



|              |   |
|--------------|---|
| Title        | Induced HMGA1a expression causes aberrant splicing of Presenilin-2 pre-mRNA in sporadic Alzheimer's disease                                     |
| Author(s)    | 眞部, 孝幸  |
| Citation     | 大阪大学, 2003, 博士論文  |
| Version Type |   |
| URL          | <a href="https://hdl.handle.net/11094/43894">https://hdl.handle.net/11094/43894</a>   |
| rights       |   |
| Note         | 著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、<a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed">大阪大学の博士論文について</a>をご参照ください。 |

*The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA*

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

The University of Osaka

|            |  |
|------------|--|
| 氏名         | 眞部 孝幸  |
| 博士の専攻分野の名称 | 博士(医学)   |
| 学位記番号      | 第 17576 号  |
| 学位授与年月日    | 平成15年3月25日   |
| 学位授与の要件    | 学位規則第4条第1項該当<br>医学系研究科情報伝達医学専攻   |
| 学位論文名      | Induced HMGA1a expression causes aberrant splicing of <i>Presenilin-2 pre-mRNA</i> in sporadic Alzheimer's disease.<br>(HMGA1a誘導が引き起こす、孤発性アルツハイマー病患者脳内における、<br>プレセニリン-2 遺伝子のスプライシング異常) |
| 論文審査委員     | (主査)<br>教授 遠山 正彌<br><br>(副査)<br>教授 戸田 達史 教授 長田 重一  |

## 論文内容の要旨

## 〔目的〕

近年、多くの神経変性疾患において特定遺伝子のスプライシング異常が報告されている。例えば、前頭側頭型痴呆における tau、家族性アルツハイマー病 (FAD) における Presenilin-1 (PS1) などである。このうちアルツハイマー病 (AD) は若年で発症する FAD と高齢になって発症する孤発性 AD (SAD) に分類される。最近 SAD 脳において、PS2 にも exon 5 を欠失したスプライシング変種 (PS2V) が存在し、ストレスセンサーIRE1 のリン酸化障害を引き起こし、細胞を小胞体 (ER) ストレスに対し脆弱にさせることを突き止めた。この PS2V がコードする蛋白質は SAD 脳に 100% 検出された。

そこで本研究では、PS2V の出現機構を明らかにすれば、その機序の抑制により神経細胞死を防ぐことができると考え、PS2 遺伝子の異常スプライシングを引き起こす因子の同定を試みた。

## 〔方法ならびに成績〕

まず、PS2V を產生する条件を決定するため、培養細胞を用いてどの刺激によって PS2V が產生されるか検討したところ、低酸素負荷した神経系細胞 SK-N-SH でのみ検出された。そこで、低酸素により exon 5 に正常なスプライシングを阻害するような蛋白質が結合する可能性を考え、exon 5 を含む RNA プロープを合成し、pre-mRNA 結合実験を行った。その結果、低酸素刺激下の SK-N-SH 細胞の核抽出液中に PS2 pre-mRNA に結合する約 20 kDa 蛋白質を発見した。さらに、この蛋白質は PS2 exon 5 の 3' 末端に存在する特徴的な配列に特異的に結合していることもわかった。そこでこの蛋白質を、その結合活性を指標に単離精製を行い、ペプチド配列決定を行ったところ HMGA1a を得た。HMGA1a は本来 DNA に結合する転写因子で、今回初めて pre-mRNA に結合してスプライシングに影響を与えることを示した。

次に、低酸素負荷時の HMGA1a の発現について検討するために、低酸素刺激後の HMGA1a mRNA および蛋白質発現、細胞内局在をそれぞれ観察した。その結果、HMGA1a は mRNA、蛋白質とも低酸素負荷した SK-N-SH 細胞でのみ刺激 10 時間以降発現上昇しており、核内 speckle に強く発現していた。

それでは低酸素刺激を行わなくとも HMGA1a さえ発現させれば PS2V は産生されるだろうか？ そこで、HMGA1a の発現ベクターを作成し、細胞に導入後、PS2V の検出を試みた。その結果、低酸素刺激を行っていないにも関わらず、HMGA1a の導入量依存的に PS2V が検出された。従って PS2 exon5 を欠失させる直接の原因是 HMGA1a が PS2 pre-mRNA に結合することであることが確かめられた。おもしろいことに、低酸素刺激で PS2V が検出できなかった HEK293T にも HMGA1a 強制発現すると PS2V が検出できた。これは神経細胞以外の細胞では低酸素刺激に晒されても HMGA1a の誘導が見られないために PS2V が産生されないことを強く示唆しており、AD で神経細胞のみが脆弱になる一つの理由であるかもしれない。

次に、HMGA1a が PS2 exon 5 の 3' 末端の特異的な配列に結合することに注目し、HMGA1a がこの部分に結合すると正常なスプライシングが行われる際にスプライシング必須因子 U1 snRNP が本来結合すべき exon-intron 接合部に結合できなくなるのではないかと考えた。解析の結果、U1 snRNP の構成蛋白質である U1-70K と HMGA1a が結合していること、U1-70K の導入量依存的に HMGA1a 導入によるあるいは低酸素刺激による PS2V の産生が抑えられることが明らかとなった。すなわち、HMGA1a が PS2 pre-mRNA の exon 5 の 3' 末端に結合すると、U1-70K が HMGA1a に結合してしまい U1 snRNP が 5'-スプライスサイトに結合できなくなる。その結果、exon 4 の 3' 端から exon 6 の 5' 端までが大きな intron として切り出され exon 5 が欠失することが強く示唆された。

次に、SAD 患者脳に HMGA1a 蛋白質が発現上昇しているかどうか検討した。SAD 脳および正常脳の海馬を用いたイムノプロット法および免疫組織化学法を用いた結果、対照群に比べ SAD では、錐体細胞の核内で HMGA1a 蛋白質が著明に上昇していた。

#### [ 総括 ]

これら結果から、SAD の発症の少なくとも一部は HMGA1a の発現上昇により PS2 exon 5 が欠失し、PS2V 産生を引き起こす結果である可能性が示唆される。また、今回の成果は、HMGA1a の全く新しい機能を証明すると共に、SAD 発症メカニズム解明の大きな足がかりとなる可能性が示唆される。

#### 論文審査の結果の要旨

近年、多くの神経変性疾患において、特定遺伝子のスプライシング異常が報告されている。これまでアルツハイマー病 (AD)、なかでもその 90%以上を占めると言われている孤発例 (SAD) において、プレセニリン-2 (PS2) 遺伝子のエクソン 5 を欠いたスプライシング変種 (PS2V) が高頻度に発現していること、およびこの PS2V が細胞ストレスに対する生体防御機構のひとつ unfolded protein response (UPR) のシグナル伝達を減弱させ、小胞体 (ER) 分子シャペロンの GRP78 発現誘導を負に制御していることが知られていたが、その詳細な異常スプライシングメカニズムは明らかにされていなかった。今回申請者は、HMGA1a という因子が、低酸素などの酸化ストレスが加わった時に、PS2 の pre-mRNA 上の特徴的な繰り返し配列に特異的に結合し、スプライシング必須因子である U1-70K の機能異常を引き起こすことによって、PS2V を産生させることをつきとめた。このスプライシングメカニズムの詳細な解析により、異常スプライシングを阻害する物質を用いることで、SAD 発症予防あるいは治療に役立つ可能性が示唆された。これらの結果から、SAD 脳内で発現し、神経細胞を ER ストレスに対して脆弱化させる PS2V の詳細な発現メカニズムを解明し、その発症機構解明にせまる研究成果であり、学位に値するものと考えられる。