

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 16 日現在

機関番号：72801

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26461555

研究課題名(和文) 脊髄性筋萎縮症原因遺伝子産物によるmRNA前駆体制御機構の解析

研究課題名(英文) Analysis of the pre-mRNA regulation by survival motor neuron protein

研究代表者

荒川 正行 (ARAKAWA, Masayuki)

公益財団法人微生物化学研究会・微生物化学研究所・研究員

研究者番号：90398868

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：脊髄性筋萎縮症(SMA)は、Survival motor neuron 1(SMN1)の欠失・変異によりSMN蛋白質の減少が生じる。SMAでは、SMNは同染色体上にあるSMN2 mRNAからも翻訳されるが、その前駆体のexon7スキッピングが惹起され翻訳された蛋白質はその機能を失う。本研究では、SMNの発現変化による内在SMN2mRNAの制御機構について調べた。その結果、SMA患者由来細胞に外来SMN1 mRNA導入後8hにおいて、トータルの内在SMN2 mRNAの発現と内在SMNの発現亢進が観察された。このことからSMNの発現変化によりSMN2発現の転写活性が亢進することが示唆された。

研究成果の概要(英文)：Spinal muscular atrophy (SMA), a genetic neuromuscular disorder, leads to motor neuron degeneration. SMA is caused by the reduction of the survival motor neuron (SMN) protein resulting from the homozygous deletion or mutation of the survival motor neuron 1(SMN1) gene and abnormal splicing of the SMN2 gene that is a highly homologous copy of SMN1. SMN2 is unable to compensate for defects in SMN1. This study was focused on the SMN2 pre-mRNA regulation of SMN protein in SMA patient-derived fibroblasts. By the overexpression of the exogenous GFP-SMN, endogenous SMN protein and total SMN2 mRNA expression were increased in SMA fibroblasts. These results suggest that SMN protein expression level have effects on the endogenous SMN2 gene transcription.

研究分野：細胞生物学

キーワード：脊髄性筋萎縮症 mRNA前駆体 スプライシング 転写

1. 研究開始当初の背景

ヒトを含む多細胞生物において、セントラルドグマ連の流れにある選択的スプライシングや翻訳機構は、一つの遺伝子転写産物から発生段階や組織依存的に多様な成熟 mRNA を産生し、最終遺伝子産物(蛋白質)を産生させる重要な生命機構である。RNA の多様性が、時・空間的に制御されていることが近年明らかにされてきたが、様々な遺伝子の mRNA 前駆体が細胞の種類や発生段階に応じてそれぞれ特異的・選択的にプロセッシングされ、それらの制御機構は複雑で実体が解明されていないことが多い。このような巧妙な選択的スプライシング制御や翻訳メカニズムの破綻は様々な疾患を引き起こすことが知られている。特に、遺伝性疾患の 15%以上で、原因遺伝子の欠失・変異により選択的スプライシング異常が生じると報告されており (Singh and Cooper, Trends Mol Med. 2012; Daguene E et al, EMBO Rep., 2015; Chabot and Shkreta, J Cell Biol., 2016)、その一つが本研究で対象とする脊髄性筋萎縮症 (SMA) である。

SMA は原因遺伝子 Survival motor neuron 1 (SMN1) の欠失・変異によりスプライシング制御に重要な SMN 蛋白質が減少する。さらに、SMA では、SMN 蛋白質が同染色体上の SMN2 mRNA から翻訳されるが、5 つの塩基の違いにより SMN2 mRNA 前駆体の exon7 スキッピングが惹起され翻訳された蛋白質は不安定でその機能を失う。一方、外来から SMN 蛋白質を補うと SMN2 exon7 スキッピングを修復する報告があるがその分子機構は明らかではない (Jodelka et al, Human Mol Genet, 2010)。本研究では、SMN 蛋白質の発現変化と内在の SMN2 mRNA の発現制御及び SMN 蛋白質発現を制御するメカニズムを解析し、遺伝子発現制御の多様性と SMA 治療戦略の可能性を追求する。

2. 研究の目的

本研究は、脊髄性筋萎縮症 (SMA) の原因遺伝子産物である SMN 蛋白質の細胞レベルでの発現変化における SMN2 mRNA 前駆体制御機構を解析し、遺伝子発現制御の多様性の理解と SMA 治療戦略の可能性を追求することを目的とする。

3. 研究の方法

(1) 細胞培養

正常ヒト皮膚線維芽細胞及び SMA I 型患者由来皮膚線維芽細胞に対しては 20%FBS-DMEM(1g/L glucose) の培地で維持し、継代数は 9 以下のものを使用した。他の HeLa 細胞、胚性腫瘍由来細胞株 (NTERA-2)、神経芽細胞腫 SK-N-SH 細胞に対しては 10%FBS-DMEM(4.5g/L glucose) の培地を使用した。

(2) 外来遺伝子導入ベクターの調整

SMA は、SMN 蛋白質の減少に伴い脊髄前角運動神経細胞の変性に至る疾患である。そこで、外来から導入し SMN 蛋白質を発現させるために運動神経に特異的に感染するポリオウイルス (PV) ベクターを用いた。PV ベクターは、ウイルスとして複製可能なまま全長の増殖型 PV に外来遺伝子を導入する場合、400 塩基程度までの外来遺伝子しか安定に発現できないことがわかっている。一方、非増殖型 PV ベクターは PV ゲノム内の構造蛋白質をコードする領域を欠失した領域に外来遺伝子を導入することが可能である。このベクターに構造蛋白質を補うことによりパッケージされた PV ゲノムの一部を欠失した非増殖型の欠陥干渉 (Defective interfering; DI) 粒子を用いてウイルス粒子を作製した。本研究に用いた SMN 発現 PV ベクターは、外来遺伝子 (GFP, GFP-SMN1) 挿入 PV ゲノム RNA と PV 構造蛋白質領域を組み込んだ発現プラスミドに対し、リポフェクタミン 2000 を用いたリポフェクション法により 293T 細胞に導入し、24h 後に細胞及び培養上清を回収し、パッケージされた外来遺伝子発現 PVDI 粒子とした。この粒子を用いて PV レセプターを有する各細胞へ導入し発現誘導を試みた。

3) 免疫染色法

①各細胞を PBS で 2 回洗浄後、0.2% Triton-X100 in PBS を用いて室温、10 分で膜透過処理を行い、②10%馬血清または 10%ヤギ血清 in PBS にて室温 60 分ブロッキングを行った。③一次抗体 (mouse monoclonal human SMN antibody BD 社, anti-GFP antibody MBL, human gemin 2 antibody, human gemin 3 antibody Abcam 社 TDP-43 antibody, coillin antibody Santa cruz 社, human polypyrimidine tract-binding protein-associated splicing factor (PSF) antibody MBL 社) を用いて各希釈液 (ブロッキング溶液) で調整し、室温、60 分インキュベーションを行った。④二次抗体 anti-mouse IgG conjugated Alexa 488 antibody, anti-rabbit IgG conjugated Alexa 594 antibody を用いて室温 60 分で染色した。⑤染色後、PBS で洗浄後、ヘキスト 33342 を用いて核染色を行って蛍光顕微鏡観察を行った。

(4) スプライシングアッセイ法

各細胞を洗浄後、トータル RNA を RNeasy キット (キアゲン) を用いて精製し、逆転写反応 (PrimeScript RT Master Mix: タカラ) を 500ng/10 μ l の反応系で行った。RT 後の cDNA サンプルを用いて、特異的 primer (SMN1/2: forward: 5' -CTCCATATGTCCAGATT CTCTT-3'; reverse: 5' -CTACAACACCCTTCTC

ACAG-3')を用いてPCR 30 サイクル(94°C, 10s, 48°C, 30s, 68°C, 30s)で増幅した。その結果全長 *SMN1/2*(505 bp)及び exon7 スキッピング *SMN2*(451 bp)を2%アガロース電気泳動で検出した。さらに、内在の *SMN2* の exon8 内の制限酵素サイトを特異的に切断する DdeI 処理を overnight で反応させて完全に切断させて上記のアガロース電気泳動により *SMN1/2* mRNA を区別した。

さらに、上記の方法でトータル RNA 及び RT 反応を行い、定量的 PCR 法 (リアルタイム PCR:CFX96 Real-Time System, Bio-RAD)を行った。各サンプル 12.5ng/well に調整した 25 μ l の系で行った。特異的 primer (cSMN7F;5' -GAAGGTGCTCACATTCCTTAAAT-3' cSMN8R;5' -ATCAAGAAGAGTTACCCATTCCA-3')PCR 40 サイクル(95°C, 30s, 95°C, 5s, 60°C, 10s)で増幅した。

4. 研究成果

SMA 患者では、*SMN2* mRNA 前駆体がスプライシング機構により 20-90%の割合で exon7 のスキッピングを生じ、生産された mRNA やその翻訳産物は不安定で機能しないことが報告されている。しかし、そのスプライシングパターンによる SMN 蛋白質の発現が SMA 患者の病態にどのような影響を及ぼすかは明らかにされていない。そこで、*SMN1/2* mRNA を発現していると思われるヒト培養細胞系におけるスプライシングパターンを RT-PCR 法で調べたところ、HeLa 細胞、胚性腫瘍由来細胞株 NTERA-2、神経芽細胞腫 SK-N-SH、正常皮膚線維芽細胞における *SMN1/2* mRNA の検出では、全長の *SMN1/2* mRNA の発現量が高く、また制限酵素 Dde I 処理において *SMN1* と 2 の発現量を比べたところ、どの細胞においても *SMN1* mRNA の発現量が高いことが明らかとなった。また、exon7 のスキッピングした mRNA はほとんど発現されなかった。次に、*SMN1* を欠失している SMA 患者由来線維芽細胞 2 株を用いて、上記の解析を行ったところ、全長 *SMN2* mRNA の発現量の違いが観察された。

次に、正常ヒト皮膚線維芽細胞に外来から SMN 発現 PV ベクターを用いて、導入後の GFP-SMN の発現は蛍光顕微鏡観察では導入 4 時間以降に発現が見られることが明らかとなり、免疫組織化学染色法やウエスタンブロット法では、6 時間以降に検出されることが明らかとなった。さらに、経時的にトータル RNA を回収し、RT-PCR 法で *SMN1/2* の発現検出を試みたところ、導入 6 時間までは、発現変化が見られなかったが、8 時間では、内在の *SMN1/2* のスプライシングに変化が見られた。その後、Dde I 処理後の産物を調べたところ *SMN1* の発現には影響がないことが明らかとなった。一方、SMA 患者由来細胞に外来から導入すると正常ヒト皮膚線維芽細胞と同様に 6 時間から GFP-SMN 蛋白質の発現が見られた。さらに、

SMN2 mRNA の発現を RT-PCR 法を用いて、経時的に調べたところ、内在の *SMN2* mRNA の発現が上昇する傾向が見られた。さらに、導入 8 時間後に、制限酵素 Dde I 処理後の *SMN2* mRNA 産物を調べたところ、無処理、GFP 発現コントロールと比較して内在のトータル *SMN2* mRNA が発現上昇していることが示唆された。また、導入 8 時間後に GFP-SMN 蛋白質を抗 GFP 抗体によるウエスタンブロット法で発現を確認後、抗 SMN 抗体により内在の SMN 蛋白質の発現を調べたところ、導入無し、GFP 発現のコントロールと比較して内在の SMN 蛋白質の発現が亢進していることが明らかとなった。

これらの結果から、異なるスプライシングアッセイ法として、レポーターアッセイ系の構築が遅れたので、リアルタイム qPCR 法を用いてスプライシングアッセイを行った。導入 8 時間の SMA 患者由来線維芽細胞に対してコントロールとして GFP を発現させた細胞と比較したところ、GFP-SMN 発現細胞では、全長の *SMN2* mRNA の発現が 2.5 倍上昇した。一方、exon7 のスキッピングした *SMN2 Δ 7* の発現も 1.4 倍に上昇した。これらの結果から、外来から SMN 蛋白質の発現による内在 SMN 蛋白質の発現増加は、SMN 蛋白質による *SMN2* mRNA の転写機能が促進されて翻訳されたタンパク質の増加が示唆された。

本研究期間において、SMA の原因遺伝子産物である SMN 蛋白質の発現変化により、内在 *SMN2* mRNA 前駆体の制御機構について解析を行った。外来からの SMN 蛋白質の導入により内在の SMN 蛋白質の発現亢進し、トータル *SMN2* mRNA の発現変化が生じることが明らかになった。特に、全長の *SMN2* mRNA の発現の上昇は興味深い結果である。しかし、SMN 蛋白質の発現上昇により *SMN2* mRNA 前駆体の exon7 スキッピングを抑制させて、全長の *SMN2* が発現するというよりは、全 *SMN2* mRNA の転写機能が促進されることが示唆された。

近年、SMN 蛋白質は、転写制御を担う RNA ポリメラーゼ II の C 末ドメインの修飾酵素 PRMT5 に結合し、転写終結を調節している重要な分子であると報告された (Zhao DY., et al., Nature 2016)。

今後の課題として、SMN 蛋白質の発現変化により、SMN 結合蛋白質や核内構造体 (Gems 等) を構築する蛋白質発現への影響及び *SMN2* やその他の遺伝子発現や転写に与える影響について検討する必要がある。

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 2 件)

- 1) Reiko Arakawa, Masayuki Arakawa, Kaori Kaneko, Noriko Otsuki, Ryoko

Aoki, Kayoko Saito, Imaging flow cytometry analysis to identify differences of survival motor neuron protein expression in patients with spinal muscular atrophy Pediatric Neurol. 査読有 2016,61,70-75 doi:10.1016/j.pediatrneurol.2016.05.009.

- 2) Masayuki Arakawa, Reiko Arakawa, Shinichi Tatsumi, Ryoko Aoki, Kayoko Saito, Akio Nomoto A, novel evaluation method of survival motor neuron protein as a biomarker of spinal muscular atrophy by imaging flow cytometry. Biochem Biophys Res Commun. 査読有 2014, 453, 368-374 doi:10.1016/j.bbrc.2014.09.087.

[学会発表] (計 6 件)

- 1) Reiko Arakawa, Noriko Otsuki, Masayuki Arakawa, Kaori Kaneko, Ryoko Aoki, Kayoko Saito, Development of SMN protein analysis in human blood cells as a spinal muscular atrophy biomarker. The 13th International Congress of Human Genetics 2016年4月6日 国立京都国際会館・京都府京都市
- 2) 荒川玲子、大月典子、金子芳、青木亮子、荒川正行、斎藤加代子 イメージングフローサイトメトリーを用いた新規 SMN タンパク質解析法 日本人類遺伝学会第 60 回大会 2015 年 10 月 16 日 京王プラザホテル・(東京都新宿区)
- 3) Masayuki Arakawa, Reiko Arakawa, Ryoko Aoki, Akio Nomoto, Masakatsu Shibasaki, Kayoko Saito, A novel evaluation method of survival motor neuron protein as a biomarker of spinal muscular atrophy. The 20th International World Muscle Society Congress 2015 年 10 月 1 日 Brighton・(UK)
- 4) 荒川正行、荒川玲子、青木亮子、大月典子、野本明男、柴崎正勝、斎藤加代子、脊髄性筋萎縮症原因遺伝子産物 SMN 蛋白質の新規検出法 第 1 回日本筋学会学術集会 2015 年 8 月 8 日 国立研究開発法人国立精神医療研究センター・(東京都小平市)
- 5) Masayuki Arakawa, Reiko Arakawa, Kayoko Saito, A novel evaluation method of survival motor neuron protein as a biomarker of spinal muscular atrophy. BIT's 8th Annual World Protein & Peptide Conference 2015 年 4 月 27 日 Nanjing・(中国) 招待講演
- 6) Masayuki Arakawa, Reiko Arakawa,

Shinichi Tatsumi, Ryoko Aoki, Kayoko Saito, Akio Nomoto, A novel evaluation method of survival motor neuron protein as a biomarker of spinal muscular atrophy by imaging flow cytometry. 2015 Merck Millipore Asia Forum 2015 年 4 月 20 日 目黒雅叙園・(東京都目黒区) 招待講演

[産業財産権]

○取得状況 (計 1 件)

名称 : SMN 蛋白質の発現を検出する方法
発明者 : 斎藤加代子、荒川玲子、荒川正行、野本明男
権利者 : 学校法人東京女子医科大学、公益財団法人微生物化学研究会
種類 : 特許
番号 : 特願 2016-511649
取得年月日 : 平成 29 年 3 月 31 日
国内外の別 : 国内

[その他]

ホームページ等
公益財団法人微生物化学研究会 微生物化学研究所ホームページ
<http://www.bikaken.or.jp/research/publications/index.php>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

荒川正行 (ARAKAWA Masayuki)
公益財団法人微生物化学研究会・微生物化学研究所・上級研究員
研究者番号 : 90398868

(3) 連携研究者

斎藤加代子 (SAITO Kayoko)
東京女子医科大学・医学部・教授
研究者番号 : 90138834