

機関番号：32651

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2008～2010

課題番号：20500326

研究課題名（和文） 脊髄性筋萎縮症関連遺伝子の発現の調節

研究課題名（英文） Posttranscriptional regulation of the expression of Spinal Muscular Atrophy associated genes SMN1/2

研究代表者

鹿島 剛 (KASHIMA TSUYOSHI)

東京慈恵会医科大学・医学部・助教

研究者番号：30459622

研究成果の概要（和文）： SMN1 遺伝子の発現が不活化されている脊髄性筋萎縮症 SMA 由来の線維芽細胞に RNA 結合蛋白質 hnRNP A2 に対する RNA 干渉を施すと SMN の産生量が減少する現象を見つけた。この作用機序は、SMN2 遺伝子の翻訳レベルでの調節であることが解析できた。この事は、SMN2 と A2 による分子間相互作用が新たな分子標的として、創薬のターゲットとして今後の研究対象になることを示唆している。

研究成果の概要（英文）： We found that hnRNP A2 specific RNAi treatment decreased the protein level of SMN in Spinal Muscular Atrophy (SMA) derived fibroblast cells. Our analyses indicated that this effect was controlled at translational level. This result was suggested that the molecular interaction between SMN mRNA and hnRNP A2 might be a new molecular target for developing a therapeutic method for SMA.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,100,000円	330,000円	1,430,000円
2009年度	1,100,000円	330,000円	1,430,000円
2010年度	1,100,000円	330,000円	1,430,000円
年度			
年度			
総計	3,300,000円	990,000円	4,290,000円

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：神経科学・神経解剖学・神経病理学

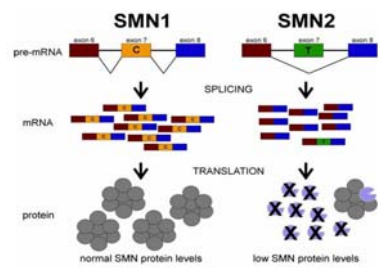
キーワード：RNA 結合蛋白質，RNA 干渉，3' 非翻訳領域，翻訳調節，mRNA の安定化

1. 研究開始当初の背景

脊髄性筋萎縮症（Spinal Muscular Atrophy, SMA）は Survival Motor Neuron 1 (SMN1) 遺伝子の欠損や変異によって起こる常染色体劣性遺伝形式をとる比較的頻度の高い神経変性疾患である。ヒトには SMN1 とほぼ同一コピーである SMN2 遺伝子が同じ染色体に存在するが、SMN2 遺伝子の発現は SMN1 の欠損を補うことはできない。SMN1/2 の両遺伝子間には、幾つかの塩基の違いがあり、殊に第 7 エクソン内の第 6 塩基が SMN1 では C(シトシン)のところを SMN2 では T(チミ

ン)に置き換わっていて、この 1 塩基の違いが第 7 エクソンの mRNA への取り込みに影響を及ぼしている。すなわち、SMN1 遺伝子から転写産物はその殆んどは第 7 エクソンを含むが(90%)、SMN2 からの転写産物の殆んどはエクソン 7 を含んでおらず(80%)、このエクソン 7 を欠いた mRNA からは正常に機能する SMN が産生されない。私は、2000 年以降、この SMN1 と SMN2 に於けるエクソン 7 のスプライシングの違いを研究し、エクソン 7 上の第 6 塩基の違いが SMN2 上に hnRNP A1 依存性のエクソン性スプライシ

ング・サイレンサーを創り、このスプライシング抑制因子である hnRNP A1 をこの部位に誘導し第7エクソンのスプライシングを抑制する



という分子制御のメカニズムを解明した(図1)。この中で hnRNP A1/A2 に対して特異的な RNA 干渉作用を誘導すると第7エクソンのスプライシングが改善することも示した。そこで、我々は hnRNP A1 や A2 に対する特異的な RNA 干渉作用を SMA の治療に応用できないかと考えた。最初の研究計画としては、SMA 患者由来の線維芽細胞に対して A1 及び A2 に対して特異的な RNA 緩衝作用が、エクソン7のスプライシングを促進し、その結果として SMN タンパク質の産生を促進する効果を期待する。その過程で、我々との共同研究のグループは、A1 と A2 に対する特異的な短いヘアピンループの RNA 鎖を転写する SMA 患者由来の線維芽細胞を樹立し、SMN の産生量を測ったところ、A2 の減少が見られるクローンは SMN の産生量が増えるどころか著しく減少が観察された。

SMA の治療法を開発することは、勿論 SMN1 遺伝子を導入し、SMN を特に運動ニューロン内で増量させることがベストだが、世界的に遺伝子治療への安全性が疑問視されている現在はその他の治療法を開発せざる終えない。SMN1 遺伝子のホモでの欠損や変異に起因している SMA では、上記したように SMN2 遺伝子は発現しているがエクソン7のスプライシングの不完全により SMN タンパク質の産生量は正常細胞の 1/6 から 1/8 に減少している。現在考えられている SMA の治療法は、唯一発現している SMN2 遺伝子の転写レベルを上げる、またはエクソン7のスプライシングを促進し SMN の産生量を増やす試みが成されている。

今回の我々の発見は、上記の2通りのプロセス以外での SMN の制御の可能性を示唆しており、この解析を進めることは SMN 産生の制御の上でのユニークなコントロールの解明に結びつき、更には新しい分子標的の同定や治療法の開発に繋がると考えられる。

2. 研究の目的

SMA の SMN1/2 両遺伝子の複雑な相互関係を考慮すると唯一発現している SMN2 遺伝子を利用して SMN の産生量を増加し、SMA の病態の進行を止めることが、この疾患の治療の基本的コンセプトであると考え

られる。

(1)これまでの我々の SMN1/2 のミニ遺伝子を用いた研究結果、すなわち hnRNP A1 および A2 に対する特異的な RNA 干渉作用を誘導し SMN2 に於けるエクソン7のスプライシング反応を促進することは、SMA 患者由来の線維芽細胞にその効果として SMN の増量をもたらすかどうかを検証する。

(2)この研究から派生した現象、hnRNP A2 に対する特異的な RNA 干渉作用により SMN 蛋白質の産生が抑制される現象に於いて、SMA 患者由来の線維芽細胞と短鎖 RNA 二十鎖を使って再現し、その調節機構を分子レベルで解析し、そのメカニズムを解明する。

3. 研究の方法

(1)細胞培養・継代 正常人と SMA 患者由来の線維芽細胞は、スタンダードな細胞培養条件で10-15%のFBSの供給のもとDMEM培養液で継代された。

(2)RNA 干渉処理 線維芽細胞を 3.5×10^4 の密度で6ウェルプレートに撒き、翌日それぞれの短鎖 RNA 二重鎖を 10nM の最終濃度で細胞上にかける。その後6日後に細胞を収穫し、タンパク質の検出や RNA 分析に使う。使用した短鎖 RNA 二重鎖は Dharmacon 社より購入した。

(3)細胞周期の解析 トリプシン処理後、細胞を固定化し、RNA 分解酵素で処理後、プロピジウム・イオジドで DNA を染色した後、フローサイトメトリーを用いて細胞周期の分布を解析する

(4)タンパク質の検出と定量化 細胞をトリプシン処理後、細胞溶解液に溶かす。BCA アッセイでタンパク質濃度を定量したのち、同量の 2×SDS ゲルローディング溶液を混ぜ、98 度で不活化後、10%の SDS-PAGE にサンプルを流し、その後ニトロセルロース膜に移し、BSA でブロッキングした後に、1 次抗体で反応させる。3-4 回 PBS-T で洗った後、2 次抗体で反応させる。3-4 回 PBS 緩衝液で洗った後に、ECL plus による科学発光反応を使ってタンパク質を検出する。使用した 1 次抗体は、抗 SMN 抗体は BD Biosciences 社より、抗 hnRNP A1 と A2 抗体は Sigma 社より、抗 GAPDH 抗体は CST 社より、そして 2 次抗体は Promega 社より購入した。

(5)mRNA の検出と定量化 細胞より RNA を抽出し、その総量を測定する。逆転写酵素を使って cDNA を産生し、様々な遺伝子に特異的なプライマー対を使って TaqDNA ポリメラーゼのもと半定量的 RT-PCR の反応させ、アガロースゲルに流し、EtBr のもと蛍光反応を利用して、mRNA を判定量的に検出する。また一方で、これらの cDNA はリアルタイム PCR の反応によって定量的検出する。

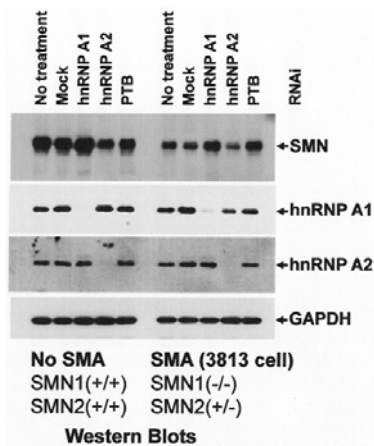
(5)mRNA 安定化の実験 細胞を RNAi 処理後 6

日目にアクチノマイシン D で 6 時間処理し、その後細胞を収穫した後、RNA とタンパク質を抽出する。タンパク質は(4)に記したようにウエスタンブロットで検出する。RNA は(5)に記したように判定量的 RT-PCR アッセイ法で検出する。

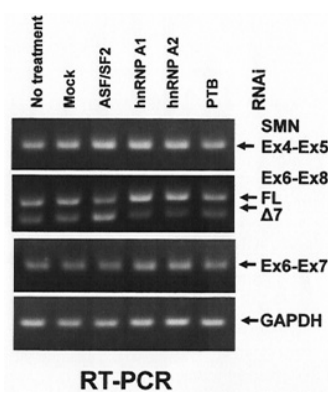
(6) 新生タンパク質合成の検出 細胞を RNAi 処理し、6 日後に AHA(アジドホモアラニン)を含むメチオニンを含まない培養液で 4 時間培養する。トリプシン処理後、細胞を集め、細胞溶解液に溶かす。BCA アッセイ法でタンパク質を定量する。AHA を取り込んだタンパク質に化学反応を利用して、ビオチンを付加した後、精製する。その後、ストレプトアビジン親和性ビーズにて精製し、(4)に記したように SDS-PAGE にて分画した後、ウエスタンブロット法で、SMN や GAPDH を検出する。

4. 研究成果

(1) hnRNP A1 および A2 に特異的な RNA 干渉を誘導した時の SMN 産生への効果 SMA 患者由来の線維芽細胞(3813 cell)を hnRNP A1 または A2 に特異的な RNA 干渉作用を誘導させ 6 日間培養すると、A1 ノックダウンの状態では今までの予想したとおりに SMN は増加した(図 2)。一方、A2 ノックダウンの細胞では、驚いたことに SMN は減少した。その他のスプライシング促進因子である ASF やスプライシング抑制因子である PTB では、A1 や A2 の時のような顕著な SMN の産生量への効果は見られ



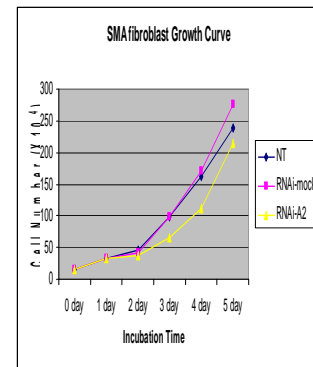
なかった。また同様の処理を正常人からの線維芽細胞に施すと、やはり A1 処理細胞では SMN は増加し、A2 処理細胞では SMN は減少した。SMA 由来の細胞では、SMN は SMN2 遺伝子に由来し、正常人由来の細胞の SMN はその殆んどが SMN1 由来であるため、A2 の減少による SMN の産生量の減少は SMN1/2 に共通する現象であると推測される。この A1 や A2 に対する特異的な RNAi 処理によって、エクソン 7 のスプライシングへの影響を判定量的 RT-PCR やリアルタイム RT-PCR アッセイ法で分析してみた。図 3 に示されたように、これらの RNAi 処理は GAPDH 遺伝子に対すると同様に SMN2 遺伝子の転写活性に影響は及ぼし



ていない。エクソン 4 から 5 の転写産物は、2つの選択的スプライシング産物 (FL と Δ7) にとって共通している。一方で、A1 と A2 に対する RNAi 処理後は、エクソン 7 のスプライシングが促進された結果、エクソン 7 を含む完全な (FL) 転写産物の割合が増えエクソン 7 を含まない Δ7 の産物の割合が減っていることが示された。これらの結果から、A2 に対する RNAi 処理による SMN の産生の減少は、転写レベルでの抑制でもなければ、エクソン 7 のスプライシングの抑制でもない、更に下流領域のプロセスでの制御の結果と考えられる。

(2) A2 ノックダウンによる細胞増殖への影響

hnRNP A2 は細胞内の発現量は非常に多く、その RNA 結合タンパク質としての機能は細胞内では多岐にわたる。hnRNP A1 と A2 はその構造と細胞内分布から多くの機能をシェアしていることが判っているが、両分子間の機能や RNA の標的に対する違いは、未だあまり判っていないことが多い。この実験に於いて、SMN の産生に於ける A1 と A2 の果たす役割は全くの逆である。次に、A2 ノックダウンの効果が線維芽細胞にどのような影響があるかを、まず細胞増殖能を測定してみた。図 4 から

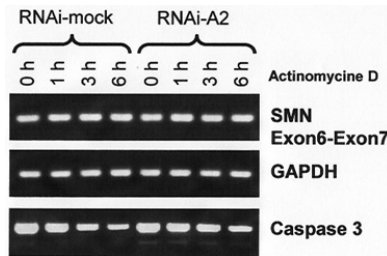


A2 をノックダウンすると何も処理していない細胞やモック処理の細胞に比べて細胞増殖能が約 10%遅くなっていることが示された。フローサイトメトリーを使って細胞周期に於ける細胞分布を解析してみると、A2 に特異的な RNAi 処理後の細胞は細胞分裂への移行速度が遅くなっていることが示された。この事実は、ほかのグループが行った腫瘍細胞に対する hnRNP A2 のノックダウンの効果により細胞の増殖能が遅くなったというデータと一致している。

(3) A2 に特異的な RNAi 処理による SMN mRNA の安定化への影響

RNA 結合タンパク質は、RNA の代謝のあらゆるプロセスに関与して、

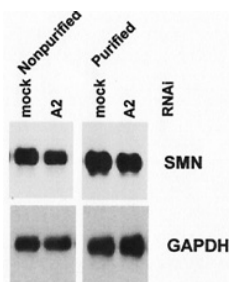
これらの反応を制御していることがわかっている。特に、細胞質に存在する多くの mRNA は RNA 結合タンパク質と相互関係を持つことによりそれらの運命は大きく左右される。ことに mRNA の安定化はタンパク質の生成だけでなく、その細胞の活性おもコントロールしている程、とても重要なプロセスである。そこで、次に A2 に特異的な RNAi 処理は SMN の



mRNA の安定化に大きく影響を及ぼしていないかどうかを検証するために、

アクチノマイシン D で系時的に処理した後、細胞を回収し、SMN の mRNA の安定化を検証した。アクチノマイシン D で 1 時間、3 時間、6 時間と系時的に処理した細胞より RNA を抽出した後、半定量的 RT-PCR アッセイ法で検証すると、SMN の特に正常な SMN タンパク質をコードしているエクソン 7 を含む転写産物 (FL) は全ての時間点において増減が見られなかった。一方、Caspase-3 の転写産物はアクチノマイシン D 処理後は系時的に少しずつ減少することが観察された (図 5)。この結果から、A2 に特異的な RNAi 処理により細胞内の hnRNP A2 は確かに減少し、SMN の産生量も減少しているが、SMN2 の mRNA の安定化には影響を及ぼしていないことが示された。

(4) A2 に特異的な RNAi 処理後の新生たんぱく質の抽出・精製と解析 これまでの結果より A2 ノックダウンによる SMN 産生量の減少は翻訳レベルでの調節を受けている可能性が強まった。そこで、メチオニンのアナログである AHA を RNAi 処理した細胞に 4 時間取り込ませた後に、たんぱく質を抽出し、化学反応を使ってアジド基のビオチンを付加し、その後ビオチン・ストレプトアビジンの親和ビーズを使って新生されたたんぱく質を精製し、ウエスタンブロット法で目的のたんぱく質 (SMN, GAPDH) を検出した。その結果、SMN の減少は新生の翻訳レベルでも保存されていた (図 6)。



これらの結果から、次の結論が導き出された。

① hnRNP A1 に特異的な RNAi 処理は、SMA 由来の線維芽細胞に対してエクソン 7 のスプライシングの促進を促すだけでなく SMN の産生量の増大を誘導する。従って、SMN の産生

量を増やすという目的において hnRNP A1 に特異的な RNA 緩衝作用の誘導は SMA の治療に直接適用できる。

② hnRNP A2 に特異的な RNAi 処理により、SMA の線維芽細胞ではエクソン 7 の転写産物への取り込みは増えるが SMN の産生量は逆に減ることが示された。よって、A2 に特異的な RNA 干渉作用の誘導は直接 SMA の治療には適さない。

③ 一方で、SMN2 遺伝子の調節機構において hnRNP A2 はエクソン 7 のスプライシングの過程で影響を及ぼしているだけでなく、その下流領域の翻訳機構のレベルにおいて SMN の mRNA と直接相互作用して SMN の産生をコントロールしていることが示唆された。このユニークな調節機構は今後新たな分子標的として開発され、今までとは異なる SMA の治療法の開発の基礎となると考えられる。

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 1 件)

① 鹿島 剛、RNA 病としての脊髄性筋萎縮症、細胞工学、Vol. 29、No. 2、pp. 149-153

[学会発表] (計 1 件)

① Kashima T. and H. Yamada, hnRNP A2 Modulates SMN Synthesis at Translation Level. 第 33 回 日本分子生物学会年会, 第 83 回 日本生化学会大会 合同大会, 2010 年 12 月 7 日-10 日, 神戸

6. 研究組織

(1) 研究代表者

鹿島 剛 (KASHIMA TSUYOSHI)

東京慈恵会医科大学・医学部・助教

研究者番号：30459622