

論 文 の 内 容 の 要 旨

論文題目      Transcriptional regulation of muscle-specific genes by poly(A) binding protein 2, the gene product responsible for oculopharyngeal muscular dystrophy

和訳            眼咽頭筋ジストロフィーの原因遺伝子産物、poly(A)結合蛋白質 2 による筋肉特異的遺伝子の転写調節機構

指導教官    清水   孝雄   教授

東京大学大学院医学系研究科

平成 9 年 4 月入学

医学博士課程

分子細胞生物学専攻

氏名   金   然正

Mammalian 細胞において、polyadenylation は最も基本的な転写後プロセスである。それに関与する因子の一つである poly(A)結合蛋白質 2 (poly(A) binding protein 2, PABP2)は、1991年 calf thymus で初めて同定された。現在考えられている PABP2 の機能は、1)poly(A) polymerase を活性化し、poly(A) の mRNA 前駆体への付加反応を促進する；および 2) poly(A) tail に結合し mRNA の poly(A)の長さを 200-250 nucleotides に制限する、ことである。PABP2 は大部分の組織で発現しているにも関わらず、その変異が原因である眼咽頭筋ジストロフィー(oculopharyngeal muscular dystrophy, OPMD)の病変は骨格筋に局限する。PABP2 は核内蛋白として存在し、転写と不可分な関連を持つ mRNA の転写後プロセシング因子であること、また OPMD が筋肉疾患であることから、PABP2 と骨格筋特異的遺伝子の発現の間に密接な関係が推測される。わたしは、OPMD の発症機構を解明するためには、まず骨格筋における PABP2 の生理機能を解明することが必要と考えた。

マウス C2 細胞株は骨格筋由来の株として、筋分化や筋特異的遺伝子の解析などで広く使われている。C2 細胞株の筋分化は、myogenic factor と呼ばれる、basic helix-loop-helix 転写因子の作用による、骨格筋特異的遺伝子の発現

によって起こると考えられている。わたしは骨格筋における PABP2 の生理的機能を解明するため、PABP2 の安定導入株を樹立し、筋分化を誘導させたとき生じる形態的变化を観察した。コントロール細胞の筋管は分化誘導後3日目に出現したが、安定導入株では分化誘導後2日目に筋管が形成された。この安定導入株においては、コントロール細胞に比べ、筋分化誘導因子の MyoD と myogenin および最終分化特異的遺伝子の一つであるミオシンの mRNA が過剰発現していた。これらのことから、わたしは PABP2 の強制発現が C2 細胞株の分化を促進させたと考えた。

PABP2 の強制発現がどのように C2 細胞株の分化を促進させたのかその機構を探るため、nuclear run-on assay を行った。その結果、MyoD 遺伝子の転写効率が PABP2 の強制発現によって特異的に上昇しており、PABP2 の強制発現が mRNA の processing による mRNA の安定性および細胞質への輸送に影響することではなく、MyoD 遺伝子の転写に直接関わっていることがわかった。

PABP2 は、多くの RNA 結合蛋白質のなかに見出されている RNA 結合モチーフ(RNP1, RNP2)を持っている。この RNA 結合モチーフが poly(A)結合に寄与すると考えられている。わたしは PABP2 のどの領域が筋分化の促進に関わっているのかを知るため、PABP2 の欠損変異体を C2 細胞に一過性発現させ、筋分化誘導因子およびミオシンの mRNA を定量的に解析した。その結果、RNA 結合ドメインの欠損変異体(PABP2 の N-末端領域)を強制発現させると MyoD、myogenin と共にミオシンの mRNA の過剰発現がみられた。一方、RNA 結合ドメインを一過性発現させたところ、筋分化誘導因子の過剰発現は認められなかった。これらのことから、わたしは PABP2 の N-末端領域が骨格筋の遺伝子発現に関与すると考えた。さらに、yeast two-hybrid screening 法を用いて、PABP2 の N-末端領域(アミノ酸 1-145)に結合する蛋白の同定を試みた。その結果、ひとつの候補として Ski-interacting protein (SKIP)を得た。SKIP は元来 oncoprotein Ski の結合蛋白質として同定されており、最近の結果によると、vitamin D 受容体やレチノイン酸受容体などの核内受容体による転写調節の供与因子として知られている。以上から、MyoD による転写調節機構における SKIP の意義に注目した。実際、GST-pulldown assay と免疫沈降法によって、SKIP が PABP2 の N-末端領域に特異的に結合することを確認した。また SKIP は PABP2 と共に核内でスペckル(斑点)状に分布することがわかった。

多くの骨格筋特異的遺伝子は、その promoter 領域に E-box と呼ばれる DNA

配列を持ち、筋分化誘導因子群によって活性化され、筋細胞分化を引き起こすと考えられている。わたしは PABP2 と SKIP の相互作用がどのように骨格筋特異的遺伝子の転写調節機構に関わっているかを調べるため、E-box が仲介するレポーターを利用し、転写活性を測定した。その結果、PABP2 と SKIP の共発現が、MyoD の存在下レポーター活性を顕著に上昇させ、その作用が PABP2 の N-末端領域の発現に依存していることを見出した。さらに、MyoD の抗体を使った免疫沈降実験の結果、PABP2 と SKIP が MyoD と複合体を形成することがわかった。これらの結果は、SKIP と共に PABP2 が直接に MyoD に結合し、転写活性を調節することを強く示唆する。以上から、PABP2 が単に polyadenylation プロセスに関与しているだけではなく、その N-末端領域が MyoD を介し、骨格筋特異的遺伝子の発現に関与することが明らかとなった。

眼咽頭筋ジストロフィー(OPMD)は、PABP2 遺伝子の変異により生じる常染色体優性遺伝疾患である。通常 50 歳以降に発症し、眼瞼下垂と嚥下障害を主徴とする。野生型の PABP2 は、開始コドンによるメチオニンの後に 6 個のアラニンが続く。OPMD 変異型では、アラニンをコードする GCG 反復配列の異常伸長により、同部位に 10 - 15 個のアラニンが存在する。しかし、PABP2 遺伝子の変異による OPMD の発症機構はまだ不明である。実際、本研究において変異型 PABP2 を用いても実験を行ったが、野生型との間に機能的違いはみられなかった。

OPMD の筋検体からは、約 2.5 %程度の核に封入体が観察されている。この核内封入体は OPMD の重要な病理学的特徴であり、polyglutamine disease と同様の発症機構が推測される。すなわち、核内封入体が細胞に悪影響を及ぼすという gain-of-toxic function である。わたしは、HeLa 細胞で PABP2 を一過性に発現させ、約 5 %頻度で核内封入体を見出したが、そこでも野生型と変異型の違いはなかった。最近の報告によると、GCG9 / GCG9 の OPMD 患者から樹立した myoblasts において、poly(A)の長さはコントロールに比べ、差異がなかった。これらのことから、変異が PABP2 蛋白本来の性質を変えていない可能性が強い。わたしは PABP2 による核内封入体がスペckル状に形成されることに注目している。スペckル部位はクロマチン間顆粒 (interchromatin granule) に対応し、スプライシング因子の貯蔵または組み立て部位と考えられている。PABP2 は骨格筋特異的転写に関わっていると共に、その過剰発現がスペckル状に封入体を形成し、骨格筋特異的遺伝子のスプライシングに影響する可能性もある。

[別紙1]

老化に伴い、骨格筋では筋再生を刺激する因子が多量発現すると報告されている。筋再生は筋繊維の周辺の衛星細胞(satellite myoblasts)が分化することによると考えられている。わたしが樹立した PABP2 の C2 安定導入株は、PABP2 mRNA の発現が一定にも関わらず、分化に伴い、PABP2 蛋白が核内に濃縮されるのが観察された。最近の報告によると、OPMD 筋検体の核内封入体にも、ubiquitin が検出されており、polyglutamine disease の場合と同じく核内封入体の形成と proteasome との関連が推定される。

Positional cloning によって、多くの原因遺伝子が発見され、これまで全く不明であった変性疾患の一端が明らかとなったが、それら遺伝子産物の生理機能の多くは不明である。本研究において、わたしは、OPMD の原因遺伝子産物である PABP2 のこれまで知られた機能以外の、筋分化における生理的役割を明らかにした。