

## 学内グラント 報告書

平成27年度 学内グラント終了時報告書

RNA 結合蛋白質 PABPN1 によるポリ A 選択制御と  
眼咽頭筋ジストロフィーの病理

研究代表者 中尾 啓子 (医学部 生理学)

## 緒 言

眼咽頭筋ジストロフィー (OPMD) は、遅発性の眼瞼下垂と嚥下障害と主症状とする優性の遺伝性疾患で、日本では稀少疾患であるが、50代女性が本大学病院・神経内科を受診され遺伝子解析によってOPMDヘテロ変異を有すると診断された<sup>1)</sup>。OPMDの原因遺伝子産物は、RNA結合型タンパク質PABPN1 (poly (A) -Binding Protein Nuclear I) で、標的遺伝子のmRNAのポリAサイトに結合し発現レベルの調節を行っていると考えられている。PABPN1のN末近傍のアラニンGCGの半複製配列が正常では6～7回繰り返されるのに対し、OPMD疾患型では9～13回に伸長している。2012年にJenalらによって、PABPN1がポリA鎖の近位のサイトに結合すると、そこでのポリA鎖の切断・ポリアダニル化を阻害するため、結果としてPABPN1の結合しない遠位のサイトが切断・ポリアダニル化され長いポリA鎖をもつmRNAが多く生成される (選択的ポリアダニル化 alternative polyadenylation : APA) のに対し、疾患型PABPN1では近位のサイトの切断・ポリアダニル化を阻害しないため結果として短いポリA鎖を持つmRNAが生成されること (選択的ポリアダニル化の異常) によって、標的遺伝子の発現を変えようというモデルが提唱された<sup>2)</sup>。ポリA鎖の長さが変化すると、そこに結合するmicro RNAの結合状況が変わり、結果として標的遺伝子の発現レベルを調節していると考えられているが、実際にどのような標的遺伝子の選択的ポリアダニル化の異常がOPMDの疾患病理の原因であるかについては殆どわかっていない。

また、PABPN1は、発生初期からずっと遍在的に発現していることから、患者の生検サンプルでは、変異型PABPN1の発現による直接的な原因を推定し難いので、OPMD発症機序の解明のためには、それぞれの疾患型PABPN1の発現をコンディショナルに誘導できるモデルマウスを作成し、疾患型のPABPN1がどのような分子・細胞レベルの異常を導入直後の亜急性期に起こすかを解析することで因果関係を明確にする必要がある。

我々は、自身で開発した成体筋組織への高効率in vivo

電気穿孔法 (特許出願準備中) を用いて、PABPN1の疾患変異型遺伝子をマウス筋組織へと導入することにより持続的に発現させ、時間経過と共に進行性にOPMD疾患と同様な筋力低下を含む筋病変や細胞死がみられることを免疫組織学的解析等により確認した。導入された筋肉組織では、疾患変異型を発現する筋繊維の直径は正常型の筋繊維と異なり一定でなく、縁取り空胞の形成、核の増加が認められ、核の位置の異常が観察された。さらに、ECMの増加による顕著な線維化の亢進も認められ、両側性に変異型PABPN1を導入・発現させたマウスにおいては顕著な運動性の異常も認められる (data not shown) など、OPMDの疾患病態をかなり良く再現できている<sup>3,4)</sup> (論文投稿中)。

本研究では、我々は、それらのOPMD疾患モデルマウスにおいて導入された変異型PABPN1の発現開始直後に蛋白質の発現レベルが変化する複数の標的候補遺伝子に焦点を絞り、それらがPABPN1による標的遺伝子の選択的ポリアダニル化による発現調節の結果として起こっているかどうかをまずはC2C12細胞株を用いた生化学的解析によって解析し、少なくともC2C12において選択的ポリアダニル化が起こっている事が明らかになった標的遺伝子については、再びin vivo電気穿孔法で正常型及び疾患型PABPN1遺伝子をマウス大腿筋に導入しmRNAの3'端を解析し、最終的に正常型及び疾患型PABPN1がそれら標的遺伝子産物の発現レベルを変える事が確認できたら、それを真にOPMDの病理に関与するPABPN1のターゲット転写産物と考え、それらの発現調節を介した疾患病理を解明し治療法の開発をめざす。

## 方 法

- 1) C2C12細胞にPABPN1の正常型および患者型をLipofectamine LTXを用いたtransient transfection法によって導入し、一過性の発現による細胞の増殖・生存、形態変化に及ぼす影響を解析した。
- 2) C2C12細胞にPABPN1の正常型および患者型をDoxycycline (Dox) 依存的に誘導性に発現させられるベクター PB110を用いて導入し、細胞株をそれぞれ5株ずつ樹立。Doxycyclineによる発現誘導後の細胞の

増殖・生存、形態変化に及ぼす影響を解析し、また、それらの細胞株よりmRNAを抽出し、標的mRNAのポリA選択が変化しているかどうかについて、RT-PCRおよび3'RACE法、Northern blot, exon array, RNA-seqを用いて調べる。

- 3) ヒトiPS細胞、ヒトES細胞にゲノム編集によってPABPN1の疾患型の変異を導入した細胞株を樹立し、筋細胞に分化させる過程でどのような表現型が見られるかを組織化学的(筋組織の免疫染色, 化学染色等)、電子顕微鏡的(サルコメア構造やZ-lineの乱れ, 異常封入体)に解析する(慶應義塾大学・今井貴雄先生)。

## 結 果

- 1) マウス大腿筋にPABPN1の正常型(6k), 疾患型(9k, 616k)を導入マーカーのCAG-EGFPベクターと共にin vivoエレクトロポレーション法によって導入し、1ヶ月後にsacrificeし、薄切した凍結切片を4% PFAで固定後、抗PABPN1抗体、抗GFP抗体を用いて、免疫組織化学法及び蛍光抗体法を行って、疾患型の筋繊維

の直径は正常型の筋繊維と異なり一定でなく、縁取り空胞の形成、核の増加が認められ、核の位置の異常が観察された(図1)。さらに、ECMの増加による顕著な線維化の亢進も確認できた(data not shown)。

- 2) C2C12細胞及びヒトiPS細胞、ヒトES細胞に正常型及び疾患型PABPN1遺伝子(C末端にFLAGタグを導入)の発現ベクターを導入し、stable cell linesを確立し、Doxycyclinで誘導後にPABPN1 variantsとの発現をFLAG抗体で確認した(図2)。C2C12細胞の免疫染色によっても確認した(data not shown)。

現在、得られたstable cell linesからmRNAを抽出した後3'RACE法で選択的ポリアダニル化(APA)によって調節されている候補遺伝子のクローニングを行い、Northern blotting等で確認中である。

C2C12細胞にPABPN1の正常型及び疾患型をtransientに導入し細胞の生存に及ぼす影響を解析した。図3に示す通りPABPN1-616kを発現した場合に著しく生存・増殖が低下した。細胞の形態にも異常が見られ、細胞接着性も低下していた(data not shown)。

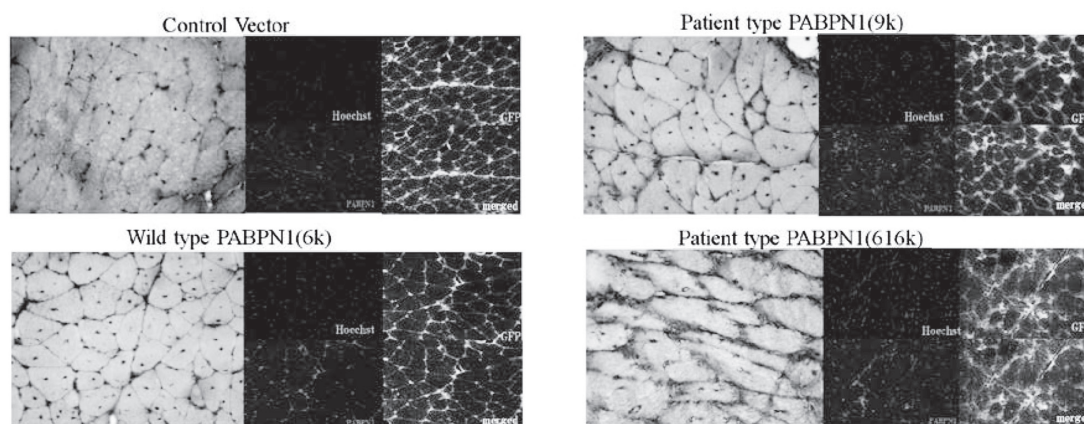


図 1.

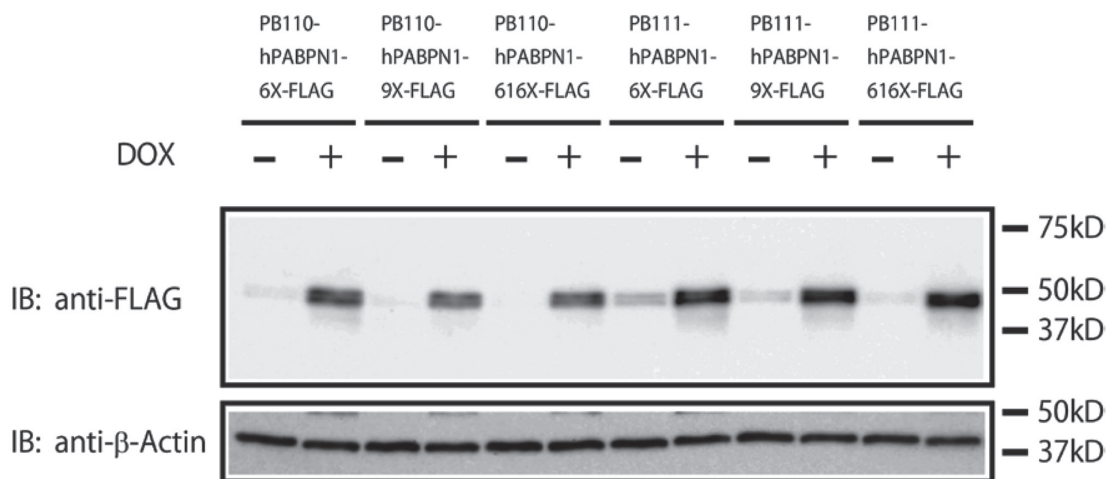


図 2.

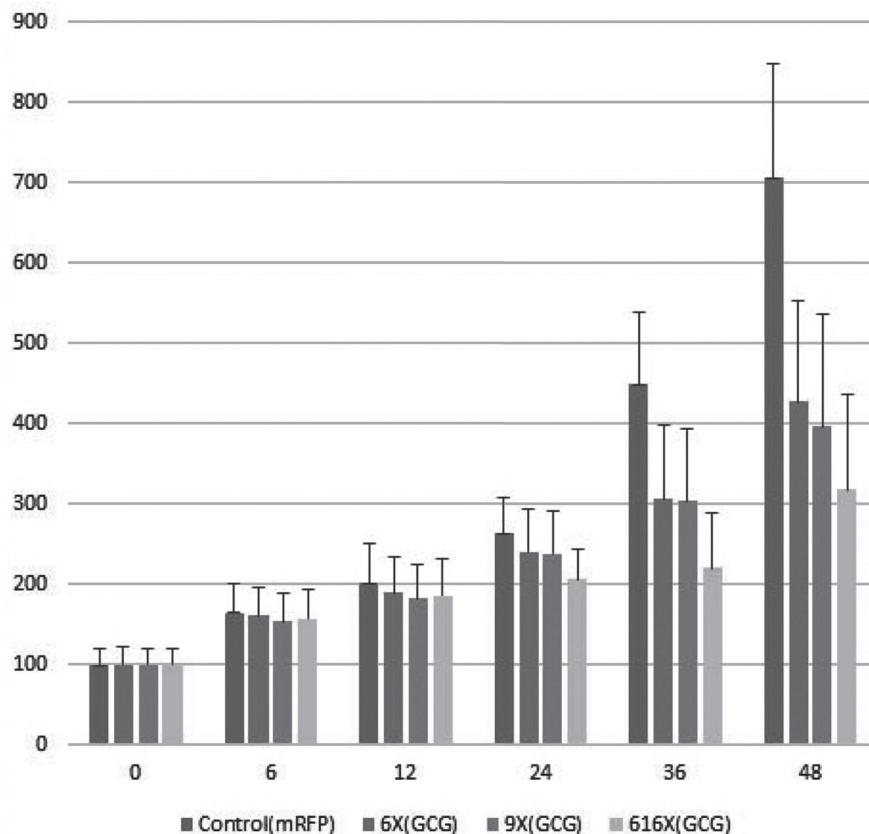


図 3.

## 考 察

我々の開発した高効率なin vivo電気穿孔法を用いて作成したモデルマウスにおいてPABPN1の疾患型を発現するとOPMDの病態を再現できることから最終的なOPMDの疾患病理を明らかにするためには、このモデルマウスにおいてPABPN1による選択的ポリAデニル化によって実際に発現が制御され、タンパクレベルでも発現が上昇または低下している標的遺伝子を同定する事が重要であると考えている。

しかしながら、現段階では少なくともC2C12あるいはヒトiPS細胞、ヒトES細胞において、PABPN1によって選択的ポリAデニル化で調節されていると考えられる標的遺伝子を確実に絞りこんでいる段階であるため、残念ながらモデルマウスで検証するに至っていない。

最近、PABPN1が結合することでTDP-43と言う家族性筋萎縮性側索硬化症(ALS)の原因遺伝子の一つと考えられている蛋白質の核移行を調節しているという報告がなされた<sup>5)</sup>。前述のように、PABPN1のN末近傍のアラニンGCGの半復配列が正常では6~7回繰り返されるのに対し、OPMD疾患型では9~13回に伸長しているが、アラニン鎖の伸長度だけが症状の重篤度を決めているわけではないようである。実際、本大学病院を受診された女性患者は、ヘテロ変異にも関わらず、本来はホモ変異にしか

見られない認知機能にも異常がみられた。つまり、運動神経においては、アラニン鎖の伸長度以外の要因も関与している可能性もあり、異なる細胞における疾患型PABPN1の関与についても別途調べる必要があると考えている。

## 謝 辞

本研究は、埼玉医科大学生理学教室において、課外プログラムに参加してくれた医学部学生松本恵さん、池田正明教授、熊谷恵助手との現在論文投稿中の共同研究「in vivo電気穿孔法を用いて作成した眼咽頭筋ジストロフィー疾患モデルの開発」が土台となっており、その後、共同研究者である慶應義塾大学医学部生理学教室助教(本学非常勤講師)の今井貴雄先生の全面的な御協力の下で実施されました。ここに深く感謝いたします。

## 引用文献

- 1) Mizoi Y, Yamamoto T, Minami N, Ohkuma A, Nonaka I, Nishino I, Tamura N, Amano T, Araki N. Oculopharyngeal muscular dystrophy associated with dementia. *Intern Med* 2011; 50(20): 2409-12.
- 2) Jenal M, Elkon R, Loayza-Puch F, van Haaften G, Kuhn U, Menzies FM, Oude Vrielink JA, Bos AJ, Drost J, Rooijers K, Rubinsztein DC, Agami R. The poly(A)-binding protein nuclear 1 suppresses alternative cleavage

- and polyadenylation sites. *Cell* 2012; 149(3): 538-53.
- 3) Abu-Baker A, Rouleau GA. Oculopharyngeal muscular dystrophy: recent advances in the understanding of the molecular pathogenic mechanisms and treatment strategies. *Biochim Biophys Acta* 2007; 1772(2): 173-85.
  - 4) Gidaro T, Negroni E, Perie S, Mirabella M, Laine J, Lacau St Guily J, Butler-Browne G, Mouly V, Trollet C. Atrophy, fibrosis, and increased PAX7-positive cells in pharyngeal muscles of oculopharyngeal muscular dystrophy patients. *J Neuropathol Exp Neurol* 2013; 72(3): 234-43.
  - 5) Chou CC, Alexeeva OM, Yamada S, Pribadi A, Zhang Y, Mo B, Williams KR, Zarnescu DC, Rossoll W. PABPN1 suppresses TDP-43 toxicity in ALS disease models. *Hum Mol Genet* 2015; 24(18): 5154-73.

## 研究成果リスト

### 学会発表

- 1) Nakao K, Matsumoto M, Kumagai M, Mizoi R, Araki N, Ikeda M, Imai T. Functional and pathological analysis of PABPN1, a responsible gene for oculopharyngeal muscular dystrophy (OPMD), which is introduced in to mouse skeletal muscles by in vivo electroporation. 第38回日本分子生物学会年会／第88回日本生化学会大会合同大会, 平成27年12月, 神戸ポートアイランド
- 2) 中尾啓子, 松本恵, 熊谷恵, 池田正明, 今井貴雄. in vivo電気穿孔法を用いて作成した眼咽頭筋ジストロフィー疾患モデルにおける原因遺伝子PABPN1の機能解析, 第39回日本神経科学大会, 平成28年7月, パシフィコ横浜