

氏 名（本籍）	寶田 徹（兵庫県）
学位の種類	博士（薬学）
学位記番号	博第 37 号
学位授与年月日	平成 29 年 3 月 9 日
学位授与の条件	学位規程第 4 条第 1 項該当者
学位論文の題名	エクソン認識を制御する RNA 結合蛋白質解析法構築と 遺伝性疾患治療薬開発への応用研究
論文審査委員	主 査 教 授 和田 昭盛 副 査 教 授 江本 憲昭 副 査 教 授 長谷川 潤 副 査 准教授 竹内 敦子

論文内容の要旨

RNA スプライシングは、主に RNA と蛋白質の巨大複合体であるスプライソソームの触媒反応によって進行する。これらの構成因子が適切なエクソン-イントロン境界部位を認識し、イントロン配列の除去とエクソン配列の連結を行う。RNA 結合蛋白質の一つである「スプライシング制御因子」は、スプライソソームの機能を補助することにより、精巧なスプライシング反応の進行に関わる（図 1）¹⁾。この制御機構の破綻は多くの重篤な疾患を引き起こすことが知られている²⁾。

スプライシング病として知られている筋緊張性ジストロフィー（Myotonic dystrophy type 1; DM1）ではインスリンレセプター（Insulin receptor; IR）の選択的スプライシング異常が生じ、エクソン 11 を欠失したアイソフォーム（IR-A）が主に産生される（図 2）。これはインスリンの細胞内へのシグナル伝達効率を低下させるために、DM1 患者は耐糖能異常を併発する³⁾。

スプライシング異常を修正するための治療アプローチとして核酸医薬品である「アンチセンスオリゴヌクレオチド（Antisense oligonucleotide; AO）」を用いる方法がある^{4,5)}。AO によるスプライシング異常の修正は幾つかの疾患を対象とした臨床試験が行われており、世界標準の治療法となりつつある。しかしながら、AO は合成費用が高額となるため、患者への経済的負担が大きくなることが問題視されている。もう一つのスプライシング異常を修正する方法として「低分子化合物」を用いる方法がある⁶⁾。AO と比較した場合の特異性の低さが課題とされているが、利便性やドラッグデリバリーの優位性などから、現在、その実用化が期待されている。

著者は DM1 患者で併発する耐糖能異常が IR の選択的スプライシング異常に起因することに着目し、低分子化合物を用いたスプライシング異常の修正を試みた。その結果、ポリフェノール成分の一つがス

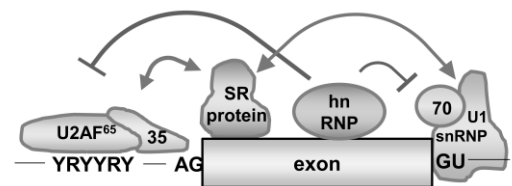


図 1 エクソン認識に関わるスプライシング制御因子

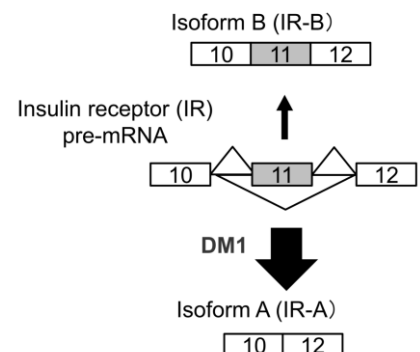


図 2 DM1 における IR スプライシング異常

プライシング異常を修正することを見出した⁷⁾。また本化合物のプライシング調節作用に関する分子機序を解明するため、幾つかの分子生物学的手法を用いた検証を行った。プライシング異常を修正する新規治療薬の開発には標的となるプライシング制御因子の同定およびその解析法が必要となる。本研究では「分子生物学的な実験手法」と「網羅的解析が可能な質量分析 (Mass spectrometry; MS) 法」を組み合わせた「未知結合蛋白質同定法」を構築した。これを利用し、エクソン 11 領域に直接結合するプライシング制御因子を同定した。プライシング制御因子の RNA への結合を阻害する低分子化合物の探索および細胞内在性 IR のプライシング反応への影響を検討し、本手法の有用性を評価した。

I. IR の選択的プライシング

I-1. IR の選択的プライシングを操作する低分子化合物の探索

IR のエクソン 11 は選択的プライシングを受け、エクソン 11 を含むアイソフォーム (Isoform B; IR-B) とエクソン 11 を欠くアイソフォーム (Isoform A; IR-A) が産生される。健常者では、インスリンの細胞内へのシグナル伝達効率が良い IR-B が主に産生される。しかしながら、DM1 ではプライシング異常によりエクソン 11 を欠失した IR-A が主な産生物となる。この IR-B の産生障害は耐糖能異常を引き起こす³⁾。そこで著者は、IR 遺伝子のプライシング時にエクソン 11 の取込みを促進させ、IR-B の産生を促す低分子化合物の探索を行った。播種した HeLa 細胞の培養液へ候補化合物を添加し、培養後、RNA の抽出および RT-PCR を行った。IR のエクソン 11 の有無を検出できるようにエクソン 10 と 12 上に設計したプライマーを用いて PCR を行った。PCR 産物をキャピラリー電気泳動で分離し、プライシング産物を解析した。薬物スクリーニングを行った結果、ポリフェノール成分の一つである Resveratrol (RES) がエクソン 11 の取込みを強く促進させることを見出した (図 3)⁷⁾。この結果から、RES は DM1 患者のプライシング異常を修正できると考えられた。

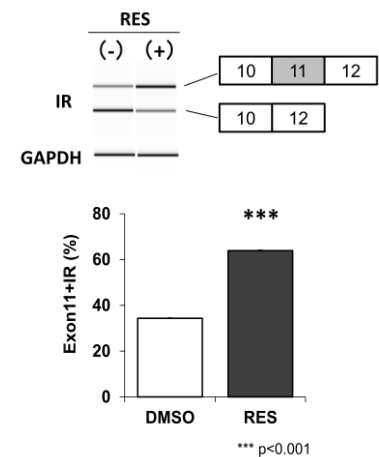


図 3 RES のエクソン 11 取り込み促進作用

I-2. DM1 患者由来細胞の IR 選択的プライシング異常の修正

DM1 は表現促進現象を生じることが知られており⁸⁾、世代を経るごとに発症年齢が若年化し、臨床症状がより重篤になる。本実験では 3 世代にわたる DM1 患者由来細胞を用いて、世代による IR の選択的プライシング異常の違いを確認した。その結果、エクソン 11 を含む転写産物の割合 (Exon11+IR) は第 1 世代から第 3 世代へと世代を経るごとに低下し、エクソン 11 の欠失が増加していた (図 4)。この結果は患者由来細胞においても表現促進現象によるプライシング異常が生じていることを示唆している。このプライシング異常を RES が修正できるかどうかを確認するため、細胞培養液中に RES を添加し、同様の実験を行った。その結果、RES は重症度に関わらず、DM1 患者におけるエクソン 11 の取り込みを健常者以上まで回復させることが明らかとなった (図 5)。

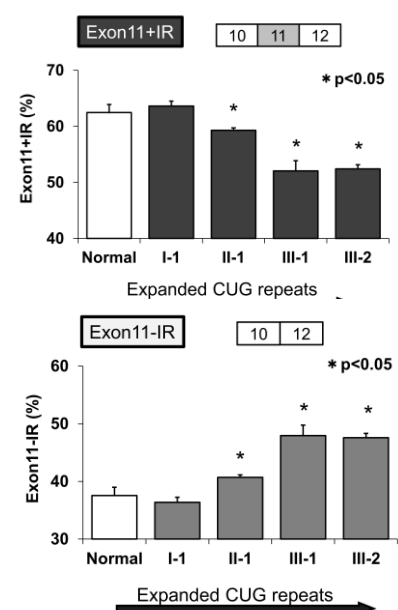


図 4 表現促進現象と IR スプライシング異常

以上の結果より、RES はエクソン 11 の選択的スプライシング異常を修正することにより、DM1 患者で併発する耐糖能異常に対する新規治療薬候補になることが示唆された⁷⁾。

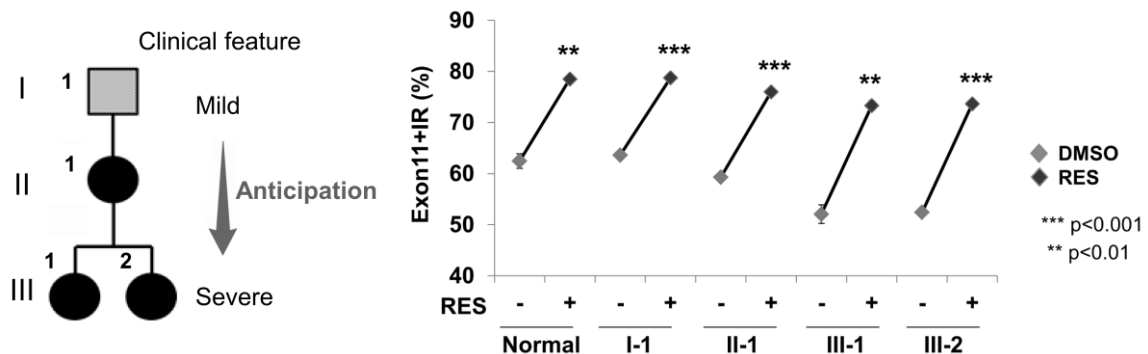


図5 DM1 患者由来細胞の家系図および RES 添加によるエクソン 11 の認識促進作用

II. RES のスプライシング調節作用の検討

II-1. RES の代表的シグナル経路と IR スプライシング

RES は数多くのシグナル経路に関わることが報告されている⁹⁻¹¹⁾。代表的な活性化経路として SIRT1 (Sirtuin 1) および AMPK (AMP activated protein kinase) 活性化経路が知られている。両者の経路はインスリン抵抗性の改善にも関与することが報告されており¹²⁻¹⁴⁾、II 型糖尿病患者に対する治療標的としても注目されている。RES のスプライシング調節作用がこれらの経路を介して発現しているかどうかを確認するため、SIRT1 活性化剤および AMPK 活性化剤を用いて、エクソン 11 のスプライシング変化を確認した。

SRT1720 は RES の 1000 倍程度強い SIRT1 活性化作用をもつ合成化合物である。RES によるスプライシング調節作用が確認された健常者由来細胞および DM1 患者由来細胞に対して SRT1720 を添加し、SIRT1 の活性化を行ったが、有意なスプライシング変化は確認できなかった (図 6)。AICAR は AMPK 活性化作用を有するアデノシンアナログである。AICAR をこれらの細胞に添加した場合においても、SRT1720 と同様に有意なスプライシング変化は確認されなかった (図 6)。

これらの結果は RES が代表的なシグナル経路である SIRT1 および AMPK 活性化経路に非依存的に IR の選択的スプライシングを調節することを示唆している⁷⁾。

II-2. RES の CUGBP1 への作用

DM1 における IR のスプライシング異常を引き起こす原因蛋白質の一つとして CUG-binding protein 1 (CUGBP1) が挙げられる。CUGBP1 はエクソン認識を抑制するスプライシング制御因子であり、DM1 ではその定常レベルが増大することにより、スプライシングが異常化する¹⁵⁾。CUGBP1 は主に選択的スプライシングを受けるエクソン近傍のイントロン配列に結合することが報告されている¹⁶⁾。そこで、エクソン 11 近傍の CUGBP1 の結合配列を予測し、エクソン 11 の上流配列内に CUGBP1 の結合領域として報告がある UG-rich 領域を発見した^{17,18)}。合成 RNA プローブと HeLa 細胞核抽出液を利用した *in vitro* の結合反応を行い、エクソン 11 近傍配列と CUGBP1 の複合体形成を試みた。CUGBP1 抗体を用いた

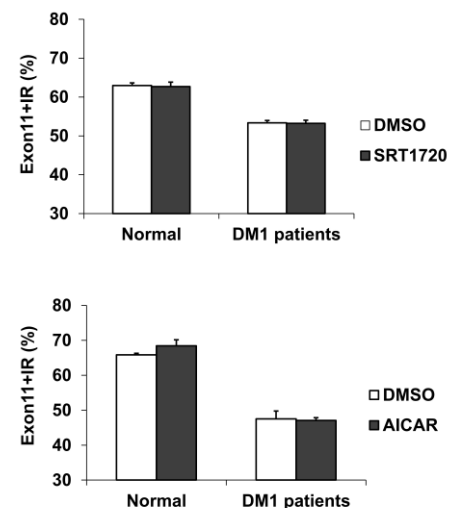


図6 SIRT1 および AMPK 活性化と IR スプライシング

Western blot 法で複合体の検出を行った結果、RNA と結合することにより、移動度が低下した CUGBP1 由来のバンドが観察された。

次に RES が CUGBP1 と RNA の複合体形成に影響を与えることによってスプライシング反応を調節しているかどうかを検証するため、RES 存在下で *in vitro* 結合反応を行った。上記と同様の方法で複合体の検出を行った結果、RES が CUGBP1 のエクソン 11 近傍配列への結合を濃度依存的に阻害することを見出した。本実験結果は RES の複合体形成阻害作用がスプライシング調節作用を示す上での一つの要因であることを示唆している。

III. スプライシング制御因子の同定法の構築とその応用

pre-mRNA 上にはスプライシングを制御するためのシス配列が存在する。スプライシング制御因子がエクソン認識を促進する配列や抑制する配列に結合することにより、スプライシング反応は調節されている。エクソン認識を促進する因子として SR (serine/arginine-rich) 蛋白質が知られており、RNA 認識モチーフ (RNA recognition motif: RRM) を介して pre-mRNA に結合し、スプライソソーム構成因子と相互作用すると考えられている。一方、エクソン認識を抑制する蛋白質として hnRNPs (heterogenous nuclear ribonucleoproteins) が知られている。その多くは SR 蛋白質やスプライシング基本因子と拮抗することにより、エクソン認識を抑制する。

スプライシング制御因子の同定は複雑なスプライシング機構の理解だけでなく、スプライシング異常を修正するための標的分子の発見や治療薬の開発へとつながる。これを実現するためには、エクソン認識に関わる未知蛋白質を網羅的に解析する手法が必要となる。そこで合成 RNA プロブを用いた *in vitro* での複合体形成反応や Electrophoretic mobility shift assay (EMSA) などの分子生物学的な実験手法と未知分子の同定および網羅的解析が可能な質量分析法を組み合わせたスプライシング制御因子同定法の構築を行った (図 7)。エクソン 11 を例に、この手法を用いてスプライシング制御因子の同定を試みた。

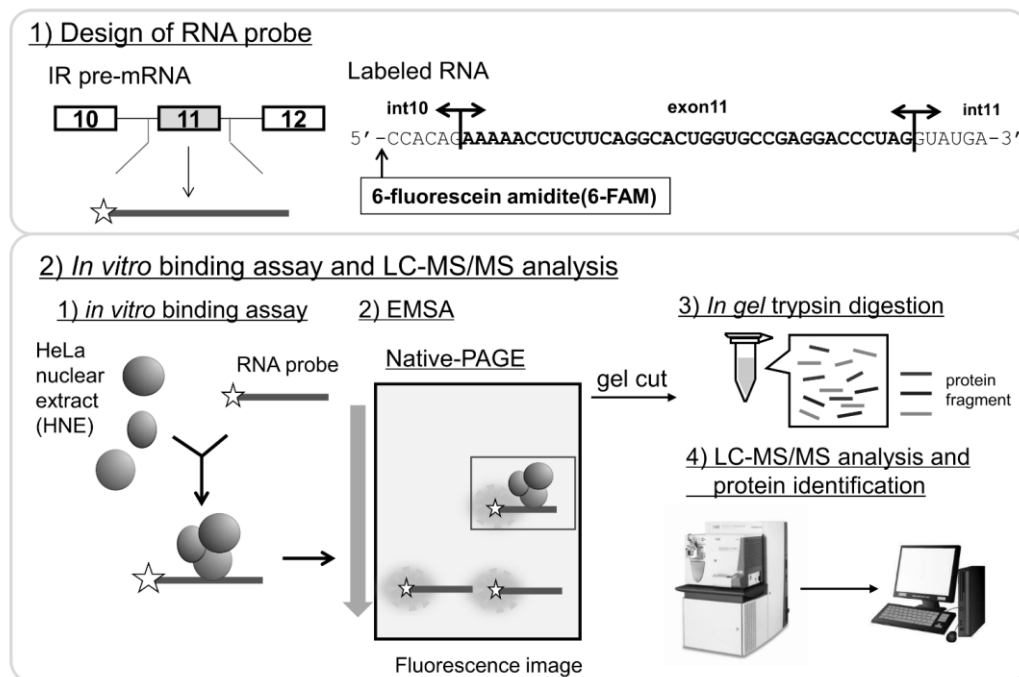


図 7 スプライシング制御因子同定法の構築

III-1. 質量分析法を利用したスプライシング制御因子の同定

(i) RNA-EMSA 法を利用した RNA-蛋白質複合体の形成

核酸と蛋白質の相互作用解析法の一つに EMSA がある。EMSA は蛋白質と核酸が相互作用し、複合体を形成することにより、電気泳動時に核酸の移動度が低下する現象を利用した解析法である。RNA-EMSA を行うため、エクソン 11 全領域とイントロン断片からなる RNA プロブを合成した。従来の EMSA 法では RNA プロブの標識にラジオアイソトープ (RI) ^{32}P が主に使用される。しかしながら ^{32}P は半減期が短いことや取扱いに注意を払う必要がある。本研究では扱いやすい非 RI ラベル化法の一つである蛍光色素 (6-FAM) を採用した¹⁹⁾。この RNA プロブとスプライシング制御因子を含む HeLa 細胞核抽出液を *in vitro* で反応させ、RNA-蛋白質複合体の形成を行い、電気泳動で分離した。その結果、複合体形成を示す 4 本の蛍光バンド (Complex a,b,c,d) が観察された (図 8)。複合体の構成蛋白質を同定するため、これらの蛍光バンドを切り出し、ゲル内酵素消化後、抽出したペプチド断片を LC-MS/MS 解析した。

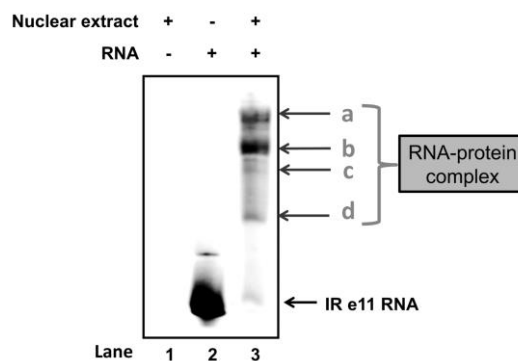


図 8 RNA-蛋白質複合体形成

(ii) LC-MS/MS 解析による結合蛋白質の同定と分子機能に基づく分類

質量分析法は広範な生体分子を分析することが可能であり、分子そのものから構造情報を得ることができるため、未知分子の同定に利用できる。質量分析を行うためには、測定サンプルがイオン化される必要があり、その手法として様々な方法が開発されている。本研究では試料の分離が可能な液体クロマトグラフィー (LC) と接続させたエレクトロスプレーイオン化法 (ESI 法) を採用することにした。さらにエレクトロスプレーを小型化したマイクロスプレーチップを使用し、より小さな液滴の生成と少ない流量による高感度化を図った。質量分析部にはリニアイオントラップ (LTQ) とオービトラップ (電場型フーリエ変換質量分析装置) のハイブリッド質量分析システムを採用した。これらの測定装置による蛋白質同定法を最適化した後、前述の RNA-EMSA で観察された 4 つの複合体の構成蛋白質を同定した。

4 つの複合体の LC-MS/MS 解析の結果、ペプチドの質量や部分配列情報から多くの蛋白質が候補結合蛋白質として同定された (228 種)。さらに、複合体と同じ移動度をもつ偽陽性成分を除外するため、細胞核抽出液のみを電気泳動し、同移動度の領域をゲルから切り出した。ここで同定される蛋白質を偽陽性成分とし、コントロールに利用した。図 9 はコントロール (灰色) と複合体形成由来 (黒色) のバンド内で同定された蛋白質数を比較したベン図である。Complex a においては 78 種の蛋白質が両群に含まれていたことから、これらは複合体と同じ移動度をもつ偽陽性蛋白質であると考えられる。一方、複合体形成由来のバンドのみで同定された蛋白質数は 17 種であった。Complex b では 13 種、Complex c では 14 種、Complex d では 5 種の計 49 種が IR エクソン 11 領域に結合する蛋白質であると考えられた。

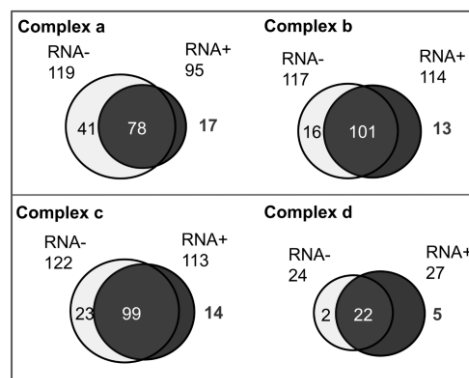


図 9 コントロールと複合体の同定蛋白質の比較

(iii) 同定蛋白質の分子機能および RNA 結合ドメインによる細分化

LC-MS/MS 解析で同定された 49 種の結合蛋白質を分子機能に基づいて分類を行った。その結果、49 種中 30 種は RNA 結合能を有することが知られていた。スプライシング制御因子の多くは RNA と相互作用するために必要となる「RNA 結合ドメイン」を構造内にもつ。RNA 結合能を有する 30 種の同定蛋白質を 7 種類の RNA 結合ドメインに基づいて細分化を試みた (図 10)。ここでは最も広く存在することが知られており、スプライシング制御因子の多くが有するドメインである RRM に着目した。30 種の同定蛋白質中では 5 種の蛋白質が RRM を構造として有していた。これらの 5 種の蛋白質は RRM を介して RNA と相互作用することが予想された。LC-MS/MS 解析の結果、スプライシング抑制作用を有する「hnRNPA1 (heterogenous nuclear ribonucleoprotein A1)」が最も高いスコアで同定された。hnRNPA1 は IR エクソン 11 の認識を抑制することが既に報告されており、本解析手法の有用性を確認することができた。

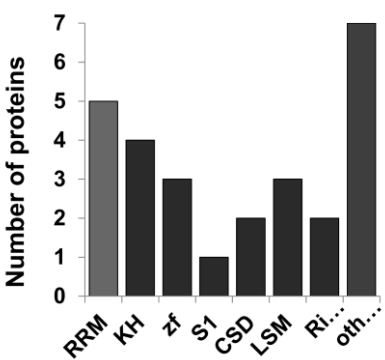


図 10 RRM に基づく同定蛋白質の細分化

III-2. スプライシング制御因子の IR のエクソン 11 領域への結合様式の確認

スプライシング制御因子の RNA への結合様式には主に以下の二つが考えられる。1) RNA 配列に直接結合する場合と、2) 他の蛋白質との相互作用を介して複合体を形成する場合である。hnRNPA1 がエクソン 11 配列に直接結合するかどうかを検証するため、光架橋形成反応を利用した実験を行った。In vitro で形成させた RNA-蛋白質複合体に紫外線を照射し、近接するアミノ酸と塩基間に架橋構造を形成させた。hnRNPA1 が RNA に対して直接結合する場合、SDS による変性条件下においても複合体形成は維持されるが、間接的に結合する場合では複合体から解離されることを利用し、複合体の結合様式を確認した。

架橋形成後の反応液を変性後に SDS-PAGE で分離した結果、約 50kDa 付近に一本の強い蛍光バンドが観察された。RNA プローブが約 16kDa であることから結合蛋白質の分子量は約 34kDa であると予想された。この蛍光バンドが hnRNPA1 と RNA プローブの複合体であることを確認するため、蛍光バンドを切り出し、ゲル内酵素消化と LC-MS/MS 解析によって、結合蛋白質の同定を行った。図 11 に hnRNPA1 のペプチド断片として同定され、最もイオン強度が高く検出されたペプチド「GFAFVTFDHDSVDK」(aa.147-161) の同定結果を示した。同様の原理で同定されたペプチド情報を統合することによって、hnRNPA1 が高いカバー率とスコアで同定された (図 11)。

以上の結果より、光架橋形成反応および SDS-PAGE と LC-MS/MS 解析を用いることにより、hnRNPA1 が IR のエクソン 11 領域内の配列に直接的に結合していることが確認できた。

N-terminal G F A F V T F D D H D S V D K C-terminal													
y14 y13 y12 y11 y10 y9 y8 y7 y6 y5 y4 y3 y2 y1													
b1 b2 b3 b4 b5 b6 b7 b8 b9 b10 b11 b12 b13 b14													
#1	b(1+)	b(2+)	Seq.	y(1+)	y(2+)	#2							
1	58.03	29.52	G			15							
2	205.10	103.05	F	1642.74	821.87	14							
3	276.13	138.57	A	1495.67	748.34	13							
4	423.20	212.10	F	1424.63	712.82	12							
5	522.27	261.64	V	1277.56	639.29	11							
6	623.32	312.16	T	1178.50	589.75	10							
7	770.39	385.70	F	1077.45	539.23	9							
8	885.41	443.21	D	930.38	465.69	8							
9	1000.44	500.72	D	815.35	408.18	7							
10	1137.50	569.25	H	700.33	350.67	6							
11	1252.53	626.77	D	563.27	282.14	5							
12	1339.56	670.28	S	448.24	224.62	4							
13	1438.63	719.82	V	361.21	181.11	3							
14	1553.65	777.33	D	262.14	131.57	2							
15			K	147.11	74.06	1							

Protein name	Peptides	Coverage(%)	Score
hnRNPA1	25	35.22	92.93

図 11 質量分析法による hnRNPA1 の同定結果

III-3. 低分子化合物を用いた hnRNPA1-RNA 複合体形成阻害

hnRNPA1 はスプライソソームによる様々な遺伝子のエクソン認識を抑制することが報告されており、IR のエクソン 11 についても同様の報告がされている^{20, 21)}。脊髄性筋萎縮症の治療アプローチとして、hnRNPA1 の RNA への結合を阻害することにより、選択的スプライシングを操作する手法が提唱されている^{22, 23)}。そのため、hnRNPA1 のエクソン 11 領域への結合を阻害する低分子化合物を発見することができれば、エクソン 11 の認識を促進させ、スプライシング様式を変更することができると考えた。

上述の *in vitro* 結合反応実験を利用し、hnRNPA1-RNA 複合体の形成を直接阻害する低分子化合物の探索を試みた。5 つの各種候補化合物存在下で複合体形成を行った結果、ポリフェノール成分である Quercetin (QC) 存在下において複合体形成が強く阻害されることを見出した (図 12)。また本化合物は濃度依存的に複合体形成を阻害した。これまでに QC は hnRNPA1 の C 末端領域と結合し、transportin-1 (Tnpol) を介した細胞質から核への移行を妨げることによって、抗がん作用を示すことが報告されている²⁴⁾。さらに QC は hnRNP C の脱リン酸化作用をもつことが報告されており、スプライシング反応を調節する可能性が示唆されていた²⁵⁾。これらの結果は、QC が hnRNPA1 の RNA への結合を阻害し、エクソン 11 のエクソン認識を促進することによって、スプライシング異常を修正することを示唆している。

次に、QC を HeLa 細胞培養液中に添加し、細胞内在性 IR の選択的スプライシングの操作を試みた。その結果、エクソン 11 を含む転写産物 (Exon11+IR) の割合を 43.9% から 59.9% まで有意に増大させることに成功した (図 13)。この結果は QC が IR のスプライシングを操作し、インスリン感受性の高いアイソフォームへと変更することによって、インスリン抵抗性を改善する可能性を示している。QC は RES と同様に様々な生体内作用をもつことが知られているため、スプライシング調節作用の発現には他の経路も同時に関与している可能性が考えられる。しかしながら、阻害作用が見られた低分子化合物をさらに最適化することができれば、より特異的な化合物の発見につながると考えられる。

本研究で構築したスプライシング制御因子同定法を利用することにより、エクソン 11 領域の RNA 配列に hnRNPA1 が間接的にではなく、直接的に結合していることを確認した。網羅的解析が可能な LC-MS/MS 解析によ

って、hnRNPA1 以外にも多くのスプライシング制御因子を含む蛋白質が同定されている。本研究では機能と研究が進んでいる hnRNPA1 に着目したが、それ以外にもエクソン 11 の認識に関わる重要な因子が含まれている可能性は残されている。また本手法を応用し、hnRNPA1 という特定の因子を標的分子として捉えることによって、RNA への結合を阻害する QC を見出すことに成功した。さらに QC は RES と同様に細胞内在性 IR の選択的スプライシング様式を変更することが可能であった。本手法は他の遺伝子におけるエクソンについても応用することができると考えられたため、複雑なスプライシング機構の理解、標的分子の発見や治療薬開発の一助となると考える。

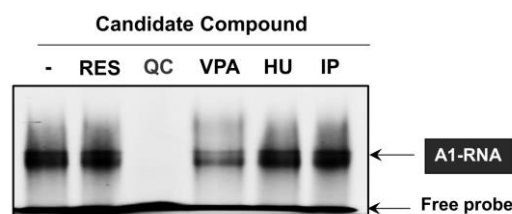


図 12 低分子化合物を用いた複合体形成阻害

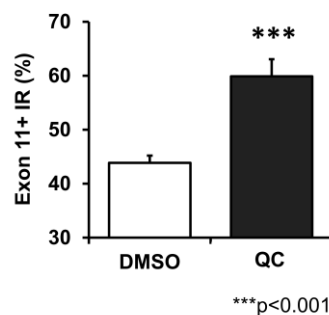


図 13 QC の細胞内在性 IR のスプライシング調節作用

低分子化合物を用いたスプライシング異常修正は利便性やドラッグデリバリーの優位性などから、その実用化が待望されている。IR のエクソン 11 におけるスプライシング異常を修正する低分子化合物を探索した結果、食品に含まれるポリフェノール成分の RES を見出した。全作用機序の解明の課題は残るが、作用点の一つがエクソン認識を抑制するスプライシング制御因子の CUGBP1 であることを発見した。RES は DM1 患者細胞においてもスプライシング異常の修正効果を発揮したことから、新規治療薬候補のリード化合物となる可能性がある。

現在のオミックス解析では各階層が独立した研究分野として扱われることが多い。しかしながら、生体内では RNA と蛋白質の相互作用等の階層を超えた強い関わりが存在する。これらの階層を繋ぐ研究分野の発展は複雑な生体機能の解明や新規治療薬開発に極めて重要となる。本研究の後半では「分子生物学的な実験手法」と「網羅的解析が可能な質量分析法」を組み合わせた「未知結合蛋白質同定法」を構築した。本手法を利用することで、IR のスプライシングを制御することが知られている hnRNPA1 が RNA に直接結合することを確認した。さらに、結合を阻害する低分子化合物を探索した結果、ポリフェノール成分である QC の結合阻害作用を見出した。また QC は細胞内在性 IR のスプライシングを調節していた。本法を応用することで、標的となるスプライシング制御因子の同定が可能となり、標的分子側からの低分子化合物の発見が容易になると考える。構築した解析法は特定配列の解析に限定されないため、DNA や RNA に結合する様々な蛋白質の解析に応用することが可能である。本研究手法の発展は複雑な生命現象に関する新知見をもたらすだけでなく、新たな治療標的の発見を起点とした疾患治療につながることを期待できる。

【参考文献】

- 1) Busch A and Hertel KJ. *Wiley Interdiscip Rev RNA*. **3**, 1-12 (2012)
- 2) Wang GS and Cooper TA. *Nat Rev Genet*. **8**, 749-761 (2007)
- 3) Savkur RS, Philips AV, and Cooper TA. *Nat Genet*. **29**, 40-47 (2001)
- 4) Matsuo M. *IUBMB Life*. **53**, 147-152 (2002)
- 5) Aartsma-Rus A. *Methods Mol Biol*. **867**, 97-116 (2012)
- 6) Nishida A, et al. *Nat Commun*. **2**, 308 (2011)
- 7) Takarada T, et al. *Brain Dev*. **37**, 661-668 (2015)
- 8) Udd B and Krahe R. *The Lancet Neurology*. **11**, 891-905 (2012)
- 9) Jang M, et al. *Science*. **275**, 218-220 (1997)
- 10) Howitz KT, et al. *Nature*. **425**, 191-196 (2003)
- 11) Park SJ, et al. *Cell*. **148**, 421-433 (2012)
- 12) Feige JN, et al. *Cell Metab*. **8**, 347-358 (2008)
- 13) Mitchell SJ, et al. *Cell Rep*. **6**, 836-843 (2014)
- 14) Coughlan KA, et al. *Diabetes Metab Syndr Obes*. **7**, 241-253 (2014)
- 15) Kuyumcu-Martinez NM, Wang GS, and Cooper TA. *Mol Cell*. **28**, 68-78 (2007)
- 16) Masuda A, et al. *SciRep*. **2**, 209 (2012)
- 17) Takahashi N, et al. *Biochem Biophys Res Commun*. **277**, 518-523 (2000)
- 18) Suzuki H, et al. *Genes Cells*. **7**, 133-141 (2002)
- 19) Wang K, et al. *Mol Biol Rep*. **37**, 2871-2875 (2010)
- 20) Jean-Philippe J, Paz S, and Caputi M. *Int J Mol Sci*. **14**, 18999-19024 (2013)
- 21) Talukdar I, et al. *PLoS One*. **6**, e27869 (2011)
- 22) Hua Y, et al. *Am J Hum Genet*. **82**, 834-848 (2008)
- 23) Hache M, et al. *J Child Neurol*. **31**, 899-906 (2016)
- 24) Ko CC, et al. *J Biol Chem*. **289**, 22078-22089 (2014)
- 25) Mayrand SH, Dwen P, and Pederson T. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **90**, 7764-7768 (1993)

論文審査の結果の要旨

本学位論文では生体内機構の選択的スプライシングに着目し、耐糖能異常の原因となるインスリンレセプター（IR）のスプライシング異常を修正する低分子化合物を探索した。まず、IR の選択的スプライシングを赤ワイン等に多く含まれる Resveratrol（RES）がスプライシングを調節することを見出した。この作用は細胞種に依存した反応を示し、耐糖能異常の原因となる筋緊張性ジストロフィー（DM1）患者由来細胞の異常を重症度に関わらず、正常以上にまで修正することを明らかにした。また、RES のスプライシング調節作用について検討し、RES の代表的なシグナル経路やスプライシング促進因子である MBNL1、新規蛋白質合成合成には関与せず、IR のスプライシング異常の原因因子の一つである CUGBP1 の RNA への結合阻害に関わっていることを示し、RES の作用メカニズムの解明研究に発展させている。次に、RNA-EMSA 法を利用した分子生物学的なアプローチと網羅的解析が可能な質量分析アプローチを組み合わせた制御因子同定法を構築した。本法により IR のスプライシングを制御することが知られている hnRNP A1 が RNA に直接結合することを明らかにし、優秀な方法であることを証明した。さらに、結合を阻害する低分子化合物を探索した結果、ポリフェノールである Quercetin（QC）の結合阻害作用を発見し、細胞内在性 IR のスプライシングを調節するという興味ある結果を得ている。本法を利用することで、標的となる制御因子を同定し、標的分子側からの低分子化合物の発見が容易になることを提案した。

本研究では「分子生物学的な実験手法」と「網羅的解析が可能な質量分析法」を組み合わせ、「未知結合蛋白質同定法」を構築した。本研究手法の発展は複雑な生命現象に関する新知見をもたらすだけでなく、新たな治療標的の発見などの疾患治療に貢献することが期待でき、この領域での研究に光明を与えている。

以上、エクソン認識を制御する RNA 結合蛋白質解析法構築と遺伝性疾患治療薬開発への応用研究を行った著者の研究は独創性に富み、数多くの興味ある新知見を明らかにしており、極めて高い学問的価値を有しているものと判断できる。

實田徹の論文を審査した結果、博士（薬学）の論文として適当と判定する。