

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 3 日現在

機関番号：82401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2011～2013

課題番号：23791007

研究課題名(和文)ポリグルタミン病におけるRNA代謝異常とRNA結合タンパク質

研究課題名(英文)RNA metabolism and RNA-binding proteins 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・脳科学総合研究センター・客員研究員

研究者番号：80415140

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円、(間接経費) 960,000円

研究成果の概要(和文)：ポリグルタミン病は遺伝子のコード領域に存在するCAGリピートの伸長によって引き起こされる遺伝性神経変性疾患の総称であり、ハンチントン病に代表される。本研究では、ポリグルタミン病におけるRNAプロセッシング異常の存在を、培養細胞と疾患モデルマウスと用いて明らかにし、疾患におけるRNA結合タンパク質の関与が示唆された。また、ポリグルタミン病の原因遺伝子の転写産物の制御におけるRNA結合タンパク質の役割についても明らかにした。

研究成果の概要(英文)：Polyglutamine diseases, including Huntington's disease, are genetic disorders caused by a repeat expansion of CAG repeat tracts in protein-coding regions. This study revealed aberrant RNA processing in polyglutamine diseases using cultured cells and disease model mice, suggesting the involvement of RNA-binding proteins in the disease pathogenesis. In addition, RNA-binding proteins have a potential regulatory role in the expression of the gene products of a polyglutamine disease.

研究分野：分子生物学

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：神経変性疾患 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コード領域に存在する CAG リピートの伸長によって引き起こされる神経変性疾患の総称である。伸長したポリグルタミンは、自己凝集するだけでなく、異常なタンパク質結合能を獲得し、それが生体内分子経路を阻害する可能性が考えられている。一方、ポリグルタミン病原因遺伝子の多くは機能が未知で、ポリグルタミン鎖以外の目立った共通点はないとされてきた。しかし、近年の研究からは、過半数が転写調節複合体(AR, TBP, DRPLA, ATXN1, ATXN7)や RNA 結合タンパク質(ATXN1, ATXN2)といった部類のタンパク質であることが明らかであり、RNA 代謝との強い関連が示唆される。実際、多くのポリグルタミン病モデルマウスにおいて、転写制御の異常が確認されている。

研究代表者の所属研究室の先行研究において、RNA 結合タンパク質である FUS/TLS や TIA-1 がポリグルタミンと相互作用することが示されている。しかし、ポリグルタミン病においては転写制御異常がよく知られているものの、より広範な RNA プロセッシング異常については、ほとんど検討がなされていない。

## 2. 研究の目的

ポリグルタミンによる異常な影響を受ける可能性のある分子群として RNA 結合タンパク質を解析し、ポリグルタミン病における RNA 代謝異常の実態を明らかにすることを目的とする。また、ポリグルタミン自体の発現に影響する分子とその機構を RNA 代謝の観点から明らかにする。

## 3. 研究の方法

マイクロアレイ(Affymetrix 社 ExonArray)を用いたポリグルタミン病モデルマウスの網羅的遺伝子発現解析により、RNA プロセッシング異常の有無を検討した。

培養細胞系において、ミニ遺伝子を用いたスプライシングアッセイ系において、ポリグルタミンの発現がスプライシングパターンの変化を引き起こすか検討した。

培養細胞およびポリグルタミン病モデルマウス脳からタンパク質凝集体を精製し、質量分析によってその構成タンパク質を同定した。

ポリグルタミン凝集体構成タンパク質の遺伝学的な部分的欠損がポリグルタミン病モデルマウスに与える影響(生存、行動解析、遺伝子発現)を解析した。

ポリグルタミンをコードする mRNA の細胞内局在を蛍光 in situ hybridization 法によって解析し、その挙動やタンパク質発現に影響を与える因子を検討した。

## 4. 研究成果

ハンチントン病モデルマウス R6/2 の線条体から抽出した全 RNA を用いて Affymetrix 社 ExonArray による網羅的遺伝子発現解析を行った結果、既知および新規の遺伝子発現量の変化を見出した。異なる週齢のマウスを用いたが、変化する遺伝子数が疾患進行に伴って増加するだけでなく、その機能的カテゴリーも継時的な変遷が見られた。その中でも、線条体特異的遺伝子の発現低下が疾患最初期から確認された。さらに、発現量の変化よりは小規模ながら、RNA プロセッシングの変化も同時期から確認された。これらには選択的スプライシングあるいは遺伝子末端のエクソンの変化によるものが含まれた。より網羅性の高い解析には RNA-seq などの手法の利用が必要だと考えられるが、疾患初期における RNA プロセッシング異常の存在を確認することができた。これらの変化は、疾患発症の一部を担う可能性があるほか、疾患進行のバイオマーカーとして利用できる可能性がある。

蛍光タンパク質を付加した伸長型ポリグルタミンを発現する Neuro2a 細胞およびハンチントン病モデルマウス(HD190QG)から、蛍光を指標にポリグルタミン凝集体を精製・濃縮し、その構成タンパク質を同定した。その結果、既知および新規のタンパク質を多数同定した。この中には RNA 結合タンパク質も複数含まれており、割合としても大きかった。培養細胞とマウス脳では、構成タンパク質に違いが見られたが、細胞によるタンパク質発現量や凝集体形成の時間経過の違いを反映していると考えられる。

培養細胞 Neuro2a を用いたスプライシングアッセイ系において、いくつかのミニ遺伝子とポリグルタミンの共発現を検討したところ、2 つにおいてスプライシングパターンの変化が見られた。この変化はタンパク質をコードしない CAG リピート RNA の発現では見られなかった。上記で得られた RNA 結合タンパク質の過剰発現あるいはノックダウンによるミニ遺伝子のパターンの変化を検討した結果、複数の RNA 結合タンパク質がミニ遺伝子の制御因子であることが示唆された。

RNA プロセッシング異常に関わる可能性のある有力な因子として、ポリグルタミン凝集体構成タンパク質の一つに注目し、その遺伝学的な部分的欠損がポリグルタミン病モデルマウスに与える影響を解析した。ここでは 2 つの異なるポリグルタミン病モデルを用いたが、興味深いことに、疾患によってこのタ

ンパク質の部分的欠損の影響が異なることがわかった。この差は、ポリグルタミン病原因タンパク質との共凝集の程度や遺伝子発現変化の程度と相関していた。この結果は、凝集体形成を通じた RNA 結合タンパク質の機能異常が疾患の発症あるいは進行に寄与し得ることを示唆している。

ポリグルタミンをコードする CAG リピード RNA は、RNA 結合タンパク質の一つである MBNL1 と結合することが先行研究より明らかである。この結合は、RNA 封入体として、蛍光 in situ hybridization で確認することができる。培養細胞において、この RNA-タンパク質結合が CAG リピード RNA の核内滞留を促し、結果としてポリグルタミンの発現低下に繋がることを明らかにした。ハンチントン病モデルマウスの脳において、導入遺伝子由来の RNA の局在を調べたところ、顕著な RNA 封入体の形成は見られず、MBNL1 の局在も正常であった。すなわち、生体脳においては、何らかの理由で CAG リピードと MBNL1 の結合が不十分であり、その結果 CAG リピード RNA が細胞質へと輸送され、異常タンパク質の発現に繋がると考えられた。この要因としては、MBNL1 の脳における発現量、タンパク質翻訳後修飾、核内滞留に関わる共因子の有無などが考えられる。脳において CAG リピードの細胞内局在を制御する因子は、原因遺伝子産物の毒性の程度にも関わると考えられるため、今後の解明が期待される。

#### 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)

Koebis M, Ohsawa N, Kino Y, Sasagawa N, Nishino I, Ishiura S. (2011)  
Alternative splicing of myomesin 1 gene is aberrantly regulated in myotonic dystrophy type 1.  
*Genes to Cells*, **16**(9), 961-972.

Maheshwari M, Bhutani S, Das A, Mukherjee R, Sharma A, Kino Y, Nukina N, Jana NR. (2014)  
Dexamethasone induces heat shock response and slows down disease progression in mouse and fly models of Huntington's disease.  
*Human Molecular Genetics*, **23**(10), 2737-2751.

Asada A, Yamazaki R, Kino Y, Saito T, Kimura T, Miyake M, Hasegawa M, Nukina N, Hisanaga SI. (2014)  
Cyclin-dependent kinase 5 phosphorylates and induces the degradation of ataxin-2.

*Neuroscience Letters*, 2014 Jan 31;563C:112-117. doi: 10.1016/j.neulet.2014.01.046.

紀 嘉浩, 貫名 信行 (2012)  
ハンチントン病の治療法開発とモデルマウスを用いた評価  
実験医学, Vol. 30 No. 2 (増刊) in vivo 実験医学によるサイエンスと疾患解明 (株)羊土社刊 203-210 頁

紀 嘉浩, 貫名 信行 (2014)  
FUS/TLS  
医学のあゆみ 医学・医療のいまがわかる キーワード 2014, 249(5) 438

[学会発表](計 5 件)

紀 嘉浩, 鷲頭知花, 奥野弥佐子, 黒澤大, 山田みず樹, 土井宏, 貫名信行  
筋萎縮性側索硬化症に関連する変異は FUS/TLS の細胞内局在およびスプライシング制御能に影響する  
第 52 回日本神経学会学術大会, 2011 年 5 月 18 日、名古屋

紀 嘉浩, 鷲頭知花, 黒澤大, 貫名信行  
RNA 結合タンパク質 MBNL1 によるリピード伸長疾患 RNA の制御  
包括型脳科学推進支援ネットワーク 夏のワークショップ 2011 年 8 月 23 日 神戸

Kino Y, Washizu C, Kurosawa M, Oma Y, Ishiura S, Nukina N  
Muscleblind proteins repress aberrant protein expression derived from expanded repeats.  
8th International Myotonic Dystrophy Consortium Meeting, 2011 年 12 月 1 日 タンパ(米国)

Kino Y, Washizu C, Kurosawa M, Oma Y, Ishiura S, Nukina N  
Nuclear localization of MBNL1: Implications for splicing-mediated autoregulation and expanded repeat-related protein expression  
第 34 回日本分子生物学会年会, 2011 年 12 月 13 日、横浜

Kino Y, Nukina N  
Protein/RNA aggregation in neurological disorders  
Neuro2013, 2013 年 6 月 21 日、京都

[図書](計 1 件)

紀 嘉浩, 黒澤大, 貫名信行 (分担執筆: 三品昌美編)

モデル動物実験マニュアル 疾患モデルの  
作成と利用 脳・神経疾患 第2節 ハンチ  
ントン病モデルマウス、株式会社エル・ア  
イ・シー刊 2011年、39-47頁

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・脳科学総合研究  
センター・客員研究員

(明治薬科大学・薬学部・講師)

研究者番号：80415140