

平成 21 年 5 月 29 日現在

研究種目： 若手研究(B)
 研究期間： 2007 ～2008
 課題番号： 19790620
 研究課題名（和文） リpeat伸長疾患における異常なRNAの発現とその細胞毒性
 研究課題名（英文） The expression and effects of aberrant RNAs in repeat expansion disorders
 研究代表者
 紀 嘉浩(KINO YOSHIHIRO)
 独立行政法人理化学研究所・構造神経病理研究チーム・研究員
 研究者番号：80415140

研究成果の概要： ハンチントン病(HD)などの CAG リpeat伸長疾患では、伸長した異常タンパク質が毒性をもたらす。一方、伸長した非コード領域のリpeat RNA が毒性をもたらす例もある。これらの発症機構を考える上で、Huntington's disease-like 2(HDL2)は興味深い。HDL2 は非コード領域にもコード領域にもなる CTG リpeat伸長を原因として HD 様の症状を示す神経変性疾患である。本研究では、HDL2 原因遺伝子の JPH3 の解析を行い、その遺伝子産物の特性や制御因子を明らかにした。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	1,700,000	0	1,700,000
2008 年度	1,600,000	480,000	2,080,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	480,000	3,780,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・神経内科学

キーワード：リpeat伸長疾患、RNA 代謝、ハンチントン病、CTG リpeat

1. 研究開始当初の背景

1990 年代以降、反復配列の伸長を原因とする疾患が相次いで発見されている。ハンチントン病などの翻訳領域の CAG リpeat伸長による疾患では、変異型タンパク質のポリグルタミンが細胞障害を引き起こすと考えられている。一方、翻訳領域以外のリpeat伸長が優性の疾患を引き起こす例も知られており、筋強直性ジストロフィー1型・2型、脊髄小脳失調症 8 型・10 型・12 型などが知られている。

筋強直性ジストロフィーの遺伝子変異は、

CTG または CCTG リpeatの伸長である。これらの CTG・CCTG リpeatは翻訳領域には無いが、CUG・CCUG リpeatとして RNA に転写される。この疾患では、伸長した RNA リpeatが悪影響をもたらすという新たな疾患発症の概念 (RNA 機能獲得仮説) が提唱されている。現在有力な発症機構のモデルは、CUG・CCUG リpeatと特異的に結合する RNA 結合タンパク質 MBNL1 が過剰にトラップされ、このタンパク質の機能喪失を招くというものである。私はこれまでに、MBNL1 が CUG および CCUG リpeat RNA の両者と直接的に結合することを示

した。さらに、別のグループにより、MBNL1 ノックアウトマウスが筋強直性ジストロフィーの特徴的な症状のいくつかを再現することが示された (Kanadia *et al.* 2003 *Science* 302)。これらの結果は、RNA 機能獲得仮説を支持するものである。

RNA 機能獲得仮説を検討すべき疾患は他にも存在する。私は、ハンチントン病様 2 (Huntington disease-like 2: HDL2) という疾患に注目した。この疾患は JPH3(junctophilin-3)遺伝子 exon 2A に存在する CTG リピートの伸長によって引き起こされる (Holmes *et al.* 2001 *Nat. Genet.* 21)。興味深いことに、この CTG リピートは、exon 2A の選択的スプライシングによって読み枠が変化し、伸長したポリアラニンまたはポリロイシンをコードするか、終止コドンの挿入により 3'非翻訳領域の CUG リピート RNA となる。ただし、いずれの読み枠でも、CUG リピートは RNA として転写産物に含まれる。一方、疾患名が示す通り、HDL2 はハンチントン病と極めて類似した症状を示す神経変性疾患である。現時点で、JPH3 のどの遺伝子産物が神経変性に関わるかは不明である。

この疾患の発症は、RNA 機能獲得仮説で説明できるだろうか？それとも、さらに新たな発症機構を提示する可能性はないだろうか？

2. 研究の目的

HDL2 に関しては、原因遺伝子が同定されて以降、発症機構に関する報告は世界的にもほとんど存在しない。しかし、HDL2 の発症機構は極めて重要な論点を孕んでいると思われる。第一に、筋強直性ジストロフィーで見られるように、リピート RNA の毒性が発症に寄与するかという点。第二に、この RNA リピートがコードするポリアミノ酸(ポリアラニン・ポリロイシン)の毒性に関わるのかという点。第三に、ハンチントン病との共通点は何かという点である。HDL2 は、複数のカテゴリーのリピート伸長疾患と重なりつつ、しかし異なる、という特異な疾患である。従って、HDL2 の理解は、他のリピート伸長疾患の理解にも寄与するだけでなく、以下のように、従来のリピート疾患の枠組みを変化させる可能性がある。

ポリアラニン伸長疾患には眼咽頭型筋ジストロフィーなどが存在するが、ポリロイシン伸長疾患は他に報告がない。HDL2 は、ポリロイシンの毒性に関わる初の神経変性疾患である可能性があるが、本研究はこの点を検証できる。最近の研究から、ポリロイシンが極めて高い毒性を示すことが明らかであり、ポリロイシンが実際に細胞で発現していれば、上の可能性は十分に考えられる。

さらに、異常な RNA とポリアミノ酸の複合的・相乗的な効果による細胞障害を検出できる可能性がある。これが本当であれば、HDL2 が従来の RNA 機能獲得仮説にとどまらない、新規の発症機構を持つことを意味することになる。

3. 研究の方法

(1) 変異型 JPH3 のミニ遺伝子を用いた発現解析

JPH3 遺伝子のゲノム DNA 断片より、各種の長さの CTG リピートを持つ遺伝子断片を作製した。ここからそれぞれの CTG 長において、CTG リピートがポリアラニン、ポリロイシンおよび 3' 非翻訳領域になる 3 つの読み枠の cDNA コンストラクト断片を作製した。これらに緑色蛍光タンパク質 (GFP) を付加する発現コンストラクトを作製し、実験に用いた。発現実験には培養細胞株 Neuro2A を用い、発現したタンパク質の細胞内局在、凝集体形成の有無、細胞毒性の有無を比較検討した。これらの実験から、毒性が高い JPH3 遺伝子産物を明らかにすることを試みた。

(2) 伸長した CTG リピートが自他の選択的スプライシングに及ぼす影響

JPH3 遺伝子の CTG リピートは exon 2A 自体のスプライシングの状況を変化させる可能性がある。この点を検討するために、*in vivo* スプライシングアッセイを用いて、CTG リピートの長さ JPH3 のスプライシングの関係を検討した。

さらに、CTG リピートの伸長が他の遺伝子のスプライシングに与える影響も検討した。筋強直性ジストロフィーにおいては、CTG/CUG リピートの発現がインスリン受容体や塩素チャネルなどのスプライシングを変化させることが知られている。私は、先行研究において、塩素チャネルのミニ遺伝子を作製し、共発現した DMPK 遺伝子の CTG リピート長に依存的なスプライシングの変化を検出している。このミニ遺伝子を用いることによって、変異型 JPH3 遺伝子が同様の効果を持つかを調べた。

(3) CUG リピート結合タンパク質 MBNL1 と JPH3 遺伝子発現への影響

MBNL1 は CUG リピートを特異的に認識する RNA 結合タンパク質であるため、JPH3 遺伝子の mRNA とも結合する可能性が高い。MBNL1 はスプライシングおよび翻訳を制御するタンパク質であり、変異型 JPH3 のスプライシングを制御する可能性がある。これらは変異型 JPH3 の細胞毒性にも影響すると考えられる。そこで、両者を共発現させ、JPH3 の mRNA の量およびスプライシング、そしてタンパク質

量を検討し、MBNL1 の影響を調べた。

(4) JPH3 凝集体構成タンパク質の同定

予備実験より、JPH3 遺伝子の発現が細胞内凝集体の形成をもたらすことを観察している。この凝集体を精製し、構成タンパク質を質量分析によって同定することを試みた。これらは、研究室において既に確立されている方法で行う (Doi *et al.* 2004 FEBS Lett. 571)。

また、ハンチントン病 (HD) は臨床 HDL2 と関わりが深い疾患であるが、HD 原因タンパク質からなる封入体の構成要素が多数知られている。JPH3 の凝集体と共局在するタンパク質として、既知の HD 封入体構成タンパク質があるかどうかを調べた。

4. 研究成果

(1) EGFP の下流に JPH3 遺伝子の exon 1 から exon 2A までのゲノム配列を挿入したミニ遺伝子を作製した。exon 2A には CTG リピートが存在するが、14、50、65、100 リピートのものを作製した。これらを細胞に発現させると、JPH3 の選択的スプライシングによって複数種の JPH3 遺伝子産物が得られた。さらに、EGFP が融合されているので、その細胞内局在をダイレクトに観察することができた。さらに、発現が確認された個々のアイソフォームをそれぞれ EGFP 下流に融合した発現コンストラクトも作製した。興味深いことに、いくつかのアイソフォームにおいて細胞内凝集体が確認された。また、アイソフォームによっては、発現量が著しく低く、タンパク質分解が亢進していると思われるものがあつた。細胞毒性に関しては、JPH3 産物の CTG リピートの読み枠によって異なっていた。このことは、タンパク質としての JPH3 遺伝子産物が細胞毒性をもたらす可能性を示唆している。

(2) JPH3 の CTG リピート長が exon 1-exon 2A 間のスプライシングに影響するかを検討した。その結果、リピート長依存的にスプライシングのパターンが変化することがわかった。すなわち、リピート長によって、各種 JPH3 アイソフォームの量比が変化することが示唆された。また、JPH3 ミニ遺伝子の発現が他の遺伝子のスプライシングを変化させるかを検討したが、これまで試した遺伝子においてはスプライシングのパターンに大きな変化をもたらさなかった。このうちいくつかのものは、CTG480 リピートを持つ筋強直性ジストロフィーの原因遺伝子の発現によってパターンが変化するものがあつたので、CTG リピートの絶対的な長さか、それ以外の遺伝子配列による特異性が重要であることが示唆された。

(3) MBNL1 は CUG リピートを認識する RNA 結合タンパク質であり、JPH3 の exon 2A のスプライシング制御に関与する可能性がある。MBNL1 を各種の CTG リピート長を持つ JPH3 ミニ遺伝子と共発現させたところ、スプライシングのパターンに顕著な変化が確認された。このことから、MBNL1 が JPH3 遺伝子の調節因子の一つである可能性が示された。

(4) 上記の通り、JPH3 アイソフォームのいくつかでは細胞内に凝集状の構造を形成した。神経変性疾患では封入体の有無やその構成要素が疾患の病理的マーカーや発症機構への手掛かりとして重要な役割を果たす。そこで、JPH3 の凝集体の性状の解析を試みた。CAG リピート伸長疾患で見られるポリグルタミン凝集体は各種の界面活性剤に対して強い耐性を示すが、JPH3 の場合、アイソフォームによって凝集体の可溶性性に差があるように見えた。現在のところ、網羅的な凝集体構成要素の同定は終了していないが、少なくとも一つのタンパク質が JPH3 の凝集体と共局在することがわかった。興味深いことに、このタンパク質は変異型ハンチンチンの凝集とも共局在性を示した。

(5) 以上の結果より、HDL2 についてのいくつかの新たな知見が得られた。まず、exon 2A を含む JPH3 遺伝子産物として過去に報告があつたアイソフォームの発現を、本研究ではミニ遺伝子系において再現できた。また、各種アイソフォームの相対的な発現状況を mRNA およびタンパク質のレベルで比較することができた。この結果、アイソフォームによっては、タンパク質での凝集性および毒性が確認され、HD との共通点として興味深い。神経変性疾患における細胞毒性に関しては、疾患ごとの部位選択性が大きな問題として残されている。今後、複数の部位の神経細胞を用いて、各種の JPH3 のアイソフォームの神経毒性を詳細に検討することが重要であると考えられる。

さらに、JPH3 の発現制御因子として MBNL1 が見出されたことは重要である。MBNL1 は HDL2 患者の組織において、RNA 封入体に存在するとして報告されている。この場合、変異型 JPH3 の mRNA (あるいはその前駆体) による MBNL1 への影響が考えられる。本研究では、逆に、MBNL1 が JPH3 を制御する機能を持つことを明らかにした。すなわち、両者は双方が他方に影響し合う関係であると考えられる。さらに、最近、MBNL1 がポリグルタミン病 (脊髄小脳失調症 3 型および HD) のショウジョウバエでのモデルにおいて、疾患修飾因子として機能することが報告されている (Li *et al.* 2008 Nature)。これが哺乳動物でも真実であ

るとすると、MBNL1 は筋強直性ジストロフィーに始まり、HD および HDL2 と関与する可能性がある共通因子として非常に興味深い位置を占めることになる。今後、HDL2 および HD やその他のポリグルタミン病における MBNL1 の役割を明らかにすることが重要であると言える。

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 大西隼、紀嘉浩、森田智子、二井勇人、笹川昇、石浦章一、MBNL1 associates with YB-1 in cytoplasmic stress granules、Journal of Neuroscience Research、86(9)、1994-2002 頁、2008 年、査読有
- ② 森大輔、笹川昇、紀嘉浩、石浦章一、Quantitative analysis of CUG-BP1 binding to RNA repeats、Journal of Biochemistry、143(3)、377-383 頁、2008 年、査読有
- ③ 鳥海和也、大間陽子、紀嘉浩、二井勇人、笹川昇、石浦章一、Expression of polyalanine stretches induces mitochondrial dysfunction、Journal of Neuroscience Research、86(7)、1529-1537 頁、2008 年、査読有
- ④ 大間陽子、紀嘉浩、鳥海和也、笹川昇、石浦章一、Interactions between homopolymeric amino acids (HPAAs)、Protein Science、16(10)、2195-2204 頁、2007 年、査読有
- ⑤ 根津友理子、紀嘉浩、笹川昇、西野一三、石浦章一、Expression of MBNL and CELF mRNA transcripts in muscles with myotonic dystrophy、Neuromuscular Disorders、17(4)、306-312 頁、2007 年、査読有

〔学会発表〕(計 2 件)

- ① 紀嘉浩、Cell-based analysis of splicing regulation by MBNL proteins、Therapeutic Strategies for Myotonic Dystrophy Workshop、2008 年 8 月 15 日、バンフ (カナダ)
- ② 紀嘉浩 (代表者)、Structural determinants for the molecular properties of MBNL proteins、6th International Myotonic Dystrophy Consortium Meeting、2007 年 9 月 14 日、ミラノ (イタリア)

〔図書〕(計 1 件)

- ① 紀嘉浩、貫名信行、羊土社、実験医学 (増刊) 脳神経疾患の分子病態と治療への展開、2007 年、101-108 頁、「神経筋疾患と RNA代謝異常」

6. 研究組織

(1) 研究代表者

紀嘉浩 (KINO YOSHIHIRO)

独立行政法人理化学研究所・構造神経病理研究チーム・研究員

研究者番号：80415140