

令和 4 年 5 月 16 日現在

機関番号：17501

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2021

課題番号：19K17366

研究課題名(和文) 遺伝性神経変性疾患に認めるtRNA由来小RNAの生理的・病理的意義の解明

研究課題名(英文) Physiological and pathological significance of tRNA fragments in hereditary neurodegenerative diseases

研究代表者

井上 真紀 (Inoue, Masanori)

大分大学・医学部・助教

研究者番号：20726913

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は、神経変性疾患である橋小脳低形成10型の患者や動物モデルにおいて細胞内に蓄積しているチロシンtRNA前駆体から由来の5'側のエクソン断片(5' Tyr-tRF)が、がん抑制因子p53の過剰な活性化を介して神経細胞死を惹き起こす際に関与する分子を同定し、その分子機能の解析を行うことを目的とした。解析の結果、5' Tyr-tRFはPyruvate kinase M2 (PKM2)と結合すること、PKM2 mRNAは5' Tyr-tRFによって誘導される神経細胞死を改善することを解明した。その結果、5' Tyr-tRFがPKM2を介して惹起する神経細胞死の分子機構の一部を明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究は、神経変性疾患の病因となり得るチロシンtRNA前駆体から由来の5'側のエクソン断片(5' Tyr-tRF)とPKM2の関連性を明らかにした。5' Tyr-tRFの蓄積は、橋小脳低形成10型の細胞だけでなく、酸化ストレスに応答した野生型細胞でも観察されることが分かっている。そのため、5' Tyr-tRFはアルツハイマー病、筋萎縮性側索硬化症、パーキンソン病などの他の神経変性疾患の病因に関与している可能性があると推測される。5' Tyr-tRFとPKM2は、これらの神経変性疾患の診断や治療のための、標的分子になり得る可能性がある。

研究成果の概要(英文)：We investigated the molecular mechanism of neuronal cell death induced by 5' tRNA fragments derived from tyrosine pre-tRNA (5' Tyr-tRF). From the modified version of the drug affinity responsive target stability (DARTS) approach, we identified pyruvate kinase M2 (PKM2). We injected PKM2 mRNA transcribed in vitro together with 5' Tyr-tRF into one-cell zebrafish embryos. Surprisingly, PKM2 mRNA specifically prevented the abnormal development from 5' Tyr-tRF toxicity. The PKM2 mRNA injection selectively prevented microcephaly and spinal motor neuron loss induced by 5' Tyr-tRF injection. We verified the interaction between the 5' Tyr-tRF and PKM2 by a pull-down assay. 5' Tyr-tRF showed much higher interaction with PKM2. These data suggest that 5' Tyr-tRF interacts directly with PKM2 and may inhibit the PKM2-related signaling pathway.

研究分野：小児科学

キーワード：橋小脳低形成10型 tRNA fragment 神経細胞死 p53 PKM2 ゼブラフィッシュ

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

近年、筋萎縮性側索硬化症やアルツハイマー病などに代表される神経変性疾患において、RNA 結合タンパク質の遺伝子変異が次々と報告されている。神経変性疾患の発症病態に RNA 代謝異常が深く関わっていることは認識されつつあるが、その病態分子機構は未だ不明であり、根本的な治療薬はない。治療法確立のためにも、RNA 代謝異常による神経特異的な変性メカニズムの解明は喫緊の課題である。橋小脳低形成は小児期発症の神経変性疾患の一つであり、RNA 結合タンパク質である CLP1 や TSEN54 などの変異により発症する。進行性の小頭症や退行、橋・小脳の低形成を特徴とする難病である。がん抑制因子 p53 の活性化を介した神経変性がマウスモデルを用いた研究において報告されているが、p53 が活性化する詳細な分子機構はわかっていない (Hanada T et al. Nature, 2013)。一方、CLP1 や TSEN54 は tRNA 代謝に関連しているため、CLP1 遺伝子の異常によって発症する橋小脳低形成 10 型の患者細胞中には tRNA 代謝異常により生じた種々の tRNA 小断片 (tRNA fragment; tRF) の蓄積が報告されている (Karaca C et al. Cell, 2014)。しかしながら、蓄積している tRF が神経変性の病態にどのように影響を及ぼすのかについては不明である。

2. 研究の目的

申請者は「橋小脳低形成では、RNA 代謝異常の結果として細胞内に蓄積している tRF 自体が、p53 を活性化し、神経変性を惹き起こす原因となっているのではないか」と仮説を立て、橋小脳低形成 10 型で蓄積が報告されている tRF のうち、神経細胞死を誘導する機能を持つものがあるのかについて、予備実験を行い検証した。ヒト神経芽細胞株やゼブラフィッシュに tRF を導入して神経細胞死の誘導を経時的に検討した結果、チロシン tRNA の 5'側を由来とする tRF (5' Tyr-tRF) が有意に p53 を活性化し神経細胞死を誘導することを見出した。そこで本研究では、5' Tyr-tRF が直接結合する分子を同定し、その分子機能を解析することを目的とした。

3. 研究の方法

本研究では 5' Tyr-tRF に結合する分子の探索と、その候補分子と 5' Tyr-tRF との結合性、およびその候補分子を導入した動物モデルと神経変性病との関連性について検証した。

(1) 改変 DARTS 法とプロテオーム解析による 5' Tyr-tRF に結合する分子の検索

DARTS (drug affinity responsive target stability) 法を応用し、RNA プロテクションアッセイを行う。DARTS 法とはタンパク質が化合物と結合すると構造が変化し、タンパク質分解酵素による分解能に変化が生じることを利用して、化合物が直接結合するタンパク質を同定する方法である。本方法を用いて、5' Tyr-tRF とヒト神経芽細胞株の溶解液を混合したものを、タンパク質分解酵素であるプロテアーゼで処理し、SDS page で電気泳動する。5' Tyr-tRF が結合する分子はプロテアーゼによる切断部位に差が生じ、電気泳動により通常とは異なるバンドが検出されることが予想される。検出できた特異的バンドをプロテオーム解析し、5' Tyr-tRF に結合するタンパク質の検索を行う。また、さらに定量的な正確性を高めるために、SILAC (Stable Isotope Labeling using Amino Acids in Cell Culture) 法を用いてタンパク質をラベリングする方法も併用する。SILAC 法とはそれぞれ質量の異なる同位体で標識したアミノ酸を含む培地中で培養した細胞の質量分析を行うことで、発現量の変化したタンパク質の同定・定量を網羅的に解析できる手法である。

(2) 候補分子を導入した動物モデルと神経変性病との関連性の検証

同定された候補分子の mRNA を受精後 1 細胞期のゼブラフィッシュ胚盤胞に 5' Tyr-tRF と共に co-injection し、神経変性との関連性を解析する。

(3) ビオチンラベル化 5' Tyr-tRF と候補分子との結合性の検証

5' Tyr-tRF をビオチンラベル化し、プルダウンアッセイを実施する。ビオチンラベル化 5' Tyr-tRF と 3xFLAG タグ融合を付けた候補分子のプラスミドベクターを HEK293T 細胞株に導入し、ストレプトアビジンビーズによる免疫沈降を行い、ウエスタンブロット法により 5' Tyr-tRF と候補分子との結合を確認する。

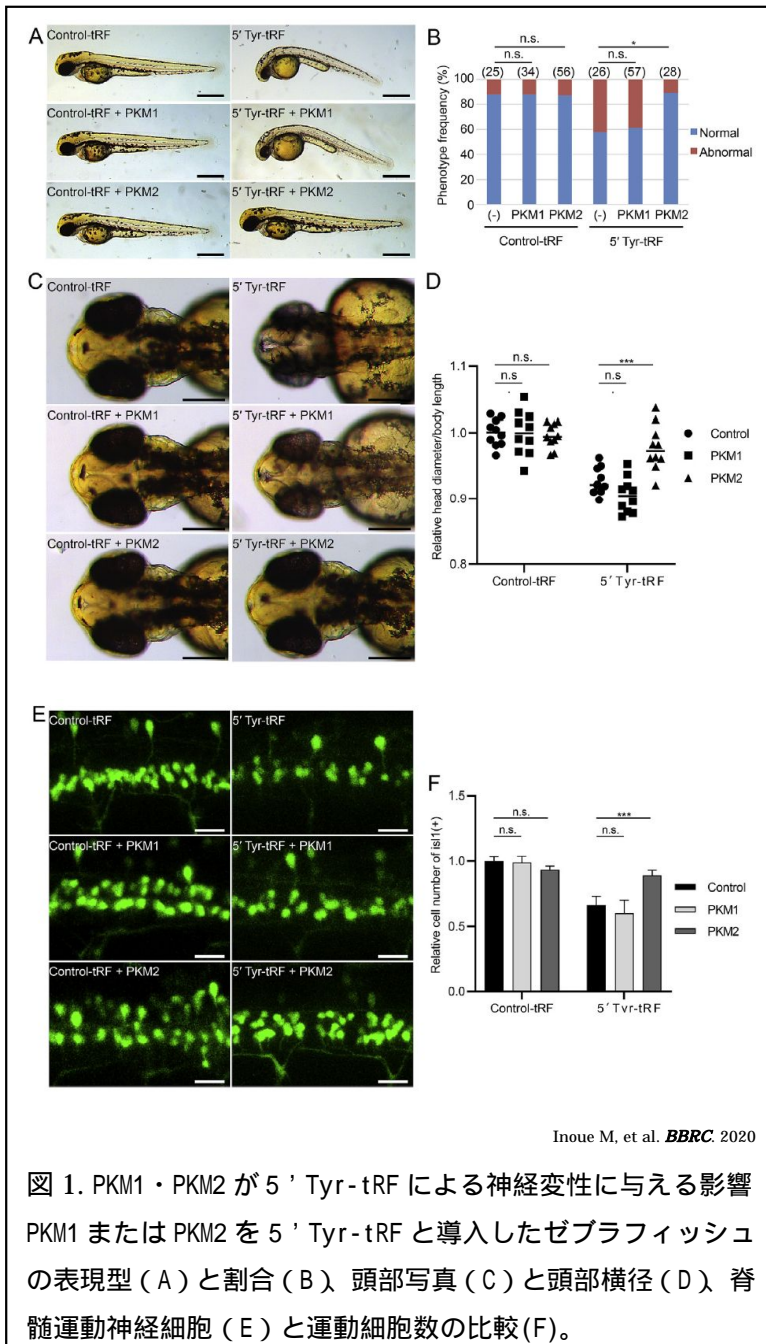
4. 研究成果

(1) 5' Tyr-tRF との結合候補分子

SILAC 標識したヒト神経芽細胞株に 5' Tyr-tRF を導入して DARTS 法を実施し、プロテオーム解析を行った結果、Pyruvate kinase M1 (PKM1) と Pyruvate kinase M2 (PKM2) を同定した。

(2) PKM2 が 5' Tyr-tRF による神経変性を抑制した

PKM1 と PKM2 のどちらが 5' Tyr-tRF による神経変性との関連があるかを調べるため、1 細胞期



Inoue M, et al. *BBRC*. 2020

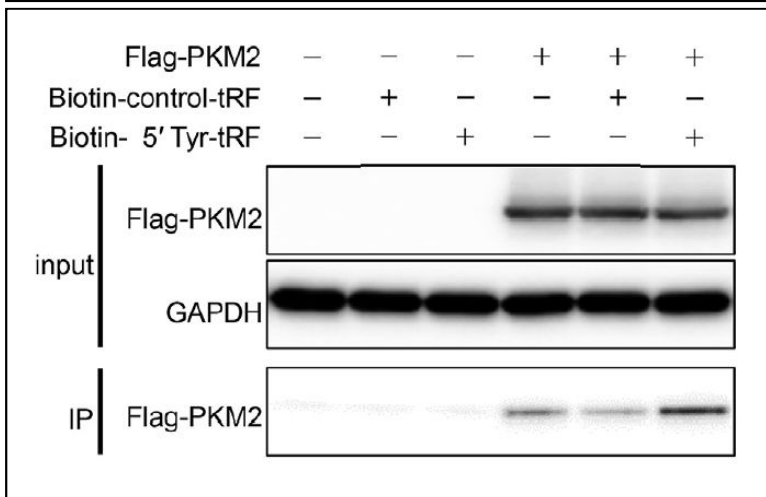
図 1. PKM1・PKM2 が 5' Tyr-tRF による神経変性に与える影響
PKM1 または PKM2 を 5' Tyr-tRF と導入したゼブラフィッシュの表現型 (A) と割合 (B)、頭部写真 (C) と頭部横径 (D)、脊椎運動神経細胞 (E) と運動細胞数の比較 (F)。

のゼブラフィッシュ胚に 5' Tyr-tRF とともにそれぞれの mRNA を co-injection した。5' Tyr-tRF が誘導するゼブラフィッシュの脊椎の弯曲や小頭症は、PKM2 mRNA を導入した個体でのみそれらの表現型が改善した (図 1 A-D)。さらに、運動神経特異的 GFP を Tg (isl1:GFP) ゼブラフィッシュを用いて、脊椎の運動神経細胞を確認したところ、5' Tyr-tRF による運動神経細胞の減少についても PKM2 mRNA の導入により改善した (図 1E,F)。そこで、PKM2 が 5' Tyr-tRF による神経細胞死に参与していると考え、PKM2 と 5' Tyr-tRF との結合性を検証することとした。

(3) ピオチンラベル化 5' Tyr-tRF と候補分子との結合性の検証

ブルダウンアッセイによって 5' Tyr-tRF と PKM2 の間の相互作用を検証しました。ピオチン標識した 5' Tyr-tRF は、コントロール 5' Arg-tRF よりも Flag タグ融合 PKM2 との相互作用がはるかに高いことを示した (図 2)。したがって、5' Tyr-tRF は PKM2 と直接相互作用し、PKM2 関連シグナル伝達経路を阻害する可能性がある。

PKM2 は、解糖系でホスホエノールピルビン酸をピルビン酸に脱リン酸化する酵素である一方、PKM2 は核内に移行して p53 と直接結合し、そのリン酸化を阻害することが報告されている (Xia L et al. *JBC*, 2016)。したがって、5' Tyr-tRF は、PKM2 の阻害を介して p53 のリン酸化を増強する可能性が示唆された。



Inoue M, et al. *BBRC*. 2020

図 2. 5' Tyr-tRF と PKM2 の免疫沈降実験
PKM2 を免疫沈降し、ウエスタンブロット法にて定量した。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Inoue Masanori, Hada Kazumasa, Shiraishi Hiroshi, Yatsuka Hiroyuki, Fujinami Hiroyuki, Morisaki Ikuko, Nishida Yoshihiro, Matsubara Etsuro, Ishitani Tohru, Hanada Reiko, Matsumoto Masaki, Penninger Josef M., Ihara Kenji, Hanada Toshikatsu	4. 巻 525
2. 論文標題 Tyrosine pre-transfer RNA fragments are linked to p53-dependent neuronal cell death via PKM2	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Biochemical and Biophysical Research Communications	6. 最初と最後の頁 726-732
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbrc.2020.02.157	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 井上 真紀, 波田 一誠, 白石 裕士, 石谷 太, 松本 雅記, 井原 健二, 花田 俊勝
2. 発表標題 tRNA代謝異常によるp53依存的神経細胞死の分子機構解明
3. 学会等名 第92回日本生化学会大会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------