

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あり、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、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、または、*ZNF9* 遺伝子イントロン 1 の CCTG リピート配列の伸長が確認されている。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などして、細胞機能に影響を与えらる。

本論文では、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した。これまで、RNA 結合タンパク質 MBNL1 が CUG/CCUG リピートに結合することが明らかにされている。さらに、*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。そこで、本論文では MBNL1 に注目して解析を行った。

本論文は以下の 3 つの部分から構成される。

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。CHHG リピートに対する結合性は、MBNL1 の組換えタンパク質を用いたゲルシフト法においても確認された。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 認識に重要であり、これまで例のない RNA 結合特性を持つ可能性を示唆している。

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ーションを持ち、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ーションのうち、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アン

トでは、核または細胞質に局在が認められ、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。以上の結果より、MBNL1 におけるドメイン構成とその機能が明らかとなった。

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係があ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。そこで、本論文では、*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 *Clcn1* のスプライシングに及ぼす影響を検証した。

Clcn1 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。次に、*Clcn1* 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。*MBNL* が *Clcn1* 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' スプライス部位のスプライシングを促進し、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。以上の結果から、*MBNL1* は *Clcn1* 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。以上、本研究は DM の発症メカニズムの一端を明らかにしたものである。従って、本審査委員会は博士(学術)の学位を授与するにふさわしいものと認定する。