

論文審査の結果の要旨

論文提出者氏名 小穴康介

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 10 万人に 8 人程度とされる。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性の形式で遺伝する。DM1 は第 19 番染色体上の *DMPK* 遺伝子の 3' 側非翻訳領域 (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。DM では、MBNL と CELF1 の挙動が異常になるため、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る。中でもクロライドチャンネル遺伝子 *Cln1* 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おり、本研究はその点に着目したものである。

本論文では、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。

第一章では DM で筋強直の原因となる *Cln1* 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 *Cln1* 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、ファルネシル化トランスフェラーゼの阻害剤である manumycin A が *Cln1* スプライシング改善に効果のあることを明らかにした。さらに、DM1 モデルマウスの前脛骨筋に筋肉内投与したところ、*Cln1* 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 *Cln1* 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 *Cln1* 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ればよい。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。

本論文の第二章では、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。DM では異常伸長した CUG/CCUG リピート RNA に MBNL が捕捉されて機能を失うことから、3'UTR を介した MBNL の遺伝子発現制御機構にも異常が生じている可能性が考えられた。

以上の結果より本論文は、第一章で筋強直性ジストロフィーにおいて筋強直改善に有効な低分子化合物となりうる manumycin A を発見し、第二章では細胞質に局在量の多い MBNL1 アイソフォームが最も 3'UTR を介して遺伝子発現を抑制することや全ての MBNL ファミリータンパク質が 3'UTR を介して遺伝子発現を抑制することを明らかにした。これらの研究は、筋強直性ジストロフィー発症の分子機構の一端を明らかにしたもので、本症発症メカニズムに対して重要な知見をもたらしたと考えられる。したがって、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。