

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 26 日現在

機関番号：32202

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2012～2015

課題番号：24390083

研究課題名(和文) 非翻訳領域リピート伸長脊髄小脳失調症のリピート不安定機構とRNA解析

研究課題名(英文) Repeat instability and RNA-mediated disease mechanism of non-coding repeat expansion ataxias

研究代表者

松浦 徹 (Tohru, Matsuura)

自治医科大学・医学部・教授

研究者番号：90402560

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 14,400,000円

研究成果の概要(和文)：脊髄小脳失調症10型(SCA10)の原因遺伝子変異は22q13.3上のATXN10イントロン9に存在するATTCT 5塩基リピートの不安定異常伸長である。RNAレベルで伸長AUUCUリピートがSCA10分子病態に寄与していると考えられており、AUUCU凝集体の核内局在は、傍核小体に認められた。また、伸長AUUCUリピート結合タンパクの検索を行い、4種の核タンパクを同定した。これらのタンパクはいずれもAUUCU凝集体と共局在していた。その中の1つであるPTBP1においては、スプライシング因子としての機能障害を生じていた。更に、SCA10剖検脳組織を用いて、これらの分子病態を確認した。

研究成果の概要(英文)：Spinocerebellar ataxia type 10 (SCA10) is a dominantly inherited neurodegenerative disorder caused by unstable expansion of ATTCT repeats in intron 9 of ATXN10 gene on chromosome 22q13.31. The mechanism by which the ATTCT expansion causes the SCA10 phenotype is still unknown. Here we present data suggesting that expanded AUUCU RNA triggers neuronal dysfunctions. We detected intranuclear AUUCU inclusions in SCA10 cells by RNA-FISH, similar to other non-coding repeat expansion disorders. Furthermore, we characterized their intranuclear localization and nucleic acid contents, demonstrating that the inclusions are located at perinucleolar compartments and enriched for the AUUCU expansion, but not intronic flanking sequences. Several RNA-binding proteins were found to bind AUUCU repeats, including splicing factor PTBP1, which regulates neuronal-specific PTBP2 splicing during neurodevelopment. SCA10 cells showed aberrant splicing of PTBP2 and significantly increased PTBP2 protein levels.

研究分野：遺伝性神経筋疾患の分子病態機構解明

キーワード：脊髄小脳失調症 脊髄小脳失調症10型 非翻訳領域リピート伸長 RNA病態

1. 研究開始当初の背景

研究代表者は、優性遺伝性脊髄小脳症の一つである SCA10 の遺伝子座 (22q13.3) を連鎖解析で明らかにした後 (Matsuura T et al. Ann Neurol 1999)、ただちにその遺伝子変異を同定した (Matsuura T et al. Nat Genet 2000)。その遺伝子変異は、既知のものとは全く異なり、SCA10 遺伝子イントロン 9 に存在する ATTCT 5 塩基リピートの不安定異常伸長であった。また研究代表者は、欧米人にのみ存在すると考えられた筋強直性ジストロフィー 2 型 (DM2) CCTG 伸長変異を Asian population に始めて同定し (Am J Hum Genet 2003; Neurogenetics 2008)、SCA31 遺伝子変異 (TGGAA 伸長変異) 発見にも寄与した (Am J Hum Genet 2009)。本邦中国地方に集積している未同定優性遺伝性脊髄小脳変性症の原因遺伝子変異として nucleolar protein 56 (NOP56) 遺伝子イントロン 1 の GGCCTG 6 塩基リピート伸長変異を多くの共同研究者らと同定した (*Kobayashi H, *Abe K, *Matsuura T, et al (*equal contribution). Am J Hum Genet 2011)。

2. 研究の目的

非翻訳領域リピート伸長変異は、翻訳領域リピート伸長に比べ遥かに大きく、その不安定性も極めて強い。リピート長 (遺伝子型) と表現型との相関も弱く、その病態解明も不十分である。本研究では、研究代表者がその遺伝子変異同定に関わった脊髄小脳失調症 10 型 (spinocerebellar ataxia type 10: SCA10)、SCA31、SCA36、脆弱 X 随伴振戦失調症候群 (Fragile X-associated tremor/ataxia syndrome: FXTAS) のゲノム・RNA 病態解析を行い、リピートインスタビリティー機構とその複雑な RNA 病態機構を理解するとともに、合理的な分子治療戦略を確立することを目的とする。

SCA10 の原因遺伝子変異は 22q13.3 上の *ATXN10* イントロン 9 に存在する ATTCT 5 塩基リピートの不安定異常伸長である (280~4500 リピート)。この非翻訳領域リピート伸長が、何故どのように優性遺伝様式で病気を発症させるのかは十分に解明されていない。同じく非翻訳領域に CTG/CCTG リピート異常伸長をもつ筋強直性ジストロフィー (DM) の RNA 病態が明らかになってきた。すなわち、伸長 CTG リピートが RNA に転写され、CUG 転写物がその結合蛋白と核内凝集体 (foci) を作ることでトリガーとなり、核内 RNA 蛋白制御不全をもたらすというものである。SCA10 においても ATTCT 伸長リピートが RNA レベルで転写され、AUUCU foci を形成することを既に示されている。そこで、本研究の目的は 1) AUUCU foci の核内局在を明らかにすること、2) AUUCU 結合タンパクを同定し、3) その機能不全を解析することで、SCA10 RNA 病態を明らかにすることにある。

3. 研究の方法

1) AUUCU foci 核内局在の解析

SCA10 リンパ芽球を用いて RNA-FISH で核内 AUUCU foci 検出後、その核内局在をより明らかにするために免疫蛍光法 (IF) を組み合わせ、核膜 (抗 Lamin B1 抗体)、核小体 (抗 nucleolin 抗体)、PML 小体 (抗 PML 抗体)、Cajal 小体 (抗 Coilin 抗体)、スベックル (抗 SC35 抗体)、傍核小体 (抗 CUGBP1 抗体) 等との共局在を FISH-IF により共焦点レーザー顕微鏡で観察した。

2) AUUCU 結合タンパク同定

ヒトリンパ芽球と神経芽腫細胞から核抽出物を精製し、AUUCU-pull down 法で質量分析により同定した。更にウエスタン法 (WB) で確認した。

3) SCA10 細胞における AUUCU 結合因子の発現解析

SCA10 リンパ芽球を用いて、2) で同定された AUUCU 結合タンパクと AUUCU 封入体との共局在を FISH-IF で検討した。更にそれらの発現量・スプライシングパターンを WB と RT-PCR でそれぞれ対照と比較検討した。さらに、その機能異常を検討した。

4) SCA10 剖検例での検討

SCA10 剖検例を用いて、AUUCU foci を検出し、2) で同定された AUUCU 結合タンパクの機能不全を実際の患者脳組織（大脳・小脳）を用いて検討した。

4 . 研究成果

1) AUUCU 封入体は傍核小体に局在していた。疾患コントロールとして筋強直性ジストロフィー 1 型・2 型 (DM1、DM2) の CUG、CCUG 封入体等はその局在が異なった。

2) AUUCU 結合タンパクとして MATRN3、PSF、p54nrb、PTBP1 の 4 種を確認した。

3) FISH-IF の結果、SCA10 リンパ芽球において上記の 4 因子は、AUUCU foci と共局在していた。SCA10 リンパ芽球の核抽出物を用いた WB 法では、対照と比較して発現レベルに差を認めなかった。しかしながら、PTBP1 がスプライシング調節している遺伝子のスプライシング異常が生じて、そのタンパクの発現が著明に上昇していた。

4) SCA10 剖検例において、核内 AUUCU foci を認めた。PTBP1 との共局在を確認し、PTBP1 の機能不全による異常スプライシングを、リンパ芽球と同様に確認した。

以上の結果から、SCA10 RNA 病態の一端が明らかにされた。

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 20 件)

1. Matsuura T, Minami N, Arahata H,

Ohno K, Abe K, Hayashi YK, Nishino I. Myotonic dystrophy type 2 (DM2) is rare in the Japanese population. *J Hum Genet* 2012; 57:219-220.

2. Yamashita Y, Matsuura T, Shinmi J, Amakusa Y, Masuda A, Ito M, Kinoshita M, Furuya H, Abe K, Ibi T, Sahashi K, Ohno K. Four parameters increase the sensitivity and specificity of the exon array analysis and disclose twenty-five novel aberrantly spliced exons in myotonic dystrophy. *J Hum Genet* 2012; 57:368-374.

3. Kurosaki T, Ueda S, Ishida T, Abe K, Ohno K, Matsuura T. The unstable CCTG repeat responsible for myotonic dystrophy type 2 originates from an *AluSx* element insertion into an early primate genome. *PLoS ONE* 2012; 7: e38379

4. Masuda A, Andersen HS, Doktor TK, Okamoto T, Ito M, Andresen BS, Ohno K. CUGBP1 and MBNL1 preferentially bind to 3' UTRs and facilitate mRNA decay. *Sci Rep.* 2012;2:209. doi: 10.1038/srep00209. Epub 2012 Jan 4.

5. Ishigaki S, Masuda A, Fujioka Y, Iguchi Y, Katsuno M, Shibata A, Urano F, Sobue G, Ohno K. Position-dependent FUS-RNA interactions regulate alternative splicing events and transcriptions. *Sci Rep.* 2012;2:529. doi: 10.1038/srep00529. Epub 2012 Jul 24.

6. Hernandez-Hernandez O, Guiraud-Dogan C, Sicot G, Huguet A, Luillier S, Steidl E, Saenger S, Marciniak E, Obriot H, Chevarin C,

- Nicole A, Revillod L, Charizanis K, Lee KY, Suzuki Y, Kimura T, Matsuura T, Cisneros B, Swanson MS, Trovero F, Buisson B, Bizot JR, Hamon M, Humez S, Bassez G, Metzger F, Buee L, Munnich A, Sergeant N, Gourdon G, Gomes-Pereira M. Myotonic dystrophy CTG expansion affects synaptic vesicle proteins, neurotransmission and mouse behaviour. *Brain* 2013; 136 (Pt 3):957 - 970.
7. Fujioka Y, Ishigaki S, Masuda A, Iguchi Y, Udagawa T, Watanabe H, Katsuno M, Ohno K, Sobue G. FUS-regulated region- and cell-type-specific transcriptome is associated with cell selectivity in ALS/FTLD. *Sci Rep.* 2013;3:2388. doi: 10.1038/srep02388.
 8. Matsuura T, Kurosaki T, Omote Y, Minami N, Hayashi YK, Nishino I, Abe K. Exome sequencing as a diagnostic tool to identify a causal mutation in genetically highly heterogeneous limb-girdle muscular dystrophy. *J Hum Genet* 2013; 58:564-565
 9. Rahman MA, Masuda A, Ohe K, Ito M, Hutchinson DO, Mayeda A, Engel AG, Ohno K. HnRNP L and hnRNP LL antagonistically modulate PTB-mediated splicing suppression of CHRNA1 pre-mRNA. *Sci Rep.* 2013 Oct 14;3:2931. doi: 10.1038/srep02931
 10. Nakayama T, Nakamura H, Oya Y, Kimura T, Imahuku I, Ohno K, Nishino I, Abe K, Matsuura T. Clinical and genetic analysis of the first known Asian family with myotonic dystrophy type 2. *J Hum Genet* 2014 Mar;59(3):129-33.
 11. Kameda T, Namekawa M, Shimazaki H, Minakata D, Matsuura T, Nakano I. Unique combination of hyperintense vessel sign on initial FLAIR and delayed vasoconstriction on MRA in reversible cerebral vasoconstriction syndrome: case report. *Cephalalgia* 2014 Nov;34(13):1093-6.
 12. Yamashita Y#, Matsuura T# (#equally contributed), Kurosaki T, Amakusa Y, Kinoshita T, Ibi T, Sahashi K, Ohno K. LDB3 splicing abnormalities are specific to skeletal muscles of patients with myotonic dystrophy type 1 and alter its PKC binding affinity. *Neurobiol Dis* 2014; 69:200-205.
 13. Kokunai Y, Nakata T, Furuta M, Sakata S, Kimura H, Aiba T, Yoshinaga M, Osaki Y, Nakamori M, Itoh H, Sato T, Kubota T, Kadota K, Shindo K, Mochizuki H, Shimizu W, Horie M, Okamura Y, Ohno K, Takahashi MP. A Kir3.4 mutation causes Andersen-Tawil syndrome by an inhibitory effect on Kir2.1. *Neurology.* 2014 Mar 25;82(12):1058-64. doi: 10.1212/WNL.0000000000000239. Epub 2014 Feb 26.
 14. Nasrin F, Rahman MA, Masuda A, Ohe K, Takeda J, Ohno K. HnRNP C, YB-1 and hnRNP L coordinately enhance skipping of human MUSK exon 10 to generate a Wnt-insensitive MuSK isoform. *Sci Rep.* 2014 Oct 30;4:6841. doi: 10.1038/srep06841.
 15. Gao R, Liu Y, Silva-Fernandes A, Fang

- X, Paulucci-Holthauzen A, Chatterjee A, Zhang HL, Matsuura T, Choudhary S, Ashizawa T, Koeppe AH, Maciel P, Hazra TK, Sarkar PS. Inactivation of PNKP by Mutant ATXN3 Triggers Apoptosis by Activating the DNA Damage-Response Pathway in SCA3. *PLoS Genet.* 2015 Jan 15;11(1):e1004834.
16. Masuda A, Takeda J, Okuno T, Okamoto T, Ohkawara B, Ito M, Ishigaki S, Sobue G, Ohno K. Position-specific binding of FUS to nascent RNA regulates mRNA length. *Genes Dev.* 2015 May 15;29(10):1045-57. doi: 10.1101/gad.255737.114.
17. Udagawa T, Fujioka Y, Tanaka M, Honda D, Yokoi S, Riku Y, Ibi D, Nagai T, Yamada K, Watanabe H, Katsuno M, Inada T, Ohno K, Sokabe M, Okado H, Ishigaki S, Sobue G. FUS regulates AMPA receptor function and FTL/ALS-associated behaviour via GluA1 mRNA stabilization. *Nat Commun.* 2015 May 13;6:7098. doi: 10.1038/ncomms8098.
18. Funayama M, Ohe K, Amo T, Furuya N, Yamaguchi J, Saiki S, Li Y, Ogaki K, Ando M, Yoshino H, Tomiyama H, Nishioka K, Hasegawa K, Saiki H, Satake W, Mogushi K, Sasaki R, Kokubo Y, Kuzuhara S, Toda T, Mizuno Y, Uchiyama Y, Ohno K, Hattori N. CHCHD2 mutations in autosomal dominant late-onset Parkinson's disease: a genome-wide linkage and sequencing study. *Lancet Neurol.* 2015 Mar;14(3):274-82. doi: 10.1016/S1474-4422(14)70266-2. Epub 2015 Feb 4.
19. Chen G, Masuda A, Konishi H, Ohkawara B, Ito M, Kinoshita M, Kiyama H, Matsuura T, Ohno K. Phenylbutazone induces expression of MBNL1 and suppresses formation of MBNL1-CUG RNA foci in a mouse model of myotonic dystrophy. *Sci Rep.* 2016 Apr 29;6:25317. doi: 10.1038/srep25317.
20. Developmentally-regulated RNA-binding Protein 1 (Drb1)/RNA-binding Motif Protein 45 (RBM45), a Nuclear-cytoplasmic Trafficking Protein, Forms TAR DNA-binding Protein 43 (TDP-43)-mediated Cytoplasmic Aggregates. Mashiko T, Sakashita E, Kasashima K, Tominaga K, Kuroiwa K, Nozaki Y, Matsuura T, Hamamoto T, Endo H. *J Biol Chem.* 2016 May 12. pii: jbc.M115.712232. [Epub ahead of print]
- {学会発表}(計6件)
1. Matsuura T, Kurosaki T, Muramatsu S, Shimazaki K, Ohno K, Abe K. "RNA-mediated disease mechanism of spinocerebellar ataxia type 10" 7th International Conference on Unstable Microsatellites & Human Disease (June 9-14, 2012, Strasbourg, France)
2. Matsuura T. "Parkinsonism in SCAs" 13th International Parkinson's Disease Symposium in Takamatsu (iPDST) (February 21-23, 2014, Takamatsu, Japan)
3. 松浦 徹「よくわかる“遺伝”」第54回日本神経学会学術大会・東京・2013年5月31日・教育講演

4. 松浦 徹 「遺伝性脊髄小脳変性症の臨床的特徴と遺伝子診断」第31回日本神経治療学会総会・東京・2013年11月22日・シンポジウム
5. 松浦 徹 「筋強直性ジストロフィーの分子病態～治療」第6回遺伝カウンセリングアドバンスセミナー（大阪）2015.1.10・教育講演
6. Matsuura T. RNA disease mechanism in DM1 and SCA10 brain. 第38回日本神経科学大会（神戸）2015.7.29・シンポジウム

〔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

<http://www.jichi.ac.jp/medicine/about/departments/clinical/internal/neurology/index.html>

6. 研究組織

(1)研究代表者

松浦 徹 (MATSUURA, Tohru)
自治医科大学・医学部・教授
研究者番号：90402560

(2)研究分担者

()

研究者番号：

(3)連携研究者

大野欽司 (OHNO, Kinji)
名古屋大学・大学院医学研究科・教授
研究者番号：80397455