

平成 30 年 6 月 18 日現在

機関番号：32409

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2017

課題番号：25860844

研究課題名(和文) ポリアラニン伸長疾患の分子機構の解明

研究課題名(英文) Molecular mechanism of polyalanine expansion disorders

研究代表者

大間 陽子 (OMA, Yoko)

埼玉医科大学・医学部・講師

研究者番号：50507928

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：ポリアラニン伸長疾患の原因タンパク質の多くは、個体の初期発生に関わる転写因子である。それぞれのタンパク質中のポリアラニン領域が伸長すると、その転写因子が関わる発生が正常に進まずに、形態形成異常を呈する。本研究では、それらの転写因子のポリアラニン正常長と伸長型の遺伝子を使用して、哺乳類培養細胞の系で分子生物学・生化学的な解析を行った。また、アフリカツメガエル (*Xenopus laevis*) の初期胚に発現させて発生期における影響を調べた。

研究成果の概要(英文)：Most causative genes of polyalanine expansion disorders encode transcription factors which are expressed at early development. Expanded polyalanine tracts in these proteins may cause the loss of function of the protein or the gain of novel function. In this study, biochemical and molecular biological analyses in cultured cells were performed to reveal the molecular mechanism of these disorders. In addition, each causative protein was expressed in embryo of *Xenopus laevis* to analyze its effect on development.

研究分野：病態生化学

キーワード：ポリアラニン トリプレットリピート トリプレットリピート病 ポリアミノ酸 ポリグルタミン

1. 研究開始当初の背景

タンパク質の中で同じアミノ酸が連続した領域をポリアミノ酸領域という。全部で20種類あるポリアミノ酸のうち、ポリグルタミン領域、ポリアラニン領域の伸長によって引き起こされる疾患が9つずつ報告されている。ポリグルタミン伸長疾患の多くは、それぞれの原因タンパク質のポリグルタミン領域が約40残基以上に伸長した場合に発症する優性遺伝を示す神経変性疾患である。一方、ポリアラニン伸長疾患の多くは、原因タンパク質（形態形成に関わる転写因子）のポリアラニン領域が約20残基以上に伸長した場合に発症する優性遺伝の形態形成異常である。ポリアラニン伸長疾患の発症機構にはまだ不明な点が多く、原因タンパク質のポリアラニン領域の伸長が、機能獲得、機能喪失（ハプロ不全または優性阻害）のいずれかを引き起こすのかという問題さえ、いまだ解明されていない。

ポリアラニン伸長疾患の原因タンパク質の多くは、個体の初期発生に関わる転写因子である。それぞれのタンパク質中のポリアラニン領域が伸長すると、その転写因子に関わる部位の発生が正常に進まずに、形態形成異常を呈する。

表:ポリアラニン伸長疾患

原因タンパク質	疾患名
HOXD13	合多指症
RUNX2	鎖骨頭蓋形成異常症
PABPN1	眼咽頭性筋ジストロフィー
ZIC2	全前脳症
HOXA13	手足性器症候群
FOXL2	瞼裂縮小・下垂・内眼角贅皮2型
SOX3	X染色体連鎖性下垂体機能低下症
ARX	X染色体連鎖性精神遅滞
PHOX2B	先天性中心性低換気症候群

近年、性分化疾患の罹患率の高さが指摘されているが、これらの一部はHOXA13のポリアラニン伸長による手足性器症候群によるものである。その他、筋ジストロフィー、精神遅滞、下垂体機能低下症など、ポリアラニン伸長疾患は単なる形態形成異常にとどまらず、患者の生活の質を著しく低下させるものが多く、分子機構の解明は社会的にも強く望まれている。

各タンパク質のポリアラニン領域の伸長によって、何が起きているのか。これまでに、研究代表者は、様々な長さのポリアラニン領域だけをタグタンパク質に付加して実験を行い、ポリアラニンは、伸長疾患の閾値付近である約23残基を境に劇的にその性質・構造を変化させることを明らかにした(Oma et al, 2007)。そのような疾患閾値付近での劇的な構造変化（異常相互作用、凝集など）は、ポリグルタミン伸長疾患の研究に

においても過去に観察されているが、伸長ポリグルタミンはSDS耐性の強固な凝集を形成するのに対して、伸長ポリアラニンによる凝集はSDS非耐性であることがこの研究から初めて明らかとなった。さらに、上記研究では、疾患閾値以上に伸長したポリアラニンが、正常長のポリアラニンと相互作用する可能性も実験によって示唆された。それによって、伸長ポリアラニンの「優性阻害」機構の可能性が新たに示唆されたが、実際の疾患における分子機構はまだ明らかになっていない。

2. 研究の目的

これまでは、様々な長さのポリアラニン領域だけを用いて研究を行ってきたが、本課題では、実際の疾患の原因タンパク質（ポリアラニン正常長と伸長型）を用いて、伸長型ポリアラニンが、どのように疾患を引き起こしているのかを解明することを目的とする。

3. 研究の方法

(1) 各疾患の原因遺伝子コンストラクトの作製と培養細胞における発現

各疾患の原因遺伝子（ポリアラニン正常長）をcDNAライブラリーからクローニングし、各実験に用いる発現ベクターに挿入した。また、クローニングされた正常長遺伝子と、ポリアラニンをコードする(GCN)_nロングオリゴから、ポリアラニン伸長型コンストラクトを作製した。作製した各疾患の原因遺伝子コンストラクト（ポリアラニン正常長および伸長型）を哺乳類培養細胞にて発現させ、細胞内局在の観察およびウエスタンブロットによる解析を行った。

(2) 相互作用の解析

伸長型ポリアラニンタンパク質同士の相互作用と、伸長ポリアラニンと正常型ポリアラニンタンパク質の間の相互作用を、それぞれに付加しているタグに対する抗体を用いた共免疫沈降法によって調べた。

(3) 転写活性の測定

疾患の原因遺伝子（転写因子）に対する応答配列を持つベクターを用いて、培養細胞の系にてレポーターアッセイを行い、転写活性を測定した。また、ポリアラニン正常長と伸長型を共発現させた時の転写活性の変化も調べた。

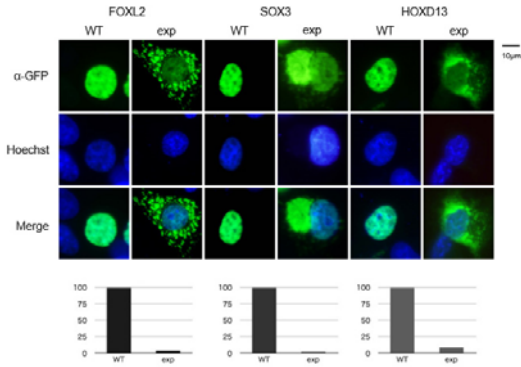
(4) アフリカツメガエル (*Xenopus laevis*) の初期胚を用いた機能解析

ポリアラニン正常型および伸長型の遺伝子コンストラクトから、*in vitro*の系でRNAを合成・精製し、アフリカツメガエルの初期胚に注入し、発生におけるそれぞれの影響を形態観察および各発生時期分子マーカーを指標にした生化学的解析により調べた。

4. 研究成果

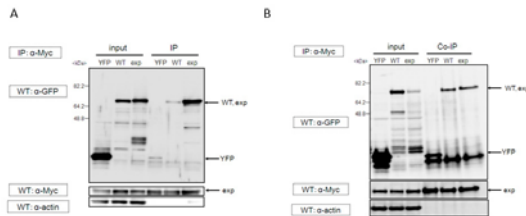
(1) 哺乳類培養細胞の系での発現

各疾患の原因遺伝子コンストラクト（ポリアラニン正常長と伸長型）をそれぞれ哺乳類培養細胞の系で発現させ、細胞内局在を観察したところ、ポリアラニン正常長は核局在を示したのに対し、伸長型は細胞質に凝集体を形成した。この凝集体形成は、ウエスタンブロット解析によっても確認された。



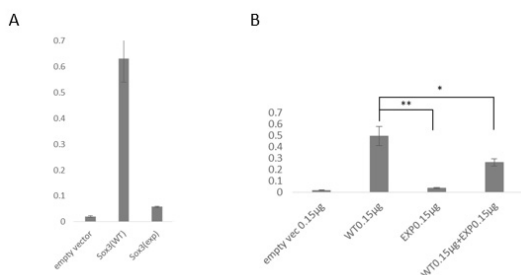
(2) 相互作用の解析

伸長ポリアラニンによる優性阻害機構の可能性を検証するため、伸長ポリアラニンタンパク質同士の相互作用と、伸長ポリアラニンと正常長ポリアラニンタンパク質の間の相互作用を、哺乳類培養細胞の系で共免疫沈降法を用いて調べた結果、いずれの相互作用も示唆された。



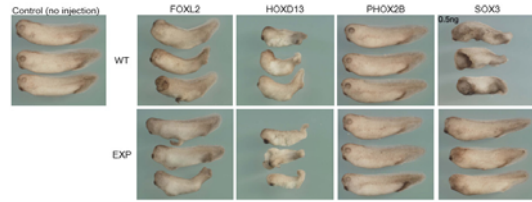
(3) 転写活性の測定

同培養細胞の系においてレポーターアッセイを行い、転写活性を測定した。その結果、ポリアラニンが正常長のものと比較して、伸長型のは、転写活性の著しい低下が見られた。また、ポリアラニン正常長と伸長型と共発現させたものでは、正常長を単独で発現させたものと比較して、有意に転写活性の低下が見られ、伸長ポリアラニンによる優性阻害効果が確認された。



(4) アフリカツメガエル (*Xenopus laevis*) の初期胚を用いた機能解析

アフリカツメガエルの初期胚に、各遺伝子コンストラクト（正常長ポリアラニンおよび伸長ポリアラニン）を注入し過剰発現させ、胚の発生における影響を観察したところ、幾つかの遺伝子を注入した胚において、著しい発生異常が観察された。本実験によって、ヒトのポリアラニン伸長疾患の病態の一端がアフリカツメガエルの系において初めて再現され、疾患の新しい動物モデルが構築された。



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 2 件)

① Kino Y, Washizu C, Kurosawa M, Oma Y, Hattori N, Ishiura S, Nukina N. (2015) Nuclear localization of MBNL1: splicing-mediated autoregulation and repression of repeat-derived aberrant proteins. *Human Molecular Genetics*, 24, 740–756 査読有

② Oana K, Oma Y, Suo S, Takahashi MP, Nishino I, Takeda S, Ishiura S. (2013) Manumycin A corrects aberrant splicing of Cln1 in myotonic dystrophy type1 (DM1) mice. *Scientific Reports*, 3:2142 査読有

[学会発表] (計 2 件)

① 大間 陽子, 高橋 秀治, 渡邊 ゆり, 石浦 章一, 小谷 典弘, 村越 隆之. 野生型および変異型 (ポリアラニン伸長型) Sox3 の神経発生における機能解析. BMB2015, 2015 年 12 月, 神戸

② 中本千里菜, 大間陽子, 三橋弘明, 石浦章一. グルタミン酸・グルタミンリピートの長さがタンパク質の安定性に与える影響. 第 87 回日本生化学会大会, 2014 年 10 月, 京都

6. 研究組織

(1) 研究代表者

大間 陽子 (OMA, Yoko)
埼玉医科大学・医学部・講師
研究者番号：50507928

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし

(4) 研究協力者

- ① 石浦 章一 (ISHIURA, Shoichi)
同志社大学・生命医科学部・教授
研究者番号：10158743
- ② 高橋 秀治 (TAKAHASHI, Shuji)
広島大学・両生類研究センター・特任准
教授
研究者番号：90447318
- ③ 村越 隆之 (MURAKOSHI, Takayuki)
埼玉医科大学・医学部・教授
研究者番号：60190906
- ④ 原本 悦一 (HARAMOTO, Yoshikazu)
産業技術総合研究所・創薬基盤研究部
門・主任研究員
研究者番号：30540869