

# 論文の内容の要旨

論文題目 筋強直性ジストロフィーの分子病態

氏名 小穴 康介

## 研究の背景と目的

筋強直性ジストロフィー（DM）は成人で最も頻度の高い筋ジストロフィーであり、患者数はおよそ8,000に1人とされる。DMは今日までに治療法が確立しておらず、またその発症機構についても不明な事が多い。

DMにはDM1とDM2の2つがあり、どちらも常染色体優勢の形式で遺伝する。DM1は第19番染色体上の*DMPK*遺伝子の3'非翻訳領域（UTR）内のCTGリピート数が異常伸長しており、DM2では第3番染色体上の*CNBP*遺伝子のイントロン1内のCCTGリピート配列が異常伸長している。異常伸長したCUG/CCUGリピートを有するRNAは核内に留まり、細胞内で毒性を持つことが知られている。DMでは、RNA結合タンパク質であるMBNLファミリーがこの異常伸長したCUG/CCUGリピートに捕捉されることで機能を失う。一方で、その詳細なメカニズムは不明だが、DMではRNA結合タンパク質CELF1が活性化される。MBNLファミリーとCELF1はどちらも選択的スプライシングを制御することが知られているので、DMでは多くの遺伝子で選択的スプライシングの異常な制御が生じている。中でもクロライドチャンネル遺伝子*Clcn1*の異常スプライシングはDMでの筋強直症状の原因となることが分かっている。

また、近年CLIP-seqを用いた解析によって、MBNLファミリーやCELF1はRNAのエクソンやイントロンより3'UTRに好んで結合していることが明らかになった。MBNLファミリーやCELF1が関わるスプライシング以外の制御機構についても注目が集まっている。

本研究では、第一章でDMの特徴的な分子病態である選択的スプライシングに注目し、治療に応用出来る低分子化合物を探索した。続いて、第二章ではMBNLファミリーの3'UTRを介した遺伝子制御機構を解析し、DMの新たな分子病態を解明しようと試みた。

## 結果と考察

第一章では*Clcn1*遺伝子の異常スプライシングを改善する低分子化合物を探索するために、ルシフェラーゼ活性で*Clcn1*スプライシングを評価できるスクリーニング系を構築した。これを用いて、細胞機能に影響を与えることが分かっている約400種類の低分子化合物をスクリーニングし、Rasファルネシル化阻害剤であるmanumycin Aが*Clcn1*スプライシング改善に効果のあることが分かった。そこで、DM1モデルマウスの前脛骨筋に筋肉内投与したところ、*Clcn1*スプライシング改善効果が認められた。manumycin AはRasの機能を阻害することから、Rasと*Clcn1*スプライシングについて解析したところ、H-RasとN-Rasの発現を抑制すると*Clcn1*の異常スプライシングに改善が見られることが分かった。低分子G-タンパク質として機能するために、H-Rasはファルネシル化される必要があるのに対して、N-Rasはファルネシル化またはゲラニルゲラニル化される必要がある。従って、manumycin Aによってファルネシル化トランスフェラーゼが阻害されたときに、H-Rasが大きく機能を失うと考えられる。H-Rasの発現を抑制すると*Clcn1*の異常スプライシングを改善したことから、manumycin AはH-Rasの機能を阻害して*Clcn1*スプライシング改善に寄与すると示唆された。ヒト*CLCN1*遺伝子のスプライシングは、マウス*Clcn1*遺伝子のスプライシングより複雑であることが知られている。そこで、DM患者細胞を用いてmanumycin Aの*CLCN1*に対する効果を検証しようとした。残念ながら、DM患者細胞を用いた実験では、安定して*CLCN1*のmRNAを解析する実験系を構築することが出来ず、manumycin Aが*CLCN1*スプライシングに対して効果を示すかどうか解析することは、今後の課題となった。

第二章では、MBNLファミリーの3'UTRを介した遺伝子発現制御機構を調べるために、ルシフェラーゼ遺伝子の3'UTRにMBNLファミリーが好んで結合するCCUG/CUGリピートを導入したレポーターベクターを作製した。細胞内での局在の異なるMBNL1アイソフォームを用いた実験では、細胞質での局在の多いアイソフォームの方が導入したCCUGリピートが短いときでもレポーター遺伝子の発現の抑制が見られた。このことから、細胞質でのMBNL1の機能が3'UTRを介した遺伝子発現制御に重要であることが示唆された。また、MBNLファミリーであるMBNL2とMBNL3もMBNL1と同様に3'UTRを介したレポーター遺伝子の発現を抑制した。すなわち、MBNLファミリーは全て3'UTRを介して遺伝子発現制御に関わることが分かった。本研究ではMBNLファミリーの3'UTRを介した遺伝子発現制御機構の詳細なメカニズムの解明には至らなかったが、新しいMBNLの機能が明らかになることで、DMの分子病態の新たな理解が得られると考えている。