

学位授与番号：乙 3 1 1 4 号

氏 名：鹿島 剛

学位の種類：博士（医学）

学位授与日付：平成 27 年 3 月 25 日

学位論文名：

脊髄性筋萎縮症に関わる *SMN2* 遺伝子の第 7 エクソンのスプライシングの制御機構

主論文名：

A negative element in *SMN2* exon 7 inhibits splicing in spinal muscular atrophy.

（脊髄性筋萎縮症に関連する *SMN2* 遺伝子の負に作用する配列がエクソン 7 のスプライシングを抑制している。）

学位審査委員長：教授 吉田清嗣

学位審査委員：教授 岡野ジェームズ洋尚 教授 井口保之

論文要旨

(2部提出)

論文提出者名	鹿島 剛	指導教授名	山田 尚
--------	------	-------	------

主論文題名

A negative element in *SMN2* exon 7 inhibits splicing in spinal muscular atrophy.

(脊髄性筋萎縮症に関連する *SMN2* 遺伝子の負に作用する配列がエクソン7のスプライシングを抑制している。)

Tsuyoshi Kashima & James L. Manley

Nature Genetics, 2003; 34; 4; 460-463.

論文要旨

脊髄性筋萎縮症 (Spinal Muscular Atrophy, SMA) は、*Survival Motor Neuron 1 (SMN1)* 遺伝子のホモ欠損によって発症する比較的頻度の高い遺伝性の神経変性疾患である。ヒトには、殆ど相同な *SMN2* 遺伝子が存在するが *SMN1* の欠損を補うのに十分な *SMN* を産生できないために SMA の発症を防ぐことができない。第7エクソンの6番目の塩基が C から T へ置換されていることが二つの遺伝子の違いの全てであり、これによって *SMN2* ではエクソン7のスプライシングが効果的に起こっていない。我々は、ここに C から T への置換は *SMN1* に於いてエクソン内スプライシング性のエンハンサー (ESE) を崩壊させるのではなく、むしろ *SMN2* に於いてエクソン内スプライシング性のサイレンサー (ESS) を創り出していることを示す証拠を提示する。更に、この ESS はスプライシング反応に対して抑制的に働く因子として知られている hnRNP A1 の結合部位として機能していることが解った。当然、*SMN2* のエクソン7の RNA に結合し、*SMN1* の RNA には結合しなかった。次に RNA 干渉作用を利用して、細胞内を生理的条件下で hnRNP A1/ A2 タンパク質の発現量を著しく減少させて、スプライシング反応を *in vivo* で解析する方法を確立した。実際に hnRNP A1 と hnRNP A2 の両タンパク質を同時に効率よくノックダウンさせると、*SMN2* のエクソン7のスプライシング反応効率は *SMN1* のレベルにまで回復した。われわれの発見は、今まで正の反応を中心に考えられていたスプライシングの研究に於いて *SMN2* のエクソン7のスプライシング反応が負の要素によって抑制されているという新しいメカニズムを同定しただけでなく、mRNA のスプライシング反応の制御を特徴付けている感受性と正確性などが、正と負の因果関係のバランスの上で成り立っているということが、今以上により一般的であることを説明している。

論文審査の結果の要旨

鹿島剛氏の学位申請論文は主論文1編、参考論文1編からなり、主論文は「A negative element in *SMN2* exon 7 inhibits splicing in spinal muscular atrophy」という題名の英文論文で、2003年の *Nature Genetics* 誌に掲載された。以下、これらの論文に基づく thesis の要旨と審査委員会の審査結果を報告する。

脊髄性筋萎縮症 (Spinal Muscular Atrophy, SMA) は、*Survival Motor Neuron 1* (*SMN1*) 遺伝子のホモ欠損によって発症する比較的頻度の高い遺伝性の神経変性疾患である。ヒトには、殆ど相同な *SMN2* 遺伝子が存在するが *SMN1* の欠損を補うのに十分な SMN を産生できないために SMA の発症を防ぐことができない。第7エクソンの6番目の塩基がCからTへ置換されていることが二つの遺伝子の違いの全てであり、これによって *SMN2* ではエクソン7のスプライシングが効果的に起こっていない。我々は、ここにCからTへの置換は *SMN1* に於いてエクソン内スプライシング性のエンハンサー (ESE) を崩壊させるのではなく、むしろ *SMN2* に於いてエクソン内スプライシング性のサイレンサー (ESS) を創り出していることを示す証拠を提示する。更に、この ESS はスプライシング反応に対して抑制的に働く因子として知られている hnRNP A1 の結合部位として機能していることが解った。当然、*SMN2* のエクソン7のRNAに結合し、*SMN1* のRNAには結合しなかった。次にRNA干渉作用を利用して、細胞内を生理的条件下で hnRNP A1/A2 タンパク質の発現量を著しく減少させて、スプライシング反応を *in vivo* で解析する方法を確立した。実際に hnRNP A1 と hnRNP A2 の両タンパク質を同時に効率よくノックダウンさせると、*SMN2* のエクソン7のスプライシング反応効率は *SMN1* のレベルにまで回復した。われわれの発見は、今まで正の反応を中心に考えられていたスプライシングの研究に於いて *SMN2* のエクソン7のスプライシング反応が負の要素によって抑制されているという新しいメカニズムを同定しただけでなく、mRNA のスプライシング反応の制御を特徴付けている感受性と正確性などが、正と負の因果関係のバランスの上で成り立っているということが、今以上により一般的であることを説明している。

平成27年3月13日、岡野ジェイムス洋尚教授、井口保之教授ご臨席のもと、公開学位審査委員会を開催し、鹿島氏による研究概要の発表に続いて口頭試験を行った。席上、

- SMN 遺伝子の機能は何か？
- ヒトにだけ SMN2 遺伝子が存在している理由は何か？
- ESS と ESE という対立した学説から折衷案が提示されていたが、その後の動向はどうなっているのか？
- セレックスの結果から hnRNP A1 の RNA 認識配列保存性が低いが、他のタンパク質が関与しているのか？
- ALS の原因遺伝子でスプライシングに関わる TDB43 と hnRNP A1 との間に機能的相関はあるのか？
- 成人にみられるような motor neuron disease にも似た様なメカニズムが知られているのか？
- アンタイセンスやゲノム編集などによる治療法の可能性について？

など多くの質問があり、鹿島氏は豊富な周辺情報も交えながら的確に回答し、活発な議論がなされた。

その後、岡野、井口両教授と慎重審議した結果、本論文は RNA スプライシング制御機構において、これまでにスプライシングエンハンサーが崩壊するという学説に対し、スプライシングサイレンサーが新たに創出されるという学説を初めて示し、その後多くの類似したスプライシング制御機構への発見に繋がったエポックメイキングな研究であり、学位申請論文として十分価値があるものと認めた次第である。