

論文審査の結果の要旨

論文提出者氏名 趙 一夢

筋強直性ジストロフィー(DM)においては、筋小胞体Ca²⁺-ATPase 1(*SERCA1*)遺伝子の選択的スプライシングが異常となっており、本来成人骨格筋では発現しないはずの*SERCA1b*のmRNAが検出されていた。*SERCA1b*は選択的エクソンであるエクソン22を含まない*SERCA1*の幼若型バリエーションで、エクソン22が挿入された成人型バリエーションである*SERCA1a*の994番目(最後)のアミノ酸Glyが、親水性アミノ酸の集まった配列、Asp-Pro-Glu-Asp-Glu-Arg-Arg-Lysに置き換わったタンパク質である。*SERCA1*は、細胞質から筋小胞体内にCa²⁺を能動輸送して筋肉を弛緩させる働きを担うが、従来両バリエーション間に機能的差異は認められていなかった。

本論文では、*SERCA1b*がDMで異常に発現していることや特異的親水性尾部の存在から、*SERCA1*の選択的スプライシング制御と、その結果であるバリエーション間の機能差を検証した。*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、HEK293細胞においてDM病態に深く関わるスプライシング制御因子のCELF1や細胞内リン酸化カスケードの重要なタンパク質であるPKCのRNA干渉や過剰発現を行い、HEK293細胞で内在的に発現している*SERCA1*のスプライシング型を解析した。その結果、CELF1、PKC(PKCβ IIとPKCθ)による*SERCA1*のスプライシング制御(エクソン22の排除促進効果)を同定した。また、CELF1とPKCの関係については、PKCとCELF1が同一の経路を介して*SERCA1*のスプライシング制御を行うことを示した。先行研究のPKCによるCELF1のリン酸化制御の結果を踏まえ、CELF1を介したPKCによる*SERCA1*のスプライシング制御機構を考察した。

*SERCA1*の機能解析を行った第二章では、*SERCA1b*特異的抗体を作製し、DMモデルマウス(HSA^{LR}マウス)及びDM患者における*SERCA1b*のタンパク質レベルでの異常発現をウェスタンブロット解析により確かめた。また、HEK293細胞に*SERCA1a*、*SERCA1b*をそれぞれ強制発現させ、活性比較を行った。その結果、*SERCA1b*では、ATPase活性、それに依存してCa²⁺輸送活性が*SERCA1a*の約半分であることが分かった。*SERCA1b*のATPase活性についてより詳細な解析を行ったところ、ATP・Ca²⁺濃度依存的ATPase活性測定の結果から、*SERCA1a*との活性差異は、ATPあるいはCa²⁺に対する親和性によるものではないことが分かった。また、Ca²⁺イオノフォアであるA23187を添加したATPase活性測定により、小胞体内のCa²⁺濃度を低くしたところ、両バリエーション間に活性差が見られなくなった。これにより、*SERCA1b*の*SERCA1a*に比べて低いATPase活性は、小胞体内側Ca²⁺に対する感受性が*SERCA1a*より高いことに起因する可能性を示した。次に、立体構造解析を行うため、高次構造

が正しい大量のSERCA1bを得られる、アデノウイルスによる発現系を構築した。発現精製した大量のSERCA1bを使用してE1・2Ca²⁺・ADP状態のSERCA1bの結晶化(リン酸アナログ、フッ化アルミニウムによる。最大分解能4Å)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。

本論文では、以上の結果から、DMでは、SERCA1の選択的スプライシングが異常になることによって、SERCA1バリエーションの機能的差異に起因するCa²⁺ホメオスタシスの乱れが存在する可能性を示した。また、DMで機能異常が報告されているMBNL1によってSERCA1の選択的スプライシングを介した細胞内リン酸化経路の乱れを引き起こす可能性も示した。更に、その結果としてこれまで機構が知られていなかったDMにおけるCELF1の過剰リン酸化が説明出来ることを考察した。

本論文では、DMにおけるSERCA1の選択的スプライシング異常から、SERCA1の選択的スプライシングという事象を中心として、その上流におけるスプライシング制御機構、またその下流におけるスプライスバリエーションの機能的差異の解析を行い、それぞれ新たな知見を得ることが出来た。注目すべきは、これまで同じと考えられて来たSERCA1のスプライスバリエーション間における機能的差異の発見である。この発見により、DM病理における新たな考察を加え、また、SERCA1bが幼若型であることを踏まえて、筋発生の理解にも有用な手がかりを示した。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。