

論文の内容の要旨

論文題目 良性成人型家族性ミオクローヌステんかん (BAFME) の発症機序に関する研究

氏名 松川 美穂

良性成人型家族性ミオクローヌステんかん (benign adult familial myoclonic epilepsy; BAFME) は皮質振戦と呼ばれる細かいミオクローヌスと全般性強直間代発作を主徴とする常染色体優性遺伝性疾患である。BAFME は本邦において頻度の高い疾患であり、20–60 歳と成人期に発症し、初発症状は皮質振戦であることが多い。全般性強直間代発作は数年に一度と低頻度で出現し、良性の経過をたどる。光過敏性やアルコール摂取による皮質振戦の改善がみられる点が特徴である。本邦の BAFME 家系の解析により *SAMD12* 遺伝子 (一部の家系では *TNRC6A* 遺伝子, *RAPGEF2* 遺伝子) のイントロンにおいて健常者に存在する (TTTTA)_n というリピートの下流または内部に (TTTCA)_n という異常伸長リピートが存在し、これが BAFME の原因であることが近年明らかになった。TTTCA repeat は脊髄小脳変性症 37 型 (SCA37) の原因であることも知られている。また、BAFME 患者剖検脳の RNA-seq では TTTCA repeat のみならず、CTTCA, GTTCA repeat で占められる short read が認められた。この解析結果から、TTTCA repeat が転写される際に何らかの修飾あるいは RNA 編集を受け、BAFME 患者の脳においてのみ UUUCA に加え CUUCA, GUUCA というモチーフからなる repeat RNA が発現していることが示唆された。

非翻訳領域のリピート伸長を原因とする代表的な疾患に *DMPK* 遺伝子の 3'非翻訳領域の CTG repeat を原因とする筋強直性ジストロフィー1型が挙げられる。この疾患では CUG repeat が細胞核内で RNA foci と呼ばれる凝集体を形成し、それにスプライシング因子である MBNL1 などの RNA 結合タンパク質 (RBP) が捕捉され量的に低下することで塩化物チャンネル (CLCN1) などのスプライシング異常が二次的に生じ、ミオトニアなど様々な症状が引き起こされると考えられている。このように伸長 RNA そのものが疾患の発症において重要な原因となる 'RNA gain-of-function

mechanism' が, BAFME においても重要である可能性を考え, 病態機序について検討を行った.

まず, BAFME 剖検脳を用いて神経細胞における RNA foci の検討を行ったところ, UUUCA repeat および CUUCA repeat が RNA foci を形成していた. したがって, UUUCA repeat および CUUCA repeat が安定した構造をとり, 何らかの RBP を捕捉して凝集体を形成する 'RNA gain-of-function mechanism' が BAFME の病態機序の中心になっている可能性が考えられた. また, *SAMD12* 遺伝子のイントロンに原因リピートを有する BAFME 患者 6 例の剖検脳を用いて, *SAMD12* 遺伝子の発現について検討を行った. Droplet digital PCR (ddPCR) による RNA 発現量の検討では, *SAMD12* transcript variant 1 の発現量については BAFME ヘテロ接合性変異群とコントロール群で有意差はなかった ($p=0.93$). Western blot によるタンパク質発現量の検討では, BAFME ヘテロ接合性変異群ではコントロール群と比較して *SAMD12* の発現量は軽度低下していた ($p=7.4 \times 10^{-3}$). したがって, BAFME では *SAMD12* の RNA 発現は不変または軽度低下, タンパク質発現は軽度低下していたが, これは筋強直性ジストロフィー1型とほぼ同様の傾向であり, BAFME においても *SAMD12* のハプロ不全 (loss of function) の病態への寄与は少ないと考えられた.

次に, 免疫沈降の原理を用いて HEK293 細胞抽出タンパク質のうち UUUCA, CUUCA, GUUCA repeat に結合するタンパク質を質量分析で網羅的に検索し, hnRNPL, LRPPRC/SLIRP 複合体, NOVA1, NOVA2 などのタンパク質を同定した. 同じく免疫沈降の原理を用いた実験である SH-SY5Y 細胞抽出タンパク質を使った RiboTrap では NOVA1, NOVA2 は UUUCA repeat に結合, hnRNPL, LRPPRC/SLIRP 複合体は UUUCA および CUUCA repeat に結合していた. さらに CUUCA repeat 優位に結合するタンパク質として PTBP1, PTBP2 にも注目した. これらの7種類のタンパク質について FLAG 融合タンパク質を精製し, RNA electrophoretic mobility shift assay (REMSA) でも repeat RNA との結合を確認した. これら3つの RNA-RBP 結合実験により, UUUCA repeat と hnRNPL, LRPPRC, NOVA1, NOVA2, PTBP1 が結合すること, および CUUCA repeat と hnRNPL, PTBP1, PTBP2 が結合することを複数の実験系で確認した. その中でも, BAFME の病態との関連が疑われる RBP として NOVA1, NOVA2 に注目した.

NOVA1, NOVA2 は傍腫瘍性オプソクローヌス・ミオクローヌス失調症 (paraneoplastic opsoclonus-myoclonus-ataxia;

POMA) において出現する Ri 抗体が標的とするタンパク質として同定されたタンパク質であり、グリシン受容体 $\alpha 2$ や GABA (A) 受容体といった抑制性受容体の pre-mRNA のスプライシングを制御している。POMA では NOVA の障害によってグリシン受容体のスプライシング異常が生じ、ミオクローヌスを発症すると考えられている。また NOVA1/2 は神経細胞においてイオンチャネルなどのシナプス機能に関わる多くの遺伝子の mRNA 発現量および alternative splicing を調節しており、NOVA2 ヘテロノックアウトマウスでは脳波異常及び全身性痙攣が出現することが知られている。したがって BAFME では UUUCA repeat に NOVA1, NOVA2 が捕捉され、何らかの遺伝子の RNA processing に異常が生じる可能性が考えられた。

そこで、ヒト神経芽細胞腫由来の培養細胞である SH-SY5Y 細胞において NOVA1, NOVA2 の発現を抑制させた場合の細胞内の RNA 発現量および alternative splicing の変化について検討した。NOVA1 shRNA, NOVA2 shRNA 発現アデノウイルスベクターおよび control の GFP 発現アデノウイルスベクターを感染させた SH-SY5Y 細胞について RNA-seq を行い、発現変動遺伝子および exon の発現変動がみられた遺伝子を検討した。発現変動遺伝子については、NOVA1 を knockdown した SH-SY5Y 細胞において *C15orf59* の発現低下 (FDR=0.012), *LAMA3* の発現増加 (FDR=0.012) が認められた。NOVA2 を knockdown した SH-SY5Y 細胞ではミオクローヌステんかんや小脳失調に関連するチャンネル遺伝子である *KCNK1* (FDR=5.23 x10⁻⁵) をはじめ *ELFN1*, *GNAO1*, *TANC2*, *VEGFA*, *AQP1*, *IGF2*, *TNR*, *DNER* など計 50 個の遺伝子について有意な発現変動がみられ、これらの遺伝子については qRT-PCR や western blot による正常遺伝子産物の定量的な評価が必要と考えられた。また、NOVA2 を knockdown した SH-SY5Y 細胞では *NFIA*, *GTF2I*, *RNF11*, *KCNH2*, *CHRNA3*, *ZFAND5*, *RCC2* の計 7 個の遺伝子についてスプライシングの有意な変化 (FDR<0.05) を認めた。このスプライシング変化がヒト神経系における各遺伝子の機能に対しどのような意義をもつのかについては今後機能解析を行い検討する必要があると考えられた。

RNA は自身や相補的な他の RNA と特定の高次構造を形成し、安定化し機能をもつことあるが、UUUCA repeat などの BAFME 病原性リピート RNA を電気泳動すると多量体の存在を疑わせる複数のバンドが認められ、高次構造の存在

が示唆された。RNA の高次構造を推定するためにサイズ排除クロマトグラフィー (SEC), 小角 X 線散乱測定 (small angle X-ray scattering: SAXS), CD スペクトル解析を行った。SEC では CUUCA₁₇ 繰り返し単位 (CUUCA₁₇) が他のモチーフの 17 回 repeat (UUUCA₁₇, GUUCA₁₇, UUUUA₁₇) よりも会合度が高いことが明らかとなった。SAXS では UUUCA₁₇, CUUCA₁₇, GUUCA₁₇ は partially folded であり一部の分子が高次構造を形成している可能性が示唆され、一方で UUUUA₁₇ はランダムな構造を有していると考えられた。CD スペクトル解析では UUUCA₁₇, CUUCA₁₇, GUUCA₁₇ のスペクトラムはいずれも A-form と呼ばれる準安定的な核酸構造のスペクトラムに類似しており、この高次構造形成により RBP との結合が可能になっている可能性が考えられた。

その他の非翻訳領域の繰り返し単位伸長を原因とする疾患でも、本研究でみられたような 'RNA gain-of-function mechanism' が病態に関与している可能性がある。これらの疾患においても同様の検討を進めることにより、RNA を標的としたアンチセンス核酸療法や捕捉されたタンパク質の神経系への補充療法などの治療法への発展が期待できる。