

## 論文審査の結果の要旨

論文提出者氏名 大澤 奈摘

筋強直性ジストロフィー (DM) は、常染色体優性遺伝子し、発症者数は 8000 人あたり 1 名と推定されており、成人の筋ジストロフィーで最も多くの患者を有する。症状としては筋力低下、筋強直、白内障、耐糖能障害、心伝導障害、精神遅滞など多臓器にわたって症状を呈するのが特徴的である。この疾患は、DM protein kinase (*DMPK*) 遺伝子の 3' 非翻訳領域に CTG リピートが異常に伸長することで発症する。発症の分子機構としては、伸長した CTG リピートから転写された CUG リピート RNA が毒性を示す RNA 機能獲得仮説が有力である。この CUG リピートが、MBNL などのスプライシング因子を捕捉することで、その機能を低下させたり、逆に CELF1 のスプライシング因子の発現量増加を引き起こすことで、様々な遺伝子で選択的スプライシングの異常を呈し、それらが症状の原因であることが考えられている。実際に DM 患者では、様々な遺伝子の選択的スプライシングが異常を示しており、クロライドチャンネルやインスリンリセプターのスプライシング異常は、それぞれ筋強直と耐糖能障害の原因であることが確認されている。このように MBNL と CELF1 といったスプライシング因子の発現量または活性の異常は、症状に関連しており、これらスプライシング因子の発現量または活性の異常を改善することは治療薬の開発にもつながる。そこで論文提出者は DM 患者で異常を示す新たなスプライシング因子を探索することを目的に研究を行った。

論文提出者は DM 患者の生検筋で *ABLIM1* exon 11 の選択的スプライシングが異常を示している事を検出し、このスプライシングの制御しているスプライシング因子を探索した。方法としては、*ABLIM1* の minigene を作製し、スプライシング因子を発現させるベクターと共にマウス筋芽細胞 C2C12 に遺伝子導入し、48 時間後、RNA を回収し RT-PCR によって minigene のスプライシングを検出した。すると、MBNL1、MBNL2、MBNL3、FOX1 を過剰発現させると *ABLIM1* exon 11 が挿入されて、正常筋で見られる isoform が増加するが、CELF1、CELF2、CELF6、PTBP1 を過剰発現させると、exon 11 が脱落して DM 筋で見られるようなスプライシングパターンを呈した。また、逆にこれらスプライシング因子の発現をノックダウンして過剰発現と逆の結果が得られるかスプライシングアッセイを行ったところ、MBNL1 と PTBP1 は過剰発現とは逆の結果が得られていた。なお、スプライシング因子の過剰発現とノックダウンはウェスタンブロットまたは RT-qPCR によって検出し、minigene の遺伝子導入は GFP 蛍光観察によって確認していた。また、MBNL1 と PTBP1 を同時に過剰発現させると、PTBP1 のタンパク質の発現が少しでもあると、

MBNL1 のスプライシングの効果、すなわち exon 11 を挿入させる作用がかなり減少することから、PTBP1 は ABLIM1 のスプライシングを MBNL1 より強く制御していると結論づけた。

そこで、DM 患者において、PTBP1 の発現量が増加していると考え、DM モデルマウスである *HSA<sup>LR</sup>* マウスの前脛骨筋と DM 患者の生検筋を用いて、PTBP1 の mRNA とタンパク質の発現量を RT-qPCR とウェスタンブロットによって検出した。すると、*HSA<sup>LR</sup>* では野生型のマウスに比べて、*Ptbp1* のタンパク質発現量が有意に増加しており、*HSA<sup>LR</sup>* で発現量の増加が報告されていた *Celf1* においても有意に増加していた。しかし、*Ptbp1* の mRNA 発現量は増加していなかった。DM 患者の生検筋では、PTBP1 のタンパク質発現量で有意差は検出できなかったが、増加傾向が見られた。また、同様に *CELF1* においても有意差は検出できなかったが、増加傾向が見られた。PTBP1 の mRNA 量はマウスの結果と同様に DM 筋においても発現量の増加は検出できなかった。

以上のことをまとめると、DM 筋における PTBP1 の発現量増加は、mRNA レベルではなく、タンパク質レベルで起こっており、翻訳または翻訳後修飾によって引き起こされていると考えられる。この研究は、PTBP1 の新しい機能を明らかにしたものであり、PTBP1 の発現量を減少させるような DM 治療薬の開発にもつながることから、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。