

令和 6 年 6 月 13 日現在

機関番号：17501

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2021～2023

課題番号：21K06871

研究課題名(和文) RNAキナーゼの機能不全と神経変性疾患

研究課題名(英文) Dysfunction of RNA Kinase in Neurodegenerative Diseases

研究代表者

白石 裕士 (SHIRAIISHI, Hiroshi)

大分大学・医学部・准教授

研究者番号：80452837

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：生体内の様々なRNA分子は、厳密に合成と分解の調節を受けており、その異常が様々な疾患を引き起こす。CLP1は、RNAの5'末端をリン酸化するRNAリン酸化酵素の一つで、その遺伝子変異が橋小脳低形成症患者で発見されている。本研究では、ヒト患者で報告された変異を導入した変異マウスを作製し、変異マウスがヒト患者と同様の神経症状を示し、CLP1の変異が橋小脳低形成症の原因となっていることを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ヒト橋小脳低形成症患者でCLP1変異が発見されていたが、CLP1変異が実際に橋小脳低形成症を発症させるかどうか不明であった。本研究により、CLP1変異が橋小脳低形成症の原因であることが初めて確認された。本研究で作製したCLP1変異マウスがヒト橋小脳低形成症患者の良い動物モデルになり、橋小脳低形成症の発症機序や治療戦略の構築の有用なツールとなると考えられる。また、RNAキナーゼの生理的意義の解明に寄与できると考えられる。

研究成果の概要(英文)：Cleavage factor polyribonucleotide kinase subunit 1 (CLP1), an RNA kinase, plays essential roles in protein complexes involved in the 3' end formation and polyadenylation of mRNA and the tRNA splicing endonuclease complex, which is involved in precursor tRNA splicing. The mutation R140H in human CLP1 causes pontocerebellar hypoplasia type 10 (PCH10), which is characterized by microcephaly and axonal peripheral neuropathy. We generated knock-in mutant mice that harbored a CLP1 mutation consistent with R140H. We found these mice showed progressive loss of the upper motor neurons, resulting in impaired locomotor activity.

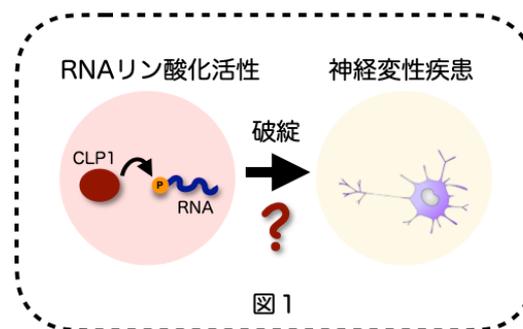
研究分野：細胞生物学

キーワード：RNAキナーゼ

様式 C-19、F-19-1 (共通)

1. 研究開始当初の背景

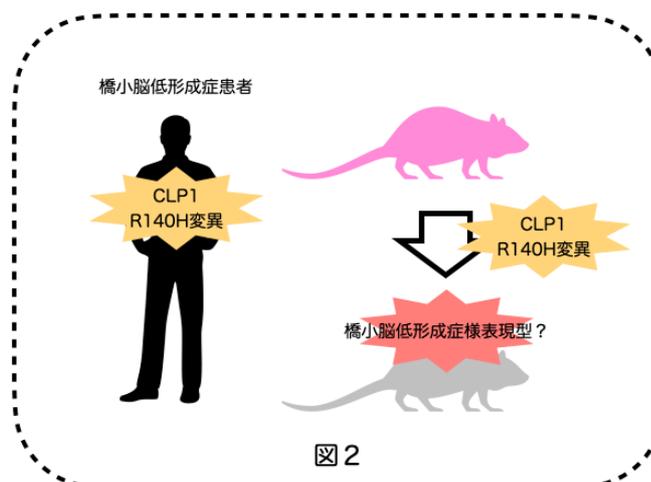
生体内の様々な RNA 分子は、厳密に合成と分解の調節を受けている。近年、それら RNA の代謝調節機構をつかさどる分子の異常が神経変性疾患や悪性腫瘍といった様々な疾患を引き起こすことが明らかとなっており、「RNA 代謝異常」という新たな病態機構の解明と関連疾患に対する治療戦略の構築が期待されている。特に神経変性疾患との関わりは注目されており、いくつかの RNA 結合タンパク質の異常によって ALS (筋萎縮性側索硬化症) や FTD (前頭側頭葉変性症) が発症することが明らかとなっている (Neuron, 2019, DOI: 10.1016/j.neuron.2019.03.014)。



研究代表者は、これまで RNA キナーゼの生理的役割について解析を行ってきた。CLP1 は、RNA の 5' 末端をリン酸化する RNA キナーゼの一つである。CLP1 は、もともと mRNA の 3' 末端を切断してポリアデニル化する酵素複合体の構成成分として酵母で同定されたが、さらに tRNA の成熟にも関わっており、tRNA 前駆体からイントロンを取り除く酵素複合体にも含まれていることが明らかとなっていた。研究代表者は、ヒト *CLP1* 遺伝子の突然変異の家系をトルコにおいて発見し、CLP1 の機能不全が異常な tRNA 断片を蓄積させ、神経変性疾患を発症させることを報告していた。現在、本疾患は「橋小脳低形成症 10 型」として新たに分類定義されるに至っている (Cell, 2014, doi: 10.1016/j.cell.2014.02.058)。しかしながら、ヒトで見つかった変異を導入した動物モデルは報告されておらず、本当に CLP1 の変異のみで本疾患が引き起こされるかは証明されていなかった。また CLP1 の機能不全において見られる異常な tRNA 断片の蓄積がどのような機序で生じ、またその蓄積がどのようにして神経特異的に細胞死を誘導しているのかは明らかになっていない。さらに RNA の 5' 末端がリン酸化されることの生理的意義も分かっていない (図 1)。

2. 研究の目的

本研究では、ヒト橋小脳低形成症患者で見つかった CLP1 の R140H 変異が実際に橋小脳低形成症の原因となっているのかを明らかにすることを目的とした (図 2)。また、なぜ RNA キナーゼである CLP1 の機能不全が神経変性を引き起こすのか、RNA リン酸化の生理的意義の解明と共に、その病態形成の分子メカニズムを明らかにし、最終的には RNA 代謝異常によって引き起こされる神経変性疾患に対する治療戦略を構築することを目的とした。



3. 研究の方法

- (1) CRISPR/Cas9 システムを用いてマウス *Clp1* 遺伝子に R140H に相当する変異を導入するため、マウスの受精卵に Cas9/gRNA/ssODN をエレクトロポレーション法にて導入した。gRNA は *Clp1* 遺伝子の第 2 エキソンにある開始コドンの下流を標的とするように設計した。相同組換えのためのドナー DNA となる ssODN は 140 番目のアルギニンをヒスチジンに置換され、かつ同時に PAM 配列に変化を生じさせる同義的な変異が導入されるように設計した。
- (2) 作製した CLP1R140H マウスの運動機能は、ロータロッド試験および歩行分析により評価した。
- (3) 組織学的解析のため、CLP1R140H マウスから脳・脊髄・筋肉を採取し、ホルマリン固定後、パラフィン切片を作製し、各種染色にて評価を行った。
- (4) R140H 変異を持つ CLP1 の生化学的解析を行うため、CLP1R140H マウスから初代継代胎仔線維芽細胞を樹立した。線維芽細胞より調製した細胞溶解液を用いて CLP1 の酵素活性を RNA キナーゼアッセイにて測定した。
- (5) 異常 tRNA 断片の蓄積は、CLP1R140H マウス組織および線維芽細胞を用いてノーザンブロット法にて検出した。

4. 研究成果

まず、CRISPR/Cas9 システムを用いて、R140H ヘテロ接合ノックインマウスを作製した。得られた R140H ヘテロ接合マウス同士の掛け合わせにより R140H 変異をホモ接合で持つマウスを得た。R140H 変異マウスは正常なメンデル比で生まれ、見た目では目立った表現型は観察されなかった。各遺伝子型の胎仔線維芽細胞を樹立し、CLP1 の発現についてウェスタンブロッティング法にて調べたところ、R140H 変異細胞においても同程度の CLP1 の発現が観察された。よって R140H 変異は CLP1 タンパク質の安定性に影響を及ぼさないと考えられた。CLP1 のキナーゼ活性を欠損させたマウスは、運動ニューロン病様表現型を示すことが知られていたため、8 週齢の若い R140H 変異マウスの脳を取り出し、重量および大きさを測定したところ、野生型マウスと同程度であり有意な差を認めなかった。また、運動機能について、ロータロッド試験にて評価を行ったが、野生型マウスとの差は認められなかった。しかしながら、R140H 変異マウスの長期観察を行ったところ、老齢になるに従って徐々に振戦、歩行障害、hindlimb claspung と呼ばれる下肢反射異常を示し始めることが明らかとなった。そこで 1 年齢の R140H 変異マウスを用いてロータロッド試験を行ったところ、野生型マウスと比べて有意に運動機能が低下していることが明らかとなった。運動障害の患者では、よく歩行障害が観察される。そこで、R140H 変異マウスの歩行分析を行ったところ、野生型マウスに比べ有意に歩幅が減少していることも明らかとなった。

次に老齢における R140H 変異マウスの脳組織の変化を調べるために、1 年齢のマウスの脳組織の大きさを測定したところ、野生型マウスと比べ終脳領域の有意な萎縮を認めた。またニッスル染色を用いた組織学的解析により、大脳皮質の厚さの減少、特に運動野第 5 層において神経細胞の有意な減少を認めた (図 3)。一方で、脊髄の ChAT 陽性ニューロンや小脳のプルキンエ細胞の数などに変化は無かった。よって老齢の R140H 変異マウスの運動障害は、上位運動ニューロンが何らかの理由により減少したことで生じていると考えられた。

分子メカニズムを探るため、R140H 変異が CLP1 のキナーゼ活性にどう影響しているか調べたところ、R140H 変異細胞ではキナーゼ活性が有意に減少していることが明らかとなった。橋小脳低形成症 10 型患者組織や CLP1 キナーゼ活性欠損マウスの組織では異常な tRNA 断片が蓄積していることが知られている。また、研究代表者らは、それら異常な tRNA 断片をゼブラフィッシュの受精卵にマイクロインジェクションすると p53 依存的な神経細胞死が誘導されることを明らかにしている (BBRC, 2020, doi: 10.1016/j.bbrc.2020.02.157)。そこで、R140H 変異マウスにおいて、橋小脳低形成症患者で見られる Ile tRNA イントロン由来断片と CLP1 キナーゼ活性欠損マウスで見られる Tyr tRNA の 5' 断片が蓄積しているかどうかノーザンブロッティング法にて調べたところ、新生仔マウスにおいて両断片とも蓄積していることが明らかとなった。このことから、R140H 変異マウスにおける運動障害は、異常 tRNA 断片の蓄積による神経細胞障害が原因だと考えられた。興味深いことに、老齢マウスの脳組織でも異常 tRNA 断片が蓄積しているものの、新生仔マウスに比べると顕著では無かった。これは異常 tRNA 断片に対する感受性が細胞ごとに異なり、幼若期に tRNA 断片に感受性の高い神経細胞群が除去されているためだと考えられた。これら異常 tRNA 断片の感受性の違いや異常 tRNA 断片による細胞障害メカニズムについて明らかにすることが今後の課題だと考えられる。

本研究では、橋小脳低形成症 10 型で発見された *CLP1* 遺伝子の R140H が実際に橋小脳低形成症様の表現型を引き起こすことを動物モデルを用いて世界で初めて報告した (図 3)。本研究で作製された CLP1R140H マウスは橋小脳低形成症のモデル動物として、橋小脳低形成症の発症機序の解明に有用だと考えられる。

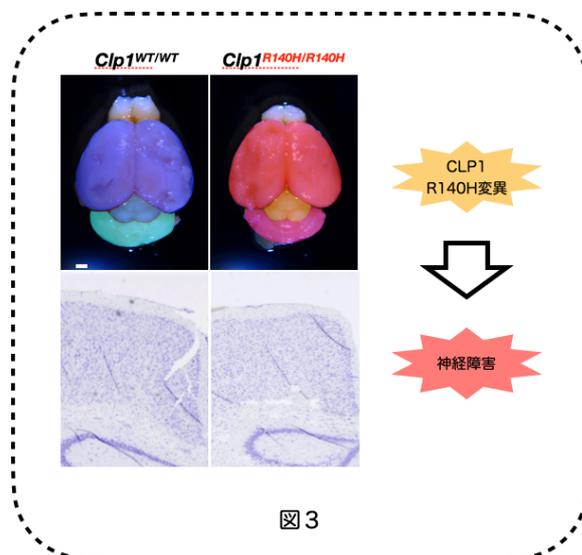


図 3

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 6件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Apidita Sebastian Wulan, Shiraishi Hiroshi, Shimizu Nobuyuki, Umeda Ryohei, Lai Shaohong, Ikeuchi Mayo, Morisaki Ikuko, Yano Shinji, Yoshimura Akihiko, Hanada Reiko, Hanada Toshikatsu	4. 巻 624
2. 論文標題 Ankle2 deficiency-associated microcephaly and spermatogenesis defects in zebrafish are alleviated by heterozygous deletion of vrk1	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Biochemical and Biophysical Research Communications	6. 最初と最後の頁 95 ~ 101
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbrc.2022.07.070	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Umeda Ryohei, Teranishi Hitoshi, Hada Kazumasa, Shimizu Nobuyuki, Shiraishi Hiroshi, Urushibata Hiroto, Lai Shaohong, Shide Masahito, Carrasco Apolinario Magdeline E., Higa Ryoko, Shikano Kenshiro, Shin Toshitaka, Mimata Hiromitsu, Hikida Takatoshi, Hanada Toshikatsu, Hanada Reiko	4. 巻 27
2. 論文標題 Vrk2 deficiency elicits aggressive behavior in female zebrafish	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Genes to Cells	6. 最初と最後の頁 254 ~ 265
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/gtc.12924	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Morisaki Ikuko, Shiraishi Hiroshi, Fujinami Hiroyuki, Shimizu Nobuyuki, Hikida Takatoshi, Arai Yuji, Kobayashi Takashi, Hanada Reiko, Penninger Josef M., Fujiki Minoru, Hanada Toshikatsu	4. 巻 570
2. 論文標題 Modeling a human CLP1 mutation in mouse identifies an accumulation of tyrosine pre-tRNA fragments causing pontocerebellar hypoplasia type 10	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Biochemical and Biophysical Research Communications	6. 最初と最後の頁 60 ~ 66
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbrc.2021.07.036	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 Inoue Masanori, Miyahara Hiroaki, Shiraishi Hiroshi, Shimizu Nobuyuki, Tsumori Mika, Kiyota Kyoko, Maeda Miwako, Umeda Ryohei, Ishitani Tohru, Hanada Reiko, Ihara Kenji, Hanada Toshikatsu	4. 巻 11
2. 論文標題 Leucyl-tRNA synthetase deficiency systemically induces excessive autophagy in zebrafish	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-021-87879-4	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Carrasco Apolinario Magdeline E., Umeda Ryohei, Teranishi Hitoshi, Shan Mengting, Phurpa, Sebastian Wulan Apridita, Lai Shaohong, Shimizu Nobuyuki, Shiraishi Hiroshi, Shikano Kenshiro, Hikida Takatoshi, Hanada Toshikatsu, Ohta Keisuke, Hanada Reiko	4. 巻 675
2. 論文標題 Behavioral and neurological effects of Vrk1 deficiency in zebrafish	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Biochemical and Biophysical Research Communications	6. 最初と最後の頁 10 ~ 18
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbrc.2023.07.005	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Shimizu Nobuyuki, Shiraishi Hiroshi, Hanada Toshikatsu	4. 巻 12
2. 論文標題 Zebrafish as a Useful Model System for Human Liver Disease	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Cells	6. 最初と最後の頁 2246 ~ 2246
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/cells12182246	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

〔学会発表〕 計27件 (うち招待講演 2件 / うち国際学会 3件)

1. 発表者名 Mayo Ikeuchi, Kyoko Kiyota, Shuya Miyazaki, Takashi Takeno, Wulan Apridita Sebastian, Masanori Inoue, Nobuyuki Shimizu, Hiroshi Shiraishi, Kenji Ihara, and Toshikatsu Hanada
2. 発表標題 Elucidation of the mechanism of hearing loss associated with distal tubular acidosis
3. 学会等名 Asian conference on fish models for diseases (国際学会)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Wulan Apridita Sebastian, Hiroshi Shiraishi, Nobuyuki Shimizu, Ryohei Umeda, Shaohong Lai, Mayo Ikeuchi, Ikuko Morisaki, Shinji Yano, Akihiko Yoshimura, Reiko Hanada and Toshikatsu Hanada.
2. 発表標題 Dynamic Duo: Ankle2 and Vrk1 coordination in maintaining neurogenesis in zebrafish
3. 学会等名 Asian conference on fish models for diseases (国際学会)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 白石裕士
2. 発表標題 ゼブラフィッシュを用いた遺伝子疾患モデルの作製
3. 学会等名 第12回癌・炎症と抗酸化研究会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 清水 誠之, 白石 裕士, 井上 真紀, 清田 今日子, 井原 健二, 花田 俊勝
2. 発表標題 X連鎖性ミオチューブラーミオパチー (XLMTM) に合併する肝紫斑病の分子病態機構の解明
3. 学会等名 第95回日本生化学会大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Wulan Apridita Sebastian, Shiraishi Hiroshi, Shimizu Nobuyuki, Hanada Reiko, Hanada Toshikatsu
2. 発表標題 ankle2 deficiency-associated microcephaly and spermatogenesis defect in zebrafish are partially restored by heterozygous deletion of vrk1
3. 学会等名 第95回日本生化学会大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Shaohong Lai, Shiraishi Hiroshi, Shimizu Nobuyuki, Sebastian Wulan, Hanada Toshikatsu
2. 発表標題 smg9 deficiency in zebrafish causes an aging phenotype
3. 学会等名 第95回日本生化学会大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 清水誠之, 白石裕士, 井上真紀, 井原健二, 花田俊勝
2. 発表標題 X連鎖性ミオチューブラーミオパチーに伴う肝紫斑病の病態機構
3. 学会等名 日本生化学会九州支部例会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Lai Shaohong, Hiroshi Shiraishi, Nobuyuki Shimizu, Wulan Apridita Sebastian, Reiko Hanada, Toshikatsu Hanada.
2. 発表標題 Analysis of smg9-deficient Zebrafish
3. 学会等名 日本生化学会九州支部例会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Wulan Apridita Sebastian, Hiroshi Shiraishi, Nobuyuki Shimizu, Reiko Hanada, Toshikatsu Hanada.
2. 発表標題 ankle2 deficiency in zebrafish causes impaired brain development
3. 学会等名 日本生化学会九州支部例会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 森崎郁子, 白石裕士, 藤浪弘行, 荒井勇二, 小林隆志, 花田礼子, 花田俊勝
2. 発表標題 CLP1 p.R140Hの変異は病的なチロシンtRNA前駆体断片の蓄積を誘導する
3. 学会等名 第94回日本生化学会大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Wulan Apridita Sebastian, Hiroshi Shiraishi, Nobuyuki Shimizu, Reiko Hanada, Toshikatsu Hanada
2. 発表標題 ankle2 deficiency in zebrafish causes impaired brain development
3. 学会等名 第94回日本生化学会大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 清田今日子, 白石裕士, 清水誠之, 井上真之, 井原健二, 花田俊勝
2. 発表標題 新規PIK3CD変異によるSLE発症のメカニズムの解析
3. 学会等名 第44回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 漆畑博太郎, 八塚洋之, 井上真紀, 清水誠之, 白石裕士, 花田俊勝
2. 発表標題 ゼブラフィッシュを用いた橋小脳低形成1C型疾患モデルの構築
3. 学会等名 第44回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Shaohong Lai, Hiroshi Shiraishi, Wulan Sebastian, Nobuyuki Shimizu, Ryouhei Umeda, Reiko Hanada, Toshikatsu Hanada
2. 発表標題 Analysis of smg9-deficient Zebrafish
3. 学会等名 第44回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 井上真紀, 宮原弘明, 白石裕士, 清水誠之, 前田美和子, 梅田涼平, 石谷太, 花田礼子, 花田俊勝, 井原健二
2. 発表標題 口イシルtRNA合成酵素欠損ゼブラフィッシュを用いた乳児肝不全症候群の病態解明
3. 学会等名 第62回日本先天代謝異常学会学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 梅田涼平, 清水誠之, 波田一誠, 寺西仁志, 鹿野健史朗, 比嘉涼子, 漆畑博太郎, 白石裕士, 花田俊勝, 花田礼子
2. 発表標題 VRK2 KO zebrafish の行動生理学的解析
3. 学会等名 第72回 西日本生理学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Hiroshi SHIRAISHI
2. 発表標題 Modeling Human Disease by CRISPR/Cas9
3. 学会等名 1st Joint Symposium and Workshop, Universitas AIRLANGGA and OITA University (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名	梅田涼平, 清水誠之, 波田一誠, 寺西仁志, 鹿野健史朗, 比嘉涼子, 漆畑博太郎, 白石裕士, 花田俊勝, 花田礼子
2. 発表標題	メスの VRK2 欠損ゼブラフィッシュでは攻撃行動が増強する
3. 学会等名	第99回日本生理学会大会
4. 発表年	2022年

1. 発表者名	白石裕士
2. 発表標題	ゼブラフィッシュを用いたヒト疾患モデルの作製
3. 学会等名	第45回蛋白質と酵素の構造と機能に関する九州シンポジウム (招待講演)
4. 発表年	2023年

1. 発表者名	白石裕士, Lai Shaohong, Sebastian Wulan, Wang Honxia, 清水誠之, 花田礼子, 花田俊勝
2. 発表標題	ナンセンス変異依存mRNA分解機構の制御破綻が早期老化を誘導する
3. 学会等名	第96回日本生化学会大会
4. 発表年	2023年

1. 発表者名	宮崎周也, 池内真代, 竹野貴志, 清田今日子, Lai Shaohong, 清水誠之, 白石裕士, 花田俊勝
2. 発表標題	ゼブラフィッシュモデルでみるSLOS脳病変のin vivo解析
3. 学会等名	第96回日本生化学会大会
4. 発表年	2023年

1. 発表者名 清水誠之, 白石裕士, 井上真紀, 清田今日子, 井原健二, 花田俊勝
2. 発表標題 X連鎖性ミオチューブラーミオパチーに伴う重度肝障害の分子メカニズムの解明
3. 学会等名 第96回日本生化学会大会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 清田今日子, 白石裕士, 清水誠之, 井上真紀, 井原健二, 花田俊勝
2. 発表標題 新規PIK3CD変異によるSLE発症のメカニズムの解析
3. 学会等名 第96回日本生化学会大会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 宮崎周也, 池内真代, 竹野貴志, 清田今日子, Lai Shaohong, 清水誠之, 白石裕士, 花田俊勝
2. 発表標題 ゼブラフィッシュdhcr7欠損モデルから視るSLOS病態
3. 学会等名 令和5年度日本生化学会九州支部例会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 池内真代, 清田今日子, 宮崎周也, 竹野貴志, Wulan Apridita Sebastian, 井上真紀, 清水誠之, 白石裕士, 井原健二, 花田俊勝
2. 発表標題 遠位尿細管性アシドーシスに伴う難聴発症のメカニズム解明
3. 学会等名 令和5年度日本生化学会九州支部例会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 白石裕士, Lai Shaohong, Sebastian Wulan, Wang Honxia, 清水誠之, 花田礼子, 花田俊勝
2. 発表標題 NMD (nonsense-mediated mRNA decay pathway) の異常は早期老化を誘導する
3. 学会等名 第101回日本生理学会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 清水誠之, 白石裕士, 井上真紀, 清田今日子, 井原健二, 花田俊勝
2. 発表標題 X連鎖性ミオチューブラーミオパチーに伴う重度肝障害の病態メカニズム
3. 学会等名 第101回日本生理学会
4. 発表年 2023年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関		
オーストリア	Institute of Molecular Biotechnology		