Osaka University Knowledge Archive

Title	筋特異的RNA結合タンパク質Rbm24およびRbm38の筋分化における役割
Author(s)	宮本, 章子
Citation	大阪大学, 2009, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/49654
rights	
Note	著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、大阪大学の博士論文についてをご参照ください。

Osaka University Knowledge Archive : OUKA

https://ir.library.osaka-u.ac.jp/

Osaka University

【20】

氏　　名	宮（みや）　本（もと）　章（しょう）　子（こ）
博士の専攻分野の名称	博　士（薬　学）
学　位　記　番　号	第　２２８８９　号
学位授与年月日	平成 21 年 3 月 24 日
学位授与の要件	学位規則第４条第１項該当 薬学研究科応用医療薬科学専攻
学　位　論　文　名	筋特異的 RNA 結合タンパク質 Rbm24 および Rbm38 の筋分化における役割
論　文　審　査　委　員	（主査） 教　授　森崎　隆幸 （副査） 教　授　八木　清仁　　教　授　山元　　弘　　教　授　岡部　　勝

論　文　内　容　の　要　旨

骨格筋の分化過程では、まず単核の筋芽細胞が融合して多核の筋管細胞となり、さらに筋管細胞が成熟し、収縮能を有する筋線維が形成される。この過程で、筋特異形質を表す筋特異的な遺伝子が次々に発現し、こうした遺伝子発現は筋分化制御因子（Myogenic regulatory factor、MRF）として知られる代表的な４つの転写因子により転写レベルで調節される。RNA結合タンパク質HuRやNF90は、これらMRFや細胞増殖抑制因子のmRNAに塩基配列特異的に結合し、核外輸送や安定化などのRNAプロセシング過程の調節により筋特異的遺伝子の発現を制御し、筋分化過程を制御する。しかし、HuRやNF90は筋組織以外でも発現は高く、筋組織で特異的に発現しRNAプロセシング調節の機能を有するRNA結合タンパク質はこれまで知られていない。以上より、筋特異的なRNA結合タンパク質を探索・同定することは、筋分化の転写後調節の分子メカニズムを理解する上で重要なステップとなることが期待されると思われた。

本研究では、まず、初期分化過程で発現する遺伝子の探索により選出されたRNA結合タンパク質遺伝子Rbm24に着目し、この遺伝子は*in vivo*においてマウス胚発生期に筋特異的に発現することを明らかにし、Rbm24の筋分化における機能の検討へと解析を進めた。また、Rbm24のRNA認識モチーフ（RRM）領域に対して、アミノ酸配列が2アミノ酸を除き一致するという高い相同性を示すRNA結合タンパク質Rbm38を見出したので、これら２つの遺伝子の解析を進めた。ところで、これらの遺伝子に関連して、線虫のRbm24、Rbm38のホモログであるRNA結合タンパク質sup12が発生過程で筋特異的な遺伝子unc60の選択的スプライシングを調節し、筋発生を制御することがすでに知られている。さらに、ヒトRBM38（RNPC1）は、ガン細胞を用いた実験で、p21 mRNAに結合しその安定性を制御することにより細胞増殖停止に関わることが報告されている。しかし、これらRbm24、Rbm38遺伝子の筋肉での発現や機能についての報告はないことから、これらの遺伝子の筋分化における機能や役割を解明すべく、遺伝子発現および機能解析を行った。

まず、成体マウスを用いた定量的RT-PCRによる組織別の発現を検討し、Rbm24とRbm38は心筋や骨格筋で特異的に発現することを明らかにした。そこで、筋分化の評価系として有用なマウス筋芽細胞C2C12細胞株を用いてRbm24とRbm38の遺伝子機能解析を行うこととした。まず、C2C12細胞の筋分化過程における定量的RT-PCRによる発現検討を行ったところ、Rbm24、Rbm38共に分化に伴って発現が上昇することが明らかになった。次に、C2C12細胞について、RNAi法によりこれらの遺伝子発現を抑制したところ、どちらの操作でもDNA合成や細胞分裂の停止の阻害が観察され、筋管細胞の形成が著しく抑制されることが明らかとなった。一方、これらの遺伝子の過剰発現を行ったところ、DNA合成や細胞分裂を停止した細胞が増加し、筋管細胞形成の促進が観察された。さらに、免疫沈降実験により、これら2つのRNA結合タンパク質のうち、Rbm38は細胞増殖抑制因子p21 mRNAと結合することを明らかにした。そして、Rbm38の遺伝子発現を抑制した細胞については、p21の過剰発現により正常な細胞増殖停止がもたらされ、筋分化阻害のレスキューが示された。一方、Rbm24の発現を抑制した細胞では、p21の過剰発現による分化状態の改善は観察されなかった。以上より、Rbm38はp21 mRNAと結合することにより細胞増殖レベルを調節し、筋分化を促進することが考えられた。

本研究により、RNA結合タンパク質遺伝子Rbm24とRbm38が筋特異的に発現し、さらに、両分子がマウス筋芽細胞の増殖停止に関わり、筋分化を制御していることを明らかにした。また、Rbm38はp21 mRNAに結合し、細胞増殖の停止を調節することにより筋分化を制御していることが示された。本研究によって、２つの筋特異的なRNA結合タンパク質を初めて明らかにしたことは、筋分化過程における転写後調節の分子メカニズムの解明やRNA結合タンパク質の組織特異性を理解する上で有用な情報となると考えている。

論文審査の結果の要旨

骨格筋の分化過程は収縮蛋白質などをコードする筋特異的な遺伝子が筋分化制御因子として知られる転写因子による制御を受けて調節されることが知られる。こうした転写レベルでの遺伝子発現調節に加えて、近年、RNAプロセシング過程の調節によっても筋特異的遺伝子の発現制御がなされていることが明らかとなり、その際、RNA結合タンパク質が大きな役割を果たすことが知られるようになった。しかし、これまで筋特異的に発現しRNAプロセシング調節を制御するRNA結合タンパク質は知られていなかった。

著者は、幹細胞の初期分化過程で発現する遺伝子の探索により、胚発生初期に筋特異的に発現するRNA結合タンパク質Rbm24に着目し機能解析を行った。同時にRbm24のRNA認識モチーフRRM領域と高い相同性を有するRNA結合蛋白質Rbm38についても同様に解析を行い、両遺伝子の筋分化に関する機能について、以下の成果が得られた。

１）Rbm24、Rbm38はともに成体で心筋、骨格筋で発現し、また、ともに筋芽細胞C2C12の分化過程で分化に伴い発現が上昇することを明らかにした。

２）筋芽細胞C2C12へのRNAi法によるRbm24あるいはRbm38の遺伝子発現抑制により、DNA合成や細胞分裂の促進がもたらされ、筋管細胞への分化抑制を生ずることを明らかにした。

３）筋芽細胞C2C12への発現ベクター導入によるRbm24やRbm38の遺伝子過剰発現により、DNA合成抑制や細胞分裂停止がもたらされ、筋管細胞への分化が促進されることを明らかにした。

４）筋分化過程の細胞増殖停止に関係する分子機構のうち、p21の作用に着目し、Rbm24やRbm38のp21 mRNAへの結合について検討し、Rbm38のみp21 mRNAと結合することを明らかにした。

５）RNAi法によるRbm38の遺伝子発現抑制がもたらす筋分化抑制は、p21過剰発現によりレスキューされることを明らかにした。

以上の成果は筋分化の分子機構や筋疾患の病態の理解に役立ち、再生医療などに通じる新規薬剤標的開発にも資する情報を明らかにしたものと考えられ、博士（薬学）の学位を授与するにふさわしいものと考える。