

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 15 日現在

機関番号：12602

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2015

課題番号：15K15334

研究課題名(和文) RNA凝集を抑制する人工RNAシャペロン、ペプチドの探索

研究課題名(英文) The protective role of RNA chaperone for RNA misfolding in neurodegeneration

## 研究代表者

石黒 太郎 (ISHIGURO, TARO)

東京医科歯科大学・医歯学総合研究科・助教

研究者番号：20748587

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)：ゲノム内の異常伸長したマイクロサテライトリピートが転写され、細胞内にリピートRNAが凝集蓄積するRNAリピート病は根本的治療法がない神経難病である。本研究では本邦で頻度が高い脊髄小脳失調症31型の病態研究を通して、RNAシャペロンタンパク質が「リピートRNAの凝集を抑制する」ことを発見した。さらにRNAシャペロンの最小機能領域を同定し、治療応用可能な実用化のためのデザインに関する知見を得た。

研究成果の概要(英文)：Microsatellite expansion disorders are pathologically characterized by RNA foci formation. We report that expression of expanded UGGAA (UGGAAexp) repeats, responsible for spinocerebellar ataxia type 31 (SCA31) in *Drosophila*, causes neurodegeneration accompanied with accumulation of UGGAAexp RNA foci, consistent with observations in SCA31 patient brains. We identified the several RNA-binding proteins (RBP), which binds to UGGAAexp and induces structural alteration of UGGAAexp. Furthermore, co-expression of the mutant with RNA-recognition motif mutation failed to rescue UGGAAexp-mediated degeneration. These data suggest that the RBP suppresses UGGAAexp-mediated neurotoxicity in *Drosophila* to function as RNA chaperones for proper UGGAAexp folding and regulation by direct binding to UGGAA repeat RNA.

研究分野：脳神経科学・神経内科学

キーワード：SCA31 RNA foci RNAシャペロン RNAミスフォールディング マイクロサテライトリピート病 RNA結合タンパク質 ショウジョウバエ

### 1. 研究開始当初の背景

近年 non-coding RNA の機能破綻が癌、神経疾患、感染症などの様々な疾患の原因となっていることが相次いで報告されている。脊髄小脳変性症は、小脳を中心とする神経系統の進行性機能障害を来す神経変性疾患の総称で、根本的治療法がない致死的な難病である。これまで我々は本邦で頻度が高い脊髄小脳失調症 31 型の原因が 2 つの遺伝子 *BEAN1* および *TK2* が共有するイントロン領域に 2.5 ~ 3.8kb の 5 塩基繰り返し配列 (TGGAA)<sub>n</sub> が挿入されることであることを明らかにした (Sato et al. American Journal of Human Genetics, 2009)。そして SCA31 の病態には変異 DNA が転写されて (UGGAA)<sub>n</sub> RNA として患者小脳プルキンエ細胞核内で凝集していること及び培養細胞モデルにおいて毒性を有することを明らかにした (Niimi et al. Neuropathology 2013)。そしてこの原因遺伝子同定の後、病態解明や治療戦略への足がかりとして疾患モデル動物の作成を試みている。ショウジョウバエは遺伝学的解析に優れた特徴を有し、ライフサイクルが約 10 日という点からも各種スクリーニングに適しており、神経変性疾患で広く有用性が認められている。我々は (UGGAA)<sub>n</sub> RNA を発現する SCA31 モデルショウジョウバエを樹立し、その表現形解析、RNA 凝集解析などの基礎技術を確立した。

### 2. 研究の目的

本研究の目的は、我が国で頻度が高い常染色体優性遺伝型の脊髄小脳失調症 31 型 (SCA31) について、原因遺伝子に由来する「細胞内異常 RNA/タンパク質凝集による細胞毒性および RNA/タンパク質品質管理機構の破綻」という現象に注目し、治療法開発を念頭に基礎的病態を解明することである。

これまで UGGAA リピートに結合するタンパク質群を培養細胞およびマウス脳を利用し RNA プルダウンアッセイおよび MS 解析にてスクリーニングを行い、およそ 80 強の候補タンパク質を同定した。そのうち UGGAA リピート筋萎縮性側索硬化症 / 前頭側頭型認知症の病態の中核分子でもあるいくつかの RNA 結合タンパク質が RNA シャペロンとして機能し、リピート RNA の凝集を抑制することを見出している。しかしこれらの RNA 結合タンパク質の発現量は厳密に調節されており、過剰になれば細胞毒性をもち、治療安全性に影響を与える可能性がある。本研究ではこれらのシャペロン機能の最小機能領域を同定し、RNA 結合タンパク質の毒性を緩和した治療応用可能な最適化新規 RNA シャペロン開発を目指した。

### 3. 研究の方法

RNA 結合タンパク質を RNA シャペロンとして治療応用を目指す際に、自身のプリオン

ドメインによる凝集性および過剰量による細胞毒性があるため、安全性を配慮する必要がある。そこでモデルショウジョウバエを利用し、以下の点に集約して課題解明を目指した。

(1) UGGAA リピートに対する RNA 結合タンパク質の各種ドメインの欠損変異体や機能喪失変異体を発現するショウジョウバエを樹立し、SCA31 ショウジョウバエと交配した。そしてシャペロン機能の最小機能領域を同定のため表現型の解析及び In situ hybridization により RNA foci を定量した。

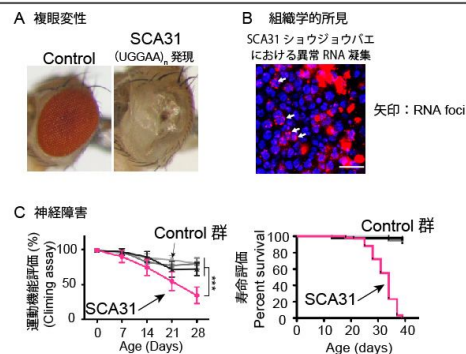
(2) プリオンドメインのアミノ酸配列を改変し、凝集性を緩和した最適化 RNA シャペロンを新規にデザインした。

(3) SCA31 に対する新規 RNA シャペロンを探索同定のため、類似構造を有する RNA 結合タンパク質群から (UGGAA)<sub>n</sub> RNA に対する RNA シャペロン活性を検討した。その検討のため候補タンパク質の過剰発現および RNAi ノックダウンショウジョウバエを利用した。

### 4. 研究成果

(1) RNA シャペロンの最小機能領域の同定  
まず RNA 結合タンパク質の野生型を始めとして各種ドメインの欠損変異体や機能喪失変異体を発現するショウジョウバエを樹立し、遺伝学的解析及び分子機能解析を行った。SCA31 ショウジョウバエは UGGAA リピートを複眼や神経系に発現させるとその組織内に RNA foci の蓄積を認め、著しい複眼変性、神経変性を引き起こすことを見出した。

SCA31 ショウジョウバエの樹立: (UGGAA)<sub>n</sub> リピートは神経変性を引き起こす

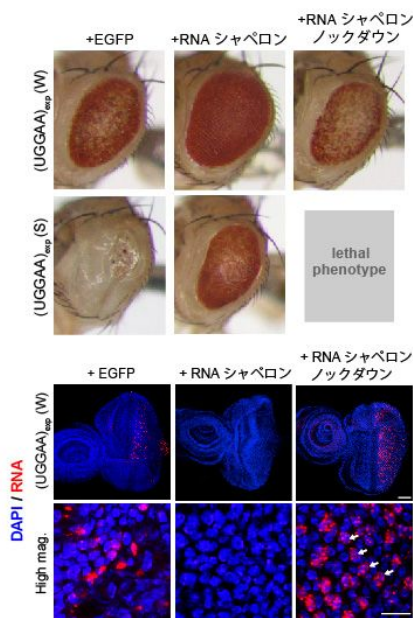


この UGGAA リピート RNA の毒性はその発現量、リピート長、RNA foci の蓄積量に相関関係があることが判明した。

これに対し、RNA シャペロンである RNA 結合タンパク質の野生型を共発現させると劇的に表現型が改善した (複眼変性の改善)。さらにこの各種変異体を用い UGGAA リピ

ートと変異体を共発現させると RNA 認識配列 (RNA recognition motif, RRM) の機能喪失変異体において表現型の改善が認められなかった。またこの RRM 変異体の共発現では in situ hybridization を施行したところ RNA foci の減少は認めなかった。このことより RRM がシャペロン機能に必須であることが推察された。さらに UGGAA リピートの RNA 発現量を定量 PCR や In situ hybridization により定量を行ったところ、RRM が RNA シャペロン機能に必須であることが裏付ける知見を得た。

RNA シャペロンの共発現により表現型及び RNA foci 蓄積が改善



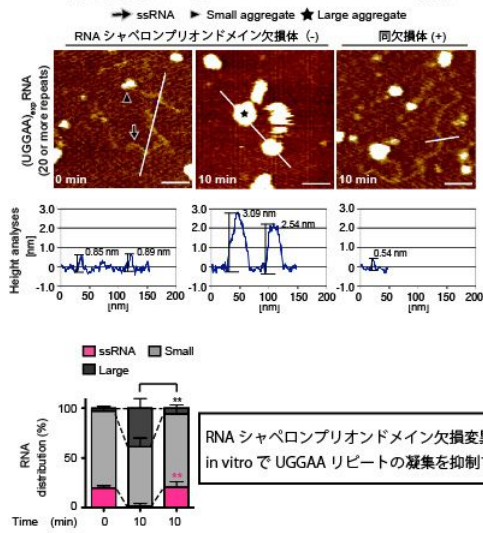
(2) 最適化 RNA シャペロンのデザイン

上記の遺伝学的解析の中、RNA 結合タンパク質の凝集性の高いことが知られているプリオンドメインの欠損変異体も樹立した。この変異体は SCA31 ショウジョウバエをレスキューするとともに、In situ hybridization により RNA foci を著明に減少させるデータが得られ、RNA シャペロンとして機能する知見を得た。

また同様に 2 量体形成に必要な領域欠損体も RNA シャペロンとして機能し、この RNA 結合タンパク質は単量体でシャペロン能を有することが推測された。また in vitro transcription にて合成した UGGAA repeat を RNA シャペロンプリオンドメイン欠損変異体と混合したのち原子間力顕微鏡にて観察した。その結果、この変異体も RNA 凝集に対して抑制的に機能することが判明した。このことよりこれらの 2 領域の欠損変異体は行このタンパク質の凝集性を抑えた最適化 RNA シャペロンとして機能する可能性が示

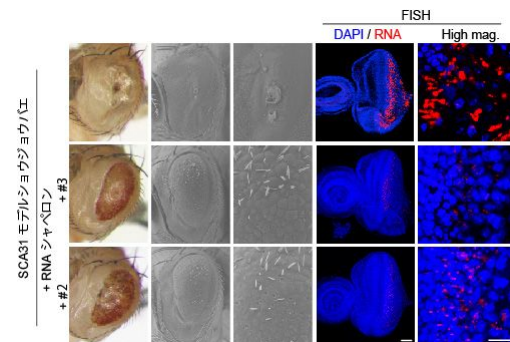
唆された。

原子間力顕微鏡によるリピート RNA の観察



(3) UGGAA リピート RNA に対する新規 RNA シャペロンの探索

これまでスクリーニングした 80 強の UGGAA リピートに結合する候補タンパク質群の中から類似の構造を有する RNA 結合タンパク質をいくつか同定した。これらの RNA 結合タンパク質を発現するショウジョウバエを樹立して RNA シャペロンとしての機能を検討した。その結果これらの RNA 結合タンパク質のうち 2 つは、ショウジョウバエ組織において RNA foci を減少させ表現型を改善させたことから UGGAA リピート RNA に対する新規 RNA シャペロンと判明した。またその他 6 種類の候補タンパク質についてもノックダウンで SCA31 ショウジョウバエの表現形を増悪させその組織において RNA foci を増加させることが判明しており RNA シャペロンとして機能する可能性が推測示唆された。



次にこれらの RNA シャペロン群の相互の補完性についても検討した。ある一種類の RNA シャペロンをノックダウンした上で別の RNA シャペロンを発現させ、UGGAA リ

ピートに対する効果をショウジョウバエにて確認したところ、それぞれ SCA31 ショウジョウバエの表現型は改善した。以上の結果より RNA シャペロン間には相互に補完性があることが示唆された。

#### 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 0 件)

〔学会発表〕(計 3 件)

T. Ishiguro, T Yokota, Y Nagai, K Ishikawa, Regulatory Role of RNA Chaperone TDP-43 for RNA Misfolding and Repeat-Associated Translation In SCA31、第 38 回日本神経科学大会、シンポジウム、2015 年 7 月 28 日、神戸国際会議場(兵庫県神戸市)

石黒太郎、佐藤望、藤掛伸宏、兼上明美、上山盛夫、和田圭司、水澤英洋、永井義隆、石川欽也、横田隆徳、RNA quality control における RNA chaperone の働きについて: SCA31 (UGGAA)<sub>n</sub> リピート発現ショウジョウバエの解析を通して見えてきたこと、第 13 回神経科学研究会、2015 年 10 月 10 日、大日本住友製薬株式会社東京本社、(東京都中央区)

T. Ishiguro, N. Fujikake, N. Sato, M. Ueyama, T. Yokota, H. Mizusawa, K. Wada, Y. Nagai, K. and Ishikawa, The SCA31-linked UGGAA<sub>exp</sub> repeat forms RNA foci and is translated into aggregating pentapeptide-repeat proteins in Human brain and *Drosophila*., 10<sup>th</sup> Brain Research Conference, 2015 年 10 月 15 日, Chicago (アメリカ合衆国イリノイ州シカゴ)

石黒太郎、横田隆徳、永井義隆、石川欽也、神経変性疾患における RNA chaperone の働き: RNA quality control の観点から、(招待講演) 臨床ストレス応答学会 2015、2015 年 11 月 7 日、東京農工大学 140 周年記念会館(東京都小金井市)

〔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

#### 6. 研究組織

(1) 研究代表者

石黒太郎 (ISHIGURO, Taro)  
東京医科歯科大学大学院  
医歯学総合研究科・特任助教  
研究者番号: 20748587

(2) 研究分担者

( )

研究者番号:

(3) 連携研究者

( )

研究者番号: