

## 論文の内容の要旨

論文題目 筋強直性ジストロフィーにおける  
筋小胞体  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase 1 のスプライシング異常

氏名 趙 一夢

### 1) 背景

筋強直性ジストロフィー (DM)は、日本では罹患率が10万人に約5人とされる遺伝性の筋疾患である。その遺伝子変異は、筋強直性ジストロフィープロテインキナーゼ(DMPK)の非翻訳領域におけるCTG反復配列の異常伸長であり、反復配列のmRNAがスプライシング制御因子と相互作用し、全身の様々な遺伝子にスプライシング異常を引き起こしている。これにより、筋強直や筋萎縮などの主症状以外にも、白内障やホルモン異常など多臓器に異常が認められることが特徴である。

筋小胞体  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase 1 (SERCA1)は、DMでスプライシング異常が認められる遺伝子の一つである。正常な成人骨格筋においてはエクソン22が挿入された成人型のSERCA1aのみが発現するのに対し、DM患者ではmRNAレベルでエクソン22を欠損したSERCA1bが発現が認められていた。SERCA1の両アイソフォームはそれぞれタンパク質に翻訳されることが知られており、SERCA1aはエクソン22上のストップコドンにより、994アミノ酸、SERCA1bはそれより7アミノ酸長く、8アミノ酸異なった1001アミノ酸から成り、C末に特異的な親水性尾部を持つ(図1)。

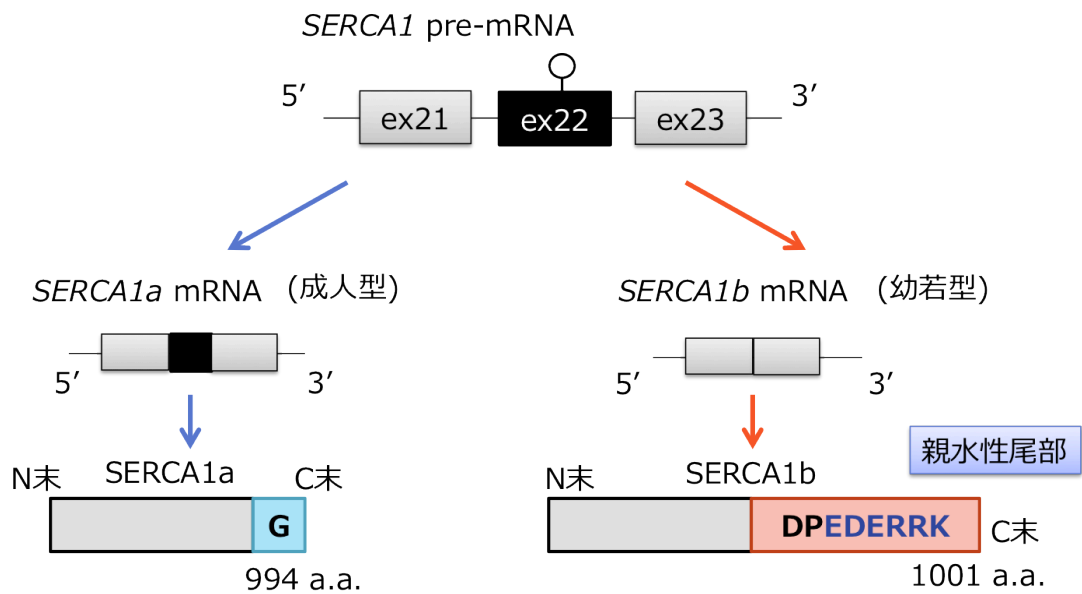


図1 *SERCA1* のスプライスバリエント

*SERCA1* の最終エクソンはエクソン23。*SERCA1a* のGは994番目のアミノ酸のグリシンを表す。*SERCA1b* の一番左側のDは994番目のアミノ酸のアスパラギン酸を表す。exはエクソン、a.a.はアミノ酸、青文字は親水性アミノ酸を表す。

## 2) 目的

*SERCA1* の選択的スプライシングの制御機構では Muscle blind-like protein 1(MBNL1)による制御が既に報告されているが、その他の制御因子については報告がなかった。また、*SERCA1a/b* の機能的差異についても詳細な解析がなされてこなかった。

しかし、*SERCA1* は  $\text{Ca}^{2+}$  の恒常性維持に重要な役割を果たすタンパク質であり、DM では細胞質における  $[\text{Ca}^{2+}]$  の異常が報告されている。また、*SERCA1b* の特徴的な親水性尾部が哺乳類で厳密に保存されていることも知られている。そこで、*SERCA1* の選択的スプライシングの制御機構(第一章)と、それによってもたらされるスプライスバリエント間の機能的差異(第二章)について、解析を行った。

## 3) 方法

PKC、CELF1 による *SERCA1* のスプライシング制御を調べるため、各タンパク質を HEK293 細胞で過剰発現・発現抑制し、RNA 抽出、RT-PCR を行い、バンドの輝度を定量した。

DM におけるタンパク質レベルでの *SERCA1* の発現を調べるため、*SERCA1b* 特異的抗体を作製し、ウェスタンブロット解析を行った。

SERCA1 スプライスバリエント間の機能的差異としては、HEK293 細胞における強制発現系を構築し、SERCA1 が局在するミクロソーム画分を精製して活性を比較した。SERCA1 は ATP を加水分解して  $\text{Ca}^{2+}$  を輸送する P 型イオンポンプであるため、活性測定では、ATPase 活性 (無機リン酸定量法) と  $\text{Ca}^{2+}$  輸送活性(原子吸光法・グラファイト炉)を調べた。

SERCA1b の立体構造解析のため、COS7 細胞において SERCA1b を発現するアデノウイルス発現系を構築し、結晶化を行った。

DM 患者における SERCA1 の制御因子であるサルコリピン(SLN)と *SERCA1b* の mRNA レベルでの発現量を調べるために、患者生検筋から RNA を抽出し、逆転写によって cDNA ライブラリーを作製し、リアルタイム PCR と RT-PCR を行った。

#### 4) 結果

*SERCA1* の選択的スプライシング制御の機構解析を行った第一章では、CUG-BP and ETR-3-like factor 1(CELF1)、PKC(PKC $\beta$  II と PKC $\theta$ )のリン酸化による *SERCA1* のエクソン 22 の挿入促進効果、PKC 分解による排除促進効果が明らかとなった。また、CELF1 と PKC の関係については、PKC が CELF1 を介して *SERCA1* のスプライシング制御を行うことが分かった。

SERCA1 の機能解析を行った第二章では、DM における SERCA1b の異常発現を確かめ、SERCA1b では、ATPase 活性、それに依存して  $\text{Ca}^{2+}$  輸送活性が SERCA1a の約半分であることが分かった。生化学的実験により、その活性差異は、ATP 或は  $\text{Ca}^{2+}$  に対する親和性の違いによるものではなく、小胞体内の  $[\text{Ca}^{2+}]$  に左右され、低  $[\text{Ca}^{2+}]$  では活性差が見られないことが分かった。また、立体構造解析を行うため、高次構造が正しい大量の SERCA1b を得るために、アデノウイルスによる発現系を構築した。そして、発現精製した大量の SERCA1b を使用して  $\text{E1} \cdot 2\text{Ca}^{2+} \cdot \text{ADP}$  状態の SERCA1b の結晶化に成功した。最後に、SERCA1 の制御因子である SLN の mRNA レベルでの発現量と SERCA1b の発現促進の間に正の相関関係があることを見出した。

#### 5) 考察と今後の展望

SERCA1b の尾部による SERCA1a との活性差をもたらす機構に関しては、SERCA1 本体をはじめとするタンパク質との相互作用を考慮し、X 線結晶構造解析やプルダウンアッセイによって解析を行うことが出来る。

SERCA1 の DM 病態への寄与に関しては、複数の  $\text{Ca}^{2+}$  恒常性維持に関わる遺伝子の選択的スプライシングが異常になっているため、正確な解析は困難である。しかし、*SERCA1* 変異による Brody 病では、健常者の半分の活性でミオトニア症状が見られることから、DM で

もミオトニアに寄与している可能性は高い。また、既存の報告も踏まえ、図 2 に示す仮説を提唱する。つまり、MBNL1 が異常伸長した反復配列の mRNA に捕捉されると、*SERCA1* のスプライシング異常が引き起こされ(E)、それによって *SERCA1* の機能障害がもたらされる。その結果として、DM1 患者で報告されていた細胞質 $[Ca^{2+}]$ 上昇が引き起こされるのではないかと考えられた。また、PKC は  $Ca^{2+}$  によって活性化されるため、細胞質  $Ca^{2+}$  ホメオスタシスの乱れにより活性化し(D)、CELFI が強くリン酸化され(A)、更なる *SERCA1* のスプライシング異常が引き起こされる(B)というものである。この仮説は、反復配列により CELFI が活性化される謎を説明し、DM の治療戦略を充実させるものである。同時に、発生時期・組織特異的なスプライシング制御機構や、 $Ca^{2+}$  ホメオスタシスの調節機構に対する知見も得られることが期待される。

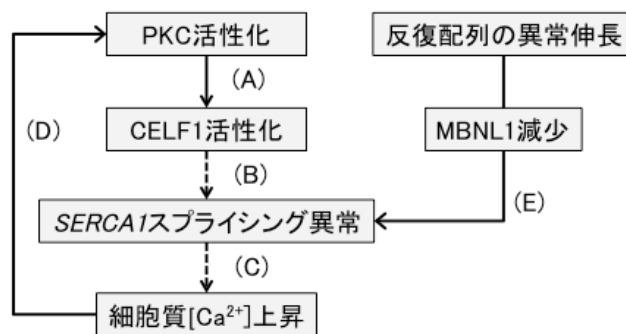


図 2 **SERCA1 スプライシング異常を介した DM の病態仮説**

実線は既に報告されている関係、点線は未検証の関係を示す。

本研究によって、これまで注目されてこなかった *SERCA1b* が、*SERCA1a* と異なる性質を持ち、その異常発現が疾患に関わっている可能性が示された。*SERCA1b* をはじめとする幼若型のスプライスバリエントが、発生過程において成人型に切り替わることは多く知られているが、その調節機構や理由はまだはっきりと分かっていない。本研究や先行研究を踏まえると、おそらく発生過程では、細胞質における最適な $[Ca^{2+}]$ が変化すると推測される。

*SERCA* ファミリーに関しては、*SERCA1*~*3* まで、生化学的手法で数多く研究されている。今後、*SERCA1b* に関しても更なる詳細な解析がなされるであろう。*SERCA* ファミリーの立体構造解析は、現在のところ、ウサギから大量に精製される *SERCA1a* を除いてまだ研究が進んでいない。しかし、これからは、本研究でも使用したアデノウイルスによる大量発現系の活用によって、*SERCA* のみでなく、膜タンパク質をはじめとする、従来高次構造が正しいものを大量に得ることが困難であったタンパク質の構造解析が加速していくと予想される。