

審査の結果の要旨

氏名 松川 美穂

良性成人型家族性ミオクローヌスてんかん (BAFME) は非翻訳領域の TTTTA repeat の下流または内部に存在する異常伸長 TTTCA repeat が原因であることが近年明らかとなった。本研究は BAFME の病態機序を明らかにするため、TTTCA repeat から転写される BAFME 病原性リピート RNA (UUUCA, CUUCA, GUUCA repeat) による BAFME 患者剖検脳神経細胞における RNA foci の形成、BAFME 病原性リピートに結合する RNA 結合タンパク質の探索およびその機能、BAFME 病原性リピートが有する高次構造を中心に解析を行ったものであり、下記の結果を得ている。

1. BAFME 患者剖検脳の後頭葉標本を用いて、Cy3-TGAAA₁₂, TTTCA₁₂, TGAAG₁₂, CTTCA₁₂, TGAAC₁₂, GTTCA₁₂, TAAAA₁₂, TTTTA₁₂ を用いた fluorescence *in situ* hybridization を行い、神経細胞核内において UUUCA repeat および CUUCA repeat が RNA foci を形成していることが示された。
2. *SAMD12* 遺伝子のイントロン領域に異常伸長 TTTCA repeat を有する BAFME 患者の剖検脳 (後頭葉) 組織を用いて、droplet digital PCR (ddPCR) および western blot で *SAMD12* の RNA およびタンパク質の発現量を定量した。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ると考えられた。これは *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型などの疾患と同様の傾向であった。
3. FLAG タグ化した UUUCA, CUUCA, GUUCA, UUUUA, CUG の 16 回リピートと HEK293 細胞抽出タンパク質を混合して得られた RNA-タンパク質複合体を免疫沈降して得られた RNA 結合タンパク質 (RBP) を質量分析法で網羅的に解析した。BAFME 病原性リピートに特異的に結合し、かつスプライシング因子などの重要な機能をもつ RNA 結合タンパク質として hnRNPL, LRPPRC, NOVA1, NOVA2, SLIRP が同定された。さらに、BrU 標識 UUUCA₁₇, CUUCA₁₇, GUUCA₁₇, UUUUA₁₇ と SH-SY5Y 細胞抽出タンパク質を混合して同様の免疫沈降の原理で RNA 結合タンパク質を得る実験 (RiboTrap) では UUUCA repeat と hnRNPL, LRPPRC, NOVA1, NOVA2, SLIRP の結合を確認し、CUUCA repeat と hnRNPL, LRPPRC, SLIRP の

結合を確認した。さらに CUUCA repeat と結合する RBP として PTBP1, PTBP2 を同定した。また、これらの RBP について FLAG 融合タンパク質を精製し、Biotin 標識 UUUCA₁₇, CUUCA₁₇, GUUCA₁₇, UUUUA₁₇ との結合を確認する RNA electrophoretic mobility shift assay (REMSA) を行い、UUUCA repeat と hnRNPL, LRPPRC, NOVA1, NOVA2, PTBP1, PTBP2 の結合を確認し、CUUCA repeat と hnRNPL, NOVA2, PTBP1, PTBP2 の結合を確認した。以上の3つの実験系より、BAFME 病原性リピートである UUUCA または CUUCA repeat に結合する RBP として hnRNPL, LRPPRC (LRPPRC/SLIRP 複合体), NOVA1, NOVA2, PTBP1, PTBP2 を同定した。

4. UUUCA repeat に結合する RBP として同定された NOVA1, NOVA2 は神経細胞特異的に発現するスプライシング因子であり、UUUCA repeat の捕捉によるその量的低下が BAFME の発症に関与している可能性が考えられた。アデノウイルスベクターを用いて SH-SY5Y 細胞において NOVA1, NOVA2 の発現を変動させ、RNA-seq で遺伝子発現量および alternative splicing の変化について解析した。NOVA2 を knock down 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ネル遺伝子である *KCNC1* (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た。また、*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。
5. *In vitro* transcription で合成した UUUCA₁₇, CUUCA₁₇, GUUCA₁₇, UUUUA₁₇ の電気泳動 (native PAGE) を行ったところ、BAFME 病原性リピートである UUUCA₁₇, CUUCA₁₇, GUUCA₁₇ において多量体の存在を疑わせる複数のバンドが認められ、何らかの高次構造を形成している可能性が考えられた。RNA の高次構造を推定するために小角 X 線散乱測定 (small angle X-ray scattering: SAXS), CD スペクトル解析を行った。SAXS では BAFME 病原性リピートである UUUCA₁₇, CUUCA₁₇, GUUCA₁₇ の Kratky plot より、これらの repeat RNA 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た。これらの repeat RNA の CD スペクトル解析ではいずれも A-form と呼ばれる準安定的な核酸構造に類似したスペクトラムが観察された。

以上の解析結果より、本論文は BAFME 病原性リピートである UUUCA repeat および CUUCA repeat が神経細胞核内に RNA foci を形成しており、'RNA gain-of-function mechanism' が BAFME の病態に寄与している可能性を示唆した。さらに UUUCA repeat または CUUCA repeat に hnRNPL, LRPPRC, NOVA1, NOVA2, PTBP1, PTBP2 の 6 個の RBP を結合することを複数の *in vitro* の実験系で証明し、BAFME 病原性リピート RNA による RBP の捕捉が病態に関与している可能性を示唆した。NOVA2 の発現を

低下させた SH-SY5Y 細胞においてチャンネル分子である *KCNC1* をはじめとした 50 個の遺伝子の発現変動および 7 個の遺伝子のスプライシング変化が生じることを示し、UUUCA repeat による NOVA2 の捕捉がミオクローヌスやてんかんなどの症状の出現に寄与している可能性を示唆した。また、BAFME 病原性リピート RNA は A-form に準じた高次構造を有していることを示し、この構造により安定化して RBP との結合が可能となっている可能性を示唆した。本研究はこれまで未知であった BAFME の病態機序の解明に重要な貢献をなすと考えられ、学位の授与に値するものと考えられる。