

## 第4章 考察

### 4.1 *ABLIM1* ex11 スプライシング異常について

本研究では、DM 患者の骨格筋と DM モデルマウス *HSA<sup>LR</sup>* の骨格筋で *ABLIM1* ex11 が有意に脱落する選択的スプライシング異常を検出し(図 3.2, 図 3.13)、さらに *ABLIM1* ex11 のスプライシング異常は、DM 患者の心筋においても同様な異常を検出されている(Koshelev *et al.* 2010)。また、正常な成人組織の骨格筋と心筋以外では、*ABLIM1* ex11 は全て脱落しており(図 3.3C)、*ABLIM1* ex11 が入った isoform は筋肉特異的に発現していることから、この isoform は筋特異的な機能を持っている可能性がある。DM 筋ではこの ex11 が入った isoform がなくなっていることから、これが DM 筋で見られる症状に関与している可能性はあると考えられる。また、*ABLIM1* の発現は主に心筋で多いので、心筋での症状に関与している可能性も高いと考えている。

*ABLIM1* の ex11 は、84 nt のため、脱落してもフレームシフトは起こらず、nonsense-mediated mRNA decay (NMD)によって分解されることはなく、コードしている 28 アミノ酸(aa)が脱落したタンパク質が翻訳されることが考えられる。序論で書いたように、この 28 aa は、*ABLIM1* の LIM ドメインの 5 アミノ酸下流からコードしており、LIM ドメインを介した結合になんらかの影響を及ぼしている可能性がある。しかしながら、*ABLIM1* は C 末の villin headpiece ドメインを介してアクチンフィラメントと結合していることは分かっているものの(Roof *et al.* 1997)、LIM ドメインを介して結合しているタンパク質は未だ検出されていない。*ABLIM1* は筋肉の Z 膜に局在している構造タンパク質として知られ、筋分化や神経の軸索誘導での機能が示唆されているが(Lin *et al.* 1994, Erkman *et al.* 2000, Barrientos *et al.* 2007)、その機能は未だよく分かっていない。なお、*ABLIM1* の ex11 が脱落した isoform から翻訳されたタンパク質を検出していないため、今後タンパク質レベルで検証する必要がある。

今回、この論文では詳細は載せていないが、*ABLIM1* ex11 以外にも DM 患者の骨格筋において RT-PCR によってスプライシング異常を検出できた *MYOM1* や *PDLIM3*、*FNI* (fibronectin 1) (Koebis *et al.* 2011, Ohsawa *et al.* 2011) はいずれも筋肉での構造タンパク質や細胞外マトリックスとしての機能を持っており、他にもこのような機能を持った様々な遺伝子のスプライシング異常が DM 患者で検出されている。以上のことを考慮すると、様々

な構造タンパク質のスプライシング異常が総合的に DM の筋症状に主に関与していると考えている。

#### 4.2 *ABLIM1* ex11 を制御しているスプライシング因子

*ABLIM1* ex11 の選択的スプライシングは MBNL、FOX1 と CELF、PTBP1 が逆にスプライシングを制御していることが、スプライシング因子の過剰発現によるスプライシングアッセイより分かった (図 4.1)。また、MBNL family タンパク質と FOX1 は、正常筋で見られる ex11 が入るスプライシングを促進し、CELF1, CELF2, CELF6, PTBP1 は DM 筋で見られる ex11 が脱落するスプライシングを促進していた (図 3.7A)。さらに、Mbnl1 ノックアウトマウスや CELF1 の過剰発現させたマウスにおいても同様な *Ablim1* のスプライシング異常が検出され (Kalsotra *et al.* 2008)、また、筋分化中に FOX1 と MBNL1 が増加し、逆に CELF1 や PTBP1 が減少することが報告されている (Underwood *et al.* 2005, Bland *et al.* 2010)。近年には、FOX1 は MBNL1 と協力的に筋肉でのスプライシングを制御している報告もあり (Klinck *et al.* 2014)、さらに C2C12 で MBNL1 の CLIP-Seq (MBNL1 と結合している RNA 配列を次世代シーケンスで読む実験) の結果を見ると、*Ablim1* ex11 の下流の intron に Mbnl1 が結合している配列が存在することが示されている (Wang *et al.* 2012)。これらを合わせて考えると、生体内においても *ABLIM1* ex11 のスプライシングは MBNL、FOX1、CELF、PTBP1 によって制御されている可能性が高い。

また、内在性の *ABLIM1* ex11 と *ATP2A1* ex22 のスプライシングアッセイより、MBNL1 と MBNL2 で同程度のスプライシング活性があることが分かり、MBNL3 はそれらより活性が低いことが分かった (図 3.4A, 図 3.5)。ウェスタンブロット解析 (図 3.4B) より過剰発現させた MBNL3 の発現量は、MBNL1 と同程度だが、MBNL2 よりも多いことから、MBNL3 のスプライシング活性は MBNL1、MBNL2 より、これら exon においては小さいことが考えられる。しかし、minigene の *ABLIM1* ex11 では MBNL2 の活性が MBNL3 と同程度に下がっていることから (図 3.7A)、minigene 作製時に削除した部分に MBNL2 が作用している可能性がある。また、この時のウェスタンブロット解析で (図 3.7B)、MBNL2 と MBNL3 の発現量が MBNL1 より少ないので、その発現量が minigene のスプライシング変化に影響しているだけの可能性もある。

内在性のスプライシング因子をノックダウンした minigene スプライシングアッセイでは、siMBNL1(No.83)、siCelf2(No.11)、siPtbp1(No.37, 38)においては過剰発現とは逆の結

果が得られたが、siCELF1(No.16, 47)、siCelf2(No.12)ではスプライシングは変化しなかった(図 3.9)。したがって、マウス筋芽細胞 C2C12 の内在性の Celf1 の発現量は、*ABLIM1* ex11 minigene のスプライシングを脱落させる発現量の閾値に達していないか、ノックダウンによってその活性が十分に落ちていないことも考えられる。ウェスタンブロットによってノックダウン効率を算出すると、Celf1 は 55~60%だが、他の因子は 74~86%減少しており、Celf1 はノックダウン効率が悪いことから、Celf1 の活性が十分に落ちていない可能性がある。Celf2 については 2 種類の siRNA で異なる結果が出ており、2 種類の siRNA ともに Celf2 のタンパク質レベルでは同程度のノックダウン効率(82%と 86%)が確認できているので、何らかのオフターゲットがあるのかもしれない。Ptbp1 は 2 種類の siRNA で共に過剰発現とは逆に ex11 が入るスプライシングが増加しているので、マウス内在性の Ptbp1 は ex11 が入るスプライシングを阻害していると考えた。逆に、マウス内在性の Mbnl1 は ex11 を入るスプライシングを促進していると考えられる。しかし、マウス筋芽細胞 C2C12 の内在性の *Ablim1* ex11 はほとんど入ってない。これはスプライシング因子の競合実験から、PTBP1 が MBNL より強くそのスプライシングを制御している可能性が高いことから、C2C12 の内在性の *Ablim1* ex11 は Ptbp1 によってスプライシングが阻害されていると思われる。

スプライシング因子の競合実験では、CELF1 と CELF6 は遺伝子導入量段階的に、MBNL1 の Ex11+を増加させるスプライシング効果を、段階的に打ち消しているため(図 3.10A)、MBNL1 と CELF1、CELF6 は同じ cis-element に競合しているか、または同じ段階でスプライシングを制御している可能性があると考えられる。一方、CELF2 と PTBP1 においては遺伝子導入量が少なくても (0.23  $\mu$ g +)、MBNL1 の Ex11+を増加させるスプライシング効果を完全に打ち消し、逆に Ex11+を減少させているので、CELF2 と PTBP1 は MBNL1 より強くスプライシングを制御していると考えられる。また、図 3.11A で示した通り CELF2 と PTBP1 の遺伝子導入量を少ないスケールで段階的にふると、CELF1 や CELF6と同様にMBNL1 の効果を段階的に打ち消しているが、PTBP1は遺伝子導入量 0.07  $\mu$ g で、すでに Ex11+が Mock と比べ減少しており、Ex11+を抑制する効果は CELF2 よりも強いと考えられる。

C2C12 を分化させると ex11 の入ったスプライシングが起こるのは(図 3.14)、Ptbp1 の発現量が減り、逆に Mbnl1 の発現量が上がること(Bland *et al.* 2010)によるものと思われる。また、生後の心筋においてもこれら因子の発現量が同様に変化することから(Kalsotra *et al.* 2008)、筋肉の成熟にもこれら因子が関与している可能性がある。さらに心筋の発生の際に

見られる PTBP1 の発現量低下によって、アポトーシスを起こす遺伝子の発現量が下がり、発生が正常に進むこと、また逆に PTBP1 を過剰発現させると、アポトーシス遺伝子の発現量が上がり、血流不全を心臓が起こすことが報告されている(Zhang *et al.* 2009)。よって、Ptbp1 の発現量を減らすことや Mbnl1 の発現量を増やすことは筋分化・成熟促進に重要だと思われる。しかし、PTBP1 は DM で見られる *TNNT2* ex5 を入れるスプライシングを阻害することから、単にスプライシングを阻害するように作用している可能性もある(Philips *et al.* 1998, Charlet *et al.* 2002a)。したがって、筋分化や成熟で見られるスプライシング変化では、これらスプライシング因子のバランスを制御することが重要だと思われる。

#### 4.3 伸長した CUG リピートと ABLIM1 のスプライシング

CUG リピート数 0 (DM0) と 18 (DM18) を発現させても *ABLIM1* のスプライシングは変化しないが、伸長したリピートを発現する DM480 では有意に Ex11+が減少したこと、また MBNL1 過剰発現下においても、DM480 を発現させると DM0 や DM18 に比べて有意に Ex11+が減少したことから (図 3.12)、伸長したリピートは内在性の Mbnl1 や過剰発現した MBNL1 を捕捉して、その機能・効果を阻害したと考えられる。これは、図 3.19 で示したように、リピートを発現しても、Mbnl1 をはじめ、Celf1 や Ptbp1 の発現量も変化していないことから、このように考えられる。また、DM18 でも遺伝子導入量を約 2 倍の 1.3  $\mu$ g に増加させると伸長したリピート程度に Ex11+が有意に減少することから、CUG リピート数が 18 でも MBNL1 を捕捉することができ、存在量が多ければ、伸長した 480 リピートと同程度の毒性を示すと考えられる。したがって、CUG リピートがどの程度発現しているかが、DM 発症には重要であると考えられる。

#### 4.4 DM1 患者と DM モデルマウス *HSA*<sup>LR</sup> で見られる PTBP1 の発現量の増加

以上のように PTBP1 が *ABLIM1* のスプライシングを非常に強く阻害すること、筋分化過程で発現量が減少することなどから、DM 患者においても PTBP1 の発現量が増加しているのではないかと考え、*PTBP1* mRNA の発現量を検量したが、正常筋と差は認められなかった (図 3.15)。しかし、タンパク質レベルでは PTBP1 の発現量が正常筋より上昇傾向を示した (図 3.16)。また、マウスにおいても *Ptbp1* の mRNA 発現量を定量すると、DM モデルマウス *HSA*<sup>LR</sup> と野生型で発現量に差は見られなかった (図 3.17)。しかし、PTBP1 のタンパク質の発現量は *HSA*<sup>LR</sup> で有意に増加していることが分かった (図 3.18)。また同様に Celf1 の発現量も有意に増加しており、これは CELF1 が PKC  $\alpha/\beta$ II (protein kinase C

$\alpha/\beta$ II) によって高リン酸化することで安定化するためだという報告がされている (Kuyumcu-Martinez *et al.* 2007)。したがって、PTBP1 においても CELF1 と同様に転写ではなく、翻訳または翻訳後修飾によって発現量が増加したと思われる。PTBP1 は PKC によるリン酸化は報告がないが、cAMP 依存的な PKA (protein kinase A) の活性化によるリン酸化は報告があり (Xie *et al.* 2003, Knoch *et al.* 2006)、PTBP1 もリン酸化されうることが分かる。また PTBP1 の 557 アミノ酸のうち、リン酸化される可能性が高いセリン、チロシン、トレオニン合わせて、25 個あった (NetPhos 2.0 Server)。

しかしながら、伸長したリピートを培養細胞に遺伝子導入しても、PTBP1 と CELF1 の発現量の増加は見られなかった (図 3.19)。したがって、筋症状などの二次的な影響を見ている可能性がある。しかし、Kuyumcu-Martinez *et al.* 2007 によると、DMPK-CUG960 (DM960) を COS M6 細胞に遺伝子導入すると、CELF1 がリン酸化され、核内の CELF1 の発現が上昇していることから、本実験ではこの培養細胞の系が機能しておらず、内在性のこれら因子の発現量を変化させることができる伸長したリピート量が遺伝子導入できていない可能性がある。本実験では、やや短い DM480 を利用していること、遺伝子導入効率が悪い C2C12 を使っていることがその原因であると考えており、今後条件検討が必要だと思われる。

#### 4.5 おわりに

本研究では DM 患者において *ABLIM1* ex11 の選択的スプライシングの異常を検出し、DM モデルマスで *ABLIM1* のスプライシングを制御しているスプライシング因子である PTBP1 のタンパク質レベルでの発現量増加を検出し、同様に DM 患者においても増加傾向を示した。PTBP1 の発現量増加は、DM で見られる多くの異常な選択的スプライシングを起こす原因である可能性があり、今後、PTBP1 をターゲットとした DM の治療薬ができれば幸いである。