

氏名	塩見美喜子
学位(専攻分野)	博士(農学)
学位記番号	論農博第1951号
学位授与の日付	平成6年11月24日
学位授与の要件	学位規則第4条第2項該当
学位論文題目	Characterization of the fragile X syndrome gene products (脆弱X症候群の直接原因となる遺伝子産物の機能解析)

論文調査委員 (主査) 教授 小田順一 教授 左右田健次 教授 駒野 徹

論文内容の要旨

脆弱X症候群は、最も高頻度に痴呆症を引き起こす遺伝病である。1991年、X性染色体脆弱部位よりこの脆弱X症候群の直接原因となる遺伝子*FMR1*が単離された。*FMR1*遺伝子の5'側上流にあるCGGのくりかえしが200以上に増幅されると*FMR1*mRNAの合成が阻害され、この病気が引き起こされること が解っているが、*FMR1*遺伝子産物の機能は未だ明らかでない。本研究において著者は、FMR1遺伝子産物が細胞質に局在するRNA結合タンパク質であることを証明したばかりでなく、抗FMR1タンパク質抗体を作製、FMR1タンパク質発現の解析を進めることに成功し、さらに*FMR1*遺伝子がファミリーを構成していることを明らかにしている。その主な内容は以下のとおりである。

アミノ酸配列の相同性検索によりFMR1タンパク質がKHドメイン、RGGボックスという2種のRNA結合モチーフを有することを明らかにした。続いて、アガロースビーズ上に固定されたRNAホモポリマーを用いてRNA結合アッセイを行い、実際にFMR1タンパク質がポリ(G)、ポリ(U)に対して特異的な結合能を有することを示した。

通常、脆弱X症候群はFMR1タンパク質が発現されないことによって引き起こされる。しかし、ある一人の患者はKHドメイン中、最も保存されているアミノ酸の一つ、IleがAsnに置換したFMR1タンパク質を発現していることが報告された。そこで、アミノ酸点変異導入によりこれと同じ変異型FMR1タンパク質を作製しRNA結合アッセイを行ったところ、この変異型FMR1タンパク質は特にポリ(U)に対する結合能を顕著に減少していた。この結果は、FMR1タンパク質のKHドメインがそのRNA結合能に重要な働きをしていること、また、FMR1タンパク質が細胞内で発現し、適切なRNA分子に結合することが知性の発達上、必須であることを示唆している。

大腸菌中での大量発現後、精製したFMR1タンパク質を抗原としてマウスを免疫し、抗FMR1ポリクローナル抗体を得た。この抗体を用いた免疫検定法を適用して、酵母からヒトに至る生物間でFMR1が発現していること、また、脆弱X症候群の患者は通常、FMR1を発現していないことをタンパク質レベル

で初めて実証した。

次いで、*FMR1* 遺伝子産物の発生における役割を調べるためにアフリカツメガエルより *FMR1* 遺伝子を単離した。その際、*FMR1* と相同性の高い新規遺伝子を得、これを *FXR1* と命名した。このことより *FMR1* 遺伝子はファミリーを構成していることが明らかになった。*FXR1* 遺伝子産物の KH ドメインを含む N 末側は *FMR1* のそれと相同性が高いが、RGG ボックスから C 末側のアミノ酸配列は特異的であった。アフリカツメガエル *FMR1*, *FXR1* は、ヒト *FMR1* と同様にポリ (G), ポリ (U) に特異的に結合し、細胞中、細胞質に局在することから、これらタンパク質はお互によく似た機能を有するものと推測した。*FMR1*, *FXR1* タンパク質各々に対する抗体を作製した後これを用いた免疫検定法により、アフリカツメガエル卵細胞が極初期の段階で既に *FMR1*, *FXR1* 遺伝子産物を発現していることを見出した。この実験によって *FMR1*, *FXR1* mRNA が母性であることを初めて明らかにしたばかりでなく、これらタンパク質の発生における重要性を提示した。

アフリカツメガエル *FXR1* 遺伝子に特異的な領域をプローブとして用い、ヒト *FXR1* 遺伝子を単離した。*FMR1* タンパク質を発現していない脆弱 X 症候群の患者も正常人と同様に *FXR1* 遺伝子と *FXR1* タンパク質の存在を、RT-PCR 法、免疫検定法などにより確認した。そして RNA 結合能や細胞内での局在は同じでも *FXR1* タンパク質は単純に *FMR1* タンパク質の役割を補うことはできないことを明示した。

さらに、遺伝子マッピングを行い、*FXR1* 遺伝子は X 性染色体上ではなく 12 番目の常染色体の長腕 (12q13) に位置することを明らかにしたが、この遺伝子が何等かの遺伝病、あるいは痴呆症を伴う病気に関わっているかは現在のところ明らかではない。

FXR1 遺伝子は *FMR1* 遺伝子が持つ 5 側上流の CGG からなる核酸のくりかえしを持たないが、5' 側上流、3' 側下流に約 90 ヌクレオチドからなる互いに相補的な配列を持つ。このような長い反復配列が mRNA に存在することは、未だ報告がない。ヒト、ツメガエル種間で高く保存されているこの特殊な配列は、mRNA の翻訳調節の機能を担っているものと推測される。*FXR1* 遺伝子発現の調節機構や *FMR1*, *FXR1* タンパク質の相関関係についてより詳細な研究を行うことは、*FMR1* タンパク質自身の機能、あるいは *FMR1* と脆弱 X 症候群との関係を知る上で重要であることを指摘している。

論文審査の結果の要旨

FMR1 は、脆弱 X 症候群という痴呆症を伴う遺伝病の直接原因となる唯一の遺伝子であり、また知能に関係する遺伝子として最初に報告されたものである。この遺伝病がどのようにして引き起こされるかは遺伝学的に既に明らかであるが、*FMR1* 遺伝子産物がどのような機能を有するかは未だ解明されていない。本論文は、この *FMR1* 遺伝子産物の機能を解析することを目的として行った研究成果をまとめたものであり、評価すべき点は次のとおりである。

1. *FMR1* タンパク質が KH ドメイン、RGG ボックスという 2 種の RNA 結合モチーフを有し、実際に RNA に特異的に結合することを RNA ホモポリマーを用いた結合アッセイによって示した。
2. 脆弱 X 症候群のある患者が KH ドメインに点変異を有する変異型 *FMR1* タンパク質を発現してい

る事実にもとづき、部位特異的導入法により同じ変異型 FMR1 タンパク質を調製し、その RNA 結合能を調べたところ、このタンパク質は RNA に対する結合能を失っていることが判明した。それによって、KH ドメインが FMR1 タンパク質の RNA 結合に重要な役割を担っていること、FMR1 がその基質である RNA 分子に結合できなくなることが脆弱 X 症候群を引き起こす原因につながることを明らかにした。

3. 大量に発現、精製した FMR1 タンパク質を抗原としてマウスを免疫し、抗 FMR1 抗体を作製することに成功したばかりでなく、その抗体を用いて免疫検定分析を行い、FMR1 が生物種間で広く分布していること、脆弱 X 症候群の患者は通常 FMR1 を発現していないことを初めてタンパク質レベルで明らかにした。
4. *FMR1* と相同性の高い新たな遺伝子 *FXR1* の存在を発見し、実際にアフリカツメガエル、ヒトよりこの遺伝子を単離し、*FMR1* 遺伝子がファミリーを構成していることを初めて明らかにした。そして両遺伝子産物が互いによく似た機能を有し、これらがアフリカツメガエル卵細胞の初期の段階で既に発現していることを見出し、これらタンパク質の発生における重要性をも指摘した。
5. *FXR1* 遺伝子は 5' 側上流、3' 側下流に約 90 ヌクレオチドからなる互いに相補的な配列をもつことを明らかにし、前例のないこのような配列が新規な mRNA の翻訳調節機構である可能性を提示した。

以上のように本論文は、*FMR1* 遺伝子産物が細胞質に局在する RNA 結合タンパク質であり、RNA 結合能を保持した FMR1 タンパク質の発現が知性の発達において必須であることを実証し、さらに類似の新しい遺伝子 *FXR1* を発見することによって、これまで全く不明であった *FMR1* 遺伝子産物の機能を解明する上で新しい重要な知見を加えたものであり、分子遺伝学、分子生物学、並びに生物化学の進展に寄与するところが大きい。

よって、本論文は博士（農学）の学位論文として価値あるものと認める。

なお、平成 6 年 9 月 27 日、論文並びにそれに関連した分野にわたり試問した結果、博士（農学）の学位を授与される学力が十分あるものと認めた。