

審査の結果の要旨

氏名 三枝 亜希

本研究は、良性家族性ミオクローヌステんかん(BAFME)における、TTTTA/TTTCA リピートがもたらす病態機序を明らかにするため、BAFME 患者のリンパ芽球様細胞や剖検脳検体における、BAFME1 の原因変異が位置する *SAMD12* の発現量の検討と、HEK293 細胞を用いた TTTTA/TTTCA リピートモチーフからの RAN translation の検討を行ったものであり、下記の結果を得ている。

1. BAFME1 患者のリンパ芽球様細胞を用い、qRT-PCR で *SAMD12* の発現量の検討を行った。健常者の中には TTTTA リピートの異常伸長を有するものもあり、これらにおいても健常群と *SAMD12* の発現量の比較を行った。*SAMD12* の TTTTA/TTTCA リピートの異常伸長が位置するイントロン 4 を挟むような形でエクソン 4 とエクソン 5 にプライマーを設計し、qRT-PCR で発現量を比較したが、BAFME 患者群、健常 TTTTA リピート伸長群ともに、健常群と比較して *SAMD12* の発現量の差は見られなかった。
2. 先行研究における BAFME 患者の剖検脳検体、リンパ芽球様細胞の RNA-seq のデータを用いて、*SAMD12* 全体の発現量の比較を行った。脳検体では、BAFME 患者群においてエクソン 1-4 の発現量の増加が見られた。リンパ芽球様細胞においても同様にエクソン 1-4 の発現量が多い傾向は見られたが、有意差は明らかでなかった。また、*SAMD12* は 5 つのイントロンしかないにも関わらず約 433kb ととてもイントロンの長い遺伝子である。イントロンの長い遺伝子で、特に脳においては、co-transcriptional splicing と様々な転写段階の新生 RNA が検出されることにより、ランダムプライマーを用いた RNA-seq では 5'→3'に向けてイントロンの RNA 発現量が低下し鋸歯状に検出されると報告されており、今回の検討でも同様の結果が得られた。また、脳ではイントロン 4 のリピート上流の発現量増加が見られ、脳において transcriptional abortion が脳でのみ起こっていることを支持する結果であった。以上のことから、*SAMD12* の発現量の低下は今回の結果からは明らかでなく、BAFME において、ハプロ不全(loss of function)の関与は大きくないと考えられた。
3. RAN translation により産生された RAN protein の C 末に EGFP が発現するように、pEGFP-N1 plasmid を改変して作成した 6xstop-pEGFP_0,-1,-2 を用い、TTTTA/TTTCA リピートからの RAN translation の有無を評価した。6xstop-pEGFP_0,-1,-2 で RAN protein の評価ができるか検証のため、まずは先行研究で

RAN translation の報告のあるハンチントン病の原因変異である *HTT* の CAG リピート(CAG105)を pEGFP_0,-1,-2 に挿入し、HEK293 細胞に transfection して蛍光顕微鏡と western blot analysis で RAN protein であるポリアラニン、ポリセリンの発現を確認した。同様に、*SAMD12* の TTTTA/TTTCA リピート(TTTTA65/TTTCA70)を 6xstop-pEGFP_0,-1,-2 に挿入し、HEK293 細胞に transfection し、RAN protein の発現の有無を評価したが、蛍光顕微鏡、western blot analysis で RAN protein の発現を示唆する結果は認めなかった。

以上、本論文は BAFME1 において TTTTA/TTTCA リピートがもたらす病態機序のうち、ハプロ不全(loss of function)の関与は小さく、RAN translation の関与を示唆する結果は得られなかった。本研究において、今まで報告のなかった AT rich なリピート配列における RAN translation の検討を行ったが RAN translation が起こっているという結果は得られず、AT rich なリピート配列からは RAN translation が起こりにくい可能性も考えられる。当研究室では、TTTCA リピートから転写された RNA に補足される RNA binding protein の検索も並行して行っているが、てんかんを起こす分子メカニズムについては未だ解明されていない。今後はさらに長いリピート長を用いた検討や、他細胞種での RAN translation の検討、生体内での RAN protein の直接評価については今後の課題であるが、今回の研究結果は BAFME の病態機序を考える上で重要な知見であると考えられた。

よって、本論文は博士(医学)の学位請求論文として合格と認められる。