

RNA 結合蛋白質の機能解析 －柔軟かつ堅牢性の高い脳の組織、 細胞機能を包括的に理解する－



東京慈恵会医科大学・総合医科学研究センター 基盤研究施設
副施設長 矢野 真人

はじめに

RNA 結合蛋白質 (RNA-binding proteins ; RBPs) は、細胞内における遺伝子情報発現を制御する因子群であり、非コード RNA を含む全ての RNA を対象として、スプライシング、ポリアダニル化、核外輸送、局在、安定性、翻訳など多岐にわたる RNA 階層性の転写後調節プロセスに関与している。2012年、Castello らは、UV 照射により細胞内蛋白質-RNA 複合体の精製を基盤とする mRNA キャプチャー法によって RNA 結合蛋白質群を網羅的に同定した¹⁾。さらに2014年には、Gerstberger らの総説によって、ヒトにおける RNA 結合蛋白質は1,542種類に見積もられ、現在まで10年間、この数字が数多く引用され定義づけられている²⁾。

RNA 結合蛋白質研究の進展は、現代の生命科学を方向づける革新的発見とも関連が強い。たとえば、RNA 誘導型サイレンシング複合体 (RISC) の中心構成因子である Argonaute (AGO) 蛋白質や、RNA ガイド依存的に DNA を切断する CRISPR-Cas9 システムの中心酵素 Cas9 は、いずれも RNA 結合能を有する RNA 結合蛋白質である。これらを中心とした研究とライフテクノロジーの分子基盤に関する研究成果は、それぞれ2024年 (miRNA)、2020年 (ゲノム編集) にノーベル賞を受賞している。また、2023年にノーベル生理学・医学賞を受賞したシュドウリジン化した mRNA ワクチンに関する研究もまた、RNA 結合蛋白質機能が中心的な役割を果たしている蛋白質合成・翻訳制御に関するものである。このように、ほんの数年間で、RNA と蛋白質の相互作用を基盤とした制御系は、生命科学、医学からバ

イオテクノロジーまで幅広い可能性を象徴するものとなっている。本総説では、自身のこれまでの研究成果を踏まえつつ、近年に解明が進んでいる RNA 結合蛋白質の機能的多様性と、それが関与する疾患との関連性、さらに基礎研究を基盤とする治療戦略・応用について紹介したい。特に、RNA 階層における RNA 結合蛋白質の制御機構に焦点を当て、その解析技術の進展とともに、神経発生・神経疾患やがんなどにおける RNA 代謝の破綻がもたらす分子病態メカニズムとその応用までを概説する。

1. RNA 結合蛋白質研究はやはり茨の道なのか

ヒトで1,542種類と言われる RNA 結合蛋白質は、各々が数百～数千におよぶ膨大な RNA 標的群を持ち、かつ多岐にわたる RNA 制御機構 (スプライシングから翻訳制御など) を有する。このことは、RNA 結合蛋白質が遺伝子発現の複雑な制御ネットワークの中心的構成要素として機能することを示しており、細胞の応答性や多様性を支える源泉ともいえる。一方で、これらの分子群は多岐にわたる冗長的な制御系を担う事で、細胞・組織の堅牢性に重要な役割を果たしている。すなわち、「複雑性の増大」と「柔軟性・堅牢性」という、ある種相反する2つの性質は、この分子群に共存している点が非常に興味深く面白いところである。また同時に、解析における困難さを象徴する要素ともなっている。

我々の解析で、筋萎縮性側索硬化症 (ALS) の原因遺伝子である *FUS* 変異を有する iPS-ALS 細胞モデルを用い、運動ニューロンへの分化ステージや *FUS* 変異のホモ接合体/ヘテロ接合体といっ

た複数条件（計60サンプル）から得られたトランスクリプトームデータを統合的に解析した結果がある。これに対し、1,000種類以上のRNA結合蛋白質群間の制御的相互関係に注目し、ベイジアンネットワーク解析を適用することで、RNA結合蛋白質間の階層構造や情報伝達の方角性を可視化する試みを行った。その結果得られたネットワーク構造は、各ノードがRNA結合蛋白質を示し、それらが因果関係を持って矢印で接続される複雑な構造体であり、まさにRNA結合蛋白質研究の難解性を視覚的に表現するものとなった（図1）³⁾。加えて、個々のRNA結合蛋白質ノードはそれぞれが膨大な標的となるRNAを制御しており、それらの機能的解釈にはさらなる深掘りが必要となり途方も無い印象を与える。

このような背景のもと、我々は以下の三段階の問いを軸に、各々のRNA結合蛋白質研究を進める戦略が、困難ながらも着実な理解へとつながる道であると考えた。

- ① 個々のRNA結合蛋白質の「RNA暗号」の解読は可能か？
- ② RNA暗号の解読から、分子機構／生物学的情報を導き出せるか？
- ③ その知見を活かした疾患応用とつながり得るか？

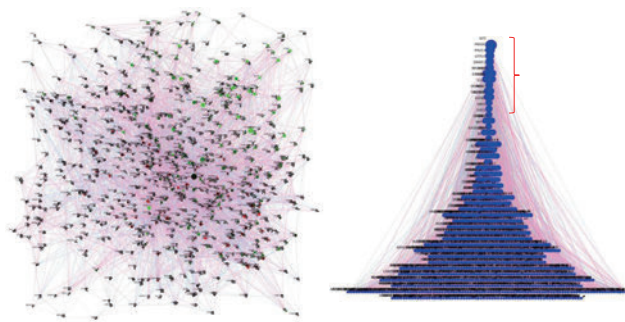


図1 RBPネットワークとRBPノードの階層構造の可視化（iBRN解析：文献3より改変）

以降の節では、上記の問いに対するこれまでの我々の研究の進展を概観するとともに、RNA結合蛋白質解析技術の進歩と限界を踏まえ、今後の解析戦略の在り方、ならびにRNA結合蛋白質研究が持つ生物学的・臨床的ポテンシャルについて考察したい。

2. 神経発生におけるRNA結合蛋白質機能の解析：(Nova2およびQki5)

本節では、神経発生をモデルとして、神経特異的RNA結合蛋白質であるNova2およびQki5の解析から得られた知見を中心に、RNA結合蛋白質が果たす機能的意義について概説する。まず、上記3つの問いを大きく進展させた解析手法が、*in vivo*におけるRNA-蛋白質相互作用を網羅的かつ高精度に解析可能な技術であるHITS-CLIP（high-throughput sequencing of RNA isolated by crosslinking immunoprecipitation）である⁴⁾。我々は、この技術を神経発生学研究に適用することで、神経特異的RNA結合蛋白質であるNova2が、Reelin-Dab1シグナル経路を介して大脳皮質における神経細胞の移動に関与することを示す事ができた。Nova2欠損マウスでは、大脳皮質および小脳プルキンエ細胞における移動異常が認められ、その表現型はReelin経路の関連因子の欠損マウスにおける発生異常と類似している。また、この知見は、RNA結合蛋白質が大脳新皮質の発生過程において機能的に重要な役割を果たすことを世界で初めて実証するとともに、その原因となる*Dab1*遺伝子のintron領域のRNA暗号領域であるYCAY配列の作動部位の同定までを明らかにした⁵⁾。

次に、我々は、胎生期マウス脳において神経細胞を生み出す細胞である神経幹細胞特異的に発現するQki5を発見した。Qki5は、神経幹細胞から神経前駆細胞への分化において、一過的に発現するTbr2陽性細胞において急速に発現が消失することから、その組織学的な発現パターンから幹細胞性の維持に関与する可能性を類推した（図2）。この仮説を検証するため、遺伝子改変マウスを用いたトランスクリプトーム解析とHITS-CLIPを統合した解析により、Qki5の標的RNA群を同定した。その結果、約850の標的RNAが同定され、特に β -cateninシグナル経路を介した神経幹細胞性の制御に関与することが示された⁶⁾。この研究で、我々はHITS-CLIP技術の改良により、Qki5のRNA結合部位であるACUAAY配列を1塩基解像度でトランスクリプトーム全体にわたってマッピングすることにも成功している^{6), 7)}。

これらの知見をまとめると、それぞれ分化段階

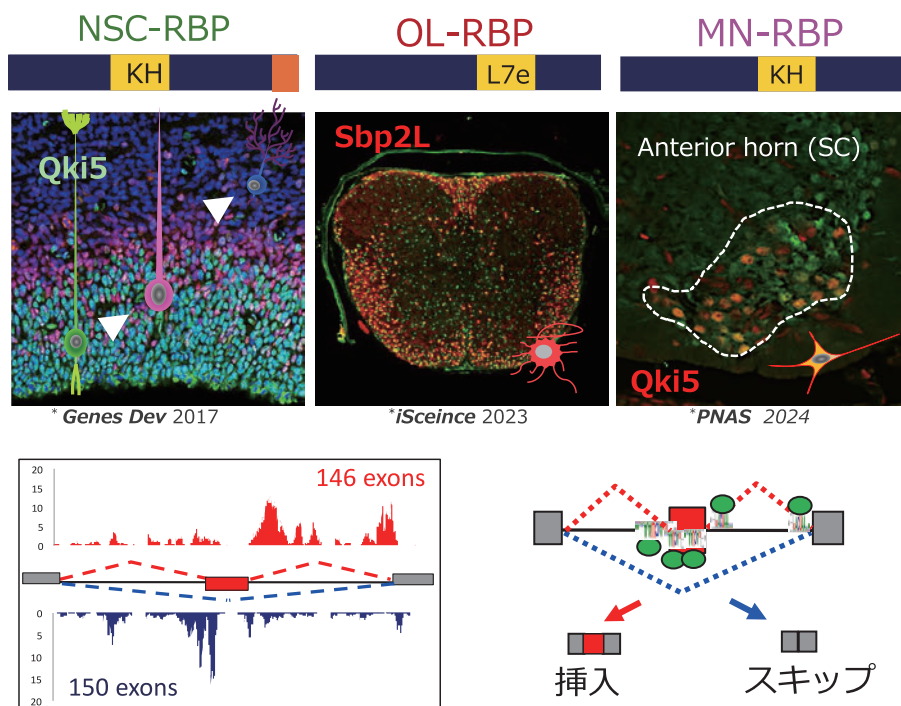


図2 神経系細胞タイプ RBP の組織学的解析と RNA 結合部位依存性スプライシングルール確立 (文献 6、10、11より改変)

の細胞に固有の RNA 結合蛋白質が神経幹細胞から神経細胞への分化遷移において、選択的スプライシングを介して細胞分化を特徴づける RNA 制御ネットワークを構築していることを示している。また、RNA 結合蛋白質による「RNA 暗号」の解釈は、特定の細胞で発現する選択的スプライシングの制御機構が、RNA 結合部位に依存した制御ルールによって担われ、そしてそれぞれの細胞らしさを規定する役割を持つことを示した。

3. 神経系細胞タイプ特異的 RBP と RNA 暗号

Gerstberger らの総説で、RNA 結合蛋白質とその類似分子である DNA 結合蛋白質を比較して、これらの因子群の組織特異性を示す発現の割合を数値化した研究がある。その結果は、DNA 結合蛋白質（転写因子を含む）と比較して明らかに RNA 結合蛋白質の組織特異的発現性が低いものとして見積もられた²⁾。細胞タイプを規定する因子がそれぞれの細胞特異的な転写産物で決定する事を想定すると、その上位因子として転写因子が働く事に異論はなく、その発現パターンの局限は美しく見事である。また、線維芽細胞を用いた分化誘導実験によりその特定の神経細胞群の誘導にもこれらの転写因子が用いられ、細胞運命決定因

子として位置付けられている⁸⁾。一方で、歴史的にも神経幹細胞因子 Msi1 や神経特異的のマーカとして、Hu、Nova や RbFox3 (NeuN 抗原) といった RNA 結合蛋白質も細胞マーカーとしてバイオインフォマティクス全盛期の現代よりかなり以前より扱われてきた⁹⁾。

そこで、我々は、各臓器の組織ごとのパターンよりもさらに詳細に脳内の細胞タイプまで分類したトランスクリプトーム情報を用いて、1,542 の RNA 結合蛋白質群について、バイオインフォマティクス解析によって細胞タイプ特異的発現を

PSI 解析によって数値化し RNA 結合蛋白質の分類を試みた。予想通りか、個人的には驚くべき結果ではあったが、神経軸索の跳躍伝導を担うオリゴデンドロサイト (OL: 希突起膠細胞) 特異的 RNA 結合蛋白質の探索で、当時、機能未知であった Secisbp2l を含むたった 2 個が OL 特異的 RNA 結合蛋白質であるという結果となった (図 2)。Secisbp2l 蛋白質は、L7e という RNA 結合性のドメインを持つ蛋白質で、RNA 暗号のような一次配列を認識するというより Secis エlement と呼ばれるキンクタン構造性の RNA を認識する Secisbp2 という似て非なる RNA 結合蛋白質のオースログ蛋白質であった。現在のところ、その RNA 暗号の解釈は未完成のままである。ところが、Secisbp2l 蛋白質、それ自身は、発現パターンを反映するように、*Secisbp2l* 欠損マウスや初代培養の OPC 分化モデルのノックダウン実験では、細胞そのものの生存を犯すことなく、オリゴデンドロサイトを固有とするコレステロール生合成経路を制御する転写因子 Tcf712 の翻訳レベルでの量調節を担う分子であることを明らかにした¹⁰⁾。

さらに我々は、さまざまな種類の神経細胞の中で、運動ニューロンにおいてのみ発現する RNA 結合蛋白質として Qki5 を同定した。Qki5 は脊髄

運動ニューロンに特異的に発現する RNA 結合蛋白質で、図 2 に示す RNA 結合部位依存的な選択的スプライシング制御の ON/OFF のもとで、運動ニューロンの特性を規定している事を見出した（図 2）。具体的には、Qki5 制御下にある選択的スプライシングエクソン群に対して、ニューロン vs オリゴデンドロサイトで特異的なスプライシングパターンを示す遺伝子群との比較解析で、Qki5 欠失の運動ニューロンでは、皮質ニューロン（通常、Qki5 が発現していない細胞）のスプライシングパターンに階層化される事が分かった。すなわち、Qki5 は神経細胞そのものの特性ではなく、運動ニューロン性の RNA 制御を担っていると考えられる。実際、Qki5 の運動ニューロン特異的欠損マウスでは、組織学的な解析により遅発性の運動神経変性を示し、バーグリッブ試験では前肢の筋力低下が雌雄の両方で確認され、生後 1 歳齢以上のマウスでは、筋力低下に伴う脊椎後弯症を示す所見が得られている¹¹⁾。

4. RBP を介した RNA 制御と治療応用の展開

RNA 結合蛋白質解析における主要な三つの問いのうち、①②にあたる CLIP 法などを用いた RNA 認識コードの抽出と、RNA 結合蛋白質による制御機構の解明、特にスプライシングに関する制御ルールについては、実験的・計算的技術の進歩により飛躍的な進展が見られた。一方で、OL 特異的 RNA 結合蛋白質である Secisbp21 では、構造的 RNA を標的として、*in vivo* における RNA 相互作用の解析においてまだまだ研究手法の改変が必要である。さらに、翻訳制御ルールの全貌解明や非コード RNA についても複雑なステップが存在し課題がある。こうした背景を踏まえ、本節では、研究が進んでいる選択的スプライシング制御を標的とした③治療応用の可能性に焦点を当ててみたい。

ヒトの蛋白質コード遺伝子の約 90 ~ 95% が選択的スプライシング制御を受けることが知られており、1 つの遺伝子から複数の mRNA 転写産物、蛋白質アイソフォームを産み出す事ができる¹²⁾。すなわち、この過程で、類似した構造を持ちながら機能的な差異を有する蛋白質が産生される。この時生じる疾患特異的に発現するアイソフォーム

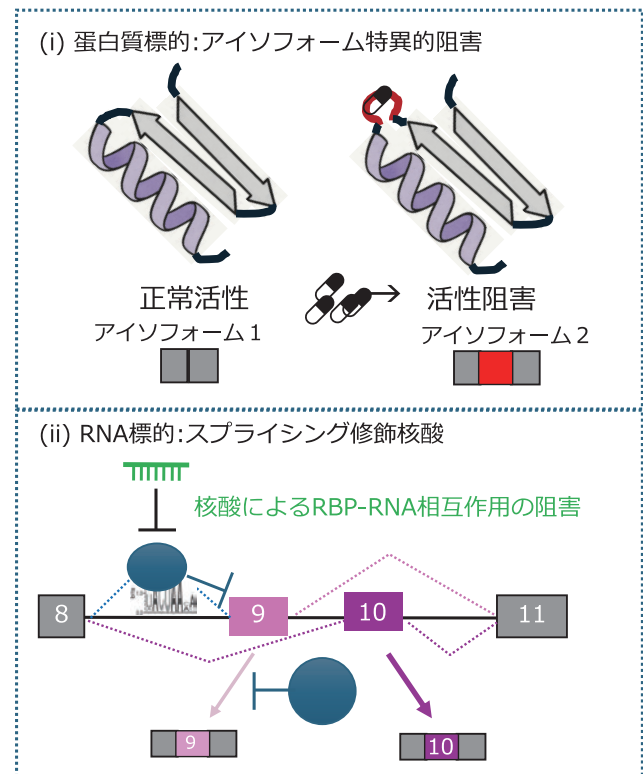


図 3 RBP による選択的スプライシング制御を基にした治療応用戦略。(i) 蛋白質標的（低分子化合物）, (ii) RNA 標的（核酸）（文献13参照）

に対し、(i) 蛋白質標的：例、特異的 exon のコード領域を標的とする、(ii) RNA 標的：スプライシング修飾といった治療戦略が提案・研究されている¹³⁾（図 3）。まず、(i) では、小腸特異的に発現する MLCK1 蛋白質の選択的スプライシングにより、蛋白質構造上に付記された IgCAM ドメインを選択的に結合する低分子化合物で、その酵素活性を阻害することで、炎症性腸疾患において副作用を回避しながら高い治療効果を実現した例が報告されている¹⁴⁾。次に注目されるのが、(ii) スプライシング制御そのものを治療対象としたアプローチである。その代表例が、脊髄性筋萎縮症（SMA）における SMN2 遺伝子を標的としたアンチセンスオリゴヌクレオチド（ASO）治療である。SMA は運動ニューロン病の 1 つである遺伝性疾患であり、SMN1 遺伝子の機能喪失が原因となるが、類似遺伝子 SMN2 のスプライシング制御により、機能的な SMN タンパク質の産生を補完することが可能となる。このスプライシング調節に関与する RNA 結合蛋白質の RNA 結合部位に対する ASO の導入によって、SMN2 遺伝子

からのエクソン7の包含を促進し、症状の改善が得られた¹⁵⁾。2017年にはヒトへの第III相臨床試験に成功し、治療不可能とされた神経疾患に対する運動機能改善のブレイクスルーとなった¹⁶⁾。この成果を追従するように、RNA結合蛋白質とRNAの相互作用を精密に標的化することによってスプライシング制御を操作する治療法は、現在も多くの疾患への応用が模索されている。たとえば、アルツハイマー病(AD)のリスク遺伝子ApoEとの関連から、アポリポ蛋白E受容体2(ApoER2)は、脳の学習、記憶に関与し、ADとの関与も提唱されている。このApoER2のExon19のスプライシングスイッチ核酸は、RNA結合蛋白質SRSF1のRNA相互作用を阻害し、Exon19スプライシングを増大させ、Exon19を含むApoER2の機能低下したADモデルマウスのシナプス機能、運動・記憶の改善が報告されている¹⁷⁾。タウオパチーでは、原因遺伝子であるMAPT遺伝子Exon10の挿入と欠失により4RTauと3RTauの過剰産生が病態となっている。このExon10の選択的スプライシングのバランスが鍵を握るが、このExon10のスプライシングスイッチを担うそれぞれ両方向性に寄与するASOの開発が進み、臨床研究への期待が高まっている^{18),19)}。異常スプライシングによる病態に対して、スプライシング修飾薬(splice-modulating drugs)による介入も今後ますます注目されている。例えば、前述のSMN遺伝子のスプライシング修飾薬の開発も進んでいるが、その低分子化合物の中には、SMN蛋白質の増大に加えて、網羅的解析から偽エクソン挿入の誘導によりHtt蛋白質の発現低下も誘導する事が確かめられ、ハンチントン病治療の可能性も秘めているなどで注目されている²⁰⁾。

ヒト遺伝性疾患のうち、約10%がスプライシング部位の変異に起因するとされている。その他のイントロンやノンコーディングRNAを含む領域の変異を持つ遺伝性疾患においても、何らかのRNA階層性の制御に起因するものが含まれる事が想定され、ヒト遺伝性疾患におけるRNA階層性に基づく病態の割合は、かなりを占めると考えられている。つまり、RNA結合蛋白質によるRNA階層性の基礎研究は、普く通ずる疾患研究の基盤となり、治療標的・応用としての可能性を

大きく広げている事が伺える。

おわりに：RBP研究の10年と未来展望

筆者は、組織や細胞タイプに特徴的な発現パターンを示すRNA結合蛋白質に着目して研究を行ってきた。特に、特定の細胞群に着目する事で、その細胞固有のRNA階層性制御の仕組みを理解し、またその弱点を知る事ができるのではないかと考えてきた。HITS-CLIPなどの技術を駆使する事で、RNA結合蛋白質のRNA結合部位を認識し、その制御メカニズムをルールアウトし、細胞機能の解明までをProof-of-Conceptとした。細胞タイプごとのスプライシングのメカニズムという意味では、包括的な理解が深まったと言えるところまできた。一方で、RNA制御ネットワークの全貌や病態を把握するという意味において、依然として問題は山積みである。むしろ、最初に記した①RNA暗号解読、②生理機能解明、③応用、の三段階の道筋における技術的な修正に加えて、従来の理解、理論に対する問いそのものやRNA結合蛋白質研究のアプローチ自体の再構築が迫られていると考えている。

そんな中で、新潟医学会誌に「RNA結合蛋白質研究最前線」というテーマで総説を執筆してから、すでに10年の歳月が流れた。この間、RNA生物学は目覚ましい進展を遂げ、miRNA/RISC、Cas9やmRNAワクチンなどがノーベル賞に輝いたことは記憶に新しい。また、2017年に脊髄性筋萎縮症(SMA)に対するASO治療が臨床応用されたことは、RNA制御の基礎研究が、いかに迅速に医療へと橋渡しされるかを示す象徴的な成果であった。

今後は、RNA結合蛋白質とRNAの動的な相互作用をリアルタイムで捉える新技術の開発や、空間的・時間的制御を視野に入れた高次解析が鍵を握ると考えられる。そして、何よりも重要なのは、RNA生物学の進展が単なる学術的好奇心の追求にとどまらず、患者に届く治療法や応用研究へと昇華されていくことである。RNA結合蛋白質研究は、益々発展し、基礎と臨床の境界を越え、新たな考えにより進展するものと期待される。

文献

- 1) Castello A, Fischer B, Eichelbaum K, et al : Insights into RNA biology from an atlas of mammalian mRNA-binding proteins. *Cell* 2012 ; 149 : 1393-1406.
- 2) Gerstberger S, Hafner M, Tuschl T : A census of human RNA-binding proteins. *Nat Rev Genet* 2014 ; 15 : 829-845.
- 3) Nogami M, Ishikawa M, Doi A, et al : Identification of hub molecules of FUS-ALS by Bayesian gene regulatory network analysis of iPSC model : iBRN. *Neurobiol Dis* 2021 ; 155 : 105364.
- 4) Licatalosi DD, Mele A, Fak JJ, et al : HITS-CLIP yields genome-wide insights into brain alternative RNA processing. *Nature* 2008 ; 456 : 464-469.
- 5) Yano M, Hayakawa-Yano Y, Mele A, et al : Nova 2 regulates neuronal migration through an RNA switch in disabled- 1 signaling. *Neuron* 2010 ; 66 : 848-858.
- 6) Hayakawa-Yano Y, Suyama S, Nogami M, et al : An RNA-binding protein, Qki5, regulates embryonic neural stem cells through pre-mRNA processing in cell adhesion signaling. *Genes Dev* 2017 ; 31 : 1910-1925.
- 7) Yugami M, Okano H, Nakanishi A, et al : Analysis of the nucleocytoplasmic shuttling RNA-binding protein HNRNPU using optimized HITS-CLIP method. *PLoS One* 2020 ; 15 : e0231450.
- 8) Masserdotti G, Gascón S, Götz M : Direct neuronal reprogramming : learning from and for development. *Development* 2016 ; 143 : 2494-2510.
- 9) Yano M, Hayakawa-Yano Y, Okano H : RNA regulation went wrong in neurodevelopmental disorders : The example of Msi/Elavl RNA binding proteins. *Int J Dev Neurosci* 2016 ; 55 : 124-130.
- 10) Yugami M, Hayakawa-Yano Y, Ogasawara T, et al : Sbp2l contributes to oligodendrocyte maturation through translational control in Tcf7l2 signaling. *iScience* 2023 ; 26 : 108451.
- 11) Hayakawa-Yano Y, Furukawa T, Matsuo T, et al : Qki5 safeguards spinal motor neuron function by defining the motor neuron-specific transcriptome via pre-mRNA processing. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2024 ; 121 : e2401531121.
- 12) Wang ET, Sandberg R, Luo S, et al : Alternative isoform regulation in human tissue transcriptomes. *Nature* 2008 ; 456 : 470-476.
- 13) Kjer-Hansen P, Phan TG, Weatheritt RJ : Protein isoform-centric therapeutics : expanding targets and increasing specificity. *Nat Rev Drug Discov* 2024 ; 23 : 759-779.
- 14) Graham WV, He W, Marchiando AM, et al : Intracellular MLCK1 diversion reverses barrier loss to restore mucosal homeostasis. *Nat Med* 2019 ; 25 : 690-700.
- 15) Hua Y, Sahashi K, Hung G, et al : Antisense correction of SMN2 splicing in the CNS rescues necrosis in a type III SMA mouse model. *Genes Dev* 2010 ; 24 : 1634-1644.
- 16) Finkel RS, Mercuri E, Darras BT, et al : Nusinersen versus Sham Control in Infantile-Onset Spinal Muscular Atrophy. *N Engl J Med* 2017 ; 377 : 1723-1732.
- 17) Hinrich AJ, Jodelka FM, Chang JL, et al : Therapeutic correction of ApoER2 splicing in Alzheimer's disease mice using antisense oligonucleotides. *EMBO Mol Med* 2016 ; 8 : 328-345.
- 18) Espíndola SL, Damianich A, Alvarez RJ, et al : Modulation of Tau Isoforms Imbalance Precludes Tau Pathology and Cognitive Decline in a Mouse Model of Tauopathy. *Cell Rep* 2018 ; 23 : 709-715.
- 19) Schoch KM, DeVos SL, Miller RL, et al : Increased 4 R-Tau Induces Pathological Changes in a Human-Tau Mouse Model. *Neuron* 2016 ; 90 : 941-947.
- 20) Krach F, Stemick J, Boerstler T, et al : An alternative splicing modulator decreases mutant HTT and improves the molecular fingerprint in Huntington's disease patient neurons. *Nat Commun* 2022 ; 13 : 6797.