

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成 25 年 5 月 20 日現在

機関番号：32409

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2011～2012

課題番号：23659461

研究課題名（和文）筋萎縮性側索硬化症原因遺伝子 TLS のメチル化異常による発症機構の
解明と治療法開発研究課題名（英文）Elucidation of causative mechanism of amyotrophic lateral sclerosis
via abnormality of methylation of TLS and development of its therapeutics.

研究代表者

黒川 理樹（KUROKAWA RIKI）

埼玉医科大学・医学部・教授

研究者番号：70170107

研究成果の概要（和文）：RNA 結合タンパク質 TLS は筋萎縮性側索硬化症（ALS）の原因遺伝子として報告された。この ALS 変異型 TLS には、アルギニン特異的（ARG）メチル化酵素 PRMT5 の結合が消失していた。そこで、変異型 TLS は ARG メチル化消失とそれに伴うタンパク質結合の異常から、不溶性凝集体を形成して ALS を発症する仮説を立てた。本研究の目的は、この仮説の検証と変異型 TLS の PRMT5 結合を回復させる RNA リガンド作成である。今回、TLS の ARG メチル化機構の詳細を明らかにし、RNA リガンド候補を得ることに成功した。

研究成果の概要（英文）：RNA-binding protein TLS has been reported as a causative gene for amyotrophic lateral sclerosis (ALS). At the ALS-mutant TLS lost binding of protein arginine N-methyltransferase 5 (PRMT 5). Then, we hypothesize that the mutated TLS should cause ALS through formation of the insoluble aggregates induced by abnormality of binding of proteins elicited with deletion of arginine-specific methylation. Specific aim of the study is to prove the hypothesis and generate an “RNA ligand” to recover the binding of PRMT5 to TLS. Then, we have shown novel mechanism of arginine-methylation of TLS and attained significant progress in generating the RNA ligand.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	2,800,000	840,000	3,640,000

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：酵素、遺伝子、核酸、生体分子、発現制御

1. 研究開始当初の背景

学術的背景

ALS は、運動ニューロンの死滅により、筋肉の萎縮と筋力低下をきたす神経変性疾患である。好発年齢は 40～50 代で、発症から 3～5 年で呼吸筋麻痺により死亡する。現在までに根治療法は開発されていない。原因遺伝子としては、SOD や TDP43 が知られている。最近、RNA 結合タンパク質 TLS/FUS が原因遺伝子として同定された。我々は、ncRNA が TLS に結合するとヒト主要ヒストンアセチル化酵素 CBP/p300 を阻害して転写を抑制するこ

とを示した（Wang et al. : Nature 454: 126-30, 2008）。すなわち、RNA 分子が TLS にアロステリック効果を発揮し RNA リガンドとして機能する。本研究では RNA リガンド機能を ALS 治療法開発に応用する。

ALS は運動ニューロン病（MND）であり、RNA スプライシングに関与する RNA 結合タンパク質 TDP43 も原因遺伝子として報告されている。脊髄性筋萎縮症（SMA）も MND で、survival of motor neuron（SMN）が原因遺伝子として知られている。SMN は、PRMT5 によりメチル化されたタンパク質群と複合体を形成し、スプラ

イスソーム形成に重要な役割を果たす。MNDにはスプライシング異常が関与し、ARGメチル化が重要な役割を担う。本研究では、ALS変異型 TLS が PRMT5 結合を失い、関連するメチル化の消失により、タンパク質結合の異常を惹起して不溶性凝集体を形成するという仮説を検証する。さらに、TLS が RNA 結合タンパク質である特性を活かし、RNA リガンドによるアロステリック効果を活用して、PRMT5 結合を回復させる分子矯正療法開発に挑戦する。この成果は、RNA 結合タンパク質とメチル化酵素が関与し凝集体形成が引き金となる MND の発症機構の解明と治療法開発のモデルとなるものである。

2. 研究の目的

我々は、非コード (nc)RNA が TLS (Translocated in liposcoma)/FUS に結合して、TLS 機能を制御する RNA リガンドとして作用することを示した (Nature:454, 126-30, 2008)。最近、TLS は筋萎縮性側索硬化症 (ALS) の原因遺伝子として報告された。予備実験では、ALS 変異型 TLS には、アルギニン特異的 (ARG)メチル化酵素 PRMT5 の結合が消失していた。この結果から、変異型 TLS は、ARGメチル化消失とそれに伴うタンパク質結合の異常から、不溶性凝集体を形成して ALS を発症する仮説を立てた。本研究の目的は、この仮説の検証と変異型 TLS の PRMT5 結合を回復させる RNA リガンド作成である。この RNA リガンドは ALS 治療法開発に大きな前進をもたらすと期待される。

3. 研究の方法

TLSメチル化アルギニンに対するモノクローナル抗体の作成

抗原として用いたメチル化ペプチドは図1に示す。

腸骨リンパ節法を用いてマウスに抗原を注射して免疫し、通法に従ってモノクローナル抗体を得た。

1 TLS-216-218 dimethylated
CGGRGRGGSG
4th & 6th R: Symmetrical dimethyl arginine (PRMT5)

2 TLS-242 dimethylated
CGYEPGRGGG
6th R: Asymmetrical dimethyl arginine (PRMT1)

3 TLS-394 dimethylated
CPMGRGGYGG
5th R: Asymmetrical dimethyl arginine (PRMT1)

図1

GST-TLSを用いたアルギニンメチル化アッセイ
大腸菌で GST-TLS 発現させて、ライセートとして回収する。このライセートをグルタチオンアガロースと反応させて、GST-TLS を結合

させる。これに PRMT 1 および PRMT5 と基質の SAM を 30°C で 30 分間反応させる。この実験から、PRMT5 のメチル化には HeLa 細胞抽出液の添加が必要であることが判明した。この結果をもとに次の方法を考案して、補助因子の同定を試みた。

GST-TLS アルギニンメチル化トラップ法

上述の GST-TLS を用いたアルギニンメチル化アッセイに HeLa 細胞から調製した核抽出液を添加し、4°C で 1 時間転倒混和する。その後、WCE 洗浄液で 3 回洗浄して SDS サンプルバッファーで 1 分間煮沸してタンパク質を回収する。

質量分析法

上述の GST-TLS にアルギニンメチル化特異的に結合したタンパク質画分を SDS-PAGE で展開し、銀染色法で検出する。得られたタンパク質バンドを切り出す。このゲル片をトリプシン処理して、nanoLC-MS/MS 装置を用いて解析を行った。

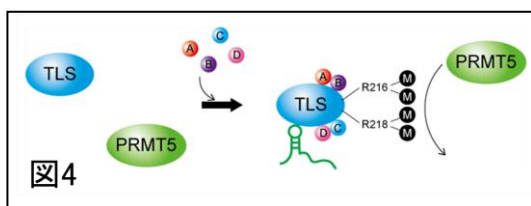
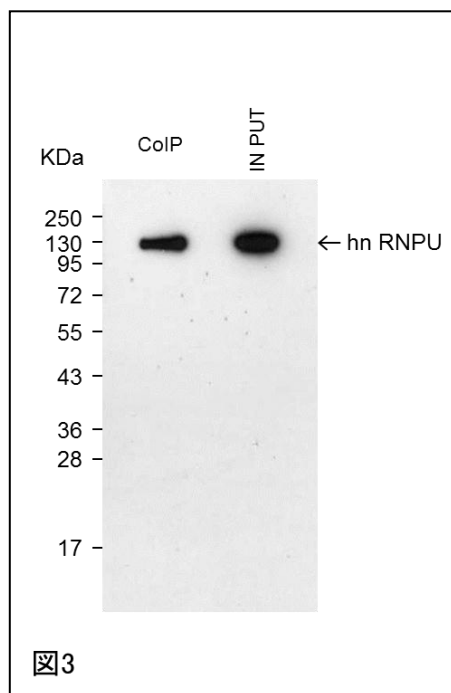
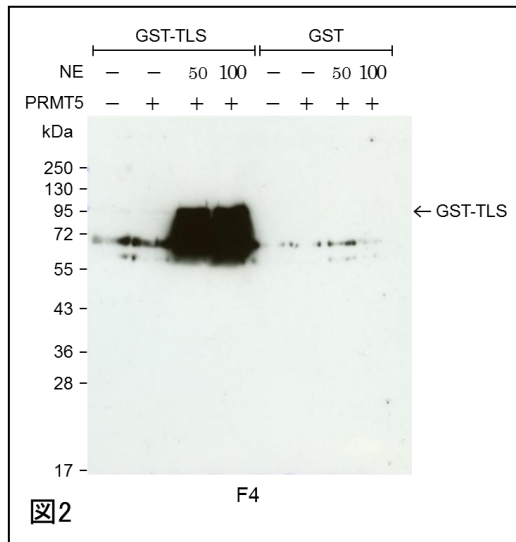
pncRNA の調製

RACE 法で決定した pncRNA-D の 600 塩基の配列を T7 プロモーターを持つ pcDNA3 に組込む。このプラスミド DNA を調製する。この DNA をバクテリオファージの T7RNA ポリメラーゼで転写して、RNA を調製する。

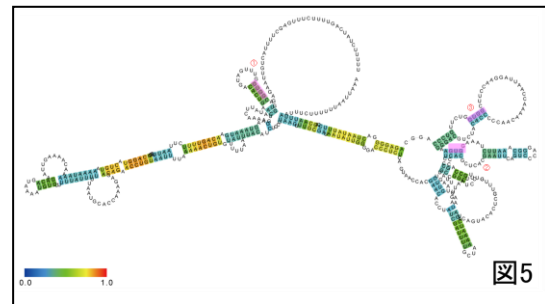
4. 研究成果

我々の質量分析の結果は、ALS 変異型 TLS にはアルギニン特異的メチル化酵素 PRMT5 の結合が消失していた。この結果から、変異型 TLS はアルギニンメチル化消失とそれに伴うタンパク質結合の異常から、不溶性凝集体を形成して ALS を発症する仮説を立てた。本研究の目的は、この仮説の検証と変異型 TLS の PRMT5 結合を回復させる RNA リガンド作成である。

我々は TLS の R216/R218 がジメチル化されることを報告した (BBRC, 2011)。そこで、これらのジメチル化されたアルギニン残基を認識するモノクローナル抗体の作成を試みた。その結果、R216/218 のジメチル化を識別する抗体 F4 を得た。この F4 抗体を用いて、TLS のメチル化を詳細にしらべると、PRMT5 による TLS の R216/218 のメチル化には補助因子の結合が必須であった (図 2, 3, 4)。これより、ALS のメチル化異常にこの補助因子の機能不全が予想された。F4 抗体を用いたウェスタンブロットから、ALS 変異型 TLS でのメチル化の低下が見られた。



さらに、TLS に特異的に結合する cyclin D1 プロモーター由来長鎖非コード RNA (pncRNA-D) を同定し(図 5)、この RNA の結合が ALS 型 TLS のメチル化不全を回復させるか鋭意検討中である。この pncRNA-D は、ALS 治療に応用可能な核酸医薬の有望なシードとなる可能性がある。以上のように、本研究は有意な成果を得たと自負している。



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 6 件)

- ① Oyoshi, T., and Kurokawa, R. Structure of noncoding RNA is a determinant of function of RNA binding proteins in transcriptional regulation. *Cell & Bioscience* 2:1, 2012. 査読有
DOI:10.1186/2045-3701-2-1
- ② Takahama, K., Sugimoto, C., Arai, S., Kurokawa, R., and Oyoshi, T. Loop Lengths of G-Quadruplex Structures Affect the G-Quadruplex DNA Binding Selectivity of the RGG Motif in Ewing's Sarcoma. *Biochemistry* 50: 5369-5378, 2011. 査読有
DOI:10.1021/bi2003857
- ③ Takahama, K., Kino, K., Arai, S., Kurokawa, R., and Oyoshi, T. Identification of Ewing's sarcoma protein as a G-quadruplex DNA- and RNA-binding protein. *FEBS Journal* 278: 988-998, 2011. 査読有
DOI:10.1111/j.1742-4658.2011.08020.x
- ④ Du, K., Arai, S., Kawamura, T., Matsushita, A., and Kurokawa, R. TLS and PRMT1 synergistically coactivate transcription at the survivin promoter through TLS arginine methylation. *BBRC* 404: 991-996, 2011. 査読有
DOI:10.1016/j.bbrc.2010.12.097
- ⑤ Kurokawa, R. Long Noncoding RNA as a Regulator for Transcription. In: Ugarković, Đ. (ed) *Long Non-Coding RNAs, Progress in Molecular and Subcellular Biology* 51, Chapter 2: 29-41, 2011. 査読有
DOI 10.1007/978-3-642-16502-3_2
- ⑥ Tokuzawa, Y., Yagi, K., Yamashita, Y., Nakachi, Y., Nikaido, I., Bono, H., Ninomiya, Y., Kanasaki-Yatsuka, Y., Akita, M., Motegi, H., Wakana, S., Noda, T., Sablitzky, F., Arai, S., Kurokawa, R., Fukuda, T., Katagiri, T.,

Schönbach, C., Suda, T., Mizuno, Y., and Okazaki, Y. Id4, a new candidate gene for senile osteoporosis, acts as a molecular switch promoting osteoblast differentiation. *PLoS Genet* 6:e1001019, 2010. 査読有

[学会発表] (計 7 件)

- ① 黒川 理樹 長鎖非コード RNA 機能の分子機構-核酸医薬の可能性
第 35 回日本分子生物学会年会
平成 24 年 12 月 12 日 福岡県福岡市
- ② Kurokawa, R. Long noncoding RNA as an epigenetic regulatory factor.
第 71 回日本癌学会学術総会
平成 24 年 9 月 20 日 北海道札幌市
- ③ Kurokawa, R. Long noncoding RNA, a counterpart of microRNA, works as a transcriptional regulator. Is lncRNA a potential target for nucleic acid medicine?
第 4 回日本 RNAi 研究会
平成 24 年 8 月 30 日 広島県広島市
- ④ Kurokawa, R. Promoter-associated noncoding RNA and Arginine-specific Methylation of RNA-binding protein TLS.
Keystone Symposia
平成 24 年 4 月 4 日 Utah, USA.
- ⑤ 黒川 理樹 長鎖非コード RNA とエピゲノム制御
第 34 回日本分子生物学会年会
平成 23 年 12 月 16 日 神奈川県横浜市
- ⑥ Kurokawa, R. TLS-CHOP, an Oncogenic Fusion Product in Myxoid Liposarcoma, Attenuates Cell Adhesion Ability through Down-Regulation of Integrin $\alpha 5 \beta 1$.
ENDO (The Endocrine Society) 2011
平成 23 年 6 月 6 日 Boston, USA.

[図書] (計 3 件)

- ① Kurokawa, R. Springer Berlin Heidelberg, Generation of Functional Long Noncoding RNA Through Transcription and Natural Selection. In: Mallick, B. (eds.) *Regulatory RNAs*, Chapter 6, 2012, pp151-174.
DOI:10.1007/978-3-642-22517-8_6
- ② Song, X., Wang, X., Arai, S., and Kurokawa, R. Springer New York, Promoter-Associated Noncoding RNA from the CCND1 Promoter. In: Vancura, A. (ed) *Transcriptional Regulation: Methods and Protocols*, Methods in Molecular Biology 809, Chapter 39, 2012, pp609-622.

DOI:10.1007/978-1-61779-376-9_39

- ③ Kurokawa, R. Springer New York, Promoter-Associated Long Noncoding RNAs Repress Transcription Through a RNA Binding Protein TLS. In: Collins, L.J. (ed) *RNA Infrastructure and Networks: Advances in Experimental Medicine and Biology* 722, Chapter 12, 2011, pp196-208.
DOI:10.1007/978-1-4614-0332-6_12

[産業財産権]

○出願状況 (計 1 件)

名称: 抗 TLS モノクローナル抗体及びその製造方法、ハイブリドーマ及びその製造方法、並びに抗 TLS モノクローナル抗体含有組成物

発明者: 黒川 理樹

権利者: 同上

種類: 特許

番号: 特願 2013-099962

出願年月日: 2013 年 5 月 10 日

国内外の別: 国内

[その他]

ホームページ等

<http://www.saitama-med.ac.jp/genome/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

黒川 理樹 (KUROKAWA RIKI)

埼玉医科大学・医学部・教授

研究者番号: 70170107

(2) 研究分担者

該当なし

(3) 連携研究者

松下 明生 (MATSUSITA AKIO)

埼玉医科大学・医学部・客員講師

研究者番号: 50402269

小川 純人 (OGAWA SUMITO)

東京大学・医学部附属病院・講師

研究者番号: 20323579