

個人研究報告

機能解析グループ 田中一則

1. Identification of protein factors which specifically bind to the conserved flanking sequences within the 3'-UTR of the myotonic dystrophy protein kinase (DMPK) gene

Myotonic dystrophy (DM) is an autosomal dominant disease caused by the expansion of a CTG trinucleotide repeat in the 3'-untranslated region (UTR) of the myotonic dystrophy protein kinase (DMPK) gene. The pathogenesis of DM and the mechanism of the CTG repeat expansion remain unknown. Recent studies using the DMPK CTG repeat transgenic animals have demonstrated that instability and expansion were influenced by the particular line. *Cis*-acting elements which flank various trinucleotide repeat sequences have also been correlated with the degree of "expandability" for different trinucleotide repeat disease. These results imply the presence of *cis*- and *trans*-acting genetic modifiers which influence instability in mice and humans.

To aid in the delineation of the molecular mechanism(s) of CTG repeat expansion, we sought to identify *trans*-acting protein factors which bind to regions of the gene adjacent to the repeat. By an electrophoretic mobility shift assay using the flanking sequence DNA probe of the DMPK gene, we found eight specific binding activities in partially purified nuclear and cytoplasmic fractions extracted from testis of a miniature porcine species. Their binding activities were assigned to three distinct regions of the DMPK gene proximal to the CTG repeat. These proximal binding regions map to sequences which are highly conserved between the human and mouse genes. These results provide the first evidence for the existence of the novel *cis*-acting elements in the 5'-flanking region of the DMPK CTG repeats and *trans*-acting factors associating with them. Further characterization of these factors may yield useful information regarding the mechanism(s) of repeat expansion and will help define sequence elements which modify repeat instability in *cis*.

2、ハンチントン病(HD)遺伝子の CAG リピートの不安定性に関わる因子及び転写調節に関与する因子の探索

ハンチントン病(HD)は、常染色体優性遺伝を示す神経変疾患である。HD 発症 (遺伝子変異) は第1エクソン内 CAG リピート (ポリグルタミン) の増大に起因する。HD

遺伝子の発現は脳特異的ではなく、全身の臓器で認められている。一方、HD の病理学的特徴は脳基底核線条体神経細胞に特異的な変性と脱落である。これらの特異的な神経細胞死の CAG リピートの増大や HD 遺伝子の転写調節機構との相関については未だ不明である。

HD 発症機序の理解のために、CAG リピートの不安定性に関わる因子及び HD 遺伝子の転写調節に関与する因子の探索を試みた。HD 遺伝子の発現は全身の組織で認められること、リピートの伸長は生殖細胞での複製時に引き起こされる可能性が高いこと並びに HD の表現促進が父系遺伝の際に顕著であることなどから、調節因子を探索するための材料としてヒト精巢を選択した。正常リピート数 (18CAG リピート) を含むヒト HD 遺伝子の 5'上流域 (プロモーター領域を含む) (-364~+158) に結合する調節因子の探索は、酵母の One-Hybrid System を用いて行われた。ヒト精巢由来の cDNA ライブラリーをスクリーニングした結果、3つのポジティブクローン(クローン 2, 8, 11)を得た。DNA 配列の解析から3つのクローンは新規蛋白質をコードしていた。さらに、クローン 2 と 8 は One-Hybrid System において特に HD 遺伝子プロモーター領域中の 20bp リピート配列を含む領域への結合活性を示した。ノーザンブロット解析からは、クローン 2 と 8 の様々なヒト組織での発現が認められた。次に 5'RACE 法やヒト精巢由来の cDNA ライブラリーから完全長 cDNA を取得したところ、クローン 2 には他に 2 種類のアイソフォーム (M, L) が存在することが判明した。これら完全長クローン 2 (M, L) と 8 の推定アミノ酸配列の比較からは構造的な類似点、核移行配列、Znフィンガードメイン、両者間で高い相同性を示す C 末端領域 (37 アミノ酸残基: 機能不明) などが認められた。また、GFP 融合蛋白質を用いての細胞内局在解析はクローン 2 (M, L) の核への、クローン 8 の細胞質への局在を示した。しかしながら、核移行配列を持つクローン 8 の局在パターンはその推定アミノ酸配列中に認められた核排出配列の影響によるものと考えられた。一方、クローン 11 は HD 遺伝子プロモーター配列ではなく、CAG リピート近傍配列に対して結合活性を示した。ノーザンブロット解析では、精巢、卵巣のみでの発現が認められ、特に精巢での発現が著しく強かった。

ここで本研究において得られた成果の考察を行う。イギリスの研究グループが HD 遺伝子プロモーター領域中の 20bp リピート配列に結合する因子の存在を示唆していることやクローン 2 と 8 の酵母の系を用いた結合領域解析、それらの推定アミノ酸配列に基づく構造的特徴や細胞内局在解析から、少なくともクローン 2 と 8 が HD 遺伝子の新規転写調節の候補因子であることが本研究の成果によって示唆された。また、クローン 11 は酵母の系を用いた結合領域解析から CAG リピートの近傍配列に結合する可能性が高い結果が得られた。また、クローン 11 がほぼ精巢のみでの発現している (卵巣においてもわずかに発現は認められる) 解析結果は、HD の表現促進現象が父系遺伝の際に顕著である特徴と何らかの関連性を持つ可能性を示唆している。つまり、クローン 11 が HD 遺伝子の CAG リピートの不安定性に関わる候補因子であることを示唆するこれらの結果も本研究における成果の 1 つである。