

## 論文審査の結果の要旨

論文提出者氏名 大西 隼

論文題目 Biochemical and physiological analysis of MBNL1-associating proteins

(RNA 結合タンパク質 MBNL1 (Muscleblind-like1) の相互作用分子の生化学的・生理学的解析)

Muscleblind は、*Drosophila*において光受容体や筋肉の分化に必須の遺伝子として同定された遺伝子であり、近年では pre-mRNA の選択的スプライシング調節因子として盛んに研究されている。Muscleblind の重要性を理解するための好例として、ヒトの遺伝病である筋強直性ジストロフィー (DM) が挙げられる。一般的な遺伝病のようにタンパク質のコード領域における変異ではなく、DM の原因となる変異は、非翻訳領域のリピート配列 (CUG)<sub>n</sub> の異常伸長である。ヒト MBNL1 (Muscleblind-like 1) は、(CUG)<sub>n</sub> RNA に結合するタンパク質として同定された。DM では、細胞の核内に形成される(CUG)<sub>n</sub> リピート凝集体に捕捉されることによる MBNL1 の機能低下が、発症の主因であると考えられている。これまでのところ MBNL1 の機能としては、スプライシング調節以外にはほとんど報告がなく、相互作用タンパク質の網羅的なスクリーニングの前例もない。

はじめに、MBNL1 の機能に関して新たな知見を得る目的で、GST-Pull down assay による相互作用タンパク質のスクリーニングがおこなわれた。質量分析法(MALDI-TOF/TOF) によって同定されたのは、YB-1 (Y-box binding protein), DDX1 (DEAD-box RNA helicase)など、計7タンパク質であった。この中で、スプライシング調節に関わることや、翻訳調節における機能も知られている YB-1 に着目し、以降の研究が進められた。免疫沈降法によって MBNL1 と YB-1 の相互作用は RNA 依存的であることが明らかとなった。続いて、選択的スプライシングアッセイを行ったところ、MBNL1 と YB-1 によって協調的に制御されることが示唆された。

培養細胞における各発現コンストラクトの局在解析では、細胞質の「顆粒状構造体」において MBNL1 と YB-1 の顕著な共局在がみられた。近年、細胞質における RNA 代謝関連の顆粒状構造体として、Processing bodies (P-bodies) と Stress granules (SGs) が研究の対象となっている。P-bodies は mRNA 分解の場であり、一方 Stress granules (SGs)は、酸化ストレス条件下に形成される凝集体であり、主要構成タンパク質である TIA1 などが局在する。

MBNL1 のポリクローナル抗体を作成し、免疫染色法によって各種培養細胞における MBNL1 の細胞内局在を解析したところ、MBNL1 はストレスに応答して SGs のマーカーである TIA1 と顕著に共局在した。すなわち MBNL1 が SGs に局在することが明らかとなった。また YB-1 も同様に SGs に局在した。MBNL1 の欠失変異体による局在解析を行ったところでは Zinc finger motifs が細胞質における顆粒形成においては必要充分であることが明らかとなった。

各変異体の RNA への結合性と顆粒形成性の間には、相関する傾向がみられた。これは、SGs において MBNL1 が RNA と相互作用することを支持する結果である。また P-bodies のマーカータンパク質のひとつである DCP2 を過剰発現させ、ストレス条件下で MBNL1 と共染色したところ、MBNL1 が形成する granules は P-bodies とは区別されることが判明した。

さらに SGs の形成過程と、ストレス解除後に SGs が消失していく過程を、MBNL1 と TIA1 を共染色し経時的に観察した結果、両タンパク質の移行速度において、顕著な差異が観察された。このような発見は新規のものであり、SGs 自体の機能的意義の理解に役立つものだと考える。最後に、DM のモデル筋芽細胞における MBNL1 のストレス応答性を調べたところ、コントロールの細胞に比べて、SGs 形成過程と SGs から核への回復過程が著しく阻害されていることが観察された。

本研究によって、MBNL1 のスプライシング機能以外の、細胞質における新規機能が示唆された。さらに、本研究は DM 発症メカニズム解明においても意義深いと考えられる。

したがって、博士（理学）の学位を授与できると認める。