

RNA 結合蛋白質の機能解析最前線

矢野 真人

新潟大学大学院医歯学総合研究科神経生物解剖学分野

(主任：竹林浩秀教授)

Leading - edge Analysis of RNA - binding Protein

Masato YANO

Division of Neurobiology and Anatomy, Graduate School of Medical and

Dental Sciences, Niigata University

(Director: Prof. Hirohide TAKEBAYASHI)

要 旨

RNA 結合蛋白質は、非コード、コード RNA を含む、RNA のプロセッシング、局在化、安定性、翻訳といった転写後調節機構を担う分子群である。ここ 2-3 年の間に、RNA 結合蛋白質は、ヒトゲノムにおいて蛋白質がコードされる遺伝子の約 7.5% にあたる約 1,542 種類存在もする事が分かってきた。実は、そのおよそ半数以上がつい最近明らかとなったという驚きと同時に、この発見は RNA 結合蛋白質への注目度の高さを意味しているとも言える。そこで、RNA 結合蛋白質研究の意義及び、その解析戦略について最新のトピックスを踏まえて概説したい。

キーワード：RNA 結合蛋白質、転写後調節、神経発生学、HITS-CLIP

RNA 結合蛋白質研究の意義を探る

転写後調節システムは、ほぼ全ての生命現象に必要な情報制御機構であり、それぞれの RNA が保持する配列暗号を多くの RNA 結合蛋白質群が

認識することで調整が行われていると考えられている。まず、この転写後調節機構を担う RNA 結合蛋白質研究の意義を深める上での重要な発見、および医療応用について述べたい。

Reprint requests to: Masato YANO
Division of Neurobiology and Anatomy,
Graduate School of Medical and Dental Sciences,
Niigata University,
1 - 757 Asahimachi - dori, Chuo - ku,
Niigata 951 - 8510, Japan.

別刷請求先：〒951 - 8510 新潟市中央区旭町通 1 - 757
新潟大学医学部第二解剖 矢野 真人

1. 病理マーカーとしてのRNA結合蛋白質

RNA結合蛋白質研究において、医学研究分野で注目を集めたのは臨床、病理マーカーとしての発見に始まったと考えられる。1990年代に、傍腫瘍性神経症候群の患者の血清中に含まれる自己抗体の標的抗原として、HuとNova蛋白質が同定された²⁾³⁾。興味深い事にこれら二つの蛋白質は、共に神経細胞に特異的に発現するRNA結合蛋白質であった。その後、様々なグループよりこれら神経特異的なRNA結合蛋白質が神経細胞のマーカー分子として利用されると同時に蛋白質そのものの機能解析が進められてきた。さらに、現在のRNA結合蛋白質研究分野の研究者人口を急速に増大させたのが、2006年の病理としてのTDP43蛋白質の発見かもしれない⁴⁾。筋萎縮性側索硬化症(ALS)や前頭側頭葉変性症(FTLD)の患者の病理組織の神経細胞やグリア細胞内に存在する、病原性凝集体の構成分子として、リン酸化あるいはユビキチン化されたTDP43蛋白質の存在が共通病理所見として認められた⁴⁾⁵⁾。現在では、孤発性、家族性含めたALSの97%でTDP43陽性の封入体が病理像として確認されている⁶⁾。

2. 病態の原因としてのRNA結合蛋白質

疾患の原因遺伝子として同定されたRNA結合蛋白質の代表例として長い間世界中で研究されてきた分子が、脆弱性X症候群の原因遺伝子であるFMRPである。FMRPの標的RNA、翻訳抑制制御、シナプス機能など様々な知見が積み重ねられてきたが、後述する近年の高解像度研究解析技術によりようやく全貌に近づきつつある⁷⁾。また、病理マーカーとしてのTDP43の発見から2年後には、孤発性、及び家族性ALSの患者にTDP43のアミノ酸変異を伴う変異型の報告が相次ぎ、特にTDP43遺伝子のC末領域のプリオン様構造領域にその多くの変異が見つけられた⁸⁾。このことよりTDP43は、病理マーカーとしてだけでなく、蛋白質そのものの機能に注目が集まった。その後の家族歴のあるALS患者間で、TDP43だけでなく、FUS、hnRNPA1やhnRNPA2B1といった多くのRNA結合蛋白質が同様にALSの原因遺伝子と

して同定された⁶⁾⁹⁾。これらRNA結合蛋白質の機能解析が、病気の原因解明や治療応用の可能性を秘めているため、世界中で研究が盛んに行われている。

また、直接RNA結合蛋白質をコードする遺伝子に欠失、変異が生じないような疾患の多くもRNA結合蛋白質が病態の原因となる事が想定されている。例えばトリプレット病といった繰り返し配列を有し、繰り返し配列を持つRNAを高レベルで発現するような変異を持つ場合、これら非コードRNAがある特定の内在性RNA結合蛋白質のシークエスターとなり、このRNA結合蛋白質の遺伝子発現プログラムに異常が生じる事が病気の一つの原因となることも考えられる。つまり、それぞれのRNA結合蛋白質による遺伝子発現プログラムの正確な理解が今後さらに必要になると考えられる。実際、最近ではTDP43とFUSというALS関連RNA結合蛋白質の遺伝子発現プログラムの共通項を追跡する研究も行われている¹⁰⁾。

3. 創薬の標的としてのRNA結合蛋白質

病態解明の鍵を握るRNA結合蛋白質研究であるが、今後1,542種あるRNA結合蛋白質の中からも新たな創薬の標的が見つかることが期待される。将来的なRNA結合蛋白質を標的とした応用研究を考える上で、現状の成功例を二つ紹介したい。

(i) C型肝炎

RNA結合蛋白質AGO2-miR-122複合体は、C型肝炎ウイルス(HCV)が感染すると、ウイルスの主に5'非翻訳領域に結合することで、HCVウイルスの増幅複製に寄与し、またウイルスRNAがAGO2-miR-122複合体のシークエスターとして働くため感染細胞の遺伝子発現プログラムに支障をきたす¹¹⁾。このAGO2-miR-122複合体とRNAの相互作用をブロックする核酸医薬(Miravirsen)が有効な治療薬として非常に効果的となっている¹¹⁾¹²⁾。蛋白質とRNAの相互作用を抑える核酸医薬としては第一号となると考えられる。

(ii) 脊髄性筋萎縮症 (SMA)

SMA は、1 万人に 1 人程度の割合の新生児に発症する運動ニューロン病の一つで、原因遺伝子 SMN (survival motor neuron) の常染色体性劣性遺伝を示す神経難病とされる。SMN 遺伝子には、相同遺伝子のコピー SMN2 が存在することから、SMN2 の選択的スプライシングスイッチする核酸を用いることで、SMN2 蛋白質の合成量を増加させ、SMN 蛋白質の減少を補う方法でモデル動物を用いた実験で有効性が実証された¹³⁾。これは、ある種の RNA 結合蛋白質-RNA 相互作用を直接、核酸が抑えることで、スプライシング制御コントロールするものだが、昨年の研究では、もっと簡便な小分子化合物の経口投与によって SMN2 のスプライシング制御が可能であることが発見されるなど、急速に病気の治療へ向け進みつつある¹⁴⁾。

RNA 結合蛋白質研究の解析戦略を支える新技術

ここまで述べてきたように、RNA 結合蛋白質研究は遺伝性疾患や創薬の標的として重要な役割を持つ事がわかってきた。RNA 結合蛋白質の機能に迫る上で、これまで様々な疾患モデル動物などを用いた解析が進められてきており、いずれも遺伝学的手法が解析のキーとなるが、それに加え最近の研究解析戦略について紹介したい。

1. 蛋白質-RNA 相互作用 HITS-CLIP

RNA 結合蛋白質の機能解析を考える上で最も本質的な生化学的イベントが蛋白質-RNA 相互作用である。とくに *in vivo* で RNA 結合するリガンド (標的) の同定は歴史的に困難を極めた。というのも RNA 結合蛋白質の固有の結合コードは、非常に複雑な二次構造を認識するものからシンプルな暗号を認識するものまで様々で、*in vitro* からの知見を *in vivo* において真実の標的を示す上で困難であった¹⁵⁾。その中で、現在最も信頼のおける解析戦略が HITS-CLIP 法 (High Throughput Sequencing UV Cross Linked ImmunoPrecipitation) である¹⁶⁾。CLIP 法の特徴の一つは、生きた細胞や組織をそのまま UV 照射する事によ

り、細胞内で直接 RNA と結合している蛋白質の間 (蛋白質-RNA = 1 Å) に共有結合させるところにある。これにより、蛋白質-RNA の再結合問題を克服し、生体内で直接結合している蛋白質-RNA の複合体中の RNA を細胞抽出液よりスナップショットする事ができる。さらに、次世代シーケンサーによる膨大な RNA 配列を読み込む事で、まさに UV 照射時の生体内での蛋白質-RNA 相互作用をトランスクリプトームワイドに眺めることが可能となった¹⁶⁾。また、現在ではさらに進化を遂げ、一塩基解像度で蛋白質-RNA 相互作用を同定できるようになっている¹⁷⁾。詳細の方法、その他に関しては、筆者他の総説、寄稿を参照して頂きたい¹⁸⁾。

2. マイクロアレイ、RNAseq 解析

マイクロアレイ技術の進展により詳細な遺伝子発現プログラムの理解が進みつつあり、感度良く網羅的にトランスクリプトームが調べられるようになった。特に、詳細なプローブ設計を元に選択的スプライシングの割合定量も様々なアルゴリズム解析のおかげで進展してきた¹⁹⁾。その一方で、ゲノム上の約 90% の領域から転写される RNA とそのプロセシングを対象とする RNA 結合蛋白質の解析では、現在ではそのまま発現している mRNA をシーケンスする RNAseq 解析が主流になりつつある²⁰⁾。

3. リボソームプロファイリング

RNA 結合蛋白質が対象とする制御システムは、RNA のプロセシングや RNA 量だけではない。特に、その中でも包括的な翻訳制御解析はまだまだ技術的制限があった。その中で Ingolia らが開発したリボソームプロファイリング法は、RNA を対象とするシーケンス技術で、細胞内の蛋白質レベルをモニターすることに成功した²¹⁾²²⁾。原理は、細胞中の翻訳状態を、翻訳阻害剤シクロヘキシムドでリボソームの挙動を停止させ、次に、RNase 処理により、リボソームでに取り込まれていない RNA を除去し、まさにリボソームでマスクされている RNA 約 26-28 塩基のみを生け捕り

にし、シークエンス解析するという方法であった。これを全 RNA シークエンスのデータからリボソームでマスクされた断片の発現量を標準化することで、翻訳効率を定量化するという戦略である。他にも、翻訳開始点の同定などにも応用可能であるが、本手法により RNA を測定する事で、細胞内の蛋白質レベルと比較的、相関性高く解析が可能となった。

神経発生学、神経疾患病態解明における RNA 結合蛋白質の解析

RNA 結合蛋白質解析の新技術は、神経発生学や神経疾患病態解明の研究にも適応されてきた²³⁾。前述の傍腫瘍性神経症候群の標的抗原として同定された Nova 蛋白質は、世界で初めて同定された神経特異的スプライシング因子であるが、前項の包括的解析技術により、シナプス関連遺伝子を中心とした ~600 近くの選択的スプライシングエクソンの制御を担っていることが明らかになった²⁴⁾。一方で、そのファミリー分子 Nova2 の欠損マウスの神経発生学的解析を行った結果、大脳新皮質興奮性神経細胞と小脳プルキンエ細胞の放射状神経細胞移動の異常所見、特にリーリンシグナル伝達系の変異マウスと同等の表現型が観察された。野生型、Nova2 欠損マウス胎生期の脳組織を用いた HITS-CLIP 解析および Exon-Junction マイクロアレイ解析によるスクリーニングの結果と発生生物学的解析を組み合わせる事により、リーリン受容体のアダプター分子 Dab1 遺伝子の Exon7bc の上流の Nova2 結合領域が神経細胞移動異常の原因領域として同定された²⁵⁾。また、逆のアプローチとして、同じくスプライシング因子である RNA 結合蛋白質 Ptpb2 解析では、Ptpb2 の包括的な遺伝子発現制御プログラムから予想された生物学的イベントの中でも、従来 Ptpb2 研究からの機能では想定外であった細胞増殖異常が組織学的解析所見により確認することができた²⁶⁾。

一方、神経変性疾患の原因遺伝子である TDP43 や FUS といった RNA 結合蛋白質の機能解析で上述の新しい解析技術を使った研究は、熾烈な競争

が予想される中、様々なグループから報告が相次いだ^{27)–29)}。こういった解析技術を扱う事で、現在迄ある一定の病態の原因となる RNA 遺伝子発現プログラムの理解が深まって来ている。今後これらの暗号を読み解くこと、および RNA 結合蛋白質を原因とした神経疾患に対する iPS 細胞技術の導入による in vitro モデル解析³⁰⁾ を組み合わせることで、有用な治療や再生医療のツールが産まれることが期待される。今後も次世代の技術開発と同時に並行しながら RNA 結合蛋白質による高次複雑系細胞機能の理解へ向けた研究が進展していくことを夢見ている。

文 献

- 1) Gerstberger S, Hafner M and Tuschl T: A census of human RNA-binding proteins. *Nat Rev Genet* 15, 829–845, 2014.
- 2) Szabo A, Dalmau J, Manley G, Rosenfeld M, Wong E, Henson J, Posner JB and Furneaux HM: HuD, a paraneoplastic encephalomyelitis antigen, contains RNA-binding domains and is homologous to Elav and Sex-lethal. *Cell* 67, 325–333, 1991.
- 3) Buckanovich RJ, Posner JB and Darnell RB: Nova, the paraneoplastic Ri antigen, is homologous to an RNA-binding protein and is specifically expressed in the developing motor system. *Neuron* 11, 657–672, 1993.
- 4) Neumann M, Sampathu DM, Kwong LK, Truax AC, Micsenyi MC, Chou TT, Bruce J, Schuck T, Grossman M, Clark CM, McCluskey LF, Miller BL, Masliah E, Mackenzie IR, Feldman H, Feiden W, Kretzschmar HA, Trojanowski JQ and Lee VM: Ubiquitinated TDP-43 in frontotemporal lobar degeneration and amyotrophic lateral sclerosis. *Science* 314, 130–133, 2006.
- 5) Arai T, Hasegawa M, Akiyama H, Ikeda K, Nonaka T, Mori H, Mann D, Tsuchiya K, Yoshida M, Hashizume Y and Oda T: TDP-43 is a component of ubiquitin-positive tau-negative inclusions in frontotemporal lobar degeneration and amyotrophic lateral sclerosis. *Biochem Biophys*

- Res Commun* 351, 602 - 611, 2006.
- 6) Ling SC, Polymenidou M and Cleveland DW: Converging mechanisms in ALS and FTD: disrupted RNA and protein homeostasis. *Neuron* 79, 416 - 438, 2013.
 - 7) Darnell JC and Klann E: The translation of translational control by FMRP: therapeutic targets for FXS. *Nat Neurosci* 16, 1530 - 1536, 2013.
 - 8) Lagier - Tourenne C, Polymenidou M and Cleveland DW: TDP - 43 and FUS/TLS: emerging roles in RNA processing and neurodegeneration. *Hum Mol Genet* 19, R46 - 64, 2010.
 - 9) Kim HJ, Kim NC, Wang YD, Scarborough EA, Moore J, Diaz Z, MacLea KS, Freibaum B, Li S, Molliex A, Kanagaraj AP, Carter R, Boylan KB, Wojtas AM, Rademakers R, Pinkus JL, Greenberg SA, Trojanowski JQ, Traynor BJ, Smith BN, Topp S, Gkazi AS, Miller J, Shaw CE, Kottlors M, Kirschner J, Pestronk A, Li YR, Ford AF, Giller AD, Benatar M, King OD, Kimonis VE, Ross ED, Weihl CC, Shorter J and Taylor JP: Mutations in prion - like domains in hnRNPA2B1 and hnRNPA1 cause multisystem proteinopathy and ALS. *Nature* 495, 467 - 473, 2013.
 - 10) Fujioka Y, Ishigaki S, Masuda A, Iguchi Y, Udagawa T, Watanabe H, Katsuno M, Ohno K and Sobue G: FUS - regulated region - and cell - type - specific transcriptome is associated with cell selectivity in ALS/FTLD. *Sci Rep* 3, 2388, 2013.
 - 11) Luna JM, Scheel TK, Danino T, Shaw KS, Mele A, Fak JJ, Nishiuchi E, Takacs CN, Catanese MT, de Jong YP, Jacobson IM, Rice CM and Darnell RB: Hepatitis C Virus RNA Functionally Sequesters miR - 122. *Cell* 160, 1099 - 1110, 2015.
 - 12) Janssen HL, Reesink HW, Lawitz EJ, Zeuzem S, Rodriguez - Torres M, Patel K, van der Meer AJ, Patick AK, Chen A, Zhou Y, Persson R, King BD, Kauppinen S, Levin AA and Hodges MR: Treatment of HCV infection by targeting microRNA. *N Engl J Med* 368, 1685 - 1694, 2013.
 - 13) Hua Y, Sahashi K, Rigo F, Hung G, Horev G, Bennett CF and Krainer AR: Peripheral SMN restoration is essential for long - term rescue of a severe spinal muscular atrophy mouse model. *Nature* 478, 123 - 126, 2011.
 - 14) Naryshkin NA, Weetall M, Dakka A, Narasimhan J, Zhao X, Feng Z, Ling KK, Karp GM, Qi H, Woll MG, Chen G, Zhang N, Gabbeta V, Vazirani P, Bhattacharyya A, Furia B, Risher N, Sheedy J, Kong R, Ma J, Turpoff A, Lee CS, Zhang X, Moon YC, Trifillis P, Welch EM, Colacino JM, Babiak J, Almstead NG, Peltz SW, Eng LA, Chen KS, Mull JL, Lynes MS, Rubin LL, Fontoura P, Santarelli L, Haehnke D, McCarthy KD, Schmucki R, Ebeling M, Sivaramakrishnan M, Ko CP, Paushkin SV, Ratni H, Gerlach I, Ghosh A and Metzger F: Motor neuron disease. SMN2 splicing modifiers improve motor function and longevity in mice with spinal muscular atrophy. *Science* 345, 688 - 693, 2014.
 - 15) Darnell RB: HITS - CLIP: panoramic views of protein - RNA regulation in living cells. *Wiley Interdiscip Rev RNA* 1, 266 - 286, 2010.
 - 16) Licatalosi DD, Mele A, Fak JJ, Ule J, Kayikci M, Chi SW, Clark TA, Schweitzer AC, Blume JE, Wang X, Darnell JC and Darnell RB: HITS - CLIP yields genome - wide insights into brain alternative RNA processing. *Nature* 456, 464 - 469, 2008.
 - 17) Moore MJ, Zhang C, Gantman EC, Mele A, Darnell JC and Darnell RB: Mapping Argonaute and conventional RNA - binding protein interactions with RNA at single - nucleotide resolution using HITS - CLIP and CIMS analysis. *Nat Protoc* 9, 263 - 293, 2014.
 - 18) 大塚貴文, 矢野真人, 岡野栄之: 脳内における蛋白質 - RNA相互作用の検出とその応用. *Medical Science Digest* 6月増刊号 RNA疾患, 326 - 329, 2014.
 - 19) Ule J, Ule A, Spencer J, Williams A, Hu JS, Cline M, Wang H, Clark T, Fraser C, Ruggiu M, Zeeberg BR, Kane D, Weinstein JN, Blume J and Darnell RB: Nova regulates brain - specific splicing to shape the synapse. *Nat Genet* 37, 844 - 852, 2005.
 - 20) Wang ET, Sandberg R, Luo S, Khrebtkova I, Zhang L, Mayr C, Kingsmore SF, Schroth GP and Burge CB: Alternative isoform regulation in

- human tissue transcriptomes. *Nature* 456, 470 - 476, 2008.
- 21) Ingolia NT, Ghaemmaghami S, Newman JR and Weissman JS: Genome - wide analysis in vivo of translation with nucleotide resolution using ribosome profiling. *Science* 324, 218 - 223, 2009.
- 22) Ingolia NT, Lareau LF and Weissman JS: Ribosome profiling of mouse embryonic stem cells reveals the complexity and dynamics of mammalian proteomes. *Cell* 147, 789 - 802, 2011.
- 23) Yano M, Ohtsuka T and Okano H: RNA - binding protein research with transcriptome - wide technologies in neural development, *Cell Tissue Res* 359, 135 - 144, 2015.
- 24) Zhang C, Frias MA, Mele A, Ruggiu M, Eom T, Marney CB, Wang H, Licatalosi DD, Fak JJ and Darnell RB: Integrative modeling defines the Nova splicing - regulatory network and its combinatorial controls. *Science* 329, 439 - 443, 2010.
- 25) Yano M, Hayakawa - Yano Y, Mele A and Darnell RB: Nova 2 regulates neuronal migration through an RNA switch in disabled - 1 signaling. *Neuron* 66, 848 - 858, 2010.
- 26) Licatalosi DD, Yano M, Fak JJ, Mele A, Grabinski SE, Zhang C and Darnell RB: Ptpb2 represses adult - specific splicing to regulate the generation of neuronal precursors in the embryonic brain. *Genes Dev* 26, 1626 - 1642, 2012.
- 27) Polymenidou M, Lagier - Tourenne C, Hutt KR, Huelga SC, Moran J, Liang TY, Ling SC, Sun E, Wancewicz E, Mazur C, Kordasiewicz H, Sedaghat Y, Donohue JP, Shiue L, Bennett CF, Yeo GW and Cleveland DW: Long pre - mRNA depletion and RNA missplicing contribute to neuronal vulnerability from loss of TDP - 43. *Nat Neurosci* 14, 459 - 468, 2011.
- 28) Lagier - Tourenne C, Polymenidou M, Hutt KR, Vu AQ, Baughn M, Huelga SC, Clutario KM, Ling SC, Liang TY, Mazur C, Wancewicz E, Kim AS, Watt A, Freir S, Hicks GG, Donohue JP, Shiue L, Bennett CF, Ravits J, Cleveland DW and Yeo GW: Divergent roles of ALS - linked proteins FUS/TLS and TDP - 43 intersect in processing long pre - mRNAs. *Nat Neurosci* 15, 1488 - 1497, 2012.
- 29) Tollervey JR, Curk T, Rogelj B, Briese M, Cereda M, Kayikci M, Konig J, Hortobagyi T, Nishimura AL, Zupunski V, Patani R, Chndran S, Rot G, Zupan B, Shaw CE and Ule J: Characterizing the RNA targets and position - dependent splicing regulation by TDP - 43. *Nat Neurosci* 14, 452 - 458, 2011.
- 30) Ichiyanagi N, Fujimori K, Yano M, Ishihara - Fujisaki C, Sone T, Akiyama T, Okada Y, Akamatsu W, Matsumoto M, Ishikawa M, Nishimoto Y, Ishihara Y, Sakuma T, Yamamoto T, Tsuiji H, Suzuki N, Warita H, Aoki M and Okano H: Establishment of in vitro FUS - associated Familial Amyotrophic Lateral Sclerosis Model Using Human Induced Pluripotent Stem Cells. *Stem Cell Reports*. in press 2016.
-