

## 筋強直性ジストロフィーの分子機構解明

● 笹川 昇

東京大学 大学院総合文化研究科 生命環境科学系

### 〈研究の目的と進め方〉

筋緊張性ジストロフィー (Myotonic Dystrophy, DM) は、常染色体優性の形式で発症する遺伝性疾患である。筋緊張、筋萎縮を主症状とし、白内障、精神遅滞、性腺萎縮、前頭部脱毛などの全身に渡る症状を併発する。責任遺伝子である筋強直性ジストロフィープロテインキナーゼ(DMPK)はヒト19番染色体長腕13.3に位置する。また、DMPK遺伝子の3'側非翻訳領域にCTG三塩基からなる繰返し配列 (CTGトリプレット・リピート) があり、正常対照では繰返し数が5-30であるのに対し、DM患者では100以上、多いものでは数千にまで伸長していることが報告されている(図1)。更に、リピート数と症状に相関関係があり、リピートが長いほど発症年齢が早まり、症状も重篤になることが知られている。

DMの遺伝子変異は非翻訳領域に位置し、患者でも正常対照と同様の翻訳産物が発現している。それにもかかわらずこの病気が優性遺伝の形式で発症することは、従来の常識から見て大きな矛盾である。これまでに責任遺伝子の発現量変化が発症に関わるのではないかと、などといったDM発症仮説が提出されてきたが、そのいずれもがDMの症状を説明するのには不十分であった。また、DMは筋緊張、筋萎縮を主症状とするものの、その他全身に渡る症状を併発するため、DMの症状を一責任遺伝子の変異だけでは説明できず、DMはゲノムレベルでの多因子がかかわる複合的な遺伝子疾患という一面を持っている。

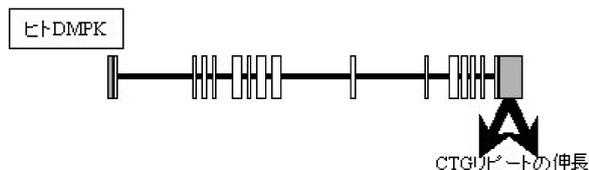


図1. DM責任遺伝子及びその変異。DM患者では3'側非翻訳領域にあるCTGリピートの伸長が見られる。

このような状況のもと、最近充実の著しいヒトゲノム情報を活用し、これらゲノム資源を有効に利用していくことで、DMのような特異な遺伝病の分子機構、発症機構を解明していくことが本研究の目的である。具体的には、本研究ではこの特異な病気の発症機構を、新しい概念「RNA機能獲得 (RNA gain of function)」を踏まえながら追究することを目的としている。つまり、ゲノムレベルでのCTGリピート伸長という遺伝子変異は、転写されたRNAレベルでその毒性を発揮し (RNA機能獲得)、最終的に発症に至るといった分子機構仮説を念頭に置いている。

DMPK遺伝子にあるCTGリピートの伸長は、DMPK自身でなく、他の遺伝子の発現様式に影響を及ぼす可能性がある。しかもこれらの候補遺伝子は、自身にCAGリピートやCTGリピートを持つ可能性が非常に高いと考えている。更に、RNA機能獲得を介した発症機構には、CUGリピートRNAに結合するようなRNA結合タンパク質の存在を仮定している。

### 〈研究開始時の研究計画〉

研究開始時において、申請者は既にヒトDMPK cDNAを取得して解析を進めており、この遺伝子の3'側非翻訳領域に、正常対照で見られるCTG5リピートを持つコンストラクトと、発症の領域に入るCTG160リピートを持つコンストラクトを作成し(図2)、且つ、これらコンストラクトを安定的に発現するマウス筋芽細胞C2C12株の樹立に成功していた。本研究ではこれらの細胞をDMモデル細胞とし、以下の2点を主眼とした研究計画を立てた。

1. これらDMモデル細胞の示す表現型を明らかにしていくと共に、マイクロアレイなどのゲノム解析手法により、DMPKのCUGリピートの伸長によって発現様式が変化する遺伝子群を特定していく。得られた候補遺伝子群については、その配列または機能的共通性を見出すことにより、CTGリピートの伸長という変異が細胞内システムに及ぼす生理作用を特定していく。

2. また、RNA機能獲得にかかわるであろうRNA結合タンパク質について、CUGリピートとの結合特異性を明らかにし、その生理的機能を追究していく。

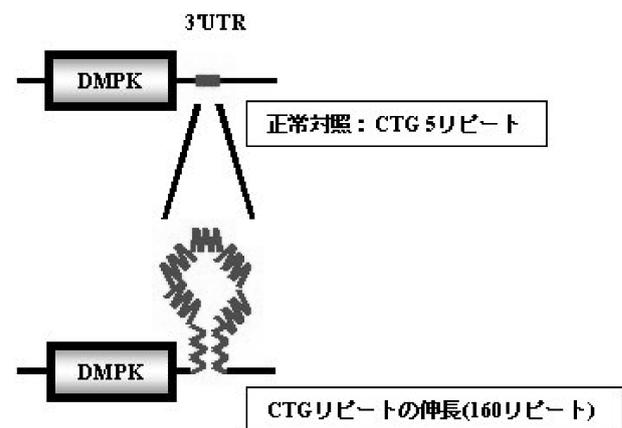


図2. DMモデル細胞に導入したコンストラクト

### 〈研究期間の成果〉

#### 1-a. DMモデル細胞の酸化ストレス脆弱性

本研究において申請者は、自らが確立したDMモデル細胞が酸化ストレスに対して高感受性を示し、より低い

ストレス濃度で細胞死を起こすことを見出した (図3)。

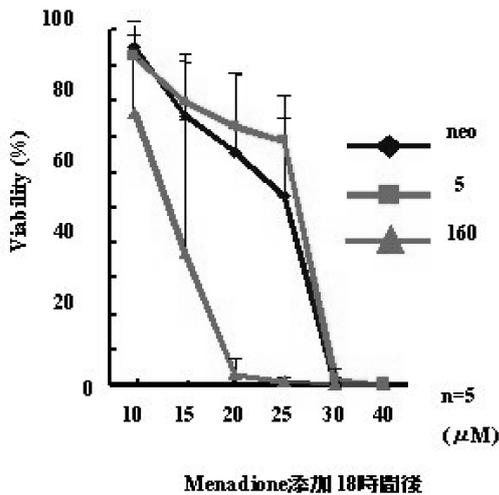


図3. DMモデル細胞の酸化ストレス脆弱性。ここでは酸化剤としてメナジオンを添加したときの結果を示す。CTG160細胞でのみ酸化ストレスに対する高感受性がみられる。

酸化剤としてメナジオンや過酸化水素を用い、これらを培地に添加した後に、トリパンブルー染色法によって細胞の生存率を測定したところ、CTG 5リピードという正常の繰返し数では空ベクターを導入しただけのコントロールと変わらない酸化ストレス感受性を示したのに対し、CTG 160リピードと発症の領域に入る繰返し数では、より低い濃度で細胞死が観察された (0404082134)。

DMPK自身は細胞骨格の再構成などにかかわる可能性がある (0404082132) が、CTG5細胞とCTG160細胞との違いは、導入したCTGリピードの繰返し数のみである。このため、これら酸化ストレスの感受性の違いは、導入したCTGリピードに起因することが示唆された。また、導入したCTGリピードは遺伝子の3'-非翻訳領域に位置しているため、導入したCTGリピードが転写され、CUGリピードとなった時点で、伸長したCUGリピードが何らかの生理機能を獲得し、それが細胞内で悪影響を及ぼしている (RNAレベルでの機能獲得) ことが想定された。

#### 1-b. DMモデル細胞を用いたマイクロアレイ解析

DMモデル細胞では、伸長したCUGリピードRNAが新たな機能を獲得し、その結果として表現型に変化が起こっていることが示唆されたため、申請者は、CUGリピードRNAが発現すると、細胞内のシステムが変化し、その結果として発現量を変化させている遺伝子群が存在することに違いないと考えた。そのため、このDMモデル細胞から全RNAを回収し、これを蛍光標識することでプローブを作成した後にマイクロアレイ解析を行った。マイクロアレイにはClontech社のマウス cDNAマイクロアレイを用いた。マイクロアレイ解析については、実験を複数回行った後に統計解析を行い、最終的な実験結果を得た。

その結果、DMモデル細胞において発現量に変化している遺伝子が判明し、リピードが増幅しているだけで既に発現変化している遺伝子が存在することを見出すことができた (表1)。しかしながら、これら遺伝子群において、発現タンパク質の機能面における共通性は、あまり無いように思われた。

アレイスポット数	3757
発現スポット数	358
発現量が減少した遺伝子 (0.8以下)	65
発現量が増加した遺伝子 (1.2以上)	57

表1. DMモデル細胞を用いたマイクロアレイ解析の結果

#### 1-c. マイクロアレイ解析から得られた候補遺伝子のプロモーター解析

1-bに示したように、伸長したCUGリピードの発現下では発現量を変化させている遺伝子が存在することが明らかとなった。これら遺伝子の機能面における共通性は得られなかったが、これら候補遺伝子群には何かしら他の共通性があるに違いないと申請者は考えた。その一端として、これら候補遺伝子の予想プロモーター解析を行うことにした。遺伝子の転写開始起点をDBTSS (<http://dbtss.hgc.jp/>)によって特定し、その上流10kbをWeb promoter scan (<http://thr.cit.nih.gov/molbio/proscan/>)によって解析した。その結果、これら候補遺伝子の発現に転写因子AP-1の関与を疑わせる結果を得た。

この結果に基づき、実際のDMモデル細胞においても各種転写因子の活性に変化が出ているかどうか確かめるため、ルシフェラーゼ遺伝子を用いた実際のプロモーター解析を行った。ルシフェラーゼ遺伝子上流に各種プロモーターエレメントをつなげたコンストラクトをDMモデル細胞に一過性に導入し、そのプロモーター活性をルシフェラーゼの酵素活性によって測定した。その結果、DMモデル細胞では、実際に転写因子AP-1の活性が低下していることを見出した (図4)。この結果は上記予想プロモーター解析の結果を支持するものであった。1-bと合わせ、これらの結果は現在投稿中である。

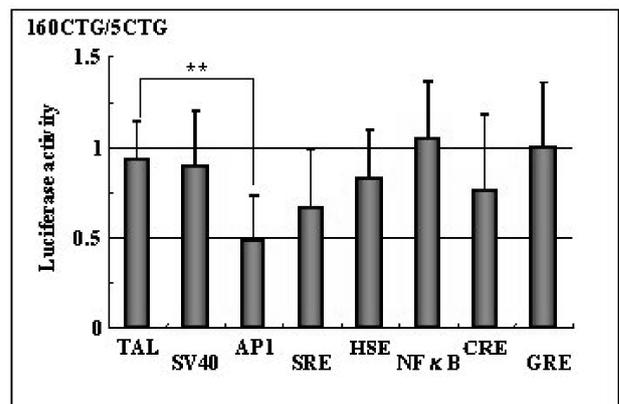


図4. DMモデル細胞を用いたプロモーター解析の結果。転写因子AP-1の活性が有意に低下していた ( $p < 0.0005$ )

## 2. CUGリピートRNAと結合するタンパク質の解析

RNA機能獲得を介した分子機構において、RNA結合タンパク質は重要な役割を担っていると考えられる。これまでにCUGリピートRNAと結合する候補分子として、CUGBPとMBNLという二種類のRNA結合タンパク質が挙げられている。本研究においては、これら二種類のRNA結合タンパク質とCUGリピートRNAとの結合を評価する実験を行った。一方で、DMと同様の症状を示し、ZNF9と呼ばれる責任遺伝子のイントロンにあるCCUG四塩基リピートの伸長が発症の原因とされる症例も報告された(DM2型、図5)。従って本実験においては、CUGリピートのみならず、CCUGリピートについても実験対象とした。

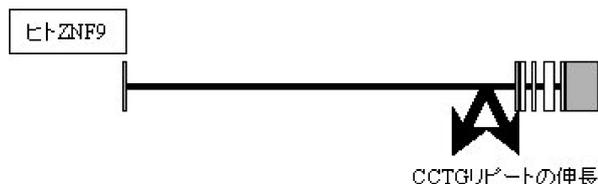


図5. 新たに発見されたDMの変異。責任遺伝子のイントロン領域にCCTGリピートの伸長が見られる。これにより、従来のCTGリピート伸長によって発症するDMをDM1、CCTGの伸長によるものをDM2と呼ぶようになった。

CUGBPとMBNLのアミノ酸構造を比較しても、両者に大きな相同性は認められない。これらRNA結合タンパク質とリピートRNAとの結合性を見るため、酵母three-hybrid系を用いてCUG-BP/EXPとCUG/CCUGリピートとの結合を検討した。その結果驚くべきことに、従来から重要と思われてきたCUGBPはCUG配列との親和性があまりなく、むしろUG二塩基配列と高い結合能を示すことが明らかになった。一方のEXPはCUG配列とCCUG配列の両方と結合能を示した(0404082137)。このことから、リピートの増幅によって起こる「RNA機能獲得」に直接作用するタンパク質はEXPであること、DM1とDM2は共通の発症機構を持つ可能性があることが示唆された。

更にMBNLとリピートRNAとの結合を酵母three-hybrid系を用いて詳細に追究したところ、MBNLは表2に示すように、CUG、CCUGリピートのみならず、CHG、CHHGで表されるリピートと結合するという結果が得られた(0404082129)。これはDMにおけるリピートの伸長→MBNLのようなRNA結合タンパク質との相互作用を仮定したときに、間接的にRNAの成熟/修飾不全を受ける遺伝子として、これらCHHG配列を遺伝子配列中に持つものが候補として考えられることを示唆しているものと思われた。

- ・ **MBNLが結合したリピート配列**  
 → 3塩基: CUG, CAG, CCG  
 4塩基: CCUG, CCCG, CUUG, CAUG, CAAG, CCAG
  - ・ **結合しなかったリピート配列**  
 → 3塩基: CCG  
 4塩基: CAGG, CCGG, CUGG, UCCGなど
- ⇒ 推定される標的配列: CHG, CHG リピート  
(H: not G)

表2. 酵母 three-hybrid 系を用いた、MBNL とリピート RNA との結合実験の結果。この結果より、MBNL は CUG/CCUG リピート以外にも、CHG/CHHG リピートとも結合することが判明した。

## 〈国内外での成果の位置づけ〉

ゲノム中のCTGトリプレット・リピートの伸長によって発現に影響が出る遺伝子を網羅的に探索した報告はまだまだなく、本研究が先駆けである。また、発症機構に関わるとされる複数のRNA結合タンパク質を同一の実験系で評価したこともDM研究において初のことである。これまでに申請者は、患者と同様の遺伝子変異を持つDMモデル細胞でマイクロアレイ解析を行い、この遺伝子変異下で発現変化を起こす遺伝子群を見出し、更にこれら遺伝子群が共通のプロモーター領域を持つことを示唆する結果を得ている。また転写因子AP-1の活性が上記DMモデル細胞で実際に減少していることを見出している。この結果はこれまでのマイクロアレイ解析、およびそれを基にしたプロモーター解析を裏付けるものであり、申請者によるこれまでのゲノムレベルでの研究が生化学的に裏付けられたことを意味する。

遺伝子変異から発症にいたるDM分子機構追究を網羅的に行い、成果を挙げている点については評価されるべきと考えるが、欧米との競争は厳しく、更なる奮起を必要としている。

## 〈達成できなかったこと、予想外の困難、その理由〉

〈研究期間の成果〉で述べた結果をDM発症機構の解明及び治療法確立にまでつなげるには、リピート伸長からRNA結合タンパク質の機能異常につながるRNA機能獲得仮説において、間接的にRNA成熟/修飾異常を受ける遺伝子の探索を行うことが重要である。その大きな鍵を握るスプライシングパターン解析については、当該研究期間内において十分に行うことはできなかった。理由として、〈研究期間の成果〉2で述べたように、我々が明らかにしたMBNLの標的配列はCHG/CHHGと非常に幅が広く、ゲノム上においてこれら配列を持つ候補遺伝子を効果的に絞込むには、もう幾許かの情報が必要なことが挙げられる。本研究期間中にDM2型の遺伝子座が特定され、ZNF9のイントロン領域にCCTGリピートの伸長が見られることが判明したが、なおDM3型の新たな遺伝子座の存在を示唆する報告もなされており、これら新しい候補遺伝子の発見が、将来のDM研究全体の底上げに寄与していくことが期待される。

研究機関全体を通して困難さを感じたところに、日本における患者データベースの未熟さがある。欧米では確固とした患者団体が存在し、これら団体が研究者の研究を後押ししている状況がある。本研究は申請者自らが確立したモデル細胞を用いて行われたものであり、いわゆる倫理面に苦慮することは無かったが、ここで得られた研究成果を実際の治療法確立にまでつなげるには、いつかは患者サンプルを用いて確認の研究を行わざるを得ない。日本でDM患者の団体の存在を聞いたことは無く、その研究(支援)体制も欧米に比べて見劣りがする。日本にもDM治療に先進的な病院はあるものの、そこでは、患者の持つ遺伝子変異(リピート数)が特定されていないなどの多くの問題点を抱える。医学的、研究的な倫理面とは別次元に、これらの不備は長期的には改善されなければならない。

## 〈今後の課題〉

我々の研究成果と世界の研究を合わせ、DMで見られる特異な遺伝子異常は、RNA結合タンパク質の機能異常を巻き込んだ「スプライシング病」であるとの認識が広まりつつある。また本研究により、CTGリピート伸長によるRNA結合タンパク質の動向変化が明らかになり、一

方で、リピート伸長によって発現変化の見られる遺伝子が見出されてきている。現在は、いわば山の両端からアプローチしている格好であるが、今後の研究で両者が融合していくことによって、より系統だったDM発症機構の理解が可能になることが期待される。

DM患者ではMBNLが関与するスプライシング系に異常が起こっていることが推察される。つまり、脳内で骨格筋型のアイソフォームが発現するなどの異常が起こり、それが生体システムに重大な影響を与えていると考えられる。申請者の研究により、MBNLが結合するRNA配列はトリプレット・リピートの場合CUG、CCG、CAGであり、クアドラプレット・リピートの場合CCUG、CCCG、CUUG、CAUG、CAAG、CCAGといった繰り返しの配列であることが明らかになっている。今後の課題として、これらの配列を指標にMBNL標的遺伝子をゲノム情報から抽出する必要がある。現時点ではCUGCAG…というようなヘテロなりリピートもMBNLと結合する可能性があるため、ゲノム情報の抽出は慎重かつ見落としの無いことが重要である。

培養細胞系を用い、MBNLと(CTG)/(CCTG)リピートの存在下でMBNL標的遺伝子のスプライシングアッセイを行うことができれば、これら標的遺伝子とDMとの関与を検証することができる。実際には標的配列の一部分をゲノムからクローニングし、これをミニジーンとして転写させる。その後、細胞からRNAを抽出し、転写産物をRT-PCRで検出することでMBNL標的遺伝子の挙動を検出していく。同時に、このアッセイにより、RNAの成熟に関わるMBNLの作用を見出していくこともできると考えている。

将来的には、DM治療を視野に入れた、MBNLとリピートRNAとの異常結合を抑えるための生理的条件の検討を行いたい。DM治療にはこれらMBNL標的遺伝子の異常なスプライシングパターンを正すことが有効である。MBNLと(CUG)リピートとの異常結合そのものを抑える条件を見出すことが出来れば、根本的なDM治療には福音となる。具体的には、MBNLのRNA結合能を欠失させた変異体をドミナント・ネガティブに発現させることで、簡便且つ有効に異常結合を抑えることが出来ると期待している。MBNLには4箇所RNA結合モチーフがあり、変異を導入する箇所を工夫することで、いわゆる副作用を最低限に抑えた変異体のデザインが可能であると予測している。更に、申請者がDMモデル細胞を用いた研究により、伸長した(CTG)リピートが細胞内に存在する条件では転写因子AP-1の活性が低下することが明らかとなっている。従ってAP-1の下流にある遺伝子群の発現量低下が表現型としてのDMの症状に深くかかわっている可能性がある。ゲノム情報を駆使してこれらAP-1の制御下にある下流遺伝子群を探索した後に、その機能を明らかにすることで、DMの症状に関与している遺伝子産物の同定と、治療法確立のための機能解析が可能になり、対症療法としてのDM治療法の確立に貢献することができる。

DM患者において、ゲノムレベルでの単純なりリピート配列伸長が、どのように多岐にわたる症状を引き起こしているのか、データベースを駆使しながら遺伝子変異と症状を体系的に結びつけ、解明していくことを今後の課題としていきたい。

#### <研究期間の全成果公表リスト>

0404082129

Kino Y, Mori D, Oma Y, Takeshita Y, Sasagawa N, Ishiura

S. Muscleblind protein, MBNL1/EXP, binds specifically to CHHG repeats. Hum Mol Genet.13, 495-507, 2004

0404082132

Sasagawa N, Kino Y, Takeshita Y, Oma Y, Ishiura S. Overexpression of human myotonic dystrophy protein kinase in Schizosaccharomyces pombe induces an abnormal polarized and swollen cell morphology. J Biochem (Tokyo)134, 537-542,2003

0404082134

Takeshita, Y., Sasagawa, N., Usuki, F. and Ishiura, S. Decreased expression of alpha-B-crystallin in C2C12 cells that express human DMPK/160CTG repeats. Basic and Applied Myology13, 305-308,2003

0404082137

Kino, Y., Oma, Y., Takeshita, Y., Mori, D., Sasagawa, N. and Ishiura, S. Direct evidence that EXP/muscleblind interacts with CCUG tetranucleotide repeats. Basic and Applied Myology13, 293-298, 2003