

平成 30 年 6 月 6 日現在

機関番号：17301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2016～2017

課題番号：16K15709

研究課題名(和文)新規タンパク質相互作用に基づいたFmr1関連早期卵巣機能不全の分子機序の解明

研究課題名(英文)Elucidation of the molecular mechanism of Fmr1-associated premature ovarian failure based on novel protein-protein interactions

研究代表者

山本 一男 (YAMAMOTO, Kazuo)

長崎大学・医歯薬学総合研究科(医学系)・准教授

研究者番号：70255123

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,600,000円

研究成果の概要(和文)：脆弱性X症候群は最も高頻度に精神遅延を発症する遺伝性疾患である。その原因遺伝子として同定されたFmr1において前変異を持つ女性保因者の約20%にFmr1関連早期卵巣機能不全症(POF)や脆弱X関連振戦・失調症候群の一部が見られるが、その原因についてはよく分かっていない。本研究代表者は、独自に同定した細胞サイズ調節遺伝子産物による新規なタンパク質相互作用が本疾患の病因特定につながるとの仮説に基づき研究に着手した。マウスや培養細胞を用いた実験はこの仮説を支持することを確認し、POFに関わると考えられる卵巣特異的なFmr1遺伝子カスケードの同定に挑んだ。

研究成果の概要(英文)：Fragile X syndrome (FXS) is a hereditary disease that causes mental retardation most frequently. Mutations in Fragile X mental retardation 1 (Fmr1) have been identified as the causative agent of FXS. It has been reported that ~20% of female carriers of pre-mutations in Fmr1 developed fragile X-associated premature ovarian failure (POF) or tremor/ataxia syndrome. However, it is not determined how Fmr1 impacts these disorders. Based on novel protein-protein interactions via a cell size-controlling gene product and other original observations, this investigator hypothesized that the targets of Fmr1 were modulated differentially in brain and ovary through the interactions among the proteins. Experiments using mice and cultured cells supported the hypothesis, and thus further investigations carried out to identify an ovary-specific genetic cascade of Fmr1.

研究分野：分子細胞生物学

キーワード：脆弱性X症候群 Fmr1関連早期卵巣不全 細胞サイズ タンパク質相互作用 遺伝子発現 翻訳制御

1. 研究開始当初の背景

脆弱性 X 症候群は、最も高頻度に精神遅延を発症する遺伝性疾患である。その原因遺伝子として同定された *Fmr1* では、5'末端の非翻訳領域（5'UTR）に存在する CGG リピートが、通常では 6 回から 45 回程度であるところが 200 回以上に伸長した変異が認められる。その結果、プロモーター領域のメチル化による転写レベルでの *Fmr1* 遺伝子発現の抑制、および mRNA の高次構造形成による翻訳阻害が起こるため、*Fmr1* がコードするタンパク質 FMRP が減少することが原因とされている。FMRP は塩基配列特異的な RNA 結合タンパク質であり、それが標的とする mRNA は自閉症スペクトラム障害に関連した遺伝子が数多く含まれることが明らかにされている（引用文献①）。また、CGG リピートが 50 回から 200 回程度の前変異を持つ女性保因者の約 20%に、*Fmr1* 関連早期卵巣機能不全症（POF）や脆弱 X 関連振戦・失調症候群（FXTAS）の一部が見られるが、その原因についてはよく分かっていない。

本研究代表者は、細胞がその「大きさ」を一定に保とうとしながら、置かれた環境や刺激に応じて一時的にサイズを変える現象に興味を抱き、独自の遺伝子スクリーニングを実施して多数の細胞サイズ調節候補遺伝子を同定した。そのうちのひとつで、過剰発現により細胞を実際に大きくすることから「Largen」と名付けた遺伝子が、ミトコンドリアの量と質を高めることにより細胞を大きくする活性を持つことを、培養細胞とトランスジェニックマウスを用いた実験により示した（引用文献②）。

これまでの研究により、Largen が新奇なタンパク質相互作用を介して卵巣特異的なシグナル伝達を行っている可能性が示唆されたため、培養細胞やモデルマウスを駆使して神経系と卵巣における *Fmr1* 遺伝子カスケードに対する Largen の役割を明らかにすることにより、未だ多くの謎を持つ *Fmr1* 関連 POF の発症機構を解明する突破口になるのではないかと考えた。

2. 研究の目的

Largen による *Fmr1* 遺伝子カスケードの組織特異的変調の可能性を調べるために、各分子の組織別発現パターンを分析し、培養細胞に対し遺伝子導入・破壊技術等を適用することにより *Fmr1* 遺伝子カスケードの解析を行う。さらにマウスを用いた組織別 *Fmr1* 遺伝子カスケード解析を加えることにより、創薬のための試験研究を目指す。

3. 研究の方法

（1）各分子の組織別発現パターンの分析

本研究代表者が作製した Largen トランスジェニックマウスとその野生型同腹仔の脳と卵巣、及びコントロールとして肝臓や腎臓等を摘出して全 RNA を抽出する。これら一定量を cDNA に変換して、特異プライマーを用いた定量 PCR を行い、Largen や FMRP の mRNA 発現量を比較する。同様に、各組織からタンパク質抽出液を調製し、ウェスタンブロットにより各分子の発現量をタンパク質レベルでも比較する。

（2）遺伝子導入・破壊技術を適用した培養細胞による *Fmr1* 遺伝子カスケード解析

（1）の結果を踏まえ、神経と卵巣で FMRP の標的遺伝子に違いがあるかどうかを解析する。このためにまず細胞を特殊試薬で処理して FMRP に結合した mRNA を架橋する。そこから調製した細胞質抽出液に対して抗 FMRP 抗体による免疫沈降を行うことにより、FMRP と特異的に結合した mRNA を回収する。その後、FMRP をプロテアーゼにより分解し、架橋をほぐすことによりフリーになった mRNA の配列を次世代シーケンサーで決定し、組織特異的な FMRP の標的遺伝子を同定する。

4. 研究成果

（1）各分子の組織別発現パターンの分析

本研究ではまず第一に、対象とする分子の発現が神経と卵巣でどのようになっているかを確認することにした。文献やデータベー

ス上では、Largen と FMRP はいずれも特に組織的な偏りがなく発現していると思われるが、この点について実際に用いる実験系で自らの手で調べ直しておくことが重要である。

まず mRNA レベルでの発現を比較したところ、Largen の発現が脳、肝臓、腎臓などの組織に比べて卵巣で有意に低いことが分かった。一方で FMRP の発現には組織間で顕著な差は見られなかった。同様に、それぞれの組織からタンパク質抽出液を調製し、ウェスタンブロットにより各分子の発現量をタンパク質レベルで比較することを試みた。しかしながら、Largen の抗体の検出感度が低く、結論を下すのに十分な結果が得られなかった。

問題のひとつとして、一頭から得られる卵巣の量がその他の臓器と比較すると圧倒的に少ないため、解析に適したサンプルを調製するのが難しいことが挙げられる。この点を克服するために、培養細胞を用いてタンパク質抽出液を調製することを試みた。この目的のためにマウス卵巣癌由来細胞株 OV2944-HM-1 とマウス神経芽細胞腫由来細胞株 Neuro-2a を入手し、両者から同等な品質のタンパク質抽出液を得ることができた。それぞれを用いてウェスタンブロットによる分析を行った結果、FMRP のタンパク質量には両者で顕著な差は見られないことが分かった。しかしながら、培養細胞由来の高濃度なタンパク質試料を用いても Largen を検出することは叶わなかった。Largen の発現量は元々どの組織・細胞でも低いことは判明していたが、さらに研究を進展させるためには感度の高い抗体を入手することが急務であることがあらためて認識された。

(2) 遺伝子導入・破壊技術を適用した培養細胞による *Fmr1* 遺伝子カスケード解析

(1) の実験結果から、少なくとも mRNA レベルでは Largen と FMRP の量比が脳と

卵巣で異なることが示唆された。興味深いことに、両者と結合できる翻訳制御タンパク質の量にも偏りがあることが判明した。従って、これら因子の作用量が異なることにより、脳と卵巣では FMRP が標的とする RNA 分子のスペクトラムが異なる可能性が十分に考えられる。この点を検証するために、培養細胞を用いた免疫沈降実験に進んだ。OV2944-HM-1 と Neuro-2a から調製した細胞質抽出液に対して抗 FMRP 抗体を用いた免疫沈降を行うことにより、まず Largen とそれに結合する翻訳制御タンパク質の回収量を比較した。同じ細胞質抽出液を用いてレシプロカルな実験も試みた。その結果は (1) で確認された発現量の差を支持するものであった。そこで、特殊試薬で処理してタンパク質と核酸をあらかじめ架橋した細胞から細胞質抽出液を調製し、抗 FMRP 抗体を用いた免疫沈降を行うことにより、FMRP と共沈してくる mRNA 分子群を精製する実験に進んだ。集めた mRNA をライブラリー化した後、次世代シーケンサーによって塩基配列を解釈すれば、実際に脳と卵巣で FMRP の制御を受けている遺伝子の違いを明らかにすることができる。

本研究では、残念ながら研究期間内に遺伝子の同定まで辿り着くことができなかった。原因としては、研究を始める契機となった仮説の検証にあたる (1) の研究が、試薬の問題等で思うようにはかどらなかったことが挙げられる。またその原因の究明と克服に予算を割かざるを得なくなり、ランニングコストの高い次世代シーケンサーの実験を行う余裕がなくなったという問題もある。研究計画自体は、このような事態に対しても十分に吟味されたものであったが、予算の削減もあったため抗体の作製やシーケンシング実験に踏み込めなかったというのも事実である。しかしながら本研究の大きな目標のひとつであった Largen と FMRP の組織特異的な発現量の相違とい

う点については検証することができた。この結果を踏まえ、次の目標である FMRP 標的遺伝子群の組織特異性を明らかにし、さらに最終的な目標である *Fmr1* 関連早期卵巣機能不全症の病因究明へと勇気を持って進んでいきたいと考えている。

<引用文献>

- ① Manuel Ascanp *et al.*, FMRP targets distinct mRNA sequence elements to regulate protein expression, *Nature*, 492 巻、2012、382-386
- ② Kazuo Yamamoto *et al.*, Largin: A molecular regulator of mammalian cell size control, *Molecular Cell*, 53 巻、2014、904-915

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 4 件)

- ① Masataka Umeda, Tomohiro Koga, Kunihiro Ichinose, Takashi Igawa, Tomohito Sato, Ayuko Takatani, Toshimasa Shimizu, Shoichi Fukui, Ayako Nishino, Yoshiro Horai, Yasuko Hirai, Shin-ya Kawashiri, Naoki Iwamoto, Toshiyuki Aramaki, Mami Tamai, Hideki Nakamura, Kazuo Yamamoto, Norio Abiru, Tomoki Origuchi, Yukitaka Ueki, Atsushi Kawakami, CD4⁺ CD52^{lo} T-cell expression contributes to the development of systemic lupus erythematosus, *Clinical Immunology*, 2018, 査読有、Vol. 187、2018、pp. 50-57、<https://doi.org/10.1016/j.clim.2017.10.004>
- ② Ganchimeg Bayarsaikhan, Mana Miyakoda, Kazuo Yamamoto, Daisuke Kimura, Masoud Akbari, Masao Yuda,

Katsuyuki Yui, Activation and exhaustion of antigen-specific CD8⁺ T cells occur in different splenic compartments during infection with *Plasmodium berghei*, *Parasitology International*, 査読有、Vol. 66、No. 3、2017、227-235、<https://doi.org/j.parint.2017.01.022>

- ③ Kazuo Yamamoto, Tak W. Mak, Mechanistic aspects of mammalian cell size control, *Development, Growth & Differentiation*, 査読有、Vol. 59、No. 1、2017、pp. 33-40、<https://doi.org/10.1111/dgd.12334>

- ④ 山本一男、哺乳類の細胞サイズを規定する分子基盤、*実験医学*、査読無、34 巻、2016、217-222

[学会発表] (計 2 件)

- ① 山本一男、細胞サイズを規定するエレメントを探して、2017 年度生命科学系学会合同年次大会、2017
- ② Kazuo Yamamoto, A mechanism of cell size regulation and its readout governed by Largin, *The EMBO Workshop of Cell Size Regulation*, 2016

[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

山本 一男 (YAMAMOTO, Kazuo)
長崎大学・医歯薬学総合研究科 (医学系)・
准教授
研究者番号：70255123

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし

(4) 研究協力者

なし