

前頭側頭型認知症 iPS 神経細胞を活用したリピート翻訳制御機構の解析

森 康治

大阪大学 大学院医学系研究科 精神医学

【研究の背景】

FTD は常同行動、脱抑制的な性格変化、進行性失語などを呈し、特に介護者や社会への負担が大きい認知症である。*C9orf72* リピート伸長変異例の多くでは GGGGCC (G_4C_2) 6塩基が数百回程度以上反復しており、これにより FTD やその類縁疾患である筋萎縮性側索硬化症 (ALS) が引き起こされる (*C9orf72* FTD/ALS)。また同変異保持者が高頻度に精神病状態を呈することも知られている。

我々は、非翻訳領域に位置するリピート配列が予想外の翻訳を受けてリピートタンパク質を生じることを明らかにし、これを dipeptide repeat protein (DPR) と命名した。

G_4C_2 リピート RNA は Repat associated non-AUG (RAN) 翻訳により3つ全ての翻訳フレームで翻訳されるため、poly-GA (グリシン-アラニン)、poly-GP (グリシン-プロリン)、poly-GR (グリシン-アルギニン) の3種類の DPR が産生される。また *C9orf72* FTD/ALS 病態においては、 G_4C_2 リピートのアンチセンス鎖にあたる C_4G_2 リピート RNA も産生され、このアンチセンス鎖リピートからも poly-PA (プロリン-アラニン)、poly-GP (グリシン-プロリン)、poly-PR (プロリン-アルギニン) の3種類の DPR が産生される。 G_4C_2 リピートに由来する DPR の中でも poly-GR は強い神経毒性を呈することが示されており、*C9orf72* FTD/ALS において神経変性を引き起こす主要な病態分子の一つとして注目されている。

【目 的】

C9orf72 変異 FTD/ALS における RAN 翻訳では翻訳フレームごとに異なる DPR が産生される。その機序はフレームごとに異なる可能性があり、また翻訳産物である DPR の毒性の強さもそれぞれ異なるため、RAN 翻訳がどの翻訳フレームで生じるかの制御機構を明らかにすることが重要である。

【方 法】

RAN 翻訳による poly-GA の発現量変化を指標として、*C9orf72* 変異 G_4C_2 リピート発現細胞系を用いた候補因子のノックダウンを行い、同定した候補因子について様々な角度から RAN 翻訳への影響を検討した。続いて *C9orf72*-FTD/ALS 患者由来 iPS 細胞を用いて *C9orf72* 変異における RAN 翻訳フレームの制御機構について検討を試みた。

【結 果】

我々は *C9orf72* 変異 G_4C_2 リピート発現細胞系を用いた検討から、翻訳開始因子の一つである eIF5 の発現抑制が poly-GA の RAN 翻訳を減弱することを見いだした。また逆に eIF5 を過剰発現させると、poly-GA の RAN 翻訳が選択的に増強した。通常の翻訳は開始コドンである AUG コドンから生じるが、リピート 5' 側上流配列に存在する開始コドン類似コドン (near cognate codon) である CUG コドンに点変異を導入すると eIF5 の poly-GA RAN 翻訳促進効果は失われた。また eIF5 の内因性活性である GTPase Accelerating Protein 活性を失活させると eIF5 の効果は減弱した。すなわち RAN 翻訳において eIF5 は GTPase Accelerating Protein 活性により特定の CUG コドンに作用して、poly-GA の翻訳を選択的に増強すると考

えられた。

続いて、患者由来細胞での検証を行うために、京都大学より *C9orf72* 患者および健常対象者由来の iPS 細胞の供与および技術指導を受け、当研究室で iPS 由来神経細胞の培養系を樹立することに成功した。しかし、同 iPS 細胞由来を神経細胞に分化させ poly-GA DPR の検出を試みたが、明らかな DPR 由来のシグナルを検出するに至らなかった。

一方で、近畿大学の永井義隆教授との共同研究において、*C9orf72* 変異 FTD/ALS ショウジョウバエモデルにおいてもショウジョウバエの eIF5 をノックダウンすることにより、poly-GA の発現量が減少することが確かめられ、eIF5 は培養細胞モデルだけでなく、in vivo モデルにおいても poly-GA RAN 翻訳を制御することが示唆された。これらの成果をまとめて、*Journal of Biological Chemistry* 誌に責任著者として論文報告した¹⁾。

また G₄C₂ リピート RNA 結合タンパク質である hnRNPA3 を介した G₄C₂ リピート RNA 分解経路を明らかにしようとする研究において hnRNPA3 がリピート RNA の分解を促進する作用とは別に RAN 翻訳を抑制する作用も持つことを偶発的に明らかにして責任著者として論文報告した^{2,3)}。

【考 察】

RNA 翻訳の制御機構は複雑であり、そのリピートの配列自体により影響されるのみならず、そのリピートのおかれた文脈、すなわちリピートの周辺配列によっても影響される。本研究では、*C9orf72*-FTD/ALS の培養細胞モデルやショウジョウバエモデルにおいて、翻訳開始因子の一つである eIF5 が開始コドン認識の正確性を緩め、CUG コドンという near cognate コドンを介して non-AUG 翻訳を促進することが poly-GA の発現量を増加させる機序であると考えられた。一方で、他の2つの翻訳フレームへの影響や検出感度の向上による患者由来細胞を用いた内因性 DPR での検証については今後の検討課題である。

【臨床的意義・臨床への貢献度】

本研究の成果は RAN 翻訳のメカニズムとその適切な制御方法を明らかにし、*C9orf72*-FTD/ALS を始めとしたリピート伸長変異による神経変性疾患の治療法開発に繋げるものである。近年自閉スペクトラム障害の一部の症例でもリピート伸長変異がみられることも報告されており、リピート関連疾患の範疇は神経変性疾患にとどまらない。本研究の成果は RAN 翻訳を標的とした様々な疾患に対する治療法開発に寄与するものとする。

【参考・引用文献】

1. Gotoh S, *Mori K, Fujino Y, Kawabe Y, Yamashita T, Omi T, Nagata K, Tagami S, Nagai Y, Ikeda M. eIF5 stimulates the CUG initiation of RAN translation of poly-GA dipeptide repeat protein (DPR) in *C9orf72* FTLD/ALS *Journal of Biological Chemistry* 300(3), 105703, 2024
2. Uozumi R, *Mori K, Gotoh S, Miyamoto T, Kondo S, Yamashita T, Kawabe Y, Tagami S, Akamine S, Ikeda M. PABPC1 mediates degradation of *C9orf72*-FTLD/ALS GGGGCC repeat RNA *iScience* 27(3):109303, 2024
3. Uozumi R, *Mori K, Akamine S, Ikeda M. Peroxidase APEX2 Proximity Biotin Labeling for Identifying Endogenous Interactors of RNA-binding Proteins in Mammalian Cells *STAR Protocols* 5, 103368, 2024