

平成23年 5 月 24 日現在

機関番号： 82401

研究種目： 若手研究(B)

研究期間： 2009～2010

課題番号： 21790854

研究課題名(和文)

リピートRNA結合タンパク質MBNLのポリグルタミン病における役割

研究課題名(英文)

Roles of an RNA-binding protein MBNL1 in polyglutamine diseases

研究代表者

紀 嘉浩 (KINO YOSHIHIRO)

独立行政法人理化学研究所・構造神経病理研究チーム・研究員

研究者番号： 80415140

研究成果の概要(和文)：

ハンチントン病などのCAGリピート伸長疾患では、伸長したポリグルタミンを含む異常タンパク質が毒性をもたらすと考えられている。一方、伸長したリピートRNAが細胞異常をもたらす可能性も考えられている。RNA結合タンパク質の一つであるMBNL1はCAGリピートRNAと結合するため、これらの疾患の病態にRNA代謝の面から関与している可能性がある。本研究では、MBNL1とリピートRNAの相互の影響を解析し、MBNL1がCAGリピート伸長疾患に関わる可能性を見出した。

研究成果の概要(英文)：

In CAG repeat expansion diseases including Huntington's disease, mutant proteins with an expanded polyglutamine tract are thought to have toxic effects in the cells. It is also possible that expanded CAG repeat RNA has toxicity in these diseases. MBNL1 is an RNA-binding protein that interacts with expanded CAG repeat RNA and can be involved in the RNA metabolisms of diseases caused by CAG/CTG repeat expansion. This study identified the effects of MBNL1 on the metabolisms of mutant RNA associated with repeat expansion diseases.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,700,000	510,000	2,210,000
2010年度	1,600,000	480,000	2,080,000
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

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：RNA結合タンパク質、神経変性疾患、MBNL1、CAGリピート、筋強直性ジストロフィー、選択的スプライシング、ポリグルタミン

1. 研究開始当初の背景

ポリグルタミン病は翻訳領域内に存在するCAGリピート配列の伸長によって引き起こされる神経

変性疾患群の総称である。これらの疾患では、原因遺伝子自体の機能や変性部位、症状などに違いが見られるが、ポリグルタミン伸長タンパク質の発現や封入体形成などの共通性も見られる。伸長した CAG リピートを含む mRNA の発現もポリグルタミン病に共通しており、伸長ポリグルタミン含有タンパク質の発現に必須な中間産物であることから、ポリグルタミン病治療標的として有望であると考えられる。例えば、ポリグルタミンに結合するペプチドや化合物は、ポリグルタミン凝集抑制や分解促進などを通じて、ポリグルタミンの毒性を低減させることが知られているが、同様の発想で、CAG リピート RNA を標的にすることで、ポリグルタミンの発現自体を低下させる可能性があり得る。

一方、CAG リピート RNA 自体の影響も注目されつつある。タンパク質に翻訳されない CAG リピート配列が毒性を発揮することが、ショウジョウバエにおいて報告されている (Li et al. 2008 Nature)。このような「RNA 毒性」は筋強直性ジストロフィーにおいて研究が先行している。筋強直性ジストロフィー 1 型 (DM1) は CTG リピート伸長疾患であるが、リピートは 3' 非翻訳領域に存在しており、タンパク質には含まれない。CTG リピートから転写される CUG リピート RNA は、RNA 結合タンパク質 MBNL1 (muscleblind-like 1) を核内で異常に捕捉し、また、別の RNA 結合タンパク質 CUG-BP を未知の分子経路により活性上昇させ、それらの複合的な結果によりスプライシング異常を引き起こす。いくつかの遺伝学的な解析から、スプライシング異常が筋強直性ジストロフィーの病態に深く関与することが明らかとなっている。一方、CAG リピート RNA が類似した効果を持つか否かについては不明である。

以上のことより、CAG リピート RNA はポリグルタミン病共通の治療標的という側面と、RNA 毒性もしくは RNA 代謝異常という側面を持つが、その詳細に関してはこれまで検討が十分にはなされていない。

2. 研究の目的

ポリグルタミン病の治療戦略の一つは、伸長ポリグルタミンを持つ変異タンパク質の発現を抑制させることである。これまでに、いくつかの研究グループによって RNA 干渉を用いた変異タンパク質の発現抑制が試されており、一定の効果が認められている。しかし、一般に、CAG リピートは正常アリルにも存在するため、変異アリルと正常アリルに由来する転写産物を区別してノックダウンをするのは困難である。しかし、伸長した CAG リピートは正常長のものとは比べて 2 本鎖構造 (ヘアピン構造) を安定にとることが予測されており、2 次構造上では両者の区別が可能

であると考えられる。私は、以前の研究から、RNA 結合タンパク質 MBNL1 が CAG リピート結合性を示すことを見出していた。そこで本研究では、MBNL1 が CAG リピートおよびポリグルタミンの発現に及ぼす影響を検討した。

一方、RNA 代謝異常はポリグルタミン病でも見られることが考えられる。まず、MBNL1 によって制御される C1cn1 スプライシングの異常が CAG リピートによっても生じるかを検討した。さらに、ポリグルタミン病に関わる RNA 代謝に関連して、MBNL1 とともに TLS/FUS の検討を行った。TLS は各種のポリグルタミン病で見られる封入体に存在し、N 末端側の領域においてポリグルタミン凝集体と結合するタンパク質である。TLS と MBNL1 はそれぞれ異なる側面からポリグルタミン病に関わる可能性が考えられる。本研究では、多角的にポリグルタミン病と RNA 結合タンパク質との関連を理解するため、将来的な MBNL1 と TLS の比較を視野に入れ、TLS についての性状解析を行った。

3. 研究の方法

(1) MBNL1 がリピート RNA の発現に与える影響

培養細胞に MBNL1 もしくは各種の変異体とリピート RNA 発現コンストラクトをトランスフェクションし、蛍光 in situ hybridization (FISH) 法によってリピート RNA をラベルした。RNA の局在は核内および核周辺部の蛍光強度を定量的に評価し、その相対的な強さの度合いを各細胞において決定した。リピート RNA から発現するタンパク質の量はウエスタンブロットによって解析した。

(2) MBNL1 の細胞内局在シグナルの同定

MBNL1 の欠失変異体および点変異体を多数用いて、培養細胞内におけるこれらの局在性を定量的に評価した。また、MBNL1 のパラログである MBNL2 および MBNL3 についても同様に解析した。さらに、ポリグルタミン病に関連する RNA 結合タンパク質として、TLS/FUS に関しても同様の解析を行った。

(3) MBNL1 によって制御される選択的スプライシングの解析

MBNL1 またはリピート発現コンストラクト存在下におけるスプライシング制御を Actn1 および C1cn1 ミニ遺伝子をレポーターとして用いて評価した。C1cn1 に関しては、MBNL1 による直接の制御機構を確認するため、種々の変異体コンストラクトを用いて MBNL1 による制御領域を特定した。さらに、MBNL1 自体のスプライシング自己調節を Mbn11 ミニ遺伝子によって検討した。TLS とその変異体に関しては改変型 E1A ミニ遺伝子を作製し、レポーターとしてアッセイに用いた。

4. 研究成果

培養細胞系において、CAG リピートを持つ疾患遺伝子およびレポーター遺伝子と MBNL1 の共発現を検討した結果、MBNL1 が CAG リピート長依存的に疾患遺伝子の発現制御を行うことが明らかとなった。また、MBNL1 は伸長した CAG または CUG リピートの RNA との核内封入体を形成するが、この封入体の核局在は MBNL1 自体の構造と局在性に依存することがわかった。そこで MBNL1 の局在性決定要因を詳細に調べたところ、古典的および新規の 2 種の核局在シグナルの存在が示唆された。これらの核局在シグナルの使い分けは選択的スプライシングを介して自己調節され、他の複数のスプライシング制御因子によっても制御されることが明らかとなった。興味深いことに、この選択的スプライシングは DM1 および脊髄小脳失調症 8 型 (SCA8) において、異常な制御を受けていることが知られている。本研究の結果は、DM1・SCA8 の MBNL1 異常スプライシングは核内 MBNL1 タンパク質の機能低下が引き金になっていることを支持している。さらに、このスプライシングの結果、強い核局在シグナルを持つ MBNL1 アイソフォームの割合が増加し、それが核内での伸長リピート RNA との結合をさらに促すという機構が示唆された。また、CAG リピートの発現による Clncl 遺伝子のスプライシングを検討したが、顕著な変化を示さなかった。この結果は、疾患における CAG リピートと CUG リピートの長さの範囲、MBNL1 との結合力、あるいは CUG-BP への影響などの差を反映していると考えられる。以上の結果から、MBNL1 が伸長リピート RNA の制御タンパク質であり、その機能の決定要因が明らかとなった。

ポリグルタミン病に関わる可能性のある RNA 結合タンパク質として、TLS/FUS も合わせて解析した。TLS/FUS タンパク質はポリグルタミン凝集体に存在するタンパク質として同定されたが、興味深いことに家族性筋萎縮性側索硬化症 (ALS) の原因遺伝子の一つであることも最近明らかとなった。本研究では、MBNL1 と同様に、TLS がポリグルタミン病の RNA 代謝に与える影響を解析し、MBNL1 と比較検討することを試みた。TLS の解析の手始めとして、その機能ドメインを欠失解析によって明らかにした。その結果、細胞内局在を決定する複数のドメインと、スプライシング制御に必要な領域を明らかにした。さらに、ALS に関連する変異を導入した場合、変異間で効果が異なることが明らかとなった。また、単独では弱い変異でも、TLS のリン酸化を模した置換を導入することによって変異の効果が著しく増強される例も見られた。以上のことから、TLS の機能・局在性を決定する要因が明らかとなった。今後、TLS がポリグルタミン病原因タンパク質によって機能的に

どのような影響を受けるかの研究へ展開するための基盤となる情報を得ることができた。

興味深いことに、ポリグルタミン病原因遺伝子の一つである ATXN2 のリピート長が ALS のリスク因子であることが最近報告されている (Elden et al. 2010 Nature)。ATXN2 は ALS において高頻度に異常蓄積する TDP-43 と結合し、ATXN2 伸長による脊髄小脳失調症 2 型 (SCA2) では TDP-43 の異常局在が報告されている。TDP-43 と TLS はともに RNA 結合タンパク質であり、ALS の原因遺伝子である点も共通している。さらに、TLS は SCA2 やそれ以外のポリグルタミン病においてもポリグルタミン封入体に存在する。一方、MBNL1 は筋強直性ジストロフィーだけでなく、SCA8 や脆弱 X 関連振戦失調症候群などの神経変性疾患でも封入体に存在する。このように RNA 結合タンパク質の病理学的異常が複数の疾患に共通して見られることが、近年相次いで発見されている。これらの発見は、疾患における分子マーカーとしての RNA 結合タンパク質の重要性を示すと同時に、RNA 代謝の異常を示唆していると考えられる。実際、ALS 孤発例ではスプライシングの異常が報告されている (Rabin et al. Hum. Mol. Genet. 2010)。本研究では、ALS 関連変異によって TLS のスプライシング制御能が低下することが確認された。従って、DM1 や SCA8 だけでなく、より広範な神経疾患において、スプライシング異常を始めとする各種の RNA 代謝異常が検討されるべきであると考えられる。

さらに、SCA8 では元々 CUG リピートを持つ転写産物が原因だと考えられたが、その逆鎖から CAG リピートを持つポリグルタミンをコードする転写産物が生じることが明らかになっており、複数の遺伝子産物が発症機構に関わる可能性が示唆されている。このような両方向転写は SCA8 だけでなく、DM1 や Huntington's disease-like 2 でも見られており、これまで知られていたよりも広範な疾患においてポリグルタミンが関与する可能性が出てきている。本研究の結果から、CAG・CUG リピートへの影響を通じて、MBNL1 が幅広い疾患群に影響する可能性が考えられる。

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 5 件)

① Kino Y, Washizu C, Aquilanti E, Okuno M, Kurosawa M, Yamada M, Doi H, Nukina N. Intracellular localization and splicing regulation of FUS/TLS are variably affected by a myotrophic lateral sclerosis-linked mutation s. *Nucleic Acids Research* 39(7) 2781-2798 2011 査読有り

② Bauer PO, Goswami A, Wong HK, Okuno M, Kurosawa M, Yamada M, Miyazaki H, Matsumoto G,

Kino Y, Nagai Y, Nukina N.
Harnessing chaperone-mediated autophagy
for the selective degradation of mutant
huntingtin protein. Nature Biotechnology
28 256-263, 2010 査読有り

③ Kino Y, Washizu C, Oma Y, Onishi H,
Nezu Y, Sasagawa N, Nukina N, Ishiura S.
MBNL and CELF proteins regulate
alternative splicing of the skeletal
muscle chloride channel CLCN1. Nucleic
Acids Research 37(19) 6477-6490、2009
査読有り

④ Doumanis J, Wada K, Kino Y, Moore AW,
Nukina N.
RNAi screening in Drosophila cells
identifies new modifiers of mutant
huntingtin aggregation. PLoS One 4(9)
E7275 2009 査読有り

⑤ Bauer PO, Wong HK, Oyama F, Goswami
A, Okuno M, Kino Y, Miyazaki H, Nukina
N.
Inhibition of Rho kinases enhances the
degradation of mutant huntingtin. Jou
rnal of Biological Chemistry 284(19)
13153-13164 2009 査読有り

[学会発表] (計5件)

① Kino et al. Intracellular localization
and splicing regulation of FUS/TLS are
variably affected by amyotrophic lateral
sclerosis-linked mutations. 第33回日本
分子生物学会年会 第83回日本生化学会大会
合同大会 (BMB2010) 2010年12月7日・8日
神戸

② Kino et al. The effects of ALS-linked
mutations of FUS/TLS 第1回新潟大学脳研究
所共同研究拠点国際シンポジウム Current
Understandings and Future Directions for
ALS 2010年11月22日新潟

③ Kino et al. RNA結合タンパク質 TLS/FUS
の機能と神経変性疾患との関連 包括脳ネ
ットワーク 夏のワークショップ 2010年7
月28日 札幌

④ 紀 嘉浩 疾患に関連した MBNL1 のスプ
ライシング制御 第32回日本分子生物学会
年会 2009年12月10日 横浜

⑤ 紀 嘉浩 Autoregulation of MBNL1:
coupling of splicing regulatory activity
and intracellular localization 7th

International Myotonic Dystrophy Consortium
Meeting 2009年9月10日 ヴェルツブルク (ド
イツ)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

紀 嘉浩 (KINO YOSHIHIRO)

独立行政法人理化学研究所・構造神経病理研究チ
ーム・研究員

80415140