

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 9 日現在

機関番号：32659

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24500449

研究課題名(和文) ストップコドンリードスルーによるミエリン構成タンパク質の産生機構と機能の解明

研究課題名(英文) Production mechanism and functional role of myelin protein produced by stop codon readthrough

研究代表者

馬場 広子 (Baba, Hiroko)

東京薬科大学・薬学部・教授

研究者番号：40271499

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)：末梢神経髄鞘タンパクL-MPZはP0 mRNAから読み飛ばしという特殊な機序でP0と共に産生される。また、末梢神経障害患者血液に抗L-MPZ抗体が存在する。そこで本研究ではL-MPZの産生機序と髄鞘での役割、抗体と脱髄の関連性を調べた。その結果、L-MPZ産生はP0 mRNAの配列に依存すること、L-MPZは細胞接着に働くことを明らかにした。一方、L-MPZ抗体自体は脱髄を起こさず、脱髄後の修復との関連性を調べる必要性が示された。また、L-MPZとP0の産生比率は髄鞘の接着性を変化させる可能性があるため、今後遺伝病の治療にリードスルー薬を用いるときは注意が必要であることが示された。

研究成果の概要(英文)：L-MPZ is a novel isoform of myelin P0 that is produced from P0 mRNA by stop codon readthrough mechanism. Antibodies against L-MPZ are often found in the patient sera with peripheral neuropathy, but the role of the antibodies in neuropathy is unknown. In present study, production mechanism, function of L-MPZ in myelin, and relevance of the antibody to demyelination were examined. We found that rate of L-MPZ production (ratio of L-MPZ/P0) was dependent on the nucleotide sequence near the stop codon, and readthrough stimulating drug, G418, significantly elevated this ratio. L-MPZ showed cell adhesion activity in the transfected cells. Anti-L-MPZ antibody did not induce demyelination, but further study on its role in remyelination may be needed. Since cell adhesion activity of L-MPZ was weaker than that of P0, change of L-MPZ/P0 ratio may affect adherence of myelin layers. Thus, our study suggests that precaution should be needed when readthrough stimulating drugs are used for therapy.

研究分野：分子神経生物学

キーワード：リードスルー ミエリン 細胞接着 リン酸化 PKC

1. 研究開始当初の背景

末梢神経系の髄鞘(ミエリン)はシュワン細胞によって形成され、ヒトでは脱髄を伴う種々の免疫性あるいは遺伝性末梢神経障害が知られている。ミエリンは脂質約70%、タンパク質約30%で構成される膜様構造物で、軸索周囲を何重にも取り囲み、絶縁および軸索上のイオンチャネルのランピエ絞輪周囲への局在化により跳躍伝導の発生に重要な役割をしている。申請者は、慢性脱髄性免疫性ニューロパチー(CIDP)患者血清中に、末梢神経ミエリン特異的な約36 kDaのタンパク質に対する抗体が高率に出現することを見出し、この抗原がミエリンタンパク質の約50%を占めるP0タンパク質のmRNAから stop codon readthrough (以下 readthrough) によって新たにC末端に63アミノ酸が付加された分子であることを明らかにし、large myelin protein zero (L-MPZ)と名付けた。L-MPZはP0と共に正常な末梢神経ミエリン中に存在するため、患者血清中の抗L-MPZ抗体が病態を修飾する可能性が考えられる。また、P0遺伝子異常によりヒトではCharcot-Marie-Tooth病1B(CMT1B)を発症する。病態とL-MPZの関連性を明らかにするためにはミエリンでのこの分子の機能を明らかにする必要がある。一方、readthroughによる翻訳修飾は、限られたゲノムから多様な分子を産生するために下等動物で見られる現象であるが、高等動物ではあまり知られていない。その反面、筋ジストロフィー症などの遺伝病においてreadthrough薬の開発が行われている。正常組織中の分子がreadthrough機序で産生されるとすれば、これらの産生にも影響する可能性が考えられる。

2. 研究の目的

上記の背景から、本研究では下記の3点を明らかにすることを目的とした。

- (1) 正常ミエリンにおけるL-MPZの機能
- (2) 脱髄性疾患と抗L-MPZ抗体の関連性
- (3) P0 mRNAのreadthrough機構の解析とL-MPZを用いた読み飛ばし候補化合物評価系の確立

3. 研究の方法

以下の研究は、東京薬科大学組換えDNA安全委員会、動物実験委員会、ヒト組織等を研究活用するための倫理委員会による審査と学長承認の上、本学の各々の規程に則って実施した。

(1) L-MPZの発現系の確立

ヒトP0 cDNAをもとに以下のコンストラクトを作製した; stop codon 変異(L-MPZのみ産生) 3'-UTR 欠損(P0のみ産生) PKC

リン酸化部位の変異体(P0とL-MPZの共通部分にあるリン酸化部位、L-MPZ特異的配列にあるリン酸化部位、両方のリン酸化部位の3種)。これらは分裂後も娘細胞に安定発現可能なpEBMuti-Hygベクターに導入した。トランスフェクション対照としてhmUKG(緑色蛍光タンパク質遺伝子)入りのベクターを用いた。これらのベクターをHeLa細胞に導入し、それぞれの強制発現細胞を作製した。hygromycinによって安定発現細胞を選択した。

(2) 細胞接着性評価

各々の安定発現細胞を37°C、10 rpmで1時間穏やかに振盪しながら浮遊培養した後撮影し、接着した細胞を数えて接着率を算出した。また、2種の異なる発現細胞同士の接着性の評価には、一方にCalcein AMを取り込ませることによって区別した。

(3) 脱髄モデル作製と抗L-MPZ抗体の解析

ラットあるいはマウスの坐骨神経にlyssolecithinを投与し、脱髄モデルを作製した。L-MPZ抗体の脱髄巣への影響に関しては、あらかじめ動物にL-MPZ由来ペプチドを投与し、抗体が産生された後に脱髄モデルを作製する方法と、脱髄モデルの尾静脈から抗体を注入する方法で解析した。

(4) in vitro translation を利用した読み飛ばし効率の解析

N末端にmycをつけたP0 cDNAをもとに無細胞翻訳系を用いてタンパク質を合成させ、SDS-PAGE電気泳動後に抗myc抗体を用いてウエスタン解析を行った。myc-P0(36 kDa)およびmyc-L-MPZ(42 kDa)の産生比(読み飛ばし効率)を算出した。

4. 研究成果

(1) 正常ミエリンにおけるL-MPZの機能

以前の解析結果から、ミエリン形成期においてL-MPZの発現量増加と共にPKCによってリン酸化された36 kDaタンパク質の量が増加することが示唆されていたが、リン酸化部位もその意義も不明であった。今回、末梢神経ホモジネートをphos-tagアクリルアミドSDS-PAGE後にウエスタン解析することにより、リン酸化なし、1カ所リン酸化、2カ所リン酸化の3つの状態のL-MPZが混在することがわかった(図1)。

P0は細胞接着分子としてミエリン膜間の接着に重要で、細胞内ドメインのPKCによるリン酸化(P0とL-MPZの共通部分にあるリン酸化部位)が細胞外Igドメインの接着性に影響することが知られている。しかし、C末端が長いL-MPZがP0同様に細胞接着に関わるのかは不明であった。そこで、L-MPZの細胞接着に対する役割およびリン酸化の影響を明らかにするために、P0、L-MPZ、

P0 との共通部分のリン酸化部位が変異した L-MPZ、L-MPZ 特異的リン酸化部位が変異した L-MPZ をそれぞれ安定に発現する HeLa 細胞を用いて、細胞接着性を解析した。コントロールには hmUKG を安定発現させた細胞を用いた。hygromycin による選択により 1 週間後には発現していない細胞をほとんど消失させることができた。これらの細胞を用いた接着実験では、ベクターコントロールの細胞と比較し、P0 あるいは L-MPZ を発現する細胞は有意に細胞接着率が高かった。しかし、この 2 つを比較すると L-MPZ の方が接着率は低い傾向が見られた (図 1)。

次に各リン酸化部位に変異を持つ細胞の接着率を調べた結果、変異によりリン酸化しない P0 の発現細胞は、コントロールよりは有意に接着率は増加したが、変異のない P0 に比して明らかに接着率は低下した。一方、L-MPZ 特異的リン酸化部位が変異した DNA を入れた細胞では、変異のない DNA を持つ細胞と比べて接着性が低下する傾向はあったが有意差はとれなかった。それに対して 2 つのリン酸化部位両方に変異を入れた細胞では、明らかに接着性が低下することから、P0 特異的なリン酸化部位が特に細胞接着性に重要であると考えられた (図 1)。

P0 発現細胞と L-MPZ 発現細胞を同数まで培養した場合、P0 と L-MPZ がヘテロに結合して細胞接着を生じる場合もみられるが、L-MPZ 発現細胞をまぜたときよりも P0 発現細胞のみの方が接着性は高い傾向にあった。

以上の結果から、L-MPZ は P0 のようにホモフィリックあるいは P0 とヘテロフィリックに結合することにより細胞接着分子としてはたらく、P0 特異的 PKC リン酸化部位のリン酸化が接着性を増加させることが明らかとなった。しかし、接着分子としての活性は P0 に比して弱いことがわかった。この結果から、P0/L-MPZ の比率が変化することにより、ミエリン各層間の接着性が変化することが示唆された。

(2) 脱髄性疾患と抗 L-MPZ 抗体の関連性

CIDP 患者血清中には高率に抗 L-MPZ 抗体が存在する。動物実験では、脱髄部位に抗 L-MPZ 抗体の沈着を認めるが、この抗体の脱髄に対する作用は明らかではない。本研究では、lyssolecithin による末梢神経脱髄モデル動物の尾静脈から抗体を入れ、脱髄巣の大きさを解析した。また、ラット (マウス) に事前に抗原ペプチドを投与して抗 L-MPZ 抗体を産生させた上で、lyssolecithin 脱髄を誘導し、抗体の有無による脱髄巣の大きさを解析した。その結果、抗 L-MPZ 抗体の有無による脱髄巣の大きさの変化は明らかではなく、抗 L-MPZ 抗体は脱髄そのものを悪化させる効果はないと考えられた。しかし、健康人血清の解析ではある程度の割合で抗 L-MPZ 抗体陽性の血清 (抗体価は低い) が認められたことから、ニューロパチー治療に

用いられるヒト IgG 製剤を解析したところ、これにも抗 L-MPZ 抗体が存在していた。ニューロパチー患者血清中の抗体と比較すると健康人血清中に見られる抗体の力価は低いが、ヒトによって数年間抗体価が維持されているのがわかった。ラット各器官のホモジネートを用いたウエスタン解析により、抗 L-MPZ 抗体が末梢神経の L-MPZ の他に、腎臓 (70 kDa) や精巣 (40 kDa) に存在する分子量の異なる分子とも反応することから、今後ニューロパチー患者で見られる高力価の抗体産生機序と共に、正常人における低力価で持続的な抗体産生機序および抗 L-MPZ 抗体による病態修飾 (特に再生への関与) に関してさらに調べる必要があると考えられた。

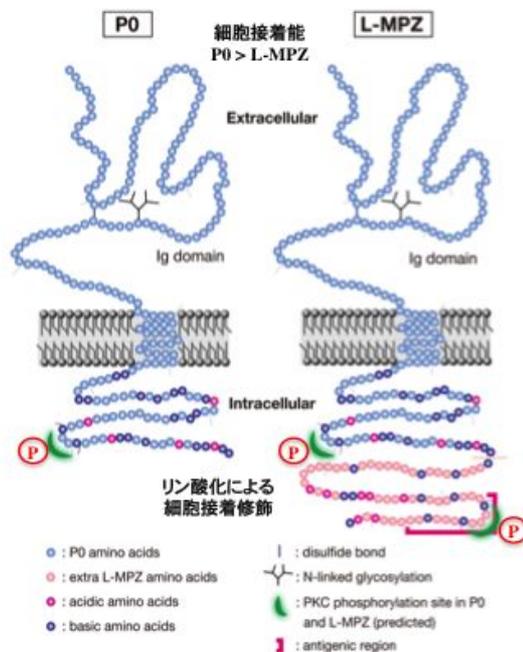


図 1 P0 と L-MPZ の構造・機能と PKC 依存性リン酸化部位 (本研究成果)

(3) P0 mRNA の readthrough 機構の解析と L-MPZ を用いた読み飛ばし候補化合物評価系の確立

読み飛ばし効率を解析した結果、P0 mRNA の塩基配列自体が比較的高い効率で読み飛ばしを生じることがわかった。さらに、ストップコドン前後の塩基配列を変化させることにより読み飛ばし効率が変化し、特にストップコドンの次の C が重要であることがわかった。哺乳類において、読み飛ばしにより C 末端が異なるタンパク質を産生する機序はまだ不明な点が多いため、今回得たような結果を今後蓄積していくことが重要であると考えられた。

また、myc-P0 cDNA を用いた無細胞翻訳系により、通常の翻訳では P0 の産生量が多いが、G418 のような読み飛ばしを促進する薬剤の存在下で翻訳を行うと、L-MPZ の産

生量が増加して両者の量比が逆転することが明らかとなった。抗 myc 抗体を用いたウエスタン解析により P0 と L-MPZ を同時に同一サンプルで検出することが可能になったため、バンドの濃さを比べることにより読み飛ばし効率を簡単に算出することができる。今後、読み飛ばし薬の開発にあたり、候補化合物の評価系として用いることができると同時に、L-MPZ のように正常組織の構成成分として存在する読み飛ばし産物への影響を調べる事が可能である。

以上の結果から、P0 mRNA の readthrough によって末梢神経ミエリンタンパク質として産生された L-MPZ は、P0 同様に細胞接着性を示すことが明らかとなった。しかし、P0 よりも接着性は弱いため P0/L-MPZ 比が変化することでミエリン層間の接着性に変化が起こり得る。また、L-MPZ は P0 よりも細胞内領域が長いため、ミエリン膜内の L-MPZ の増加はミエリン各層の厚さにも変化をもたらす、伝導速度に影響する可能性は否定できない。さらに、本研究期間中に正常な体内で機能する他の読み飛ばし産物の報告もあった (Eswarappa et al., 2014)。このため今後リードスルー薬を臨床で用いる場合には、これらの分子への影響を十分に考慮した上で用いるなどの注意が必要であることが示された。

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3件)

(1) Yoshihide Yamaguchi, Akiko Hayashi, Celia W. Campagnoni, Akio Kimura, Takashi Inuzuka, Hiroko Baba. L-MPZ, a novel isoform of myelin P0, is produced by stop codon readthrough. *J. Biol. Chem.* 287:17765-17776, 2012 査読あり

(2) Hiroko Baba Demyelinating neuropathy. *Peripheral nerve* 24:210-213, 2013 査読なし

(3) 馬場広子 末梢ミエリンと脱髄性ニューロパチー 脳 21 16:420-426, 2013 査読なし

〔学会発表〕(計3件)

(1) Yoshihide Yamaguchi, Yu Naito, Yukiko Uchino, Hiroko Baba. Analysis of stop codon readthrough mechanism for production of L-MPZ. The 11th Biennial Meeting of the Asian-Pacific Society for Neurochemistry/ 55th Annual Meeting of the Japanese Society for Neurochemistry. 2012.9.29-10.2, Kobe.

(2) Yoshihide Yamaguchi, Noriko Yano,

Saki Sato, Naruya Tabei, Hiroki Nakanishi, Hiroko Baba. Adhesion properties mediated by PKC-dependent phosphorylation are different between myelin P0 and its readthrough isoform L-MPZ. 25th Meeting of the International Society for Neurochemistry. 2015.8.23-8.27, Cairns, Australia.

(3) Yoshihide Yamaguchi, Noriko Yano, Saki Sato, Naruya Tabei, Hiroki Nakanishi, Hiroko Baba. Adhesion properties mediated by PKC-dependent phosphorylation are different between myelin P0 and its readthrough isoform L-MPZ. 12th Biennial ISN Satellite Meeting Myelin Biology 2015 Glial Neuronal Interactions. 2015.8.28-8.31, Fitzroy Island, Australia.

〔その他〕

東京薬科大学薬学部機能形態学教室ホームページ

<http://www.ps.toyaku.ac.jp/kino-keitai/youkoso.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

馬場 広子 (BABA, Hiroko)

東京薬科大学・薬学部・教授

研究者番号：40271499

(2) 研究分担者 なし

(3) 連携研究者

山口 宜秀 (YAMAGUCHI, Yoshihide)

東京薬科大学・薬学部・准教授

研究者番号：50311832

林 明子 (HAYASHI, Akiko)

東京薬科大学・薬学部・講師

研究者番号：90232090

(4) 研究協力者

中西 弘樹 (NAKANISHI, Hiroki)

矢野 法子 (YANO, Noriko)