

平成 28 年 5 月 12 日現在

機関番号：12602

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2015

課題番号：26640037

研究課題名(和文) RNAスプライシング複合体構造解析に基づく遺伝性発達障害性疾患の革新的治療開発

研究課題名(英文) Therapeutics development against intellectual disability via structural biology analyses

研究代表者

岡澤 均 (Okazawa, Hitoshi)

東京医科歯科大学・難治疾患研究所・教授

研究者番号：50261996

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：スプライシングと神経疾患の関係は注目を浴びており、脳スプライシング病という概念も出来つつある。本研究では、代表的な脳スプライシング病であり、代表的な発達障害原因遺伝子であり、神経変性病態関連分子でもあるPQBP1にフォーカスを絞って、スプライシング複合体の構造解析を行い、その結果に立脚して、PQBP1の治療効果を既に準備開発した新規のマウスモデルで検証することで神経疾患の革新的治療開発を行った。その結果、PQBP1機能欠損におけるスプライシング異常を介した小頭症・知的障害の発症メカニズム解明と治療法開発、PQBP1とU5-15kDの結合の構造生物学的基盤の解明を達成した。

研究成果の概要(英文)：RNA splicing is implicated in the molecular pathology of neurological diseases, and the concept of RNA splicing diseases has been proposed. In this project, we focused on PQBP1, which is a representative RNA splicing disease gene, a representative disease gene of intellectual disability (ID), and a neurodegeneration-related gene. We intended to perform structural biology analysis of PQBP1 and develop revolutionary therapy. As the results, we elucidated pathomechanisms of PQBP1-linked ID/microcephaly through splicing impairment, developed a gene therapy against this disorder. We also clarified structural basis of interaction between PQBP1 and U5-15KD.

研究分野：神経科学

キーワード：PQBP1 スプライシング異常 構造生物学 遺伝子治療 小頭症 知的障害 神経変性疾患

## 1. 研究開始当初の背景

PQBP1 はポリグルタミン配列に直接的に結合するタンパク質として私たちが発見したものである (Imafuku et al., BBRC1998; Waragai et al., Hum Mol Genet 1999)。PQBP1 は複数のポリグルタミン病疾患タンパク質に結合することから、疾患の枠組みを超えた病態機能が想定されている。一方、私たちのこれまでの研究 (本挑戦的萌芽研究を含む) から、PQBP1 はスプライシングと転写に関わること、PQBP1 は核内で foci を形成するとともに、細胞質にも移行し、ストレス顆粒の構成要素であること、PQBP1 の C 末端ドメインは天然変性タンパク質構造であること、などが示唆されていた。

また、PQBP1 はその遺伝子変異がレンペニング症候群をはじめ、複数の知的障害 + 小頭症の原因であることが明らかにされており (Nat Genet 2003)、変性疾患のみならず、発達障害にも関わる重要な遺伝子・タンパク質であることが示されている。

## 2. 研究の目的

スプライシングと神経疾患の関係は注目を浴びており、脳スプライシング病という概念も出来つつある。本研究では、代表的な脳スプライシング病であり、代表的な発達障害原因遺伝子であり、神経変性病態関連分子でもある PQBP1 にフォーカスを絞って、スプライシング複合体の構造解析を行い、その結果に立脚して低分子化合物を探索し、その効果を既に準備開発した新規のマウスモデルで検証することで神経疾患の革新的治療開発を行う。

## 3. 研究の方法

知的障害 (発達障害の主要な病型である) の原因遺伝子としても、スプライシング因子である PQBP1 が見つかった。PQBP1 は、もともと研究代表者グループがポリグルタミン配列に結合する新規生理的タンパク質として発見したものである (Waragai et al., Hum Mol Genet 1999; Okazawa et al., Neuron 2002)。医学臨床的に非常に重要なことは、PQBP1 遺伝子変異による発達障害が極めて一般的な疾患であることである。PQBP1 遺伝子変異と精神発達遅滞との関連は、European Consorsium of X-linked Mental Retardation によって初めて示された (Kalscheuer et al., Nat Genet 2003)。彼らの保有した原因遺伝子未同定の 29 家系のうち 5 家系が PQBP1 遺伝子変異を持っていた。さらに、Stevenson ら、Lenski らの報告が相次ぎ、de Brouwer らによれば、その頻度は Rett 症候群の疾患頻度にはほぼ匹敵するものである (遺伝性精神発達遅滞の 4.5%。これに対して Rett 症候群は 6.2%) (de Brouwer et al., Hum

Mutation 2007)。

PQBP1 はその WW ドメインを介して RNA polymeraseII の C 末端配列に、C 末端ドメインを介してスプライシング因子と結合することが知られている (Okazawa et al., Neuron2002)。したがって、FUS と同様に転写・スプライシングのカップリングにも働いていることが想定される。このカップリングの為に、2つの PQBP1 ドメインが必須と考えられるが、図3に示す通り、疾患変異は WW ドメインのコアとなるアミノ酸あるいは、C 末端ドメインの前に存在する繰り返し配列の insertion/deletion (frame shift によって C 末端ドメインの喪失を引き起こす) に集中している。したがって、転写スプライシングの連結機能が損なわれると発症する。あるいは、スプライシング機能の喪失、転写機能の喪失のいずれもが、精神発達遅滞につながるの考え方も出来よう。

スプライシング機能については、代表者グループおよび他グループによって、PQBP1 とスプライシング因子 U5-15kD の結合が示され (Waragai et al., BBRC 2000; Zhang et al., BBA 2000)、さらに、全く独立したスプライソゾーム成分解析研究から (Makarov et al., Science 2002; Makarova et al., EMBO J 2004)、PQBP1 および U5-15kD は、スプライシングの B 複合体 (図4左) に、それも B' 複合体ではなく BDU1 複合体の時期に一過性に、スプライシング複合体に含まれることが分かっている。

構造生物学的には、PQBP1 の WW ドメインのモデル構造が提案されていたが、PQBP1 全体の構造は研究されていなかった。そこで、連携研究者・水口らは、研究代表者・岡澤との共同研究を通じて、PQBP1 が WW ドメインと長い変性領域を有する天然変性タンパク質であることを示した (Takahashi et al., BBA, 2009; BBA, 2010)。さらに、詳細な NMR 解析の結果、PQBP1 が 20 残基程度の C 末端セグメントを使って U5-15kD に結合していること、PQBP1 が U5-15kD の疎水性ポケットに結合していることも示した。

本研究では、精神発達遅滞の原因となる PQBP1 変異体が U5-15kD に結合できないことの基盤を構造生物学的に解析する。

新規遺伝子の発見を端緒として、神経疾患発症メカニズムにおけるスプライシング異常の重要性が認識されている。本研究は、この背景に立って、スプライシング異常がどのように生物学的な形質 (知的障害および小頭症) につながるかを明らかにする。

さらに、PQBP1 異常を補正し、その結果をスプライシング複合体機能、動物レベルの分子病理・症状などのバイオロジー的観点から検証した上で、治療開発に発展させようとするものである。

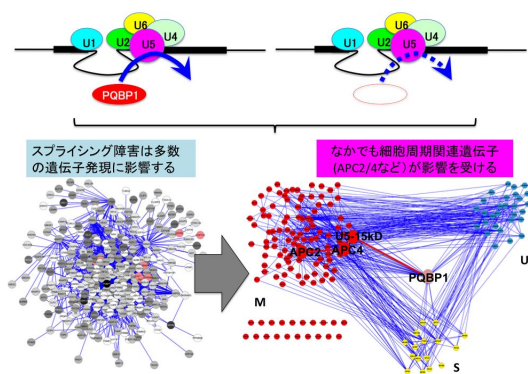
#### 4. 研究成果

##### PQBP1 機能欠損におけるスプライシング異常を介した小頭症・知的障害の発症メカニズム解明と治療法開発 (目的 に対応)

本研究では、PQBP1 の神経幹細胞からの cKO マウスを作成し、これを用いて、PQBP1 異常症における小頭症の発症メカニズム PQBP1 異常症の遺伝子治療の道筋、を明らかにした。小頭症は従来、神経幹細胞の分化効率が上昇する (このために幹細胞が枯渇する)、神経幹細胞の細胞死が亢進する、分化ニューロンの細胞移動が障害されるという3つのメカニズムが重要な役割を果たすと考えられてきました。ところが、私たちの作成した神経幹細胞内の PQBP1 を欠損する PQBP1 Nestin-Cre-conditional KO (PQBP1-cKO マウス) は、小頭症は再現するものの、これらの何れのメカニズムにも当てはまらず、その代わりに胎児の脳形成期における細胞周期時間が異常に延長していることが明らかになった。

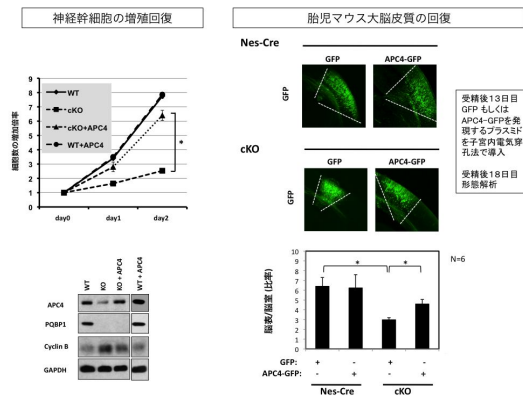
さらに、PQBP1-cKO マウスとコントロールマウスを比較すると、PQBP1 のスプライシング障害により、数百個の M 期、S 期などの細胞周期調節タンパク質やユビキチンプロテアソーム関連タンパク質が影響を受けていることが判明した (図 1)

図 1



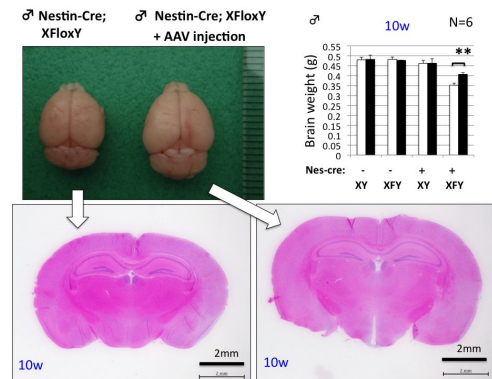
特に PQBP1 と間接的に結合している APC4 (ユビキチンリガーゼ複合体サブユニット) の減少が細胞周期延長に影響していることが示された (図 2)。

図 2



さらに、PQBP1-cKO を対象に胎児期遺伝子治療を試みた。PQBP1 欠損による機能低下を妊娠中の母マウスへ AAV ベクターを腹腔注射して PQBP1 を補充すると、生まれたあとの小頭症モデルマウスの脳サイズが部分的に回復し、行動解析でも学習能力など知的障害関連の症状が改善した (図 3)。

図 3



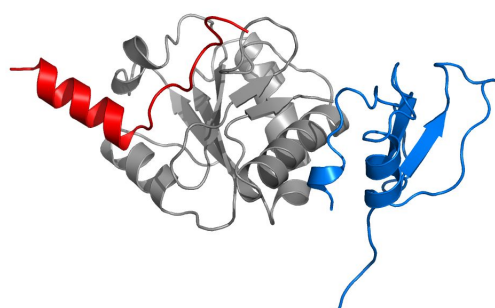
##### PQBP1 と U5-15kD の結合の構造生物学的基盤の解明 (目的 に対応)

PQBP1 は U5-15kD との結合を通じてスプライシング機能に関与することをこれまで報告してきた。本研究では、構造解析的手法により、C 末端ドメインの中に存在する特定の配列がスプライシング因子 U5-15kD などの標的タンパク質との結合に不可欠であることを明らかにした (Mizuguchi et al, Nat Commun 2014)

はじめに、PQBP1 タンパク質の立体構造を X 線結晶構造解析によって決定しました (図 4)。その結果、PQBP1 の YxxPxxVL 配列 (YxxPxxVL モチーフ) が、PQBP1 と U5-15kD タンパク質の結合に必須であることを明らかになった。本研究により、YxxPxxVL モチーフが失われると PQBP1 が RNA スプライシング因子である U5-15kD に結合できない、つまり

PQBP1 が正常に機能しないことが示された。さらに、YxxPxxVL モチーフが知的障害の原因となる PQBP1 変異体では欠損していることを示し、PQBP1 遺伝子の変異によって生じる知的障害は、YxxPxxVL モチーフが欠損することで PQBP1 が RNA スプライシングに於いて正常に機能しないことが原因と考えられた。RNA スプライシングは脳神経機能分子を含む様々な遺伝子の発現に重要な役割を果たすことが知られており、今後の研究進展により、知的障害の分子メカニズム理解と治療開発につながることを期待される。

図 4



また、本研究期間には他のグループの研究により、PQBP1 に関する理解が格段に進展した。例えば、2015 年には HIV の免疫系樹状細胞における細胞内受容体であること (Cell 2015)、続いて、冠動脈疾患の疾患ネットワークのうちの最重要因子の一つであることも示された (Cell Systems 2016)。私たちの本挑戦萌芽研究の成果と合わせて、ますます PQBP1 の重要性に対する認識が高まっている。

#### 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 8 件)

1. Kamagata, K., Kerever, A., Yokosawa, S., Otake, Y., Ochi, H., Hori, M., Kamiya, K., Tsuruta, K., Tagawa, K., Okazawa, H., Aoki, S., Arikawa-Hirasawa, E. (2016) Quantitative Histological Validation of Diffusion Tensor MRI by Two-Photon Microscopy of Cleared Mouse Brain. *Magn Reson Med Sci*. [Epub ahead of print] DOI: 10.2463/mrms.bc.2015-0148 (査読有)
2. Chen, X., Kondo, K., Motoki, K., Homma, H., Okazawa, H. (2015) Fasting activates macroautophagy in neurons of Alzheimer's disease mouse model but is insufficient to degrade amyloid-beta. *Sci Rep*. 5:12115. DOI: 10.1038/srep12115 (査読有)
3. Shiraishi, R., Tamura, T., Sone, M. and Okazawa, H. (2014) Systematic analysis of fly models with multiple drivers reveals different effects of ataxin-1 and huntingtin in neuron subtype-specific expression. *PLoS One*. 9(12): e116567. DOI: 10.1371/journal.pone.0116567 (査読有)
4. Ito, H., Fujita, K., Tagawa, K., Chen, X., Homma, H., Sasabe, T., Shimizu, J., Shimizu, S., Tamura, T., Muramatsu, S.I., Okazawa, H. (2014) HMGB1 facilitates repair of mitochondrial DNA damage and extends the lifespan of mutant ataxin-1 knock-in mice. *EMBO Mol Med*. 7(1) pp.78-101. DOI: 10.15252/emmm.201404392 (査読有)
5. Nabeshima, Y., Mizuguchi, M., Kajiyama, A., Okazawa H. (2014) Segmental isotope-labeling of the intrinsically disordered protein PQBP1. *FEBS Lett*. 588(24) pp.4583-4589. DOI: 10.1016/j.febslet.2014.10.028 (査読有)
6. Tagawa, K., Homma, H., Saito, A., Fujita, K., Chen, X., Imoto, S., Oka, T., Ito, H., Motoki, K., Yoshida, C., Hatsuta, H., Murayama, S., Iwatsubo, T., Miyano, S., Okazawa, H. (2014) Comprehensive phosphoproteome analysis unravels the core signaling network that initiates the earliest synapse pathology in preclinical Alzheimer's disease brain. *Hum Mol Genet*. 24(2) pp.540-558. DOI: 10.1093/hmg/ddu475 (査読有)
7. Ito, H., Shiwaku, H., Yoshida, C., Homma, H., Luo, H., Chen, X., Fujita, K., Musante, L., Fischer, U., Frints, S.G., Romano, C., Ikeuchi, Y., Shimamura, T., Imoto, S., Miyano, S., Muramatsu, S.I., Kawachi, T., Hoshino, M., Sudol, M., Arumughan, A., Wanker, E.E., Rich, T., Schwartz, C., Matsuzaki, F., Bonni, A., Kalscheuer, V.M., Okazawa, H. (2014) In utero gene therapy rescues microcephaly caused by Pqbp1-hypofunction in neural stem progenitor cells. *Mol Psychiatry*. 20(4) pp.459-471. DOI: 10.1038/mp.2014.69 (査読有)
8. Mizuguchi, M., Obita, T., Serita, T., Kojima, R., Nabeshima, Y. and Okazawa, H. (2014) Mutations in the PQBP1 gene prevent its interaction with the spliceosomal protein U5-15 kD. *Nat Commun*. 5: 3822. DOI:

## 〔学会発表〕(計 25 件)

1. 田川 一彦、本間 秀典、斉藤 あゆむ、藤田 慶大、陳 西貴、村山 繁雄、岩坪 威、宮野 悟、岡澤 均 第 34 回日本認知症学会学術集会「早期アルツハイマー病モデルマウス脳における網羅的リン酸化プロテオーム解析」(ポスター)リンクステーションホール青森/ホテル青森(青森市)2015/10/2
2. 田川 一彦、本間 秀典、斉藤 あゆむ、村山 繁雄、岩坪 威、宮野 悟、岡澤 均 第 38 回日本神経科学大会「早期アルツハイマー病脳における網羅的リン酸化プロテオーム解析」(口演)神戸国際会議場(兵庫県神戸市)2015/7/30
3. 田川 一彦、本間 秀典、斉藤 あゆむ、村山 繁雄、岩坪 威、宮野 悟、岡澤 均 第 56 回日本神経病理学会総会学術研究会「早期アルツハイマー病脳における網羅的リン酸化プロテオーム解析」(口演)九州大学医学部百年講堂(福岡市)2015/6/4
4. 伊藤 日加瑠、藤田 慶大、田川 一彦、陳 西貴、本間 秀典、笹邊 俊和、清水 潤、清水 重臣、村松 慎一、岡澤 均 第 56 回日本神経学会学術大会 “HMGB1 gene therapy ameliorates phenotype of mutant ataxin-1 knock-in mice” (ポスター) 朱鷺メッセ(新潟コンベンションセンター)/ホテル日航新潟(新潟市)2015/5/21
5. 田川 一彦、本間 秀典、斉藤 あゆむ、村山 繁雄、岩坪 威、宮野 悟、岡澤 均 第 56 回日本神経学会学術大会 “Comprehensive phosphoproteome analysis in preclinical Alzheimer's disease brain” (ポスター) 朱鷺メッセ(新潟コンベンションセンター)/ホテル日航新潟(新潟市)2015/5/21
6. Okazawa, H. 10th International Meeting on Copy Number Variants and Genes in Intellectual Disability and Autism. “In utero treatment for PQBP-1 gene mutations”(Oral) La Cittadella dell'Oasi (Troina, Italy) 2015/4/16
7. 岡澤 均、大谷 彰子 運動失調症の分子病態解明・治療法開発に関する研究班平成 26 年度 研究報告会・運動失調症の病態解明班「iPS 細胞由来ヒト神経細胞を用いた SCA1 の病態研究」(口演)JA 共済ビル カンファレンスホール(東京)2015/1/15
8. 岡澤 均、田川一彦 運動失調症の分子病態解明・治療法開発に関する研究班 平成 26 年度研究報告会・運動失調症の医療基盤に関する調査研究班「ヒト血液、髄液を用いた SCA1 のバイオマーカー探索」(口演)JA 共済ビル カンファレンスホール(東京)2015/1/15
9. 岡澤 均 包括脳ネットワーク冬のシンポジウム-大脳新皮質構築,シナプス病態,メゾ神経回路3領域合同公開シンポジウム-「シナプス病態 領域の紹介」(口演)ホテル東京ガーデンパレス(東京)2014/12/13
10. 岡澤 均 包括脳ネットワーク冬のシンポジウム-精神神経疾患研究の現状と展望:新学術5領域の相互理解・連携を目指して-「シナプス病態から脳疾患治療へ、網羅的質量分析の示唆するアルツハイマー病のシナプス超早期病態の分子機構」東京医科歯科大学(東京)2014/12/11
11. 伊藤日加瑠、塩飽裕紀、吉田千里、本間秀典、陳西貴、藤田慶大、岡澤 均 第 37 回日本分子生物学会年会 「神経幹細胞の Pqbp1 機能不全による小頭症は in utero 遺伝子治療によって改善できる」(ポスター)パシフィコ横浜(横浜市)2014/11/27
12. 田村 拓也、Barclay S Sam、藤田 慶大、伊藤 日加瑠、本木 和美、島村 徹平、田川 一彦、勝田 明寿香、曾根 雅紀、井元 清哉、宮野 悟、岡澤 均 第 37 回日本分子生物学会年会 「脊髄小脳失調症 1 型の分子病態コアネットワークの解明」(ポスター)パシフィコ横浜(横浜市)2014/11/26
13. 矢島 隆明、田村 拓也、岡澤 均、曾根 雅紀 第 37 回日本分子生物学会年会 「シウジョウバエアルツハイマー病モデルにおける yata 遺伝子による APP 輸送制御」(ポスター)パシフィコ横浜(横浜市)2014/11/25
14. Okazawa, H. 第 37 回日本分子生物学会年会 “DNA damage repair and neurodegenerative diseases” パシフィコ横浜(横浜市)2014/11/25
15. Tamura, T., Barclay, S, S., Fujita, K., Ito, H., Motoki, K., Shimamura, T., Tagawa, K., Katsuta, A., Shiwaku, H., Sone, M., Tagawa, K., Imoto, S., Miyano, S., Okazawa, H. Neuroscience2014. “Systems biology analysis of Drosophila in vivo screen data elucidates core networks for DNA damage repair in SCA1” (Poster and short talk) パシフィコ横浜(横浜市)2014/9/13
16. Fujita, K., Nakamura, Y., Oka, T., Ito, H., Tamura, T., Tagawa, K., Sasabe, T., Katsuta, A., Motoki, K., Shiwaku, H., Yoshida, C., Sone, M., Okazawa, H. Neuroscience2014. “A functional deficiency of TERA/VCP/p97 contributes to impaired DNA repair in

multiple polyglutamine diseases ”  
(Poster) パシフィコ横浜 (横浜市)2014/9/12

17. Okazawa, H. ISP Symposium 2014 - Ageing and Metabolis. “ Comprehensive Phosphoproteome Analysis Unravels the Core Signaling Network that Initiates the Earliest Synapse Pathology in Preclinical Alzheimer ’ s Disease Brain ” (Oral) 東京医科歯科大学 (東京) 2014/8/28
18. 田村 拓也、岡澤 均 第7回分子高次機能研究会「昆虫モデルから見る神経疾患の特異性と普遍性」(口演)KKR 沼津はまゆう (静岡県沼津市) 2014/8/25
19. 岡澤 均 第1回TMDU「知の創造」若手コアセミナー「神経変性疾患と知的障害・小頭症をつなぐRNA 関連分子PQBP1」(口演)東京医科歯科大学 (東京) 2014/8/20
20. 田村 拓也、Barclay S Sam、藤田 慶大、伊藤 日加瑠、本木 和美、島村 徹平、田川 一彦、勝田 明寿香、曾根 雅紀、井元 清哉、宮野 悟、岡澤 均 第55回日本神経病理学会総会学術研究会「脊髄小脳失調症1型におけるDNA 損傷修復異常のコアネットワーク解析」(口演)学術総合センター(東京) 2014/6/6
21. 藤田 慶大、中村 蓉子、岡 努、伊藤 日加瑠、田村 拓也、田川 一彦、笹邊 俊和、勝田 明寿香、本木 和美、塩飽 裕紀、吉田 千里、曾根 雅紀、岡澤 均 第55回日本神経病理学会総会学術研究会「複数のポリグルタミン病に共通するTERA/VCP/p97のDNA 損傷修復機能不全」(口演)学術総合センター(東京) 2014/6/6
22. 田村 拓也、Barclay S Sam、藤田 慶大、伊藤 日加瑠、本木 和美、島村 徹平、田川 一彦、勝田 明寿香、曾根 雅紀、井元 清哉、宮野 悟、岡澤 均 第55回日本神経学会学術大会「脊髄小脳失調症1型におけるDNA 損傷修復異常のコアネットワーク解析」(口演)福岡国際会議場(福岡市) 2014/5/23

〔図書〕(計 5件)

1. Shiwaku, H., Okazawa, H. (2015) Impaired DNA Damage Repair as a Common Feature of Neurodegenerative Diseases and Psychiatric Disorders. Current Molecular Medicine. Vol.15 (2) pp.119-128.
2. 藤田 慶大、岡澤 均 (2015) 神経変性疾患の共通病態としてのDNA 損傷修復異常 Annual Review 神経 2015 pp.65-72. 中外医学社
3. Okazawa, H. (2014) HD Research Around the World: Japan. Past, Present, Future. HD Insights Vol. 4 pp.7-8.

〔産業財産権〕

出願状況(計 3件)

1. 名称: 脊髄小脳変性症を予防又は治療するための薬剤  
発明者: 岡澤均  
権利者: 国立大学法人東京医科歯科大学  
種類: 特許  
番号: PCT/JP2014/077258  
出願年月日: 2014/10/10  
国内外の別: PCT

2. 名称: アルツハイマー病の診断方法、診断薬、治療薬及びこれら薬剤のスクリーニング方法  
発明者: 岡澤均  
権利者: 国立大学法人東京医科歯科大学  
種類: 特許  
番号: PCT/JP2014/084424  
出願年月日: 2014/12/25  
国内外の別: PCT

3. 名称: 神経幹細胞の増殖の促進に用いられる製剤、神経幹細胞の減少に関連する疾患の予防又は治療に用いられる製剤、シナプス後部形成の促進に用いられる製剤、シナプス後部形成の減少に関連する疾患の予防又は治療に用いられる製剤、及びスクリーニング方法  
発明者: 岡澤均  
権利者: 国立大学法人東京医科歯科大学  
種類: 特許  
番号: PCT/JP2015/069032  
出願年月日: 2015/7/1  
国内外の別: PCT

取得状況(計 0件)

〔その他〕

ホームページ等

<http://researchmap.jp/hitoshiokazawa/>  
<http://www.tmd.ac.jp/mri/shingakujutu/>

6. 研究組織

(1)研究代表者  
岡澤 均 (OKAZAWA, Hitoshi)  
東京医科歯科大学・難治疾患研究所・教授  
研究者番号: 50261996

(2)研究分担者  
該当無

(3)連携研究者  
該当無