

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 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：2013～2015

課題番号：25460387

研究課題名(和文) RNAキナーゼNOL9の生体内機能および関連疾患に関する研究

研究課題名(英文) In vivo function of RNA kinase NOL9 and its relevance to a human disease

研究代表者

花田 俊勝 (HANADA, TOSHIKATSU)

大分大学・医学部・教授

研究者番号：10363350

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)：本研究では、新規RNAキナーゼファミリーCLP1およびNOL9の生体内分子機構および疾患との関連性について、遺伝子改変マウスを用いて解析を行った。CLP1キナーゼ活性欠損ノックインマウスは進行性の神経変性疾患を呈することからヒト疾患との関連性を調べたところ、トルコにおいてCLP1遺伝子に突然変異を持ち、マウスモデル同様に遺伝性神経変性疾患を発症する患者を発見した。NOL9に関してもその生体内におけるキナーゼ活性の分子機構を調べるため、本研究でNOL9キナーゼ活性欠損ノックインマウスの樹立を目指し、今回成功に至った。今後、本マウスモデルを用いてRNAキナーゼファミリーの全容を解明したい。

研究成果の概要(英文)：CLP1 and NOL9 are the novel RNA kinase family molecules involved in RNA metabolism. In this project, we investigated the in vivo function and the relevance to a human disease of these molecules using these genetically modified mice. Previously, we have reported that the CLP1 kinase function dead mutant mice were shown to display a progressive neurodegenerative disease. Then, we further surveyed the human genome of patients with neurodegenerative diseases and identified a CLP1 homozygous mutation (R140H) in Turkish five families. Now the CLP1 mutation (R140H) associated neurodegenerative disease is classified as the pontocerebellar hypoplasia type 10. We newly established NOL9 kinase function dead mutant mice in this project. We would like to clarify the whole picture about the role of RNA kinase family molecules in vivo.

研究分野：分子生物学

キーワード：RNA代謝 遺伝子改変動物 神経変性疾患

1. 研究開始当初の背景

新たな細胞機能調節機構の一つとして機能性 small RNA が近年注目されている。機能性 small RNA の代謝機構は様々なストレス環境に応じて高度に調節され、遺伝子発現、蛋白質の生合成調節に関与している。最近の次世代シーケンサーの技術進歩により多くの RNA シークエンスが行われるようになったが、細胞内には transfer RNA (tRNA) 由来の small RNA が多く存在することが明らかになってきた。Hypoxia により誘導される tRF (tRNA-derived RNA fragment) は RNase 活性を持つ Dicer や RNase Z により tRNA から切断されて生じたものであり、癌の増殖や生存に重要な役割を持っていると報告されている (Lukong KE et al. Cell, 2008)。また、tiRNA (tRNA-derived, stress-induced small RNA) は酸化ストレスにより誘導された angiogenin によって切断された tRNA から生じる RNA 断片であるが、これは細胞のタンパク質翻訳を調節して細胞をストレスから防御する役割を担うと考えられている (Yamasaki S et al. JCB 2009)。

(1) 申請者らは、2007 年に哺乳類で初めて RNA キナーゼとして報告された CLP1 (Weitzer S and Martinez J, Nature 2007) に着目し、Cre-loxP システムを用いた CLP1 コンディショナルノックアウトマウスおよび CLP1 キナーゼ活性欠損ノックインマウスを作成して機能解析を進めてきた。CLP1 は tRNA 前駆体スプライシング酵素複合体中で分子間をつなぐアダプターの役割を持ち、そのキナーゼ活性は tRNA 前駆体の成熟化と異常な pre-tRNA 断片の排除に重要であることが判明した。さらに興味深いことに CLP1 キナーゼ活性欠損ノックインマウスは進行性の神経変性疾患を呈し、その原因は異常な pre-tRNA 断片の蓄積による神経細胞へのストレスであることがわかってきた。しかしながら、RNA キナーゼの生体における機能とその機能破綻により生じる RNA 断片の病理学的意義については不明な点が多かった。

(2) RNA キナーゼ活性を有する他分子のデータベース解析から、核小体に局在する分子 Nucleolar protein 9 (NOL9) が見出された (Heindl K and Martinez J, EMBO J. 2010)。本分子は核小体に局在することから ribosomal RNA (rRNA) 代謝に関与するものと考えられている。実際、申請者らが NOL9 遺伝子欠損胎児繊維芽細胞 (MEF) を用いて rRNA 前駆体の成熟化を検討したところ、Hela 細胞における NOL9 の siRNA ノックダウン (Kd) と同様、プロセッシングの遅延とリボソーム大サブユニットを構成する 28S と 5.8S の成熟 rRNA の減少を認めた。しかしながら、その生体内における役割については不明な点が多く残されているため、マウス等の生体モデルを用いた研究が必要となっていた。

2. 研究の目的

本研究では、CLP1 とさらに構造的に類似する分子 NOL9 に着目し、これらの分子が関与する RNA 代謝機構とその機能破綻により生じる病態との関連について遺伝子改変マウスを用いて研究を行なう。CLP1 に関して、CLP1 キナーゼ活性欠損ノックインマウスは進行性の神経変性疾患を発症することが判明したが、ヒトにおいても神経変性疾患との関連性があるのか関連性を調べる。NOL9 に関して、本分子は CLP1 同様 *in vitro* において RNA および DNA の 5' 末端をリン酸化するキナーゼ活性を持つ。また NOL9 はリボソーム合成に関与する Rix1 酵素複合体の一構成要素であり、複合体中でアダプターとしての役割を担う (Castle CD, et al, Mol Biol Cell, 2012)。そのため、NOL9 遺伝子欠損細胞に認める rRNA 成熟障害は NOL9 のキナーゼ活性を反映したものではなく、Rix1 複合体の形成に問題が生じたための結果である可能性がある。このような点から、NOL9 遺伝子のキナーゼ活性部位にアミノ酸置換変異を入れたキナーゼ活性欠損 NOL9 ノックインマウスは生体内におけるキナーゼとしての役割を解析する上で有用なモデルであると思われる。また、本研究において NOL9 と疾患との関連について解析するため、組織特異的 NOL9 ノックアウトマウスを用いた疾患モデルを解析する。まず、造血幹細胞特異的誘導性ノックアウトマウスを用い、NOL9 の造血幹細胞における時空間的機能解析を行なう。また、NOL9 を含む核小体酵素複合体の Rix1 複合体には PELP1 が存在するが、PELP1 はエストロゲンレセプターやプロゲステロンレセプターといった核内レセプターのコアクチベーターとしての機能を持ち、乳癌においてプロトオンコジンとして機能することが報告されている (Rajhans R et al, Cancer res. 2007)。乳腺細胞特異的 NOL9 ノックアウトマウスを用いて、マウス乳癌モデルを作成し、NOL9 の乳癌発症および進展における役割と治療標的としての可能性について検討を行なう。これらの解析により、NOL9 のキナーゼ活性を標的とした創薬の可能性を探る。

3. 研究の方法

(1) ヒト CLP1 突然変異の機能解析

申請者らは、本研究プロジェクトを開始してすぐに CLP1 の突然変異を持ち、ホモ変異体の患者において小頭症を発症する家系が存在するという情報を得た。そこで、本研究においてヒト CLP1 遺伝子に生じた突然変異が本来の分子機構にどのような影響を与えるのか研究を進めた。さらに CLP1 キナーゼ活性欠損ノックインマウスで発症する神経変性疾患との相似性について病理学的解析を行った。

① ヒト CLP1 突然変異 R140H の分子機能解析

CLP1-R140H の RNA キナーゼ活性を調べるため、*in vitro* kinase assay を行った。また、

CLP1はtRNA splicing endonuclease 酵素複合体(TSEN complex)の構成要素であり、そのタンパク質複合体の各分子を架橋して安定化させる機能を担っている。そこで、その分子間結合を調べるため、免疫沈降を行った。さらに、野生型 CLP1 と変異型 CLP1 における pre-tRNA のスプライシング効率の違いを調べるため、in vitro splicing assay を行った。また、ヒト CLP1-R140H 患者から採取した線維芽細胞を用いて、tRNA のノーザンブロットを行った。

②マウス脳の病理組織学的解析

CLP1 (K127A) キナーゼ活性欠損マウスの大脳組織を神経細胞特異的抗体で免疫組織化学染色を行い、形態と神経細胞数について検討を行った。また、MRI により脳の体積を計測し、ヒト CLP1 変異患者に認める小頭症との相似性について検討した。

(2) NOL9 の生体内機能についての解析

Cre-loxP システムを用いた NOL9 コンディショナルノックアウトマウスを用いて、各臓器における NOL9 の生体内分子機構を解析した。NOL9-flox 遺伝子組換えマウスと Mx1-Cre マウスを交配し、造血幹細胞における NOL9 ノックアウトマウスを作成した。また、乳癌モデル作成のため、MMTV-Cre マウスとの交配による乳腺細胞特異的 NOL9 ノックアウトマウスを樹立した。

さらに、NOL9 のキナーゼ活性のみを消失させたノックインマウスを樹立するため、キナーゼ活性部位の 1 アミノ酸のみを置換した変異マウスを ES 細胞の遺伝子組換えによるジーンターゲット法により樹立を試みた。

4. 研究成果

(1) ヒト CLP1 突然変異の機能解析

① in vitro kinase assay により野生型 CLP1、キナーゼ欠失型 CLP1-K127A、ヒト変異 CLP1-R140 H 間におけるキナーゼ活性の差を解析したところ、K127A は以前のデータ通り完全に活性を消失していたが、R140H では活性の低下がみられるものの依然として活性が存在した。R140H はキナーゼ活性に重要な配列部位の変異ではないためと考えられた。

② CLP1-R140 変異による tRNA splicing endonuclease 酵素複合体(TSEN complex)中における分子間結合を免疫沈降法により解析した。野生型 CLP1 では構成分子である TSEN2、TSEN54、TSEN34 の十分な結合が確認され、K127A 変異においても野生型に比べると減弱しているものの結合が確認された。しかしながら、R140H ではほぼ完全に分子間結合が消失していた。これらの結果よりヒト R140H 変異は、CLP1 のキナーゼ活性よりも TSEN complex 内における分子間結合に大きな影響を与えることが判明した。

③ in vitro splicing assay により野生型 CLP1、キナーゼ欠失型 CLP1-K127A、ヒト変異

CLP1-R140 H 間における tRNA のスプライシング効率の差を解析した。K127A、R140H の両変異体においてスプライシング効率は減弱していることを確認した。

③ さらにヒト CLP1-R140H の患者から採取した線維芽細胞を用いて tRNA のノーザンブロットを行ったところ、RNA 断片の蓄積を認めた。これは CLP1 (K127A) キナーゼ活性欠損マウス研究においても認めており、tRNA 断片の細胞内蓄積が神経細胞のアポトーシスを惹起する可能性を提唱したが、ヒト疾患においても同様の病態メカニズムが存在していることが示唆された。

④ CLP1 (K127A) キナーゼ活性欠損マウスの脳を詳細に解析したところ、ヒト CLP1-R140H 患者同様に小頭症を認めた。興味深いことに、胎児期 16.5 日目あたりまでは脳の体積と神経細胞数に異常は認めないが、出生前の 18.5 日では急激に脳体積および神経細胞数の減少を認めた。つまり、胎生後期において病態が急速に進行することがわかった。

(2) NOL9 の生体内機能についての解析

① 造血幹細胞および乳腺細胞における部位特異的 NOL9 ノックアウトマウスを樹立した。当初、rRNA 異常によりダイヤモンド・ブラックファン貧血などの疾患が発症するため、そのような表現型を予想していたが、これまでの解析からむしろ骨髄増殖性疾患を呈することがわかってきた。乳腺特異的 NOL9 マウスの Medroxyprogesterone acetate(MPA) と dimethylbenz[a]anthracene (DMBA) を用いたマウス乳癌モデルにおいても、乳癌の増悪傾向を示した。つまり、NOL9 は癌抑制遺伝子である可能性が新たに示された。現在、その分子メカニズムを明らかにするため解析を進めている。

② NOL9 キナーゼ活性欠損マウスの作製を試みた。NOL9 のキナーゼ活性部位は exon5 に存在するため、exon5 に変異を入れるべく exon4 と exon5 の間に neo 遺伝子および loxP 配列をジーンターゲット法により導入し、キメラマウスを作製した。しかしながら、その後 neo 遺伝子と loxP 配列が挿入されたゲノム部位が NOL9 mRNA のスプライシングに重要な配列を含んでいたと思われ、ノックインではなくノックアウト状態になりホモ接合体の個体が得られないことが判明した。そこで、新たにターゲットベクターを作製し直して neo 遺伝子および loxP 配列を exon3 と exon4 の間に挿入した。最終的に NOL9 キナーゼ活性欠損マウスの作製に成功し、現在 C57BL/6J の遺伝子バックグラウンドへの戻し交配と並行して解析を進めている。

以上より、RNA キナーゼ分子 CLP1 および NOL9 が生体内で重要な役割を担っていること、さらに様々な疾患と関連していることが分かってきた。特に CLP1 はヒトにおいてもその突然変異が神経変性疾患の発症の直接

的な原因であることが明らかとなった。現在では、CLP1-R140H 突然変異による遺伝性神経変性疾患は橋小脳低形成 10 型 (Pontocellebelar hypoplasia type10) として分類されている。一方、NOL9 は本研究において、全く新しい癌関連遺伝子としての可能性が示唆され、今後新たに樹立したキナーゼ活性欠損マウス等を用いた詳細な解析から生体内における機能と疾患との関連について明らかにしていきたい。

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)

1. Tortola L, Nitsch R, Bertrand MJ, Kogler M, Redouane Y, Kozieradzki I, Uribesalgo I, Fennell LM, Daugaard M, Klug H, Wirnsberger G, Wimmer R, Perlot T, Sarao R, Rao S, Hanada T, Takahashi N, Kernbauer E, Demiröz D, Superti-Furga G, Decker T, Pichler A, Ikeda F, Kroemer G, Vandenabeele P, Sorensen PH, Penninger JM. *Cell Reports* 15:1-12 (2016) 査読あり
2. Weitzer S*, Hanada T*, Penninger J.M, Martinez J. CLP1 as a novel player in linking tRNA splicing to neurodegenerative disorders. *Wiley Interdiscip. Rev. RNA* 6:47-63 (2015) 査読あり*equal contribution
3. *Karaca E, *Weitzer S, *Pehlivan D, *Shiraishi H, Gogakos T, Hanada T, (全 44 著者中 6 番目) Identification of a novel human neurological syndrome defined by CLP1 mutations that impair tRNA splicing. *Cell* 157: 914-929(2014) *equally contributed 査読あり
4. 花田俊勝、三木大輔、瀬尾和志. Beige 細胞/Brite 細胞の特徴と意義. 最新肥満症学-基礎・臨床研究の最前線-日本臨床 72:83-87 (2014) 査読なし
5. Hanada T, Weitzer S, Mair B, Bernreuther C, Wainger BJ, Ichida J, Hanada R, Orthofer M, Cronin SJ, (全 24 著者中 1 番目) CLP1 links tRNA metabolism to progressive motor-neuron loss. *Nature (Article)* 495:474-480 (2013) 査読あり

[学会発表] (計 6 件)

1. 花田俊勝. tRNA 代謝異常による神経変性疾患発症の分子機構. 第 89 回日本内

分泌学会学術総会 Late Breaking Great Science1 2016 年 4 月 22 日京都国際会議場 (京都府京都市) (招待講演)

2. 花田俊勝. RNA キナーゼ分子 CLP1 の tRNA 代謝機構と神経変性疾患との関連. 第 6 回酵素学講習会(酵素学ウインタースクール) 2016 年 1 月 18 日徳島大学疾患酵素学研究センター (徳島県徳島市) (招待講演)
3. 花田俊勝. RNA キナーゼ CLP1 の tRNA 代謝機構と疾患との関連. 第 39 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 2015 年 9 月 11 日別府豊泉荘 (大分県別府市) (招待講演)
4. 花田俊勝. RNA キナーゼ分子 CLP1 の tRNA 代謝機構と神経変性疾患との関連. 転写代謝セミナー(文科省新学術領域研究「転写代謝システム」) 2015 年 12 月 15 日筑波大学生命領域学際研究センター (茨城県つくば市) (招待講演)
5. 花田俊勝. 遺伝子改変マウスモデルを用いた Disease biology 新たな神経変性疾患症候群の発見. 挟間薬学セミナー 2014 年 2 月 9 日 大分大学 (大分県由布市) (招待講演)
6. 花田俊勝. RNA キナーゼ分子 CLP1 の tRNA 代謝機構と疾患との関連. 福井大学医学部大学院セミナー 2014 年 11 月 21 日 福井大学 (福井県吉田郡永平寺町) (招待講演)

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

[その他]

ホームページ等

<http://www.med.oita-u.ac.jp/seikal/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

花田 俊勝 (HANADA Toshikatsu)
大分大学・医学部細胞生物学講座・教授
研究者番号：10363350

(2) 研究分担者：なし

(3) 連携研究者：なし

(4) 研究協力者

花田 礼子 (HANADA Reiko)
寺西 仁志 (TERANISHI Hitoshi)

Josef Penninger
Javier Martinez
Stefan Weitzer