

氏名(本籍)	山 <sup>やま</sup> 口 <sup>ぐち</sup> 由輝 <sup>ゆきお</sup> 男(栃木県)			
学位の種類	博士(医学)			
学位記番号	博甲第6213号			
学位授与年月日	平成24年3月23日			
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当			
審査研究科	人間総合科学研究科			
学位論文題目	<b>Stau1 regulates Dvl2 expression during myoblast differentiation</b> (筋分化過程において Stau1 は Dvl2 の発現を制御する)			
主査	筑波大学教授	医学博士	加藤光保	
副査	筑波大学講師	博士(医学)	詫間浩	
副査	筑波大学助教	博士(薬学)	船越祐司	
副査	筑波大学助教	博士(理学)	高崎真美	

## 論文の内容の要旨

### (目的)

DNA から転写された RNA は、適切な時期、場所、量でタンパク質を産生するために、スプライシング、輸送、安定化、局在化、翻訳などの一連の転写後発現制御を受ける。RNA 結合タンパク質は、転写後発現制御の全ての段階に関わっており、細胞内外の環境変化に応答する上で重要な役割を担っている。ショウジョウバエ卵母細胞の前後軸を決定する因子として同定された RNA 結合タンパク質 Staufen は、複数の二重鎖 RNA 結合ドメインを持ち、標的となる転写産物に結合して局在化、翻訳、分解などの転写後発現制御を行っている。

著者らの研究室では、ショウジョウバエ Staufen の哺乳類オルソログである Stau1 の筋分化過程における機能解析を行い、これまでに Stau1 が筋分化に対して抑制的に機能することを見出した。しかしながら、その詳細な機構については明らかになっていなかった。幾つかの報告から、Stau1 が Wnt シグナル伝達経路の構成因子である Dishevelled (Dvl) の mRNA と相互作用すること、さらに Wnt シグナルが筋分化制御に関与していることが示されており、そこから「Stau1 は Dvl mRNA の転写後制御を介して筋分化を調節している」という仮説を立て検証を進めている。本論文では、Stau1 が筋分化を抑制する際に制御している標的 mRNA と、その制御機構を明らかにすることを目的とした。

### (対象と方法)

Stau1 と Wnt シグナル伝達経路の構成因子である Dishevelled (Dvl) mRNA が相互作用するか IP RT-PCR (Immunoprecipitation Reverse Transcription PCR) により検討した。Stau1 ノックダウンが Dvl mRNA の発現にどのような影響を与えるのかについてはノーザンブロット法により解析した。Dvl2 mRNA と相互作用するために必要な Stau1 ドメインの同定、また Dvl2 mRNA の発現に必要な Stau1 の同定を IP RT-PCR および Stau1 の相補実験により検討した。さらに、Stau1 は Dvl2 mRNA のどの領域と相互作用しているのか RNA プルダウン解析により検討を行った。ルシフェラーゼに Dvl2 3' UTR (untranslated region) を付加したものを作製し、Stau1 ノックダウンが半減期にどのような影響を与えるのかノーザンブロット法により解析した。

次に、筋分化過程における Stau1 と Dvl2 3' UTR の相互作用を、RNA プルダウン解析により検討した。分化誘導処理時の Dvl2 の発現量をノーザンブロット法により解析した。分化誘導前後における Stau1 の細胞内局在を、Stau1 の免疫染色および細胞分画法により検討した。また、Dvl2 の過剰発現が筋分化にどのような影響を与えるのか、レトロウイルス感染および筋分化マーカーの免疫染色により検討を行った。Stau1 ノックダウンによる筋分化調節因子の発現上昇を、Dvl2 の過剰発現により抑圧するか検討した。

#### (結果)

上記の研究方法を用いて以下の研究成果が得られた。

[1] Stau1 は Dvl2 mRNA の発現に必要である。

Stau1 は Dishevelled の 3 つの哺乳類オルソログである Dvl1、Dvl2、Dvl3 mRNA と相互作用した。Stau1 ノックダウンにより Dvl2 のみ発現が低下した。Stau1 dsRBD3 は、Dvl2 mRNA の発現と相互作用するために必要であった。

[2] Stau1 は Dvl2 3' UTR の付いた mRNA の安定性の上昇に寄与している。

Stau1 は Dvl2 mRNA の 3' UTR と結合した。Dvl2 3' UTR が付加されたレポーター mRNA の半減期は、Stau1 ノックダウンにより顕著に減少した。

[3] 筋分化過程において Stau1 は Dvl2 mRNA から解離する。

筋分化誘導処理に応答するように Stau1 と Dvl2 3' UTR の相互作用は減衰した。Dvl2 mRNA の発現は筋分化誘導処理後、顕著に減少した。Stau1 の細胞内局在は分化誘導の前後において変化しなかった。

[4] Dvl2 は筋分化に対して抑制的に機能する。

Dvl2 の強制発現により筋分化は抑制された。Stau1 ノックダウンによる筋分化調節因子 myogenin の発現上昇は、Dvl2 の強制発現により抑制された。

#### (考察)

Dvl2 mRNA の 3' UTR (untranslated region) には、急速な mRNA 分解の標的となる一次配列が含まれており、Stau1 は分解因子から Dvl2 mRNA を守っているのかも知れない。筋分化に伴う Stau1 と Dvl2 3' UTR の相互作用の変化は、Stau1 の修飾や、他分子との競合的結合の均衡の乱れが考えられる。Dvl2 による筋分化制御は Wnt シグナルのどの経路が関与しているのか、また筋分化をどのように制御しているのかを検討する必要がある。Stau1 は全転写産物の内の 7% 程度と相互作用することが知られており、Dvl2 mRNA 以外の複数の mRNA の安定性制御を通して筋分化を制御しているのかも知れない。

以上の結果から、Stau1 は Dvl2 mRNA の転写後段階で発現制御を通して、筋分化の調節を行っていることを示唆した。

## 審査の結果の要旨

本研究は、Stau1 が、Dvl2 の mRNA の安定化によって筋細胞の分化を抑制しており、この抑制の解除により筋分化が進行するというオリジナリティーの高い研究成果をあげており、研究計画は精緻で、実験結果の信頼性も高く、考察も妥当である。博士論文として高く評価できる優れた研究成果をあげていると認められる。

平成 23 年 12 月 26 日、学位論文審査委員会において、審査委員全員出席のもと論文について説明を求め、関連事項について質疑応答を行い、最終試験を行った。その結果、審査委員全員が合格と判定した。

よって、著者は博士（医学）の学位を受けるに十分な資格を有するものと認める。