

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 30 日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25293201

研究課題名(和文) Ataxin-2を介した神経変性疾患発症メカニズムの解明

研究課題名(英文) Elucidation of Ataxin-2-mediated neurodegeneration

研究代表者

河原 行郎 (Kawahara, Yukio)

大阪大学・医学(系)研究科(研究院)・教授

研究者番号：80542563

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 14,200,000円

研究成果の概要(和文)：Ataxin-2は、神経難病の発症に深く関連するがその機構は不明である。本研究では、Ataxin-2がRNA代謝に関与するとのこれまでの知見を手がかりに、その生理的・病的機能を明らかにすることを目的として実施した。その結果、Ataxin-2がmicroRNA機能複合体RISCと相互作用していることを発見した。また、RNA結合タンパク質として直接RNAに結合していることを見出し、その標的がmRNAであることを同定した。また、Ataxin-2は標的mRNAの安定性を促進し、疾患関連変異がこの機能を減弱することを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：The gene encoding Ataxin-2 is mutated in the patients with some neurodegenerative diseases, such as spinocerebellar ataxia type 2 and amyotrophic lateral sclerosis. This finding suggests a common pathogenic role of Ataxin-2 in these neurodegenerative diseases. Therefore, a comprehensive understanding of the physiological functions of Ataxin-2 is the first step for elucidating the mechanism underlying Ataxin-2-mediated neurodegeneration. However, although Ataxin-2 has been implicated to be involved in RNA metabolism, the exact biological mechanism and in vivo targets remain unknown. In this study, we identified that Ataxin-2 associates with RNA-induced silencing complex that is required for microRNA-mediated gene silencing. Furthermore, we found that Ataxin-2 binds to distinct elements in the 3' UTRs of target mRNAs. The functional analyses revealed that Ataxin-2 stabilizes target mRNAs, which was attenuated by disease-associated mutations.

研究分野：神経科学、RNA生物学

キーワード：脳神経疾患 RNA 脊髄小脳変性症 筋萎縮性側索硬化症 ALS 神経変性疾患 遺伝子 RNA結合タンパク質

1. 研究開始当初の背景

神経変性疾患は、高齢化社会の到来により今後益々患者数が増加すると考えられ、病態解明と治療法確立が社会的に強く望まれている。その1つである脊髄小脳変性症は、小脳および脳幹から脊髄にかけての神経細胞変性により運動失調を来す。その中でも常染色体優性遺伝型の SCA2 型は、Ataxin-2 遺伝子の CAG リピートが異常伸長する (>35 回; 健常者では 15-27 回) ことが原因である (Sanpei et al, Nat Genet, 1996)。これまでのモデルマウスの解析からは、CAG リピート伸長に伴う異常伸長ポリグルタミン鎖を持つ変異 Ataxin-2 が、蓄積などによって毒性効果を発揮することよりも、機能喪失が主要な病態機序ではないかと示唆されている (Huynh et al, Nat Genet, 2000)。一方 ALS は、運動ニューロンの選択的脱落によって全身の筋力が低下する神経難病であり、発症すると数年以内に死に至る。これまで、SCA と ALS は異なる疾患スペクトラム上にあると考えられてきたが、最近になって ALS では、Ataxin-2 遺伝子の CAG リピートが有意に中等度伸長 (28-34 回) していることが報告された (Elden et al, Nature, 2010)。ハンチントン病など他のポリグルタミン病の原因となる CAG リピート長とは相関しないことから (Lee et al, Neurology, 2011)、Ataxin-2 自体の機能破綻が ALS 発症に関与していると考えられる。

Ataxin-2 は、ポリ A 鎖結合タンパク質 PABP やスプライシング因子 A2BP と結合する (Shibata et al, Hum Mol Genet, 2000; Kozlov et al, JBC, 2010) ことから、RNA の安定性などに関与するのではないかと考えられてきたが、詳細な生理的機能については依然として不明であった。したがって疾患関連変異が具体的にどのように機能を変容させるのかも未解明であった。

2. 研究の目的

SCA2 や ALS など複数の神経変性疾患に共通する発症メカニズムを解明するために、鍵分子である Ataxin-2 の生理的機能を同定し、更に疾患関連変異の結果である異常なポリグルタミン鎖伸長が、どのように機能に影響するのかを明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 複合体解析: HEK293T 細胞を用いた FLAG-Ago2 の安定発現細胞株から細胞質成分を分画し、抗 FLAG 抗体を用いて免疫沈降した。沈降物を FPLC 法により重さによって分画した。

(2) レポーターアッセイ: TNRC6 や Ataxin-2 の N 末端側に λ N ペプチドを付加したベクターと、これと高効率かつ選択的に結合する boxB 配列をレポーター遺伝子の 3' UTR に挿入したベクターを作成した。これらを同時に

細胞内に導入し、 λ N ペプチド付加タンパク質をレポーター mRNA にテザリングさせた。その結果を、レポータータンパク質の発現量としてプレートリーダーで測定した。

(3) PAR-CLIP 法: Halo タグを付加した

Ataxin-2 の安定発現細胞株を、HEK293T 細胞を用いて樹立した。同様に各種変異体の安定発現細胞株も樹立した。これら安定発現細胞株の蛋白質抽出液から、Halo タグを利用した免疫沈降を行い、Ataxin-2 に対する PAR-CLIP 法 (Hafner et al, Cell, 2010) を行った。具体的には、細胞培養液中に 4-チオウリジン (4-SU) を添加し、新規に転写される RNA にウリジンの代わりに取り込ませた。次に 365nm の長波長紫外線によって架橋反応を行うと、4-SU を介して強い蛋白質-RNA クロスリンクが生じる。その後、免疫沈降を行い、MNase で断片化後、ラジオアイソトープ (RI) 標識した。この RNA をゲルに電気泳動し、沈降した蛋白質の大きさの位置で強く RI が検出されたので、これをゲルから抽出した。回収された断片化 RNA を用いて RT-PCR を行い、次世代シーケンサーで網羅的なシーケンスを行うためのライブラリーを構築した。

(4) 網羅的シーケンスと情報解析: 上記ライブラリーに対して網羅的シーケンス解析を行った。PAR-CLIP 法では、蛋白質と架橋した部分の 4-SU は、逆転写反応中にチミン (T) ではなくシトシン (C) に置換される。このため、シーケンス後にゲノム配列と比較し、T から C への置換が生じているかどうかを確認し、手法が確立されたかどうかを確認した。さらに、その後情報解析を行い、Ataxin-2 に結合する RNA の分類、結合モチーフなどを解析した。

4. 研究成果

(1) Ataxin-2 は、microRNA 機能複合体 RISC と結合する: 我々はこれまでに ALS の発症に深く関与する RNA 結合タンパク質 TDP-43 が microRNA の生成に関与することを明らかにしてきた (Kawahara et al, PNAS, 2012)。このため、Ataxin-2 も microRNA の生成や機能に関与しているのではないかという仮説を立て解析した。その結果、Ataxin-2 は TDP-43 と直接結合することではなく、また microRNA の生成に関与していることを示唆する結果は得られなかった。しかし一方で、Ataxin-2 が microRNA 機能複合体 RISC と一緒に共沈降されることを発見した。詳細に解析すると、TDP-43 は microRNA の生成から RISC への load を担当する RLD (RISC Loading Complex) に含有されていた一方、Ataxin-2 は、RISC の中心構成因子である TNRC6 や PABP などと一緒に RISC に含有されていた (図 1)。

次に Ataxin-2 が RISC と結合する意義を解析するため、レポーターアッセイを行った。microRNA の機能発揮に必須の TNRC6 を過剰発

現させると標的 mRNA およびタンパク質の発現抑制が促進されたが、Ataxin-2 を過剰発現すると発現がむしろ促進した (図 2)。この結果から、Ataxin-2 は RISC と結合することで microRNA の機能を直接阻害するのではないかと考えた。しかし、microRNA を用いたレポーターアッセイ時に Ataxin-2 の発現を抑制しても、影響はほとんどなかった。したがって、Ataxin-2 は microRNA の機能阻害を介さず、直接 mRNA を安定化させるのではないかと考えた。

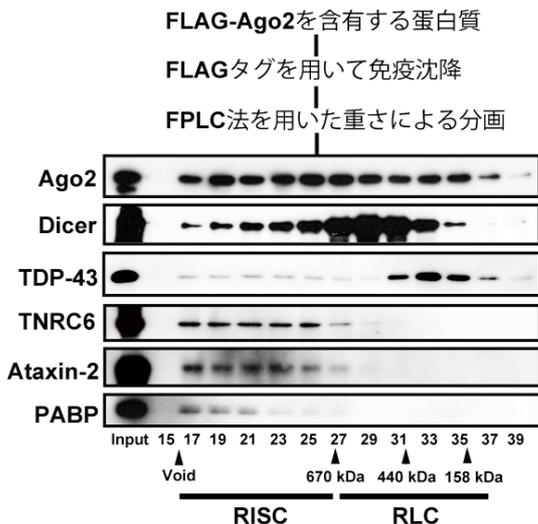


図 1. Ataxin-2 は RISC と結合する。RISC の主要な構成因子である Ago2 複合体を重さによって分画したところ、主に 2 種類の複合体が存在した。TDP-43 は Dicer とともに microRNA の生成から RISC への load を担当する RLD (RISC Loading Complex) に含有されていた。一方、Ataxin-2 は、中心構成因子である TNRC6 や PABP などと一緒に RISC に含有されていた。

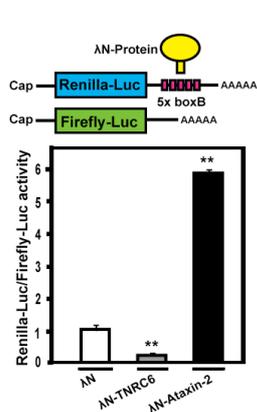


図 2. Ataxin-2 は標的 mRNA にコードされたタンパク質の発現を促進する。λN タグを付加したタンパク質を過剰発現させ、このタグが強制的に結合する box B 配列を含むレポーター遺伝子 (Renilla ルシフェラーゼ) と持たない遺伝子 (Firefly ルシフェラーゼ) を使って、tethering assay を行った。RISC の中心構成因子である TNRC6 の過剰発現は、標的タンパク質発現を約 6 倍抑制したが、Ataxin-2 は逆に約 6 倍増加させた。

(2) Ataxin-2 は mRNA の 3' UTR 領域に直接結合する: Ataxin-2 は LSm ドメインを内在している (図 3)。他の LSm タンパク質の中には、このドメインを介して直接 RNA に結合するものも知られていることから、Ataxin-2 が直接 RNA と結合している可能性について、PAR-CLIP 法を用いて解析した。その結果、Ataxin-2 に結合する RNA が確認された (図 4)。また、PABP との結合ドメインである PAM2 ドメインを欠損させた変異体を用いて同様の実験を行っても、結合 RNA の存在が確認できたことから、Ataxin-2 は PABP 非依存的に何らかの RNA に直接結合していることが明らか

かとなった。次に、結合 RNA を抽出して、網羅的にシーケンスを行った。その結果、約 4,000 遺伝子の 15,000 箇所、Ataxin-2 の結合部位を同定し、その主たる標的は、mRNA の 3' UTR 領域内にあることが判明した (図 5)。

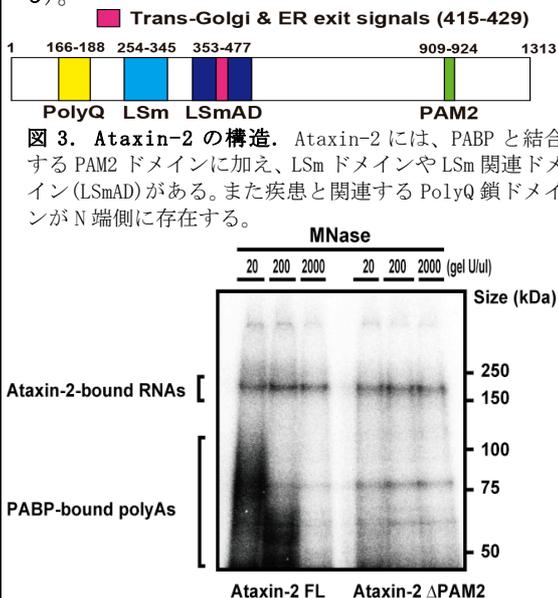


図 3. Ataxin-2 の構造. Ataxin-2 には、PABP と結合する PAM2 ドメインに加え、LSm ドメインや LSm 関連ドメイン (LSmAD) がある。また疾患と関連する PolyQ 鎖ドメインが N 端側に存在する。

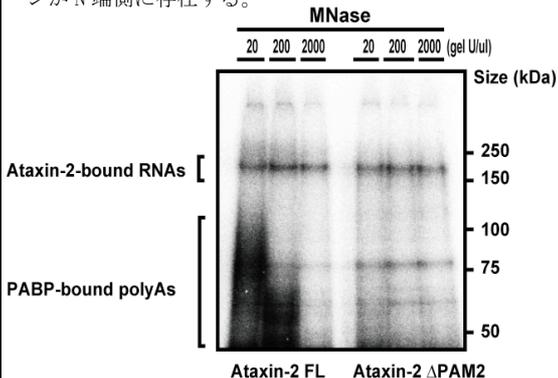


図 4. Ataxin-2 は RNA に直接結合している。Ataxin-2 に PAR-CLIP 法を実施したところ、何らかの RNA が結合していた。PABP と結合できない PAM2 欠損変異体でも同様の解析を行ったが、この Ataxin-2 に結合した RNA は失われなかったことから、直接結合していることが確かめられた。

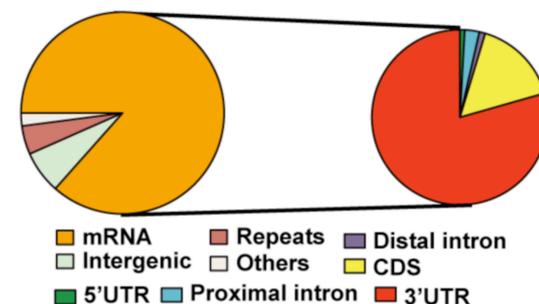


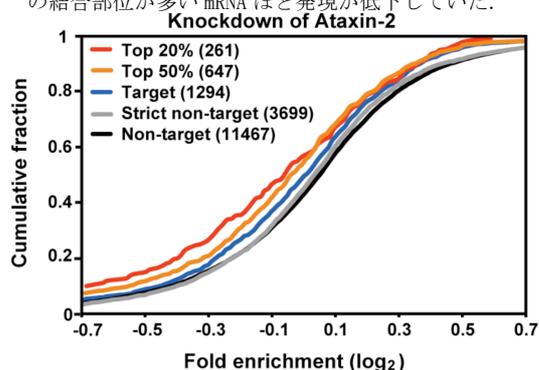
図 5. Ataxin-2 は mRNA の 3' UTR を標的とする。

(3) Ataxin-2 は U-rich 領域を認識して結合する: 次に、Ataxin-2 が特定のモチーフを認識して結合しているのかどうかを解析した。PAR-CLIP 法では、タンパク質の結合部位に T-to-C 置換が挿入されるため、この情報をもとに解析した。その結果、Ataxin-2 はウリジン (U) に富んだ配列 (U-rich element) を認識していることが分かった。その中には mRNA の安定性を制御し、AUUUA を基本骨格とする AU-rich element (ARE) も含まれていた。In vitro 系で結合アッセイを行ったところ、Ataxin-2 が、ARE を含む RNA を特異的に認識すること、結合には LSm ドメインが必要であることを確認した。

(4) Ataxin-2 は標的 mRNA の安定性を促進する: Ataxin-2 が ARE に結合することから、RNA の安定性を制御している可能性が示唆され、またレポーターアッセイの結果もこれを

支持していたため、Ataxin-2 の発現をノックダウンまたは過剰にした後、全遺伝子の発現変化をマイクロアレイを用いて解析した。その結果、Ataxin-2 を抑制すると、標的 RNA の発現量は減少し (図 6)、過剰にすると増加した。Ataxin-2 の結合部位が多いものほど、Ataxin-2 の発現量変化の影響を強く受けた。また、Ataxin-2 をノックダウンすると、標的 mRNA の半減期が減少し、これに伴ってタンパク質の発現量も減少することが確認された。これらの結果から、Ataxin-2 は、標的 mRNA の安定性を促進する機能をもつことが明らか

図 6. Ataxin-2 は標的 mRNA を安定化する。Ataxin-2 をノックダウンした後、全遺伝子の発現変動をマイクロアレイで解析した。その結果、Ataxin-2 の結合部位が多い mRNA ほど発現が低下していた。



かになった。更にレポーターアッセイにより、Ataxin-2 による mRNA 安定性促進には、Ataxin-2 が直接 3' UTR に結合することが必要不可欠であることが確認された。

(5) Ataxin-2 の機能は PolyQ 鎖長依存的に減弱する：最後に、神経変性疾患で認められる PolyQ 鎖の異常伸長が、Ataxin-2 による mRNA 安定性促進に及ぼす影響を解析した。Q31 (ALS 型)、Q35 (SCA2 型)、Q39 (SCA2 型) の伸長した PolyQ 鎖を含む 3 種類の Ataxin-2 発現ベクターを作製した。はじめに、Q31 と Q39 に対して、PAR-CLIP 法を行い、標的 RNA が変動するかどうかを解析した。その結果、80%以上の標的 RNA が野生型と同じであった。一方、レポーターアッセイを行ったところ、PolyQ 鎖が伸長するほど mRNA を安定化させる能力が低下した (図 7)。これは、HEK293 細胞でも神経系 SH-SY5Y 細胞でも同様の結果であった。以上の結果から、PolyQ 鎖の異常伸長は、標的 RNA の認識には余り影響せず、mRNA の安定性を促進する機能を減弱させることが分かった。

以上の成果から、Ataxin-2 が RNA 結合タンパク質として直接 mRNA の 3' UTR にある U-rich element に結合すること、これによって mRNA の安定性が促進されること、疾患関連変異はこの機能を減弱させることを突き止めた。これらの機能は microRNA の機能と拮抗するものであり、RISC との結合は安定性を制御するため互いに情報交換をしているのではない

かと示唆されることから、今後さらに解析を進めたい。また、モデルマウスなどを用いて、mRNA 安定化機能減弱がどのように発症に関与しているか更に解析を進める。

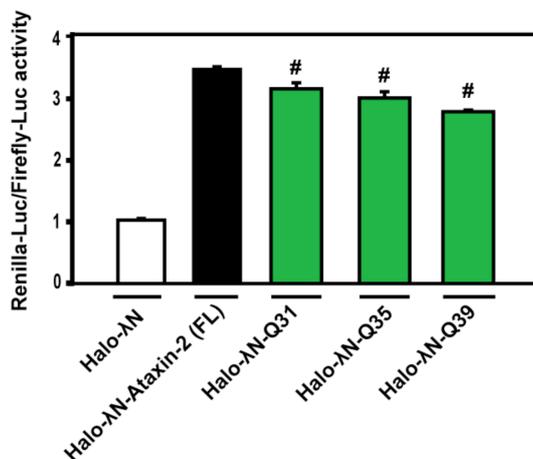


図 7. PolyQ 鎖の異常伸長は、Ataxin-2 の機能を減弱させる。図 2 と同様 tethering assay を行った。その結果、PolyQ 鎖が伸びるほど Ataxin-2 が mRNA を安定化させる機能が減弱し、その結果レポータータンパク質の発現が減少した。

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 15 件)

- ① Li Q, Yokoshi M, Okada H, *Kawahara Y. The cleavage pattern of TDP-43 determines its rate of clearance and cytotoxicity. *Nature Communications*, 6; 6183, 2015. 査読有. doi: 10.1038/ncomms7183.
- ② Li Q, Uemura Y, *Kawahara Y. Cross-Linking and Immunoprecipitation of Nuclear RNA-Binding Proteins. *Methods in Molecular Biology*, 1262; 247-263, 2015. 査読有. doi: 10.1007/978-1-4939-2253-6_15
- ③ Yokoshi M, Li Q, Yamamoto M, Okada H, Suzuki Y, *Kawahara Y. Direct binding of Ataxin-2 to distinct elements in 3' UTRs promotes mRNA stability and protein expression. *Molecular Cell*, 55(2); 186-198, 2014. 査読有. doi: 10.1016/j.molcel.2014.05.022
- ④ *Kawahara Y. Human diseases caused by germline and somatic abnormalities in microRNA and microRNA-related genes. *Congenital Anomalies*, 54(1);12-21, 2014. 査読有. doi: 10.1111/cga.12043
- ⑤ 河原行郎. CLIP 法とその改良法によるタンパク質結合 RNA の高解像度解析. *実験医学(別冊)*, 149-158, 2016. 査読無.

- ⑥ 三宅浩太郎, 中濱泰祐, 河原行郎. 自己免疫疾患と RNA 編集. 実験医学(増刊), 33(20): 3339-3344, 2015. 査読無.
- ⑦ 河原行郎. 神経疾患を microRNA で診断する. Clinical Neuroscience, 33(11): 1302-1304, 2015. 査読無.
- ⑧ 余越萌, 河原行郎. マイクロ RNA. 生体の科学, 66(5): 478-479, 2015. 査読無.
- ⑨ 河原行郎. 神経変性疾患の発症メカニズム Up-to-Date. BIO Clinica, 30(7): 705-708, 2015. 査読無.
- ⑩ 余越萌, 河原行郎. RNA 代謝異常を介した神経変性疾患の発症病態. ファルマシア, 51(1): 37-41, 2015. 査読無.
- ⑪ 余越萌, 河原行郎. 神経変性疾患関連タンパク質 Ataxin-2 は 3' 非翻訳領域にある特定の配列に直接結合することによって, mRNA の安定性を促進しタンパク質発現を増加させる. 新着論文レビュー, e9044, 2014. 査読無.
URL:<http://first.lifesciencedb.jp/archives/9044#more-9044>
- ⑫ 植村有里, 河原行郎. RNA 代謝と神経変性. Brain Medical, 26(3): 209-215, 2014. 査読無.
- ⑬ 河原行郎, 塩見美喜子. RNA 疾患研究の展開. Medical Science Digest 臨時増刊号 RNA 疾患 (河原行郎・塩見美喜子編集), 40(7): 324-325, 2014. 査読無.
- ⑭ 河原行郎. ノンコーディング RNA と神経変性疾患. 医学のあゆみ, 247(5): 421-426, 2013. 査読無.
- ⑮ 河原行郎. 筋萎縮性側索硬化症と RNA 結合タンパク質. 領域融合レビュー, 2: e010, 2013. 査読無.
URL:<http://leading.lifesciencedb.jp/2-e010/>

[学会発表] (計 20 件)

- ① Yamamoto, M., Yokoshi, M., Li, Q., Okada, H., Suzuki, Y., Kawahara, Y. Ataxin-2 stabilizes mRNA through the direct binding to the distinct motifs in 3' UTRs. NCI Symposium "RNA Biology 2015", Bethesda, MA, USA, 2015. 3. 11-12.
- ② Kawahara, Y. The physiological and pathological roles of Ataxin-2, a key player in neurodegeneration 1st International Joint Symposium on Developmental Regulation of Gene Expression 上海 中国 2014. 11. 9.
- ③ Yokoshi, M., Li, Q., Yamamoto, M., Okada, H., Suzuki, Y., Kawahara, Y. Ataxin-2 promotes the stability of mRNA through the direct binding to the distinct motifs. The EMBO/EMBL Symposium

"Complex Life of mRNA", Heidelberg, Germany, 2014. 10. 5-8.

- ④ Yokoshi, M., Li, Q., Yamamoto, M., Okada, H., Suzuki, Y., Kawahara, Y. Ataxin-2 promotes the stability of mRNA through the direct binding to the distinct motifs. Joint Australia and Japan RNA Meeting 2014, Sydney, Australia, 2014. 11. 2-5.
- ⑤ 余越 萌、李 全、山本 宗隆、岡田 ひとみ、鈴木 穰、河原 行郎. U-rich RNA 結合タンパク質 Ataxin-2 は mRNA を安定化する. RNA フロンティアミーティング 2015 タカミヤヴィレッジホテル 樹林 山形県 蔵王市 2015. 12. 8-10.
- ⑥ 河原 行郎. 分泌型マイクロ RNA の医療応用への期待と課題. 第 55 回臨床化学学会 大阪大学 大阪府吹田市 2015. 10. 30-11. 1.
- ⑦ 余越 萌、李 全、山本 宗隆、河原 行郎. Ataxin-2 promotes the stability of mRNA through the direct binding to the distinct motifs. 2014 年度包括脳科学研究推進支援ネットワーク冬のシンポジウム 東京医科歯科大学 東京都文京区 2014. 12. 11-13.
- ⑧ 余越 萌、李 全、山本 宗隆、河原 行郎. 複数の神経変性疾患に関与する Ataxin-2 の生理的・病理的役割について. 第 37 回日本分子生物学会年会 パシフィコ横浜 神奈川県横浜市 2014. 11. 25-27
- ⑨ 余越 萌、李 全、山本 宗隆、河原 行郎. 神経変性疾患関連タンパク質 Ataxin-2 による mRNA 安定化機構の解明. 第 16 回日本 RNA 学会年会 ウィンク愛知 愛知県名古屋市 2014. 7. 23-25.
- ⑩ 河原 行郎. Ataxin-2 の生理的機能と polyQ 鎖伸長の病的意義について. 第 16 回日本 RNA 学会年会 ウィンク愛知 愛知県名古屋市 2014. 7. 23-25.
- ⑪ 河原 行郎. 神経変性疾患と RNA 結合タンパク質. 第 4 回ゲノム支援公開シンポジウム 東京国際フォーラム 東京都千代田区 2014. 12. 12.
- ⑫ 河原 行郎. 神経変性疾患に関連する TDP-43 の断片化機構とその生理的意義について. 第 5 回神経科学と構造生物学の融合研究会 大阪大学 大阪府吹田市 2014. 12. 4.
- ⑬ Kawahara, Y. Elucidation of Ataxin-2-mediated regulation of RNA metabolism. 第 37 回日本神経科学大会 パシフィコ横浜 神奈川県横浜市 2014. 9. 11.
- ⑭ Kawahara, Y. RNA binding proteins involved in neurodegeneration. 第 12

回日本プロテオーム学会年会 つくば国際会議場 茨城県つくば市 2014. 6. 18

- ⑮ 河原 行郎 TDP-43 断片化の生理的意義について. 第 55 回日本神経学会学術大会 福岡国際会議場 福岡県福岡市 2014. 3. 24.
- ⑯ Li, Q., Yamamoto, M., Yokoshi, M., Suzuki, Y., Kawahara, Y. Identification of common targets of TDP-43 and FUS by PAR-CLIP. New Frontier of Molecular Neuropathology 2014. 東京大学 東京都文京区 2014. 3. 16-17.
- ⑰ Kawahara, Y. Toward a comprehensive analysis of Ataxin-2 functions for the understanding of a common mechanism underlying neurodegeneration. 第 91 回日本生理学会年会 鹿児島大学 鹿児島県鹿児島市 2014. 3. 16-20.
- ⑱ 山本 宗隆、李 全、鈴木 穰、河原 行郎 PAR-CLIP 法を用いた TDP-43 と FUS に共通するターゲットの同定. 第 15 回日本 RNA 学会年会 ひめぎんホール 愛媛県松山市 2013. 7. 24-26.
- ⑲ Li, Q., Yamamoto, M., Seno, S., Matsuda, H., Suzuki, Y., Kawahara, Y. Comprehensive analysis of the roles of TDP-43 and FUS in RNA processing. New Frontier of Molecular Neuropathology 2014. 第 36 回日本神経科学大会 京都国際会館 京都府京都市 2013. 6. 20-23.
- ⑳ Kawahara, Y. Toward a comprehensive functional analysis of Ataxin-2 for the understanding of a common mechanism underlying neurodegeneration. 第 36 回日本神経科学大会 京都国際会館 京都府京都市 2013. 6. 20-23.

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

○取得状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：

取得年月日：
国内外の別：

[その他]
ホームページ等
<http://www.med.osaka-u.ac.jp/pub/rna/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

河原 行郎 (KAWAHARA YUKIO)
大阪大学・大学院医学系研究科・教授
研究者番号：80542563

(2) 研究分担者

該当者なし

(3) 連携研究者

該当者なし