

## 【背景】

ラージ・ミエリタンパク質ゼロ (L-MPZ, 約 36 kDa) は末梢ミエリン主要構成タンパク質であるミエリタンパク質ゼロ (P0 あるいは MPZ, 約 30 kDa) の mRNA 本来の正統なストップコドン (UAG) のリードスルー (読み飛ばし) により、読み枠を維持したまま次のストップコドン (UGA) まで合成が進み産生される新しいタイプのアイソフォームです (図 1, Yamaguchi et al., 2012)。翻訳リードスルー (翻訳時のストップコドン・リードスルー) は、ウイルスからショウジョウバエに至るまで普遍的に行われており、遺伝子数の少ない動物においてもタンパク質の多様性を生み出す重要なシステムです。高等動物でも同様のシステムが存在すると予想されていましたが、近年まで普遍的な存在は確認されていませんでした。筆者らのグループが見出した L-MPZ は、ヒトを含む哺乳類において普遍的に存在する翻訳リードスルータンパク質の初めての例です。



図 1 翻訳リードスルーと L-MPZ マウス

末梢神経系において、髄鞘 (ミエリン) は跳躍伝導だけでなく神経系の発達過程や様々な神経活動に関与します。P0 は末梢ミエリンの形成や維持に非常に重要な主要タンパク質であり、細胞外にイムノグロブリン様ドメインを持つ 1 回膜貫通型の細胞接着糖タンパク質です。細胞内には接着性の調節に関わるタンパク質キナーゼ C (PKC) リン酸化サイトを持っています。P0 遺伝子はシャルコー・マリー・トゥース病 1B 型 (CMT1B) に代表される重篤な遺伝性脱髄疾患の原因遺伝子としても知られています。シャルコー・マリー・トゥース病は原因遺伝子が特定されているものも多いですが、原因分子も変異も多岐に渡り、発症メカニズムが不明なものが多いとされており、根本的な治療法のない神経系指定難病です。

L-MPZ は、P0 の細胞内ドメインの C 末に 63 アミノ酸が付加した構造をしています。主にミエリンに存在し、その構造の大部分は P0 と同一であるため、機能的にも P0 と共通する点が多いと考えられます。また L-MPZ には P0 とは異なる新たな PKC リン酸化サイトが存在します。L-MPZ は、カエルからヒトまで発現しており (Yamaguchi et al., 2018)、またこの部分のアミノ酸配列はカエルからヒトまで相同性が高く系統的に保存されているため L-MPZ の機能に重要であると考えられます。しかしながら、生体内における L-MPZ の機能的な重要性や P0 との違い、産生制御メカニズムなどは明らかではありません。L-MPZ は P0 と共に P0 mRNA から産生されるため、機能が異なる場合、その産生量や局在などが制御されていると予想されます。

本研究では L-MPZ の生理的機能に迫るために、マウスの P0 を L-MPZ に置き換えた場合に変化が生じるのか、L-MPZ の P0 に対する割合が増加した場合に異常が生じるのかを調べました。

## 【研究内容】

生体内の P0 を全て L-MPZ に置き換えるために、CRISPR-Cas9 系のゲノム編集により P0 遺伝子の正統な 1 つめのストップコドン TAG を Ala コドンの GCG に変えたマウスを作製しました。ゲノム編集された異なる 2 個体から目的の L-MPZ マウス 2 系統を樹立し解析を行いました。SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動後のクマシー・ブリリアント・ブルー (CBB) 染色ならびに抗 L-MPZ 抗体と抗 P0 抗体によるウェスタンブロットでは、ヘテロ接合体 (Het) では野生型 (WT) に比べ P0 の減少と共に L-MPZ がほぼ等量まで増加していることが分かりました。一方、ホモ接合体 (Hom) では P0 は欠損し L-MPZ に全て置き換わっていることが確認できました (L-MPZ 量, Hom > Het > WT)。本研究では 8~10 週齢の成体マウスを用いて解析を行いました。

見かけ上の表現型に変化がなかったため、運動機能の詳細を調べるために尻尾をつり下げた Tail suspension test、Rotarod test、さらに電気生理学的神経伝導試験を行いました。その結果、Hom マウスで、下肢を中心とした運動機能の低下、運動神経伝導速度や複合筋活動電位振幅の低下が認められました (図 2)。また神経線維異常による筋萎縮も認められました。これらはヒトのシャルコー・マリー・トゥース病でも認められる症状です。

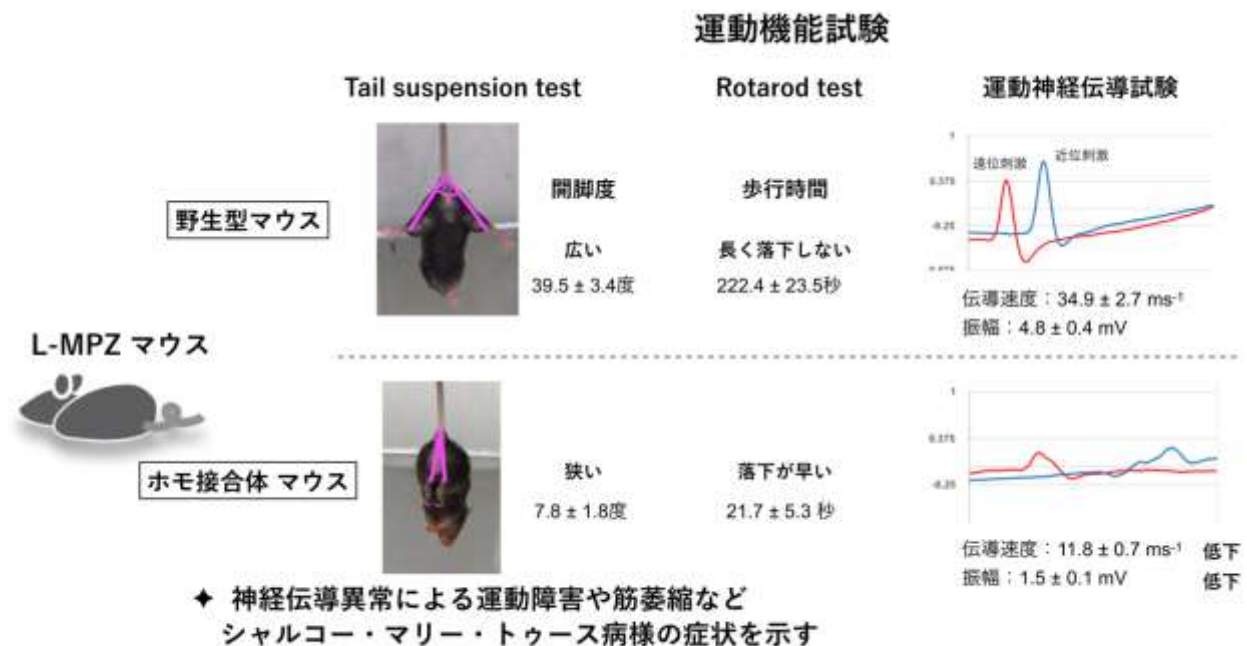


図 2 L-MPZ マウスの運動機能

これらの結果から脱髄や軸索の異常が予想されたため、次に坐骨神経の免疫染色を行いました。その結果、異常な形態のミエリンや破壊されたミエリン、物質輸送用としてミエリンに存在する細胞質を含む構造の異常、ランビエ絞輪周辺での軸索上のイオンチャネルの集積像の異常などが認められました。さらにマクロファージの浸潤も認められました。ウェスタンブロット解析では、小胞体ストレスマーカーの増加、ミエリン塩基性タンパク質 (MBP) の低下が認められ、マクロファージの増加と合わせて脱髄が示唆されました。準超薄切片あるいは超薄切片の解析では、ミエリンの薄くなった有髄軸索の増加、大径有髄神経線維の減少 (軸索の小径化) が認められました。電子顕微鏡画像ではミエリン膜が薄く各層間に隙間が存在し、膜の密な重層化 (コンパクション) が障害され、特に脂質二重膜の細胞質面同士の間

点（周期線）の開大したミエリンが数多く見られました。L-MPZ 量の増加に伴い PKC でリン酸化された L-MPZ が増加したことから、ミエリン形態の異常には、過剰なリン酸化 L-MPZ による電気的な反発が周期線の開大を引き起した可能性が考えられました(図3)。Hom マウスに比べて明らかに軽度ですが、Het マウスにおいても WT に比べて運動機能や伝導速度の低下、異常な形態のミエリンが見られました。したがって、生体内でリードスルー調節に異常が生じ、通常よりも L-MPZ 量が増加した場合には、ミエリンの異常による末梢神経障害を生じることが明らかとなりました。またこれらの異常はヒトのシャルコー・マリー・トゥース病で認められる末梢神経障害と一致することも明らかとなりました。

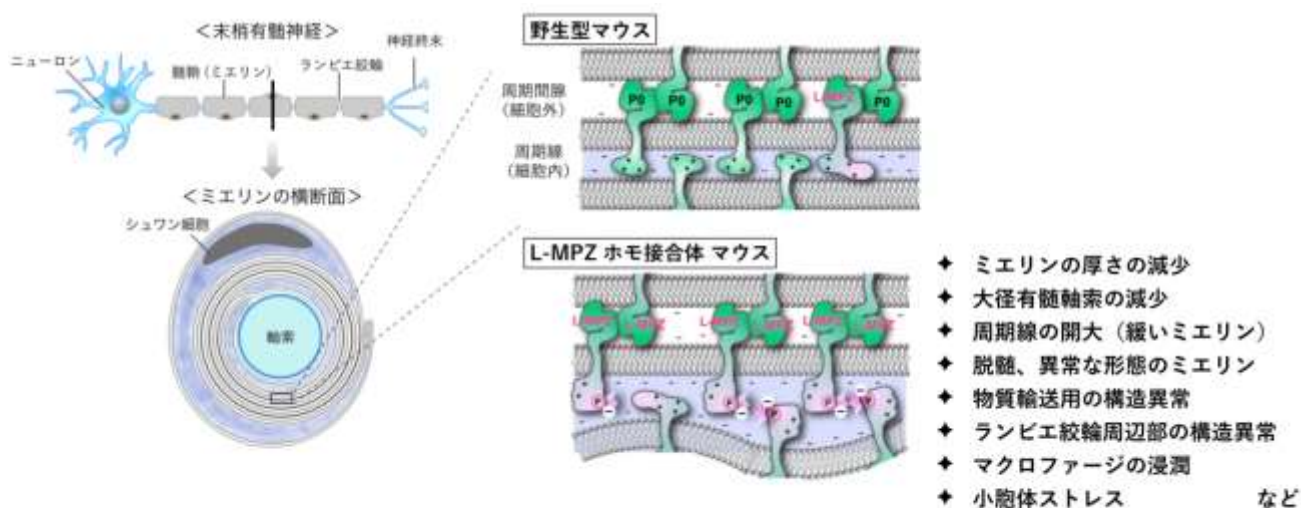


図3 L-MPZ マウスの末梢有髄神経における形態的变化

### 【今後の展望】

今回作製した L-MPZ マウスは、ヒトのシャルコー・マリー・トゥース病のモデルとして有用であり、L-MPZ マウスの発達過程や成体以降の病態の進行を詳細に調べることで末梢神経障害の発症機序や進行性病態の解明につながると期待されます。また、L-MPZ の異常や翻訳リードスルー調節の破綻による L-MPZ の異常産生などが、原因遺伝子の同定されていないシャルコー・マリー・トゥース病の発症に関与する可能性も考えられます。高等動物において L-MPZ 以外にも血管新生や中枢神経系に関わる分子の翻訳リードスルー産物が報告されていることから、翻訳リードスルーの破綻と病気との関連を調べるのが重要です。さらにデュシェンヌ型の筋ジストロフィーなどの遺伝性疾患の治療薬としてリードスルー薬の開発が行われていますが、本論文が薬物の生理的な翻訳リードスルーへの影響の啓蒙につながることを期待します。現在、L-MPZ を産生せず P0 のみを発現するマウスの解析も始めていますので、L-MPZ マウスとの比較解析により L-MPZ の生理的機能が解明されると期待されます。

本研究は JSPS 科研費 (24500449, 16K07069, 16H06280, 19K06889, 19K16267)、笹川科学研究助成 (2019-4061)、文部科学省私立大学戦略的研究基盤形成支援事業「ペプチド工学と DDS 技術を基盤とした筋疾患に対する統合創薬の研究拠点形成」、文部科学省科学研究費助成事業・新学術領域研究・学術研究支援基盤形成「先端バイオイメージング支援プラットフォーム (ABiS)」(JSPS 科研費 JP16H06280) の助成を受けたものです。



#### 【発表論文】

タイトル：

Upregulation of large myelin protein zero leads to Charcot–Marie–Tooth disease-like neuropathy in mice  
(ラージ・ミエリンタンパク質ゼロの発現増加はマウスにシャルコー・マリー・トゥース病様の末梢神経障害を引き起こす)

著者：Yoshinori Otani, Nobuhiko Ohno, Jingjing Cui, Yoshihide Yamaguchi & Hiroko Baba

掲載誌：*Communications Biology*

DOI: 10.1038/s42003-020-0854-z

#### 【用語説明】

\*<sup>1</sup> **ミエリン(髄鞘)**：ミエリンはニューロンの軸索を何重にも取り囲んで形成される特殊な膜構造であり、中枢神経系ではオリゴデンドロサイト、末梢神経系ではシュワン細胞がそれぞれの細胞膜を巻き付けて形成する。ミエリンは絶縁体として働き跳躍伝導に関わる。最近では絶縁体としての機能だけでなく、ニューロンや他のグリア系細胞などとの相互作用により、神経系の発達過程や維持過程に重要な役割を果たしていることが知られている。

\*<sup>2</sup> **翻訳リードスルー**： mRNA 本来のストップコドンのリードスルーにより、読み枠を維持したまま次のストップコドンまで合成が進み、正統な分子と共に C 末部に付加ドメインを持つ分子を産生する翻訳調節システムである。下等動物においては少ない遺伝子数においてもタンパク質の多様性を生み出す重要なシステムである。ヒトを含む高等動物では L-MPZ の他に、血管新生を促進する血管内皮増殖因子 A (VEGF-A) に対する VEGF-Ax、神経系のアストロサイトに発現し脳内の水分量を調節する水チャネルであるアクアポリン 4 (AQP4) に対する AQP4ex の存在が知られている (Eswarappa et al., 2014; De Bellis et al., 2017)。

\*<sup>3</sup> **シャルコー・マリー・トゥース病**：運動神経と感覚神経に異常が認められる遺伝性末梢神経障害で神経難病として指定されている。主に四肢の遠位部、特に下肢において神経障害や筋萎縮が認められ、臨床症状、電気生理学的検査所見、神経病理所見により主に脱髄型、軸索型、中間型の 3 つのグループに分けられる。特に脱髄型では神経伝導速度の低下、軸索型では活動電位の振幅の低下が認められる。40 種以上の原因遺伝子遺伝子が同定されているが、発症機序が不明な場合がほとんどであり、今のところ根本的な治療法はない。おもな原因遺伝子として知られているのは、末梢ミエリン構成タンパク質である PMP22 と P0 である。これらの変異も多岐に渡り、発症メカニズムは未だ明らかではない。(参考：難病情報センター、指定難病 10)

【参考文献】

De Bellis M, Pisani F, Mola MG et al (2017) Translational readthrough generates new astrocyte AQP4 isoforms that modulate supramolecular clustering, glial endfeet localization, and water transport. *Glia* 65:790–803. doi:10.1002/glia.23126

Eswarappa SM, Potdar AA, Koch WJ et al (2014) Programmed translational readthrough generates antiangiogenic VEGF-Ax. *Cell* 157:1605–1618. doi:10.1016/j.cell.2014.04.033

Yamaguchi Y, Hayashi A, Campagnoni CW et al (2012) L-MPZ, a novel isoform of myelin P0, is produced by stop codon readthrough. *J Biol Chem* 287:17765–17776. doi:10.1074/jbc.M111.314468

Yamaguchi Y, and Baba H (2018) Phylogenetically conserved sequences around myelin P0 stop codon are essential for translational readthrough to produce L-MPZ. *Neurochem Res*, 43, 227-237. doi: 10.1007/s11064-017-2423-5

以 上