), 134-141 頁, 羊
土社, 2010 (査読無)
- ② 山下暁朗、臼杵扶佐子: NMD による mRNA
排除と疾患-----難治性遺伝性疾患治療へ
の試み. 蛋白質・核酸・酵素増刊 mRNA
プログラム 多様性と非対称性の獲得戦
略 (稲田利文、大野睦人編集), 2219-2225 頁,
共立出版, 東京, 2009 (査読無)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

臼杵 扶佐子

国立水俣病総合研究センター・臨床部・
室長

研究者番号: 50185013

(2) 連携研究者

① 山下 暁朗

横浜市立大学医学部・微生物学・講師

研究者番号: 20405020

② 樋口 逸郎

鹿児島大学医学部老年神経内科・准教授

研究者番号: 80183573