

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 16 日現在

機関番号：22701

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2015

課題番号：26670445

研究課題名(和文)ポリグルタミン病におけるRNA結合蛋白の解析

研究課題名(英文)Analysis of RNA binding proteins in polyglutamine disease

研究代表者

田中 章景(TANAKA, Fumiaki)

横浜市立大学・医学(系)研究科(研究院)・教授

研究者番号：30378012

交付決定額(研究期間全体):(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文):我々が、凝集体プロテオーム解析により同定したポリグルタミン病核内凝集体構成タンパクの中には、RNA結合タンパクを中心に多くのものが含まれる。そこで、PCBP1、PCBP2、PCBP3、hnRNPU、hnRNP H1、hnRNP H2、hnRNP F、DDX5、DDX17、Matrin 3、SGTAについて、各種ポリグルタミン病剖検脳における染色性を解析した。この結果、Matrin 3とSGTAが核内凝集体に認められた。このうちSGTAにはハンチントン病モデル細胞において凝集体形成を抑制する作用があることを明らかにしつつある。また、質量解析法を用いてSGTA結合タンパクを複数同定した。

研究成果の概要(英文): Using aggregate proteome analysis we identified many component proteins of polyglutamine nuclear aggregates including RNA binding proteins. In this study we analyzed the staining patterns of PCBP1, PCBP2, PCBP3, hnRNPU, hnRNP H1, hnRNP H2, hnRNP F, DDX5, DDX17, Matrin 3, and SGTA in human autopsy brains of various polyglutamine diseases. As a result, Matrin 3 and SGTA were observed in nuclear aggregates. Preliminary result shows that SGTA suppresses aggregate formation in Huntington's disease cell model. Further, we identified SGTA-binding proteins using mass spectrometry.

研究分野：神経内科学

キーワード：ポリグルタミン病 PCBP

1. 研究開始当初の背景

我々はこれまでに、ポリグルタミン核内凝集体の構成成分として FUS/TLS、EWS、TAF15 といった RNA 結合タンパクを同定し、中でも FUS/TLS の凝集体への結合は各種ポリグルタミン病に共通して認められることを明らかにしてきた。これらはその後、ALS/FTLD においても細胞質の凝集体に結合するタンパクであることが報告された。このように、RNA 結合タンパクは各種神経変性疾患の病態形成における重要な共通機能分子と考えられ、特に FUS/TLS は、ALS/FTLD で精力的な研究が進められている。しかし、ポリグルタミン病におけるこれら RNA 結合タンパクについての研究は十分とはいえない。一方、我々は上記以外にもポリグルタミン凝集体を構成する RNA 結合タンパクとして Poly(C)-binding protein 1(PCBP1)を同定している。PCBP1 は FUS/TLS 同様、転写調節や選択的スプライシングに関与するとともに、興味深いことに鉄を細胞質内の鉄貯蔵タンパクであるフェリチンへ輸送する鉄シャペロンでもある。

2. 研究の目的

FUS/TLS の核内凝集体への結合が、ポリグルタミン病に共通して認められることはすでに報告しているが、PCBP1 についても同様か否かをポリグルタミン病剖検組織を用いて明らかにする。そして、我々が開発したハンチントン病培養細胞モデルに凝集体結合タンパクを各々過剰発現、ノックダウンしたもので神経細胞生存の差異を明らかにする。これにより、ポリグルタミン病において神経細胞生存の方向へ導く治療標的分子を同定する。

3. 研究の方法

我々はハンチンチンエクソン1とEGFPの融合タンパクを薬剤誘導性に発現する安定細胞株 HD16Q-NLS、HD60Q-NLS、HD150Q-NLS を樹立している。異常延長したポリグルタミン鎖 (HD60Q-NLS、HD150Q-NLS)をこの細胞に発

現させると、FUS/TLS など既発表のものに加えてPCBP1など未発表のRNA結合タンパクを核内凝集体にトラップしながら細胞死をきたして行く。そこで、これらRNA結合タンパクがポリグルタミン病患者剖検例において実際に核内封入体において認められるのかどうかを検証した。抗ポリグルタミン抗体(1C2, monoclonal)で橋核に核内封入体を確認したポリグルタミン病(SCA1, SCA3, DRPLA)患者剖検脳ホルマリン固定、パラフィン包埋切片(橋)を用いて免疫組織科学的検討を行った。さらに、ポリグルタミン凝集体結合タンパクのうちSGTAについては、HD150Q-NLS発現細胞における凝集体形成に及ぼす影響を検討するとともに、質量解析法によりその結合タンパクの同定を試みた。

4. 研究成果

抗PCBP1抗体(rabbit polyclonal)では、ポリグルタミン病例の核に淡い染色性を認めたが、核内封入体における染色性は認められなかった。また、同じファミリーであるPCBP2、PCBP3についても抗PCBP2抗体(mouse monoclonal)、抗PCBP3抗体(rabbit polyclonal)を用いて染色を行ったが、核内封入体における染色性は認められなかった。そこで、PCBPファミリー以外にもポリグルタミン病培養細胞モデルにおいて、核内封入体にとりこまれることを明らかにしているhnRNP U、hnRNP H1、hnRNP H2、hnRNP F、DDX5、DDX17、Matrin 3、SGTAについて、各種ポリグルタミン病ヒト剖検脳(SCA1、SCA2、SCA3、DRPLA)における染色性を解析し、in vivo においても、これらのタンパクがポリグルタミン病の病態に関わっているかどうかを検討した。この結果、Matrin 3とSGTAが核内凝集体に取り込まれていることが明らかになった。このうちSGTAについての解析を進め、HD150Q-NLS発現細胞における凝集体形成に及ぼす影響などを検討したところ、SGTAには凝集体抑制を示す効果があることが明らかになりつつある。また、Halo-Tag 結合 SGTA 発現ベクターを作成し、

Halo-Tag を標識とした Pull-Down Assay を行い、質量解析法で SGTA 結合タンパクを複数同定した。

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 8 件)

1. Nakamura R, Sone J, Atsuta N, Tohnaï G, Watanabe H, Yokoi D, Nakatochi M, Watanabe H, Ito M, Senda J, Katsuno M, Tanaka F, Li Y, Izumi Y, Morita M, Taniguchi A, Kano O, Oda M, Kuwabara S, Abe K, Aiba I, Okamoto K, Mizoguchi K, Hasegawa K, Aoki M, Hattori N, Tsuji S, Nakashima K, Kaji R, Sobue G; Japanese Consortium for Amyotrophic Lateral Sclerosis Research (JaCALS). Next-generation sequencing of 28 ALS-related genes in a Japanese ALS cohort. *Neurobiol Aging* 39: 219.e1-8, 2016. DOI: 10.1016/j.neurobiolaging.2015.11.030 査読有
2. Takahashi K, Takei K, Tanaka F. Association of multiple sclerosis with lateral olfactory tract usher substance (LOTUS), a possible endogenous inhibitor of axonal degeneration. *Clin Exp Neuroimmunol* 6: 64-69, 2015. DOI: 10.1111/cen3.12272 査読有
3. Kunii M, Doi H, Higashiyama Y, Kugimoto C, Ueda N, Hirata J, Tomita-Katsumoto A, Kashikura-Kojima M, Kubota S, Taniguchi M, Murayama K, Nakashima M, Tsurusaki Y, Miyake N, Saito H, Matsumoto N, Tanaka F. A Japanese case of cerebellar ataxia, spastic paraparesis and deep sensory impairment associated with a novel homozygous *TTC19* mutation. *J Hum Genet* 60: 187-191, 2015. DOI: 10.1038/jhg.2015.7. 査読有
4. Nakamura H, Yamashita N, Kanamaru Y, Tachibana T, Sekino Y, Chen S, Gotoh T, Tanaka F, Goshima Y: Quantitative analysis of intraneuronal transport in human iPS neurons. *J Pharmacol Sci* 128: 170-178, 2015. DOI: 10.1016/j.jphs.2015.06.006. 査読有
5. Doi H, Ushiyama M, Baba T, Tani K, Shiina M, Ogata K, Miyatake S, Fukuda-Yuzawa Y, Tsuji S, Nakashima M, Tsurusaki Y, Miyake N, Saito H, Ikeda S, Tanaka F, Matsumoto N, Yoshida K. Late-onset spastic ataxia phenotype in a patient with a homozygous *DDHD2* mutation. *Sci Rep* 4: 7132, 2014. DOI: 10.1038/srep07132 査読有
6. Koyano S, Yagishita S, Kuroiwa Y, Tanaka F, Uchihara T. Neuropathological Staging of Spinocerebellar Ataxia Type 2 by Semiquantitative 1C2-Positive Neuron Typing Nuclear Translocation of Cytoplasmic 1C2 Underlies Disease Progression of Spinocerebellar Ataxia Type 2. *Brain Pathol* 24: 599-606, 2014. DOI: 10.1111/bpa.12146 査読有
7. Suga N, Katsuno M, Koike H, Banno H, Suzuki K, Hashizume A, Mano T, Iijima M, Kawagashira Y, Hirayama M, Nakamura T, Watanabe H, Tanaka F, Sobue G. Schwann cell involvement in the peripheral neuropathy of spinocerebellar ataxia type 3. *Neuropathol Appl Neurobiol* 40: 628-639, 2014. DOI: 10.1111/nan.12055 査読有
8. 土井 宏, 田中章景. 神経細胞変性のメカニズム「蛋白質凝集と神経変性」 *BRAIN MEDICAL* 26: 73-79, 2014 査読無

[学会発表] (計 9 件)

1. 多田美紀子, 土井 宏, 児矢野繁, 田中章景. 孤発性筋萎縮性側索硬化症における Matrin3 の病理学的検討. 第 56 回日本神経

- 病理学会総会 2015年6月3日-2015年6月5日 九州大学医学部百年講堂(福岡県福岡市東区)
2. 児矢野繁, 多田美紀子, 柳下三郎, 内原俊記, 田中章景. SCA2病変におけるTDP-43細胞内局在. 第56回日本神経病理学会総会 2015年6月3日-2015年6月5日 九州大学医学部百年講堂(福岡県福岡市東区)
 3. 土井 宏, 吉田邦広, 牛山雅夫, 谷佳津子, 松本直通, 田中章景. Late-onset spastic ataxia phenotype related to a novel homozygous DDHD2 mutation. 第56回日本神経学会学術大会 2015年5月20日-2015年5月23日 朱鷺メッセ(新潟県新潟市中央区)
 4. 田中章景. RNA病からみた認知症関連疾患C9orf72遺伝子変異と前頭側頭型認知症. 第33回日本認知症学会学術集会. 2014年11月29日-2014年12月1日 パシフィコ横浜(神奈川県横浜市)
 5. Nakamura R, Sone J, Atsuta N, Watanabe H, Hirakawa A, Watanabe H, Ito M, Senda J, Katsuno K, Tanaka F, Izumi Y, Morita M, Ogaki K, Taniguchi A, Aiba A, Mizoguchi K, Okamoto K, Hasegawa K, Aoki M, Kawata A, Abe K, Oda M, Konagaya M, Imai T, Nakagawa M, Tsuji S, Kaji R, Nakano I, Sobue G. Analysis of major amyotrophic lateral sclerosis genes in Japan. 64th Annual Meeting of the American Society of Human Genetics 2014年10月18日-2014年10月22日 San Diego Convention Center (San Diego, CA, USA)

〔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〕

なし

6. 研究組織

(1)研究代表者

田中 章景(TANAKA, Fumiaki)
横浜市立大学・医学研究科・教授
研究者番号:30378012

(2)研究分担者

土井 宏(DOI, Hiroshi)
横浜市立大学・医学部・講師
研究者番号:10326035

児矢野 繁(KOYANO, Shigeru)
横浜市立大学・医学部・准教授
研究者番号:50315818

多田 美紀子(TADA, Mikiko)
横浜市立大学・附属病院・助教
研究者番号:303722467

(3)連携研究者

なし