

審 査 の 結 果 の 要 旨

氏 名 金 然 正

本研究は、眼咽頭筋ジストロフィー(oculopharyngeal muscular dystrophy, OPMD)の原因遺伝子産物である poly(A)結合蛋白質 2 (poly(A) binding protein 2, PABP2)の生理的機能を明らかにするため、骨格筋由来のマウス C2 細胞株を用いて遺伝子の発現の解析をしたものである。

1. PABP2 の安定導入株を樹立し、筋分化を誘導させた。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、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。従って、PABP2 の強制発現が C2 細胞株の分化を促進させたと考えられた。
2. Nuclear run-on assay を行ったところ、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と考えられた。
3. 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。従って、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られた。
4. Yeast two-hybrid screening 法を用い、PABP2 の N-末端領域(アミノ酸 1-145)に結合する蛋白を同定した。そのうちの一つは 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 Ski-interacting protein (SKIP)であった。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が明らかとなった。また SKIP は PABP2 と共に核内でスペckル（斑点）状に分布した。

5. 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を発見した。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した。

以上、本論文は、PABP2 の安定導入株の解析によって、PABP2 が単に polyadenylation プロセスに関与しているだけでなく、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を明らかにした。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、OPMD の発症機構の解明に重要な貢献をなすと考えられ、学位の授与に値する。