

論文の内容の要旨

論文題目 筋強直性ジストロフィーに関わる RNA 結合タンパク質の研究

氏名 紀 嘉浩

背景と目的

筋強直性ジストロフィー (*Dystrophia Myotonica*, DM) は常染色体優性の遺伝性筋疾患で、成人の筋ジストロフィーでは最も多い。DM では、筋強直という特有の症状を示すほか、白内障、インスリン耐性、精神遅滞、内分泌異常など、筋以外の臓器でも症状を呈する点が特徴的である。DM の原因遺伝子は2つ特定されており、それぞれの変異により1型 (DM1)、2型 (DM2) に分類される。DM1 では、*DM protein kinase (DMPK)* 遺伝子の3'非翻訳領域の CTG リピート配列の伸長が、DM2 では *ZNF9* 遺伝子イントロン 1 の CCTG リピート配列の伸長が、それぞれの患者において確認されている。現在、DM 発症機構の仮説として有力視されているのは、RNA として転写されたリピート配列が細胞に何らかの悪影響を及ぼす可能性である。伸長した CUG/CCUG リピート RNA が、特定のタンパク質を異常に捕捉するか活性化するなどして、細胞機能に影響を与えられられる。これを RNA 機能獲得 (RNA gain-of-function) 仮説という。

本研究では、DM 発症機構を探るため、CUG/CCUG リピートに結合するタンパク質の性状・機能を解析することを目的とする。私は、修士課程での研究から、RNA 結合タンパク質 MBNL1 が CUG/CCUG リピートに結合することを明らかにした。MBNL1 はショウジョウバエの眼と筋肉の分化に関わるタンパク質 *muscleblind* のオルソログである。さらに、最近、*MBNL1* ノックアウトマウスが DM の一部の症状を再現することが報告されており、このタンパク質の機能障害が DM 発症の要因の一つであることが強く示唆される。MBNL1 は RNA 結合タンパク質であるので、MBNL1 の標的 RNA の特定が重要であると考えられる。また、RNA にどういう影響を及ぼすかという機能的側面の

解明も目標とする。

結果と考察

1. MBNL1 の RNA 結合特異性の解析

MBNL1 の RNA 結合配列特異性を明らかにするために、yeast 3-hybrid system を用いて多種の RNA 配列と MBNL1 の結合を比較検討した。その結果、MBNL1 は CCUG、CUG だけでなく、CAAG、CUUG、CCG、CAG などのリピート配列と結合性を示し、一方、CGGG、CGG、CUGG など G リッチなリピート配列には結合性を示さなかった。ここから、MBNL1 の認識配列は CHHG または CHG リピート(H は G 以外の塩基)であると推測した。

次に、MBNL1 の組換えタンパク質を用いて、RNA 結合特異性をさらに検討した。ゲルシフト法においても、酵母の系と同様に、MBNL1 の CHHG リピートへの結合が確認された。また、CUG および CCUG リピートともに長さ依存的な結合の促進が明らかとなった。

CHHG リピート配列は、ミスマッチを含む二本鎖ヘアピン構造をとると予測される。また、MBNL1 は CUG および CAG リピートに対しては結合性を示したが、これら両者からなるミスマッチのない CUG・CAG リピートのヘアピン RNA には結合性を示さなかった。このことは、ミスマッチの部分の存在が MBNL1 の RNA 認識に重要であることを示唆する。さらに、CCUG₁₅ のプローブ内に少なくとも二箇所の結合部位が存在することから、MBNL1 は数リピート分のステム-ミスマッチの二本鎖 RNA 構造を認識していることが推測される。

以上の結果から次の図式が考えられる。DM では、伸長した CUG/CCUG リピート RNA がミスマッチを含む二本鎖ヘアピン構造をとり、MBNL1 はこの構造を配列特異的に認識する。さらに、伸長している配列であることから多数の MBNL1 結合部位を有する。このため、リピート RNA に多数の MBNL1 タンパク質が捕捉されることになり、その結果として MBNL1 の機能不全が起こる。

2. MBNL ファミリーの機能ドメイン解析

MBNL1 は 4 つの C₃H タイプのジンクフィンガーを持ち、2 つは N 末端側、もう二つは中央部に存在する。また、多くのスプライスバリエントを持ち、C 末端側のエクソン構成は変化に富んでいる。これらの領域のうち、RNA との結合および細胞内局在に寄与する領域を、欠失または点変異体を用いて検討した。その結果、4 つのジンクフィンガーとそれらの間の領域、すなわち N 末端領域が RNA 結合に十分であり、C 末端側は必要でないことがわかった。この結果から、現在 9 種類知られる MBNL1 のスプライスバリエントのうち、CUG/CCUG リピートの影響を直接受けるものとそうでないものがあることが示唆された。

さらに、MBNL1 の細胞内局在を検討した。多くのスプライスバリエントでは、核または細胞質に局在し、細胞質顆粒の形成も見られた。一方、C 末端領域に特定のエクソンを持つスプライスバリエントでは核にのみ局在した。このことから、少なくとも一部のスプライスバリエントでは C 末端領域が細胞内局在に影響を及ぼすことが示唆された。MBNL1 のパラログである MBNL2、MBNL3 も多様なスプライスバリエントを持ち、MBNL1 と同様の RNA 結合性と細胞内局在を示した。

C 末端領域を欠失させた MBNL1 変異体でも細胞質顆粒の形成は見られたが、ジンクフィンガー

モチーフに点変異を導入した変異体では、これがほぼ消失した。ここから、RNA 結合に必要な領域が細胞内局在にも関わることが明らかとなった。

3. 筋強直の分子機構と RNA 結合タンパク質

DM 患者の細胞では、幾つかの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、これらの異常の多くは、CELF ファミリーに属する RNA 結合タンパク質である CUG-BP によって引き起こされると言われてきた。CELF ファミリーはスプライシングや翻訳の制御に関わることが知られている。DM では CUG-BP の発現量が正常と比べて増大しており、CUG-BP 活性の上昇がスプライシング異常を引き起こすとされている。

スプライシング異常の見られる遺伝子の一つ、骨格筋特異的塩素チャネル *CLC-1/CLCN1* は、DM において最も特徴的な症状である筋強直に関わると考えられている。*CLC-1* は筋肉での塩素イオン透過性に関わり、この機能の低下が筋強直を起こす。最近、*MBNL1* ノックアウトマウスにおいても、DM 患者と同様のスプライシング異常が見つかった。このことは、*MBNL1* の機能欠損がスプライシング異常と関わることを示唆している。しかし、*MBNL1* の発現が塩素チャネルのスプライシングに直接影響するかは不明である。

MBNL ファミリーおよび *CELF* ファミリーのタンパク質が、マウスの骨格筋特異的塩素チャネル *Cln1* のスプライシングに及ぼす影響を検証した。*Cln1* にはエクソン 6 とエクソン 7 の間に選択的エクソン 7A が存在する。DM モデルマウスや *MBNL* ノックアウトマウスでは転写産物にエクソン 7A が含まれるが、正常マウスではほとんど含まれないことが知られている。エクソン 7A が挿入された場合、機能を持ったタンパク質が発現しないことになり、筋強直に結びつく。*in vivo* スプライシングアッセイの結果、*MBNL* ファミリーのタンパク質全てがエクソン 7A の挿入を抑制する活性を持ち、逆に、幾つかの *CELF* ファミリータンパク質がエクソン 7A の挿入を促進することが明らかとなった。一方、CUG-BP の影響はほとんど確認されなかった。以下では、*Cln1* 制御活性を持つ *CELF* ファミリータンパク質のうち、筋肉で発現している *CELF4* と、*MBNL* ファミリーのうち *MBNL1* に注目して解析を行った。両者の共発現の結果から、*MBNL1* と *CELF4* は拮抗的に *Cln1* のスプライシングパターンを制御し得ることがわかった。また、点変異体を用いた結果から、*MBNL1* のスプライシング制御活性には RNA 結合能が必須であることが示唆された。次に、*Cln1* の欠失変異体を作製し、スプライシングに関与する機能領域を検討した。この結果、*MBNL1* がイントロン 6 のスプライシングを抑制することがわかった。そこから、*MBNL1* 応答領域が、イントロン 6 の 3'スプライス部位付近であることが示唆された。*MBNL* が *Cln1* イントロン 6 の 3'スプライス部位を抑制し、イントロン 6 の 5'スプライス部位とイントロン 7A の 3'スプライス部位のカップリングを促進し、その結果としてエクソン 7A が挿入されなくなると考えられる。*CELF4* の応答領域はこれまで不明であるが、何らかの機構でスプライソソームによるエクソン 7A の認識を促進することが推測される。

以上の結果から、*MBNL1* は *Cln1* のスプライシング制御活性を持ち、転写産物からのエクソン 7A の除外に寄与することが明らかとなった。ここから、*MBNL1* が機能低下することで、塩素チャネルのスプライシングに異常が生じることが裏付けられた。