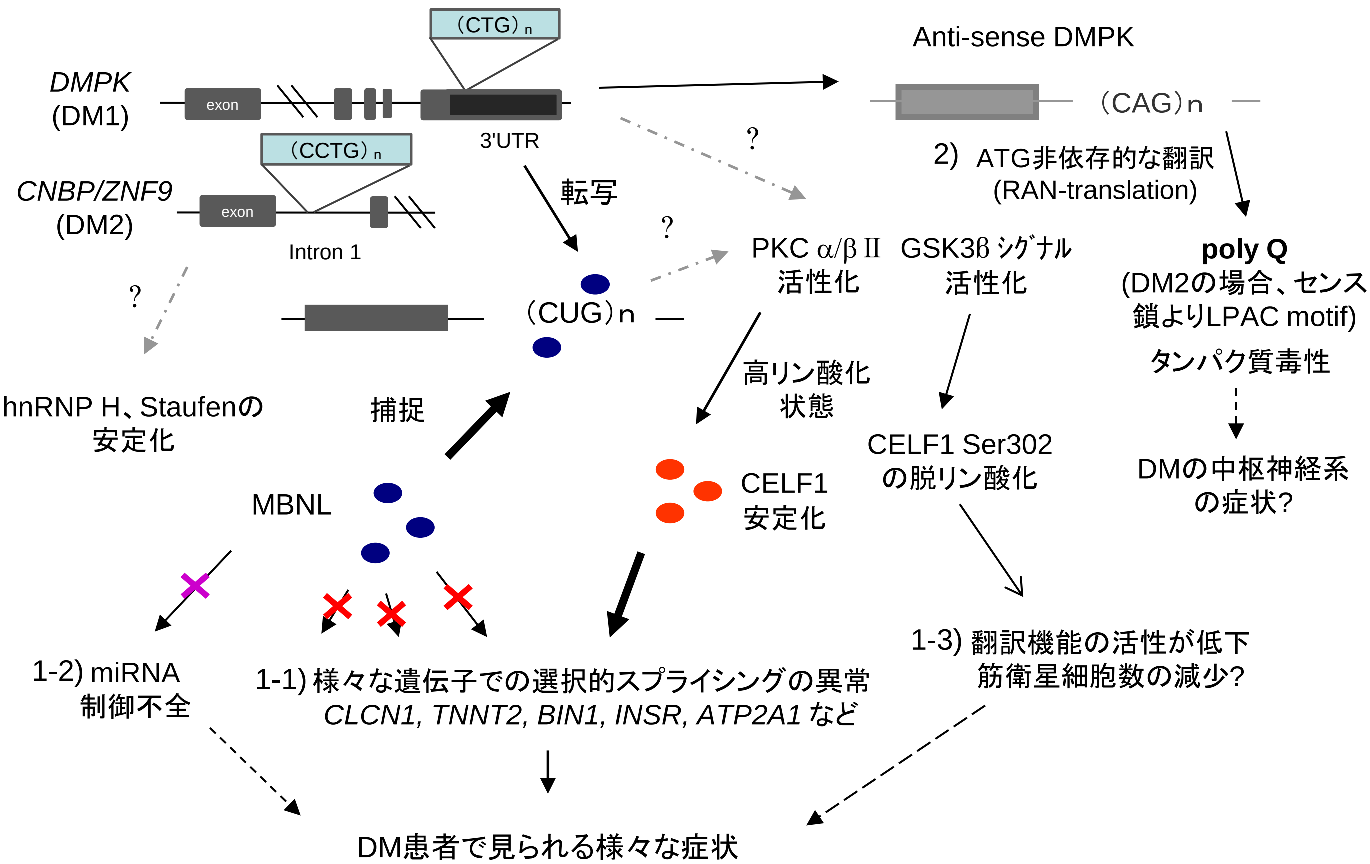

図1.1　　　　DM発症の分子機構のまとめ

異常に伸長したリピート配列がRNA結合タンパク質に作用して毒性を示す3経路とリピートRNAが翻訳された時の毒性を示す1経路を示す。

RNA結合タンパク質のMBNLはリピートRNAに捕捉され、その機能が低下することが知られており、逆にCELF1はPKC α/βⅡの活性化に伴い高リン酸化状態になり、安定化することが知られている。また、hnRNP Hなどの安定化の報告もある。これらRNA結合タンパク質の活性異常によって、1-1)の様に、様々な遺伝子での選択的スプライシング異常が引き起こり、これがDM患者で見られる様々な症状の原因になる。さらにMBNL1は1-2)のmiRNAの合成に関与しており、この機能が低下すると、特定のmiRNAの発現が減少し、このmiRNAが発現を抑制されていた遺伝子発現が異常に上昇していることが確認されており、主にDMで見られる心筋での症状に関与している可能性が高い。また、GSK3β ｼｸﾞﾅﾙの活性化によって、CELF1のSer302は脱リン酸化されており、この脱リン酸化によって、1-3)にあるようにCELF1の翻訳を活性化する機能が低下して、様々遺伝子でタンパク質の量が減少し、これが筋衛星細胞の減少につながっているのではないかという報告がある。

RNAのリピート構造は立体構造を取りやすいため、2)のATG非依存的に翻訳が起こることがあり、DM1患者の細胞ではポリグルタミン(poly Q)の凝集体が、DM2の脳の組織ではロイシン、プロリン、アラニン、システイン(LPAC)のポリアミノ酸の凝集体が確認されており、これらの凝集体が主に中枢神経系の異常に関与している可能性が示唆されている。

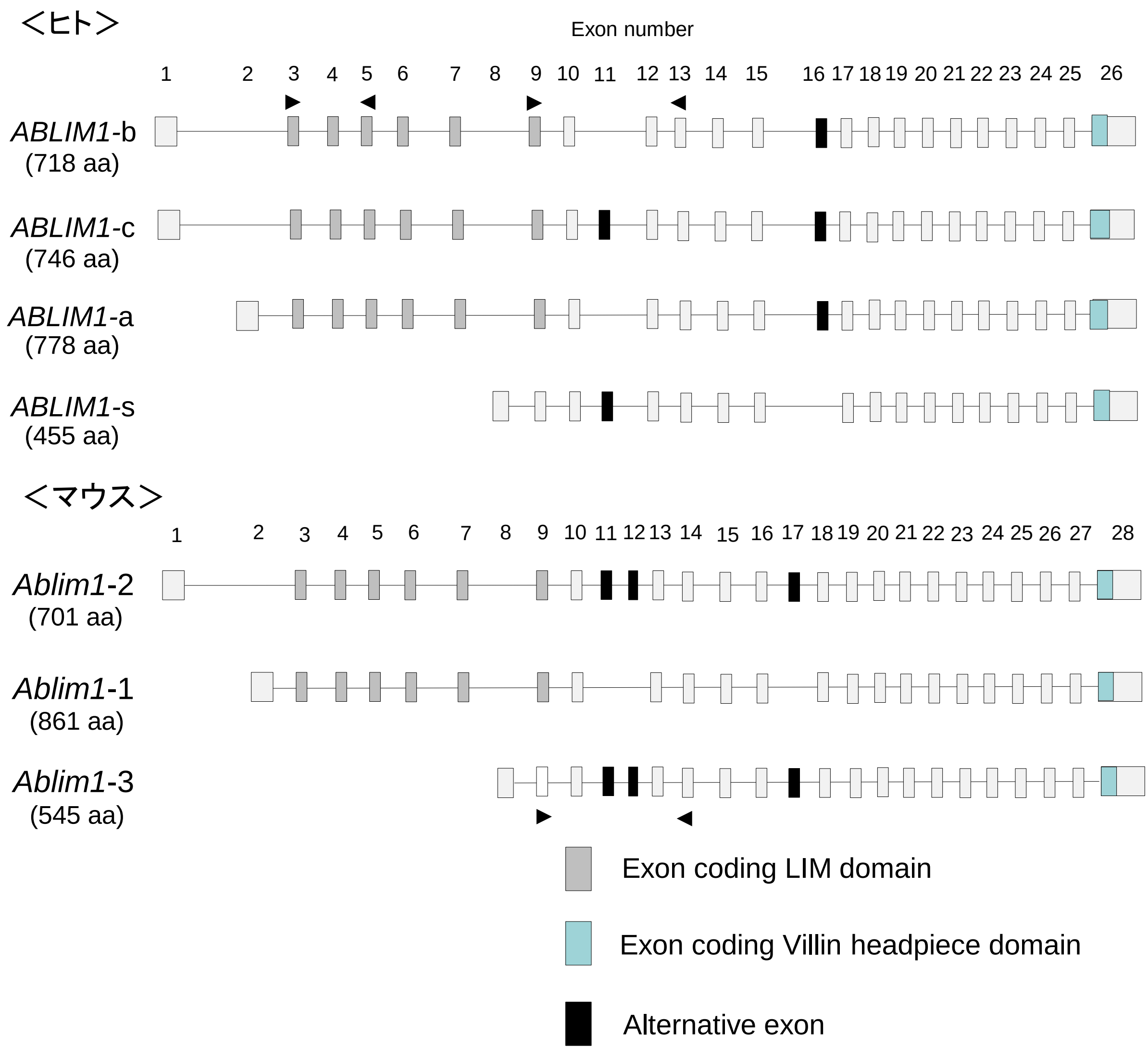

図1.2　　ABLIM1（ヒトとマウス）のスプライシングisoform（NCBIより）
ヒトには4種類の、マウスには3種類のisoformがNCBIに登録されており、括弧には各isoformのアミノ酸数を記載した。黒色のexonは選択的exonであり、グレーのexonと水色のexonはタンパク質に翻訳された時に、それぞれLIMドメインと、Villin headpieceドメインがコードされている。矢型は今回の実験で使用したprimerの位置を示してある。

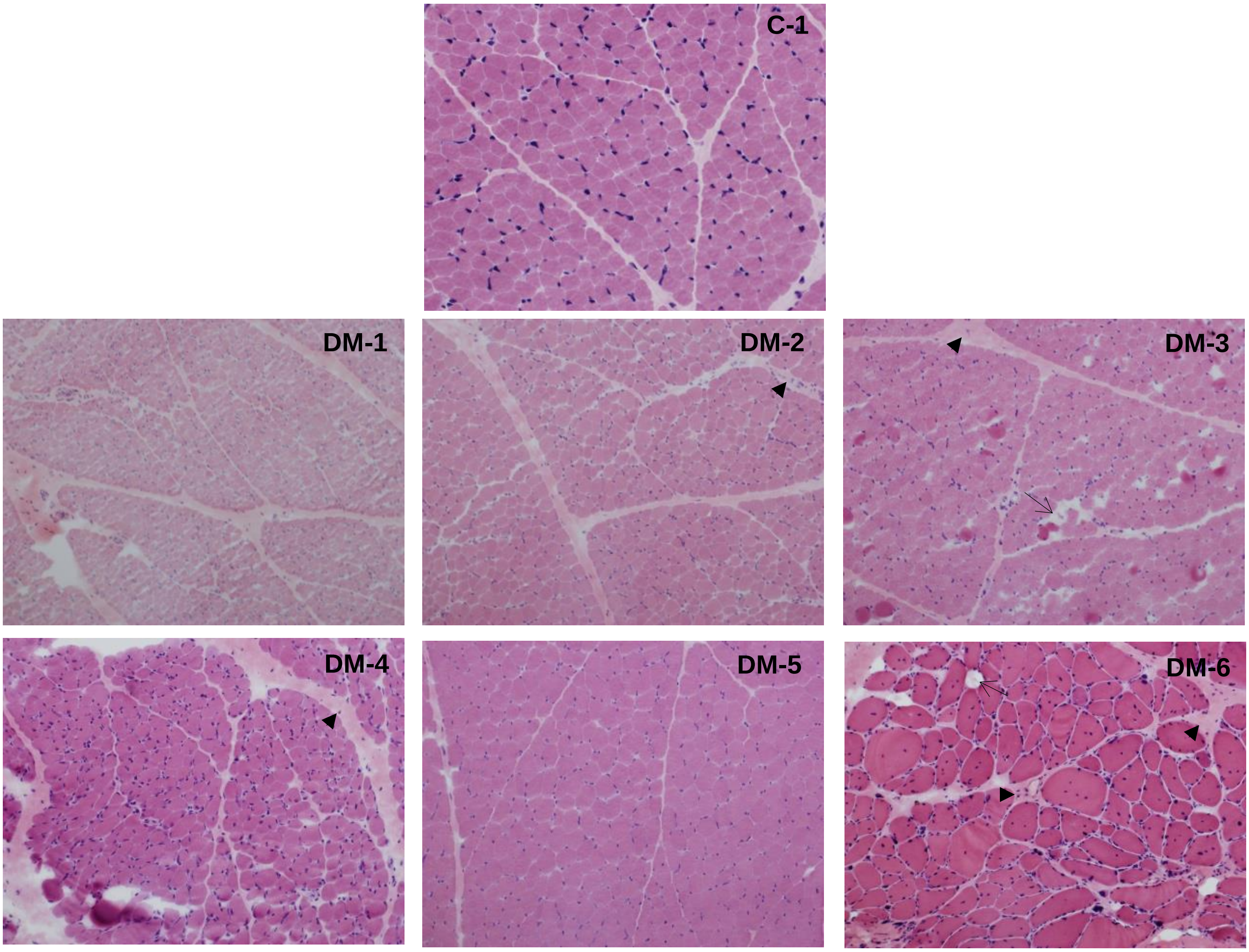

図2.1　　　　　ヘマトキシリン&エオシン染色した筋生検（non-DM患者1名とDM1患者6名）
先天性DM患者で筋生検を採取した時期が若いDM患者の筋組織では中心核があまり見られないが、採取が2歳以上のDM筋では若干の中心核が、成人のDM筋では多くの中心核が見られる。筋再生はDM筋ではnon-DM筋（Control; C-1）と同様にほとんど見られないが、DM-2、3、4、6では繊維化（矢型）と脂肪化（矢印）が若干見られる（国立精神・神経医療研究センター西野 一三研究室より提供）。

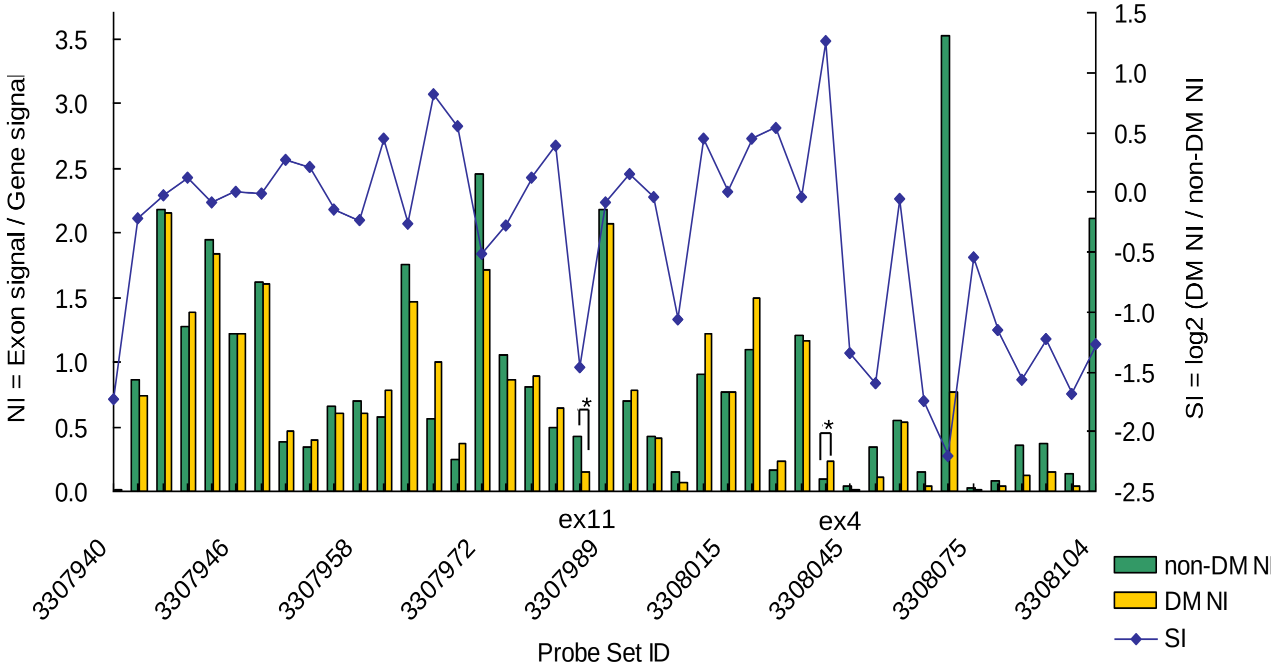

図3.1　　　　ABLIM1のExon array解析の結果。NIとは、Normalized exon Intensity (NI = Exon level signal / Gene level signal) で、SIは、Splicing Index (SI = $\log_2 NI_{DM} / NI_{non\text{-}DM}$) である。Non-DM患者の$NI_{non\text{-}DM}$とDM1患者のNI_{DM} でスチューデントの*t*検定を行い有意差(* $P < 0.05$) があり、かつSI > 1 または < -1 (NI_{DM}と$NI_{non\text{-}DM}$の差が2倍より大きい)ものexon 4とexon 11に着目した。同様な基準でその他のexonを調べると、119個の遺伝子exonが抽出された。

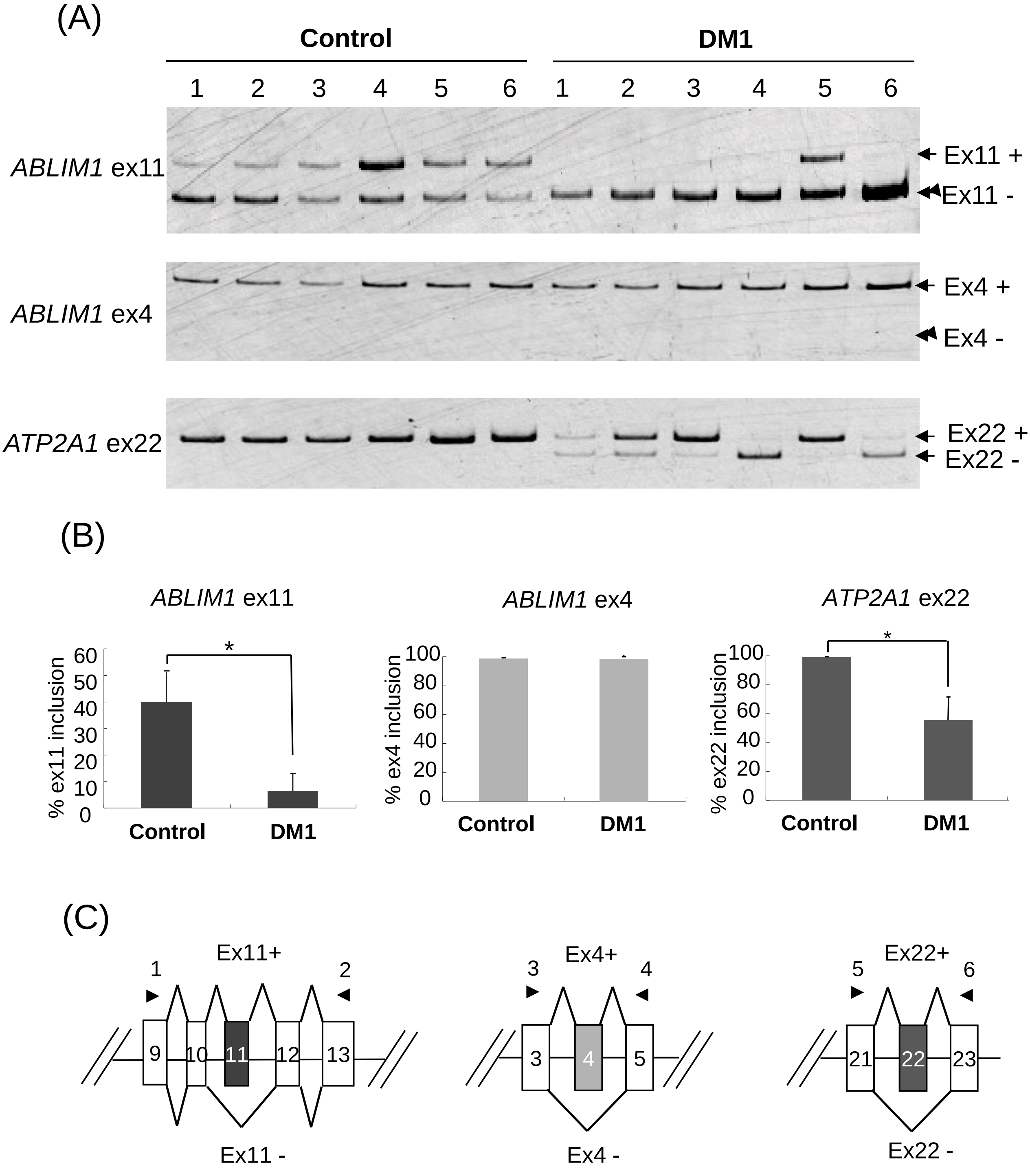

図3.2　　　　DM1患者の骨格筋で ABLIM1 ex11が脱落する選択的スプライシング異常を検出。 (A) Control (non-DM) 、DM1患者の骨格筋における ABLIM1 ex11、ex4、ATP2A1 ex22のスプライシングをRT-PCRで検出。ATP2A1 ex22はDM患者で異常を示すことが知られている。(B) それぞれのexonがinclusionされた割合を算出 (平均 + 標準偏差, n = 6) し、スチューデントの *t* 検定を行った（$*P < 0.05$）。(C) スプライシングの模式図とRT-PCRに利用したPrimerの位置を矢型1-6で示す。

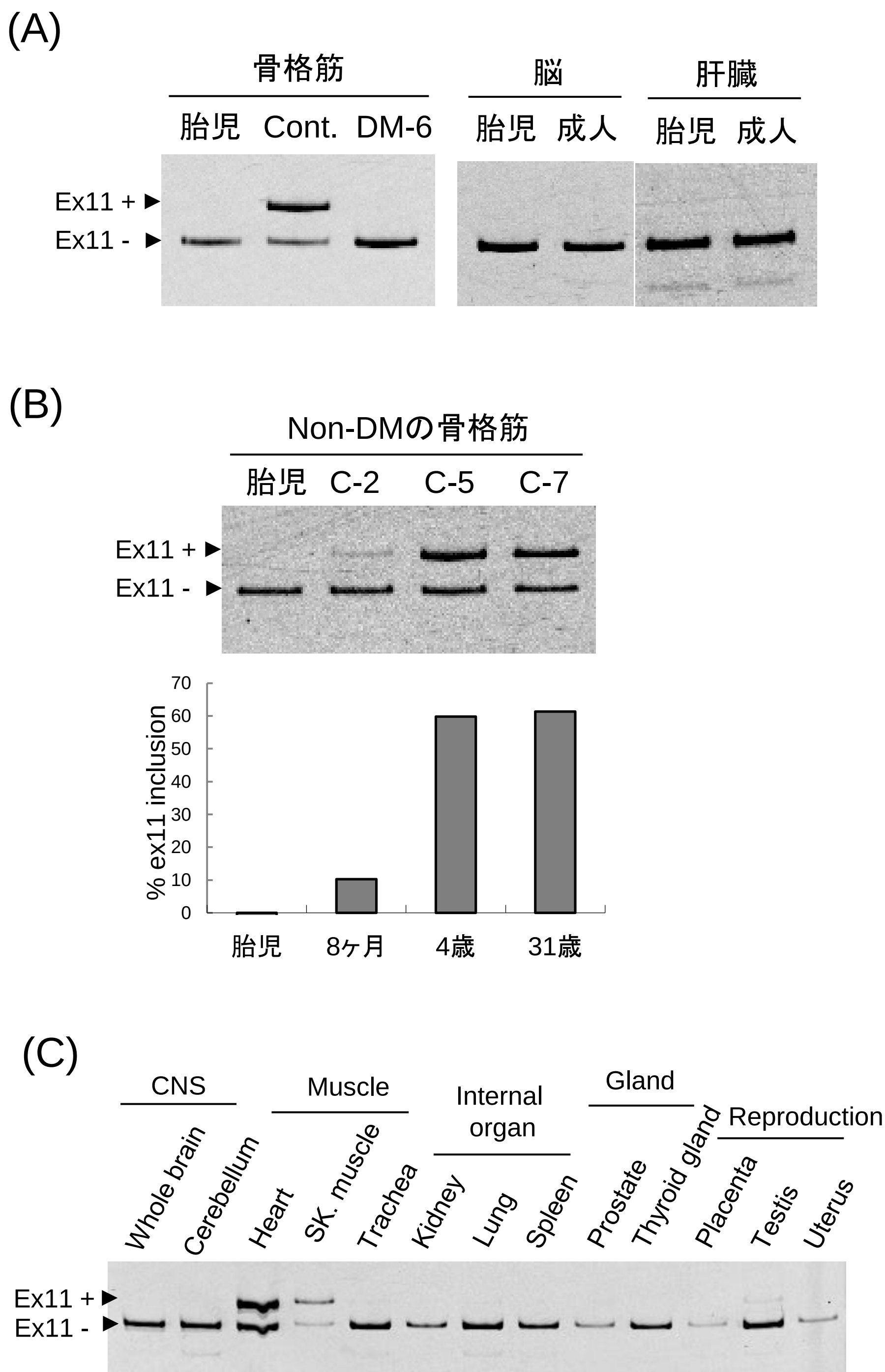

図3.3　　　　　様々な組織と時期特異的なABLIM1 exon 11のスプライシングをRT-PCRによって検出。(A) 骨格筋でのみ胎児から成人間でABLIM1のスプライシングが変化して、exon 11 inclusion isoform（Ex11+）が検出された。しかし、DM患者の骨格筋ではEx11+が胎児筋と同様に検出されなかった。(B) 胎児、生後、幼児、成人までのABLIM1のスプライシングを検出すると、生後から幼児期にかけてEx11+が大幅に増加していた。(C) 成人の組織では、骨格筋、心筋でのみ、Ex11+が検出された。

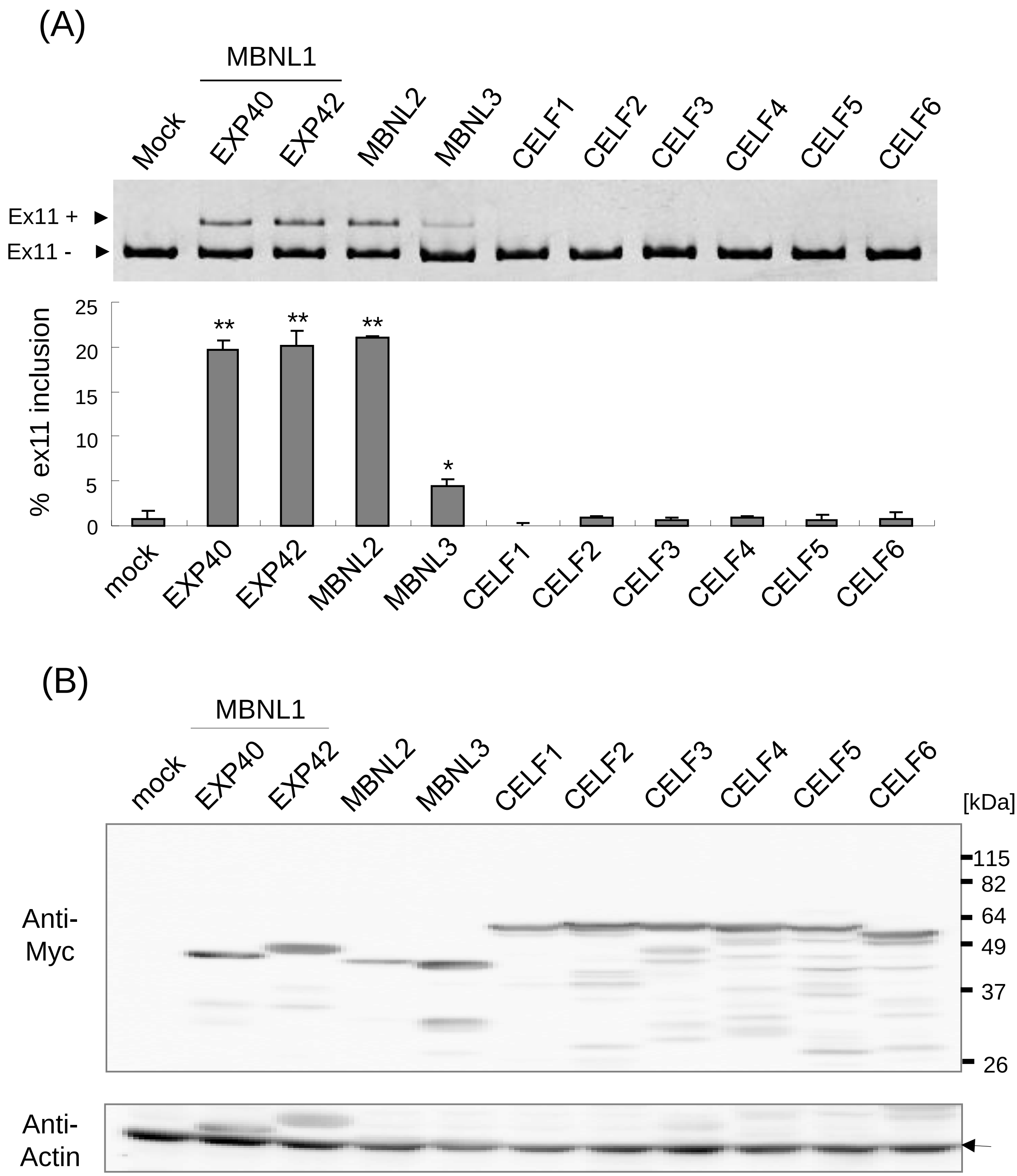

図3.4　　　　　内在性ABLIM1 ex11のスプライシングアッセイの結果。(A) スプライシング因子をHEK293細胞に過剰発現させた時の内在性のABLIM1 ex11のスプライシングをRT-PCRによって検出し、ex11がinclusionされた割合を算出し (平均 + 標準誤差, n = 3) 、ダネット検定を行った（$^*P < 0.05$, $^{**}P < 0.01$ ）。(B) スプライシング因子の過剰発現を確認したウェスタンブロット解析。遺伝子導入24時間後に回収した細胞より行った。Myc抗体で検出されたバンドがMycタグ付のスプライシング因子で、Actinは内部標準コントロールとして検出した。

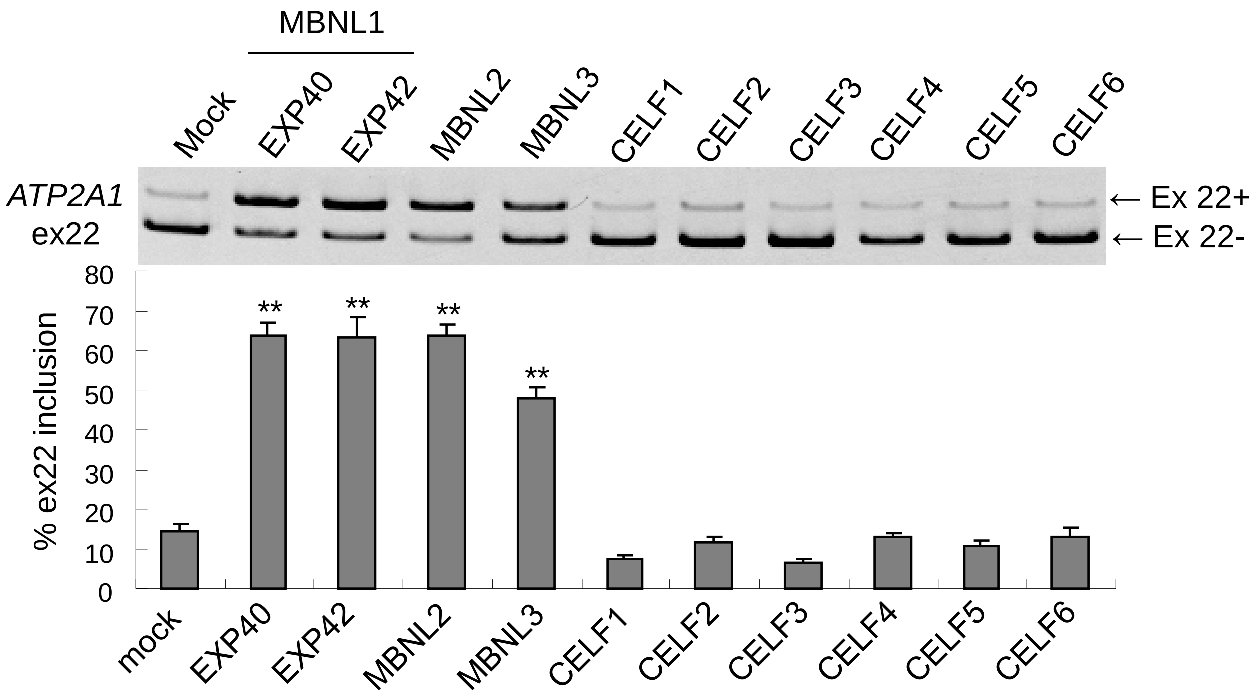

図3.5　　　　内在性ATP2A1 ex22 のスプライシングアッセイの結果。図3.4と同様にスプライシング因子をHEK293細胞に過剰発現させた時の内在性のATP2A1 ex22のスプライシングをRT-PCRによって検出し、ex22がinclusionされた割合を算出し (平均 + 標準誤差, n = 3) 、ダネット検定を行った（$^{**}P < 0.01$ ）。なおスプライシング因子の発現は図3.4(B) で確認している。

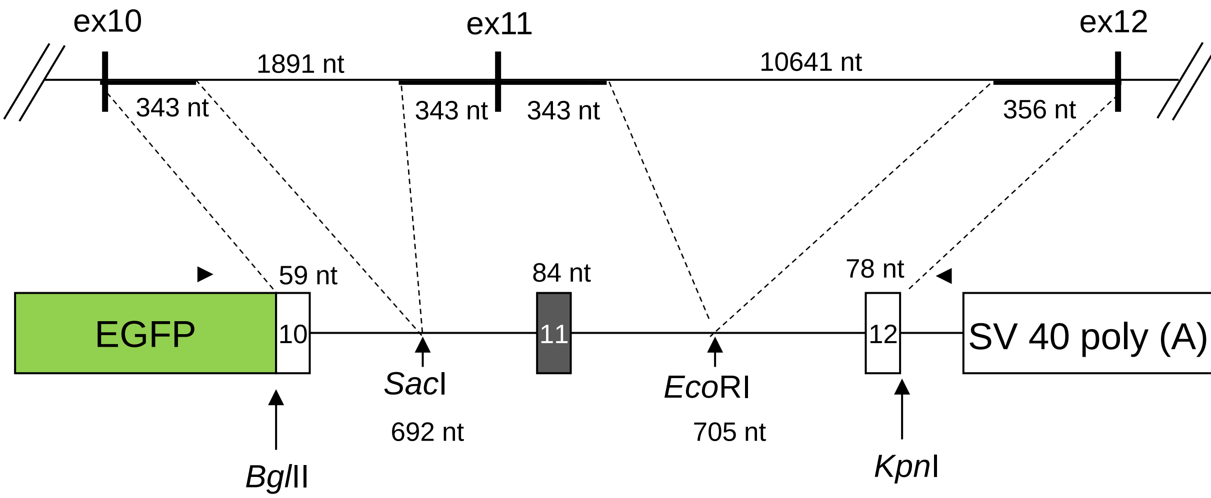

図3.6 *ABLIM1* ex11 minigene の構造。Intron 10 と intron 11の中間部分は、クローニングが困難な程長かったため、削除してminigeneを作製した。このゲノムの3か所をpEGFP-C1に1か所ずつクローニングした。このminigeneにはCMVプロモーターとSV40 poly (A) があるため、転写と翻訳が哺乳類細胞で起こる。以上のことは、このminigeneを培養細胞に遺伝子導入して、GFP蛍光観察によって確認した。スプライシングアッセイでは矢型の部分に設計したprimerを利用し、内在性のスプライシングは検出しないようにした。

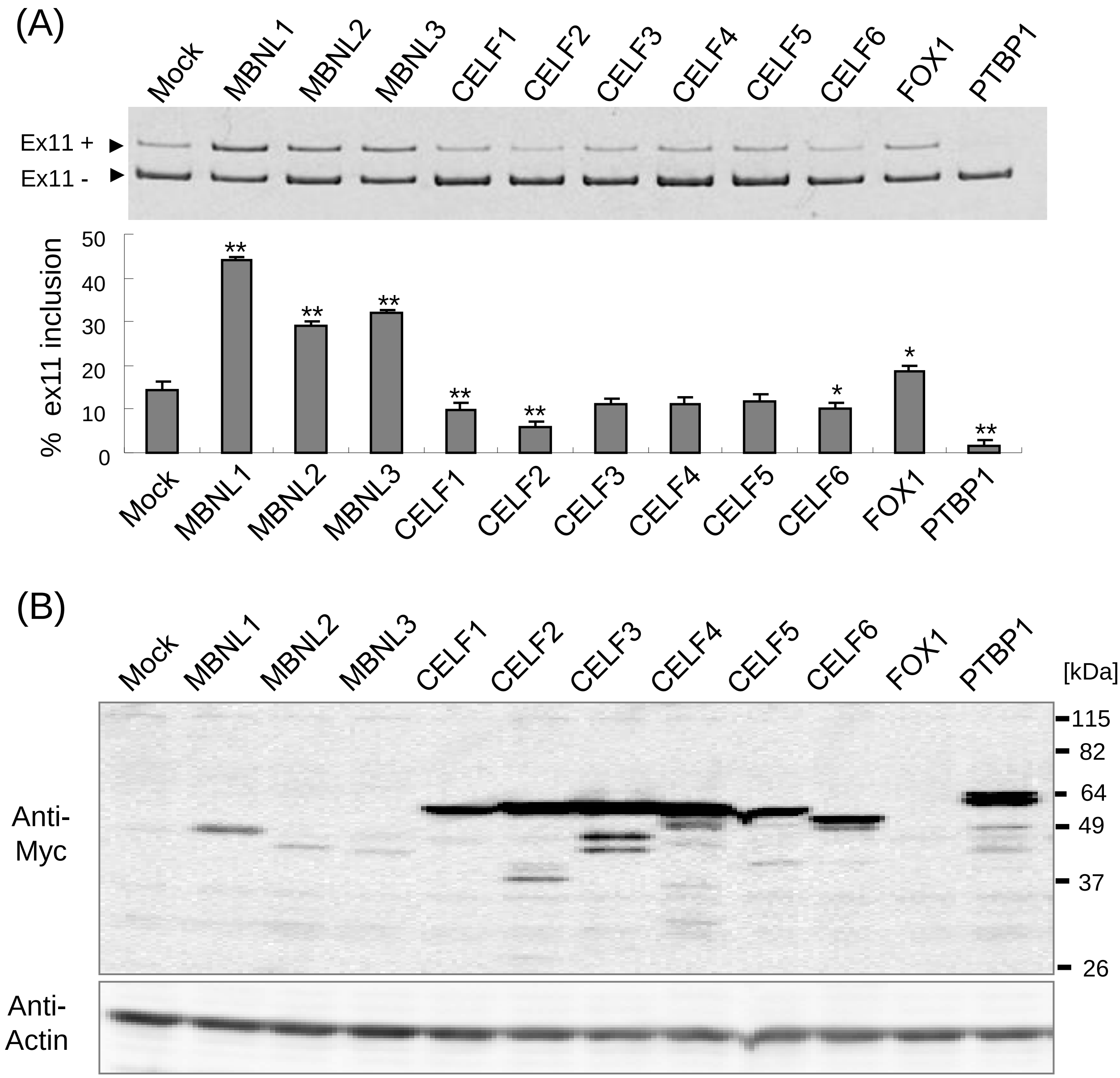

図3.7　　　　スプライシング因子を過剰発現さたた時のABLIM1 ex11 minigeneスプライシングアッセイの結果。(A) スプライシング因子をC2C12細胞に過剰発現させた時のminigeneのABLIM1 ex11のスプライシングをRT-PCRによって検出し、ex11がinclusionされた割合を算出し (平均 + 標準誤差, n = 3) 、ダネット検定を行った（$*P < 0.05$, $**P < 0.01$ ）。(B) スプライシング因子の過剰発現を確認したウェスタンブロット解析。遺伝子導入24時間後に回収した細胞より行った。Myc抗体で検出されたバンドがMycタグ付のスプライシング因子で、Actinは内部標準コントロールとして検出した。ただし、FOX1についてはウェスタンブロットで発現を確認できなかったため、qPCRによって検出した (図3.8)。

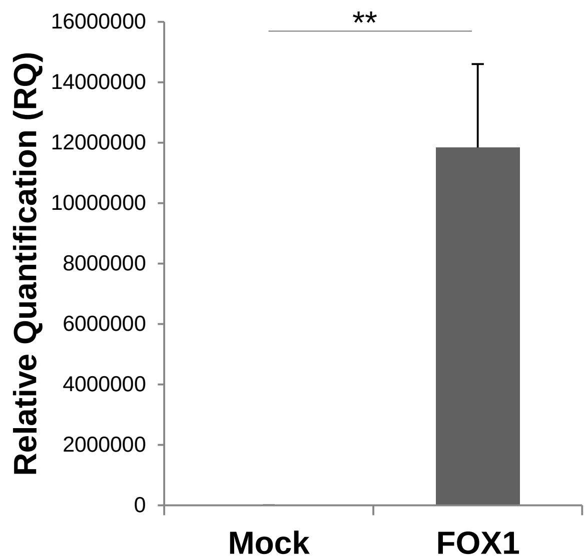

図3.8　　　　　FOX1の過剰発現を定量的PCR (qPCR) で検出。Mock (pSecDK) とFOX1発現ベクターをC2C12細胞にそれぞれ遺伝子導入したものから、RNA抽出をし、逆転写したcDNAを鋳型にして、qPCRを行った。Primerは導入したFOX1のみを増幅させるために、FOX1とpSecDK上に設計した。FOX1の発現量は、Mockを1とした時の相対量を算出し (平均 + 標準誤差, n = 3) し、スチューデントの *t* 検定を行った（$^{**}P < 0.01$）。なお、内部標準遺伝子とて、mRpl13aを用いて発現量の補正を行った。

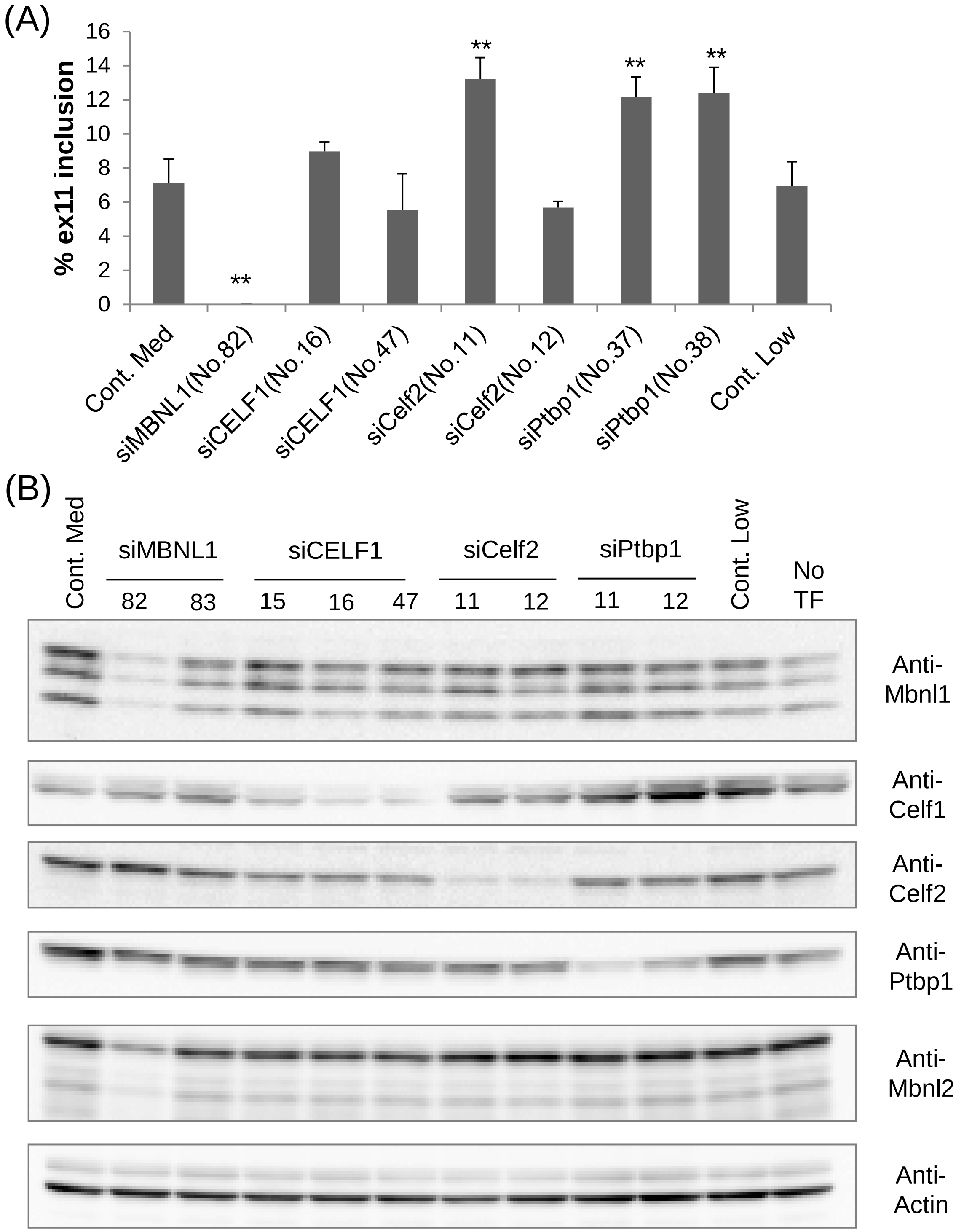

図3.9　　　　　スプライシング因子をノックダウンした時のABLIM1 minigeneスプライシングアッセイの結果。(A) C2C12細胞の内在性のスプライシング因子をsiRNAによってノックダウンさせた時のminigeneのABLIM1 ex11のスプライシングをRT-PCRによって検出し、ex11がinclusionされた割合を算出し (平均 + 標準誤差, n = 3) 、ダネット検定を行った（$**P < 0.01$ ）。(B) 内在性のスプライシング因子のノックダウンを確認したウェスタンブロット解析。遺伝子導入48時間後に回収した細胞より行った。Actinは内部標準コントロールとして検出した。

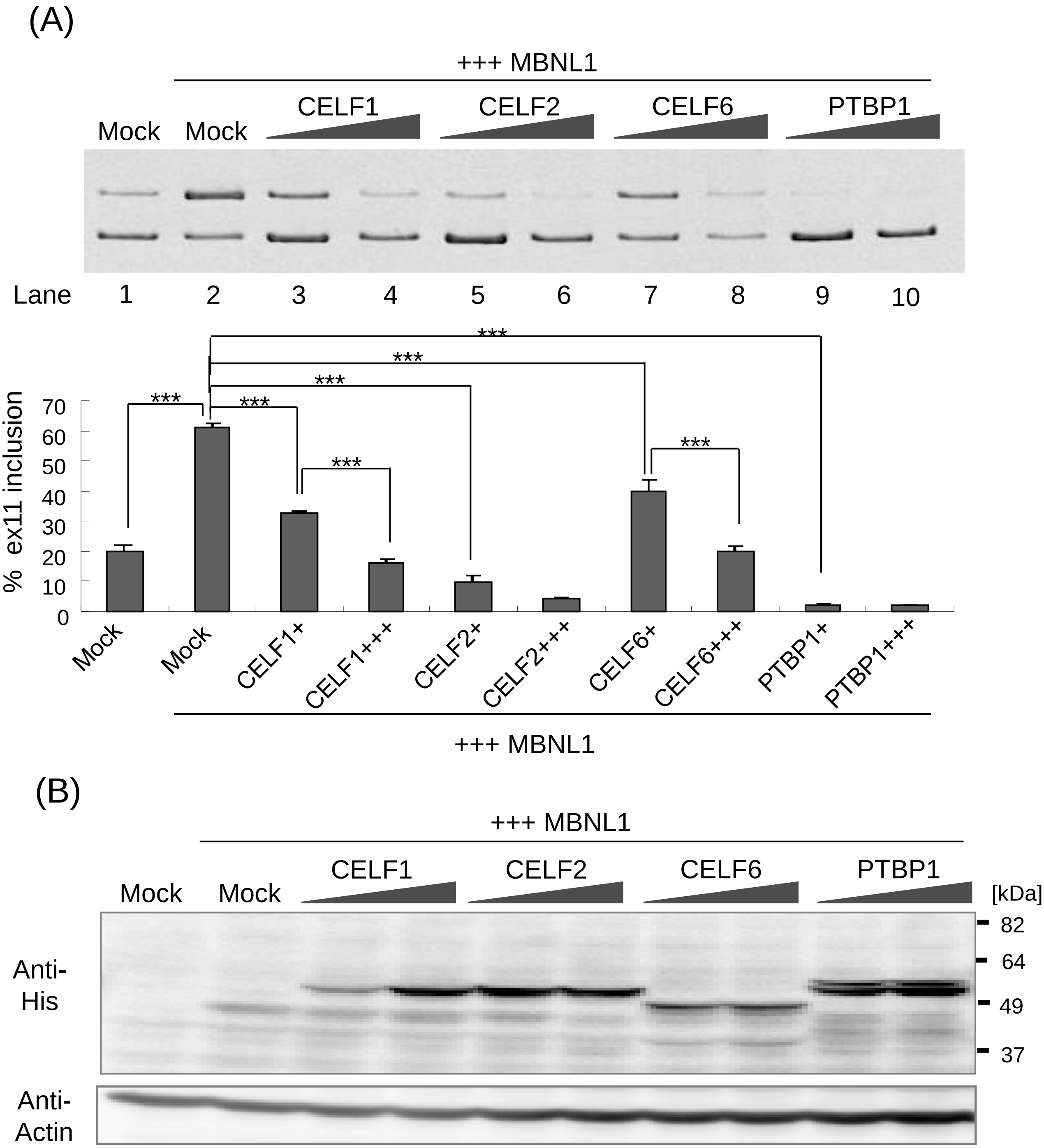

図3.10　　　　スプライシング因子を競合実験した時のABLIM1 minigeneスプライシングアッセイの結果。(A) MBNL1とCELF1または、CELF2、CELF6、PTBP1を共発現させた時のminigeneのABLIM1 ex11のスプライシングをRT-PCRによって検出し、ex11がinclusionされた割合を算出し (平均 + 標準誤差, n = 3) 、チューキー検定を行った（***P < 0.001 ）。なお、遺伝子導入量は、+++ は 0.7 μg 、+ は 0.23 μg を利用し段階的にした。(B) スプライシング因子の発現量を確認したウェスタンブロット解析。遺伝子導入48時間後に回収した細胞より行った。His抗体で検出されたバンドがHisタグ付のスプライシング因子で、Actinは内部標準コントロールとして検出した。

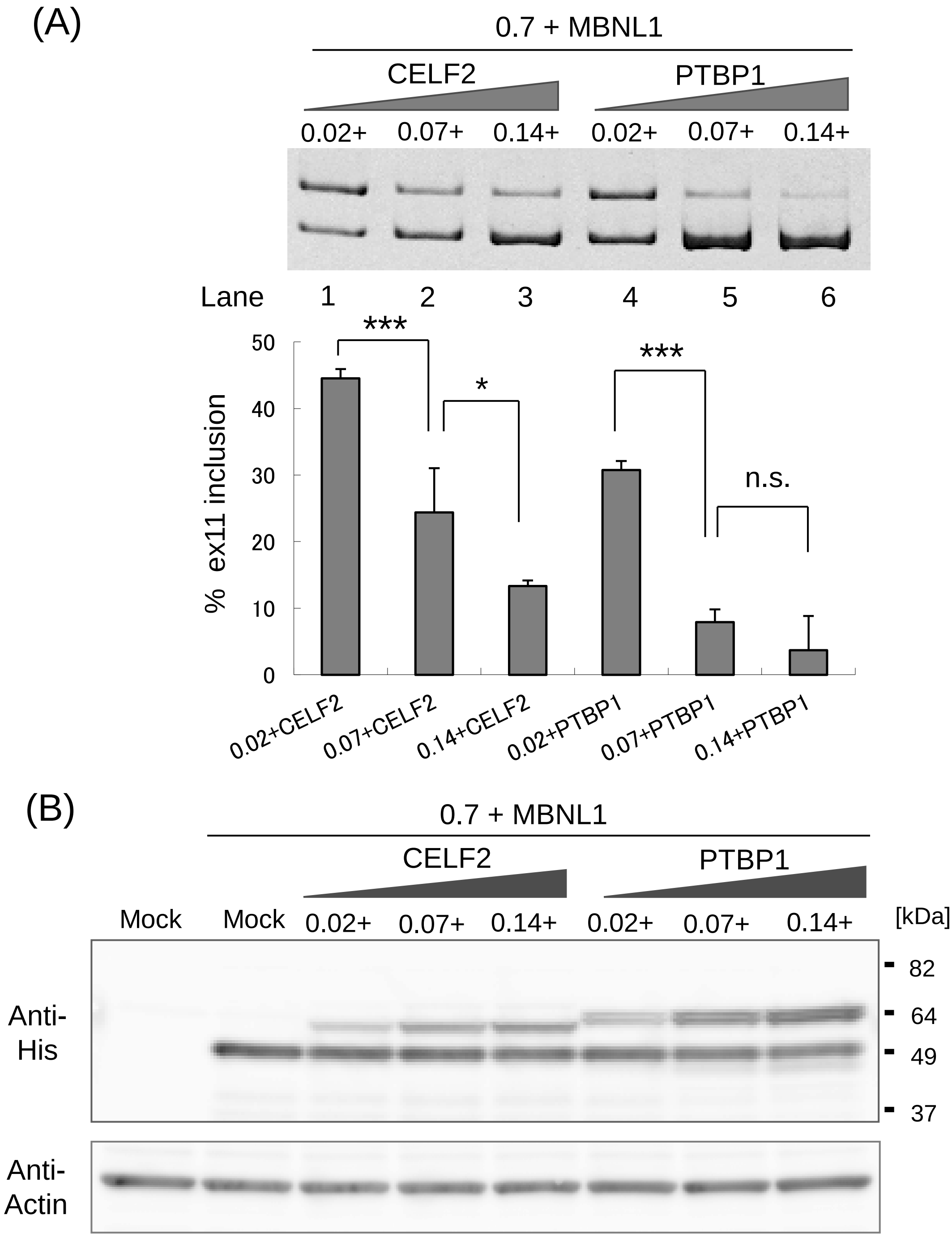

図3.11　　　　スプライシング因子を競合実験した時のABLIM1 minigeneスプライシングアッセイの結果。(A) MBNL1とCELF2または、PTBP1を共発現させた時のminigeneのABLIM1 ex11のスプライシングをRT-PCRによって検出し、ex11がinclusionされた割合を算出し (平均 + 標準誤差, n = 3) 、チューキー検定を行った（*P < 0.05, ***P < 0.001 ）。なお、遺伝子導入量は、0.7 + は 0.7 μg のように 0.02 μg 、0.07 μg 、0.14 μg を利用し段階的にした。(B) スプライシング因子の発現量を確認したウェスタンブロット解析。遺伝子導入48時間後に回収した細胞より行った。His抗体で検出されたバンドがHisタグ付のスプライシング因子で、Actinは内部標準コントロールとして検出した。

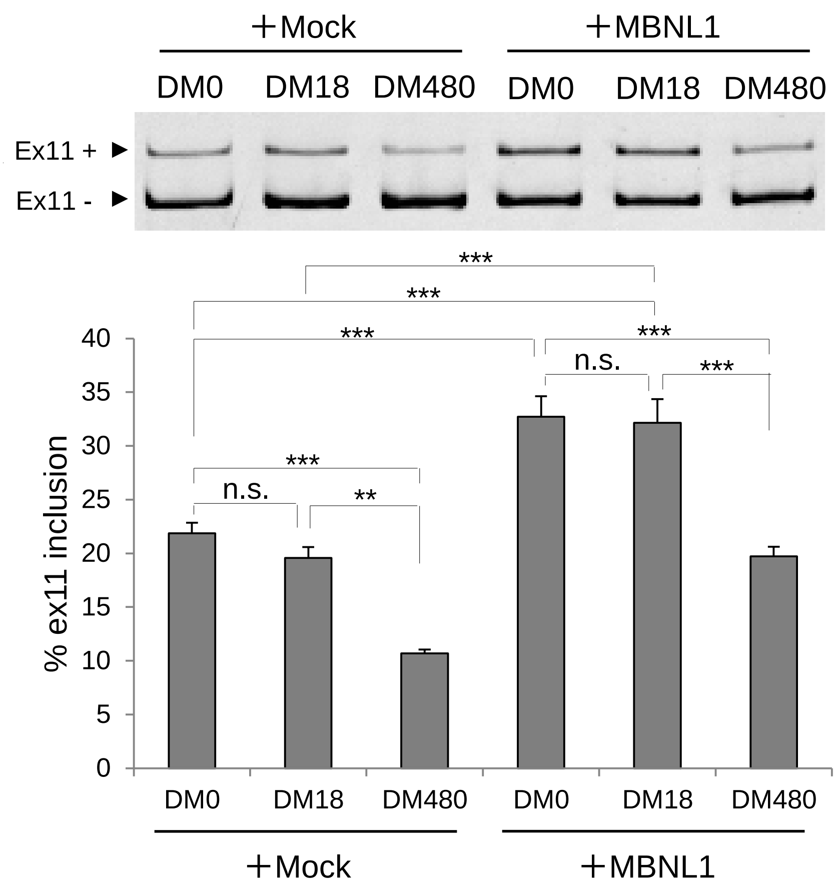

図3.12　　　　伸長したリピート発現とMBNL1を過剰発現した時のABLIM1 minigeneスプライシングアッセイの結果。リピート発現コンストラクトとMock (pSecDK) またはMBNL1を共発現させた時の、minigeneのABLIM1 ex11のスプライシングをRT-PCRによって検出し、ex11がinclusionされた割合を算出し (平均 + 標準誤差, n = 3) 、チューキー検定を行った（**P < 0.01, ***P < 0.001 ）。なお、遺伝子導入量は、リピート発現コンストラクトとMock (pSecDK) またはMBNL1 0.7 μgずつ利用した。リピート発現コンストラクトはRFP蛍光観察で発現を確認している。

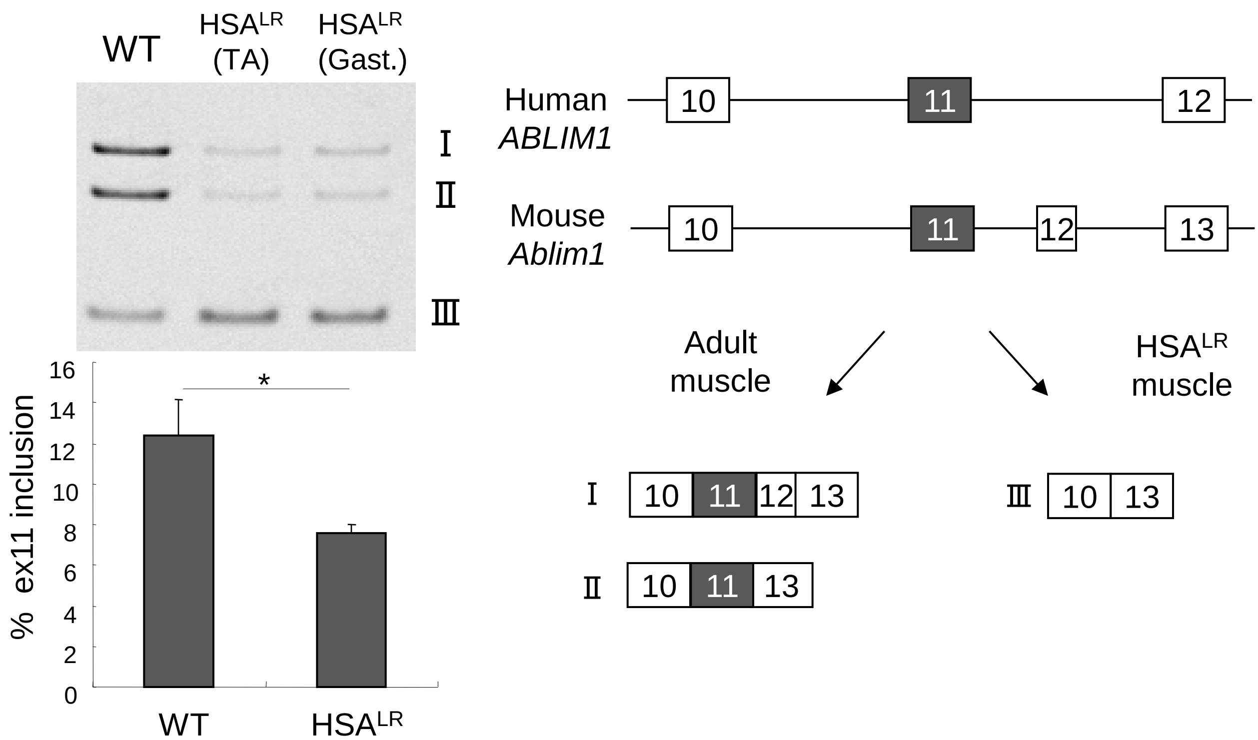

図3.13　　　*HSA*LRマウスの骨格筋で m*Ablim11* ex11が脱落する選択的スプライシング異常を検出。 野生型 (WT) 、*HSA*LRの骨格筋（TA筋、Gast.筋）における m*Ablim1* ex11のスプライシングをRT-PCRで検出。するとマウスとヒトではゲノム構造が異なり、3つのisoform、I (ex11+, ex12+) 、II (ex11+, ex12-)、III (ex11-, ex12-) が検出。IとIIをex11がinclusion　されたisoformとして割合を算出 (平均 + 標準誤差, n = 4) し、スチューデントの *t* 検定を行った（*P < 0.05）。

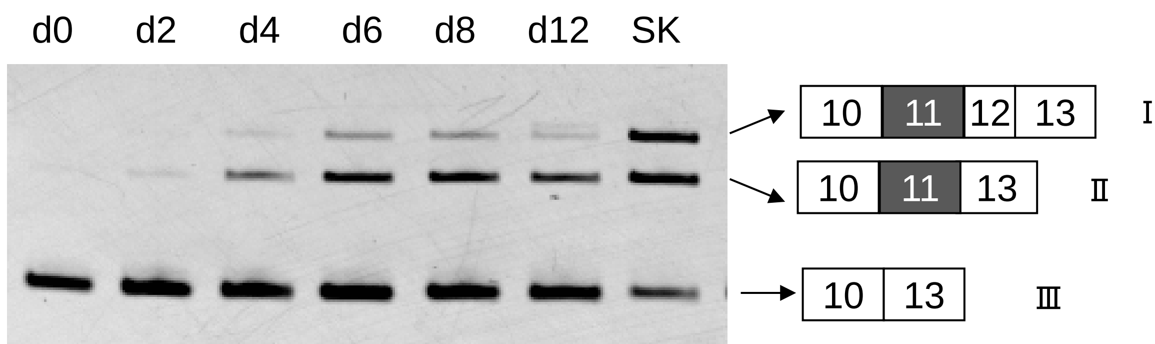

図3.14　　　C2C12細胞を分化させるとex11が入ったisoformのバンド2本（IとII）が段階的に検出されるようになった。上の数字は分化培地に変えた日をd0として、2、4、6、8、12日後の細胞を採取して、内在性のmABLIM1のスプライシングをRT-PCRによって検出した。SKは生体のマウスの骨格筋を用いた。

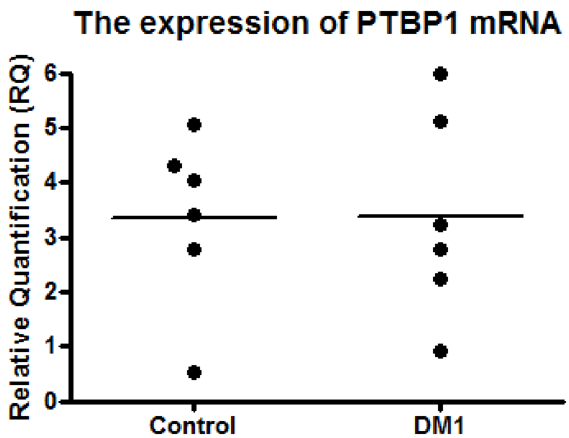

図3.15　　　DM1患者の生検筋における*PTBP1* mRNAの発現量はnon-DM筋 (Control) と差がなかった。*PTBP1* mRNA量を定量的PCR (qPCR) で検出した。*PTBP1* mRNAの発現量は、胎児筋での発現量を1とした時の相対量を算出し (横棒は平均値, n = 6) 、スチューデントの*t* 検定を行った。なお、内部標準遺伝子とて、*GAPDH*を用いて発現量の補正を行った。

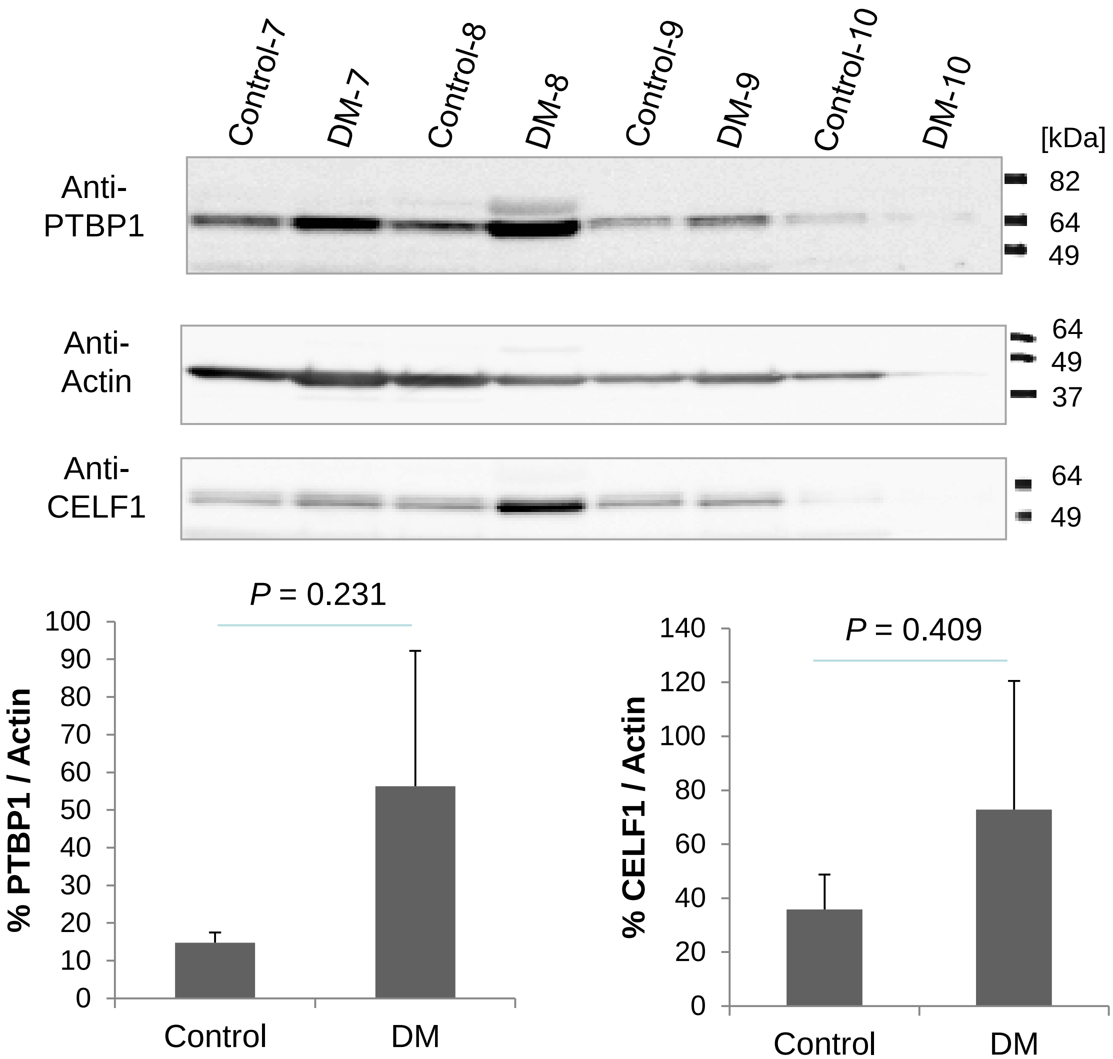

図3.16　　　　DM患者の生検筋ではPTBP1のタンパク質発現量の上昇傾向は見られるが、有意差は検出できなかった。DMではないヒトの生検筋（Control）と、DM患者の生検筋よりタンパク質を抽出し、ウェスタンブロット解析によってPTBP1とCELF1の発現量をバンドの輝度としてActinで補正して定量し (平均 + 標準誤差, n = 4または3) 、スチューデントの*t* 検定を行った。Actinは内部標準コントロールとして検出し、CELF1は既にDM患者の生検筋で発現量が増加することが報告されているのでポジティブコントロールとして定量したが、PTBP1と同様に増加傾向はあるが有意差は検出できなかった。

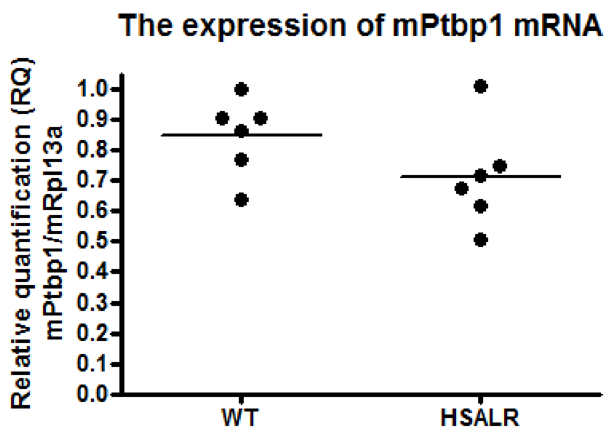

図3.17　　　　DMモデルマス（HSA[LR]）の前脛骨筋（TA筋）における*Ptbp1* mRNAの発現量は野生型マウス（WT）のTA筋と差はなかった。*Ptbp1* mRNA量を定量的PCR (qPCR) で検出した。*Ptbp1* mRNAの発現量は、ある1匹のWTでの発現量を1とした時の相対量を算出し(横棒は平均値, n = 6) 、スチューデントの*t* 検定を行った。なお、内部標準遺伝子とて、*mRpl13a*を用いて発現量の補正を行った。

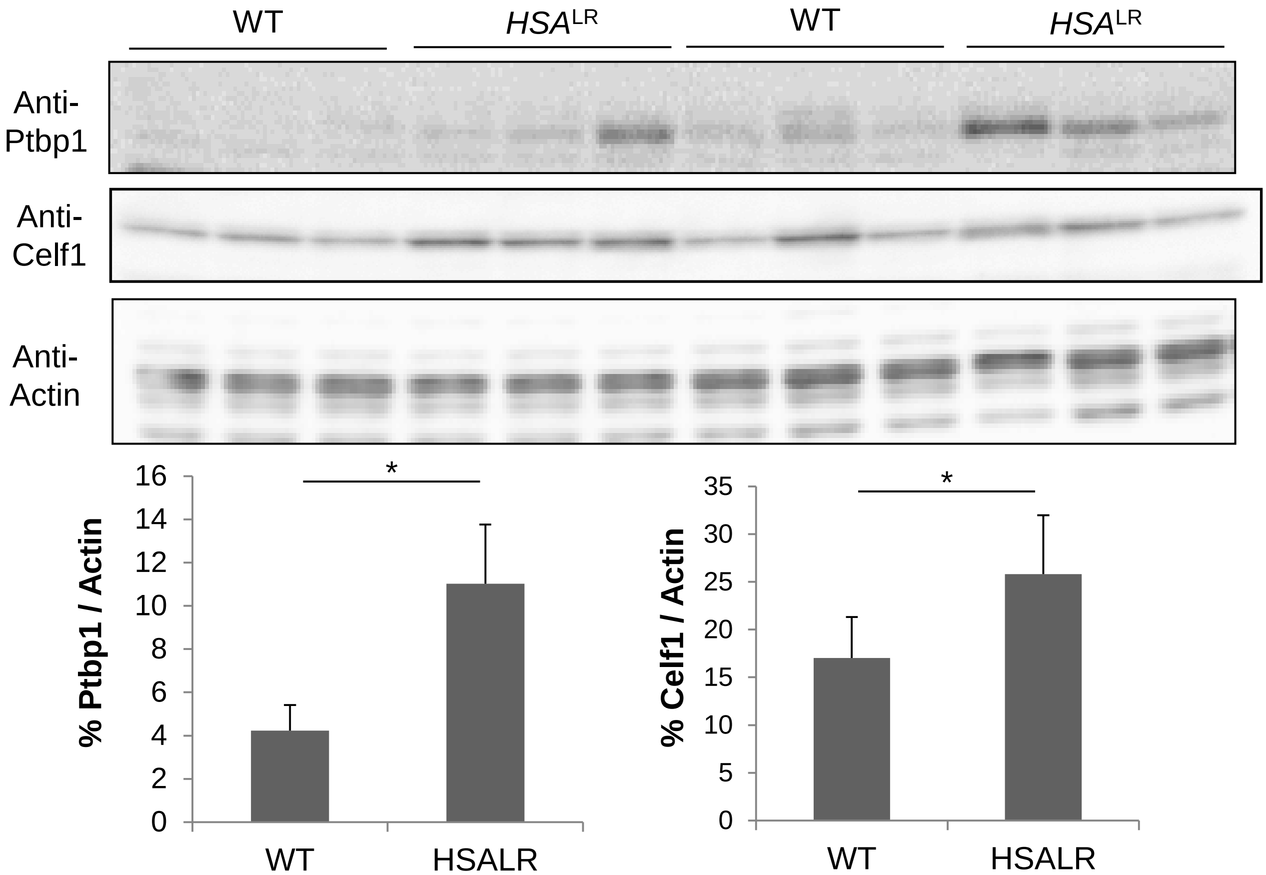

図3.18　　　　*HSA*LRマウスの骨格筋ではPtbp1の発現量が有意に高くなっていた。野生型のマウス（WT）と*HSA*LRマウスのTA筋よりタンパク質を抽出し、ウェスタンブロット解析によってPtbp1とCelf1の発現量をバンドの輝度としてActinで補正して定量し (平均 + 標準誤差, n = 6) 、スチューデントの*t* 検定を行った（$^*P < 0.05$）。Actinは内部標準コントロールとして検出し、Celf1は既に*HSA*LRマウス筋で発現量が増加することが報告されているのでポジティブコントロールとして定量した。

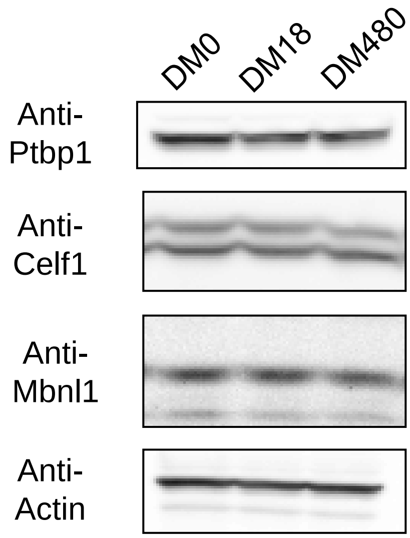

図3.19　　　　伸長したリピートを発現させてもPtbp1、Celf1、Mbnl1のスプライシング因子の発現量は変化しなかった。C2C12にリピート発現コンストラクトを1.3 μg 遺伝子導入し、24時間後に回収しウェスタンブロットを行った。Actinは内部標準コントロールとして検出した。

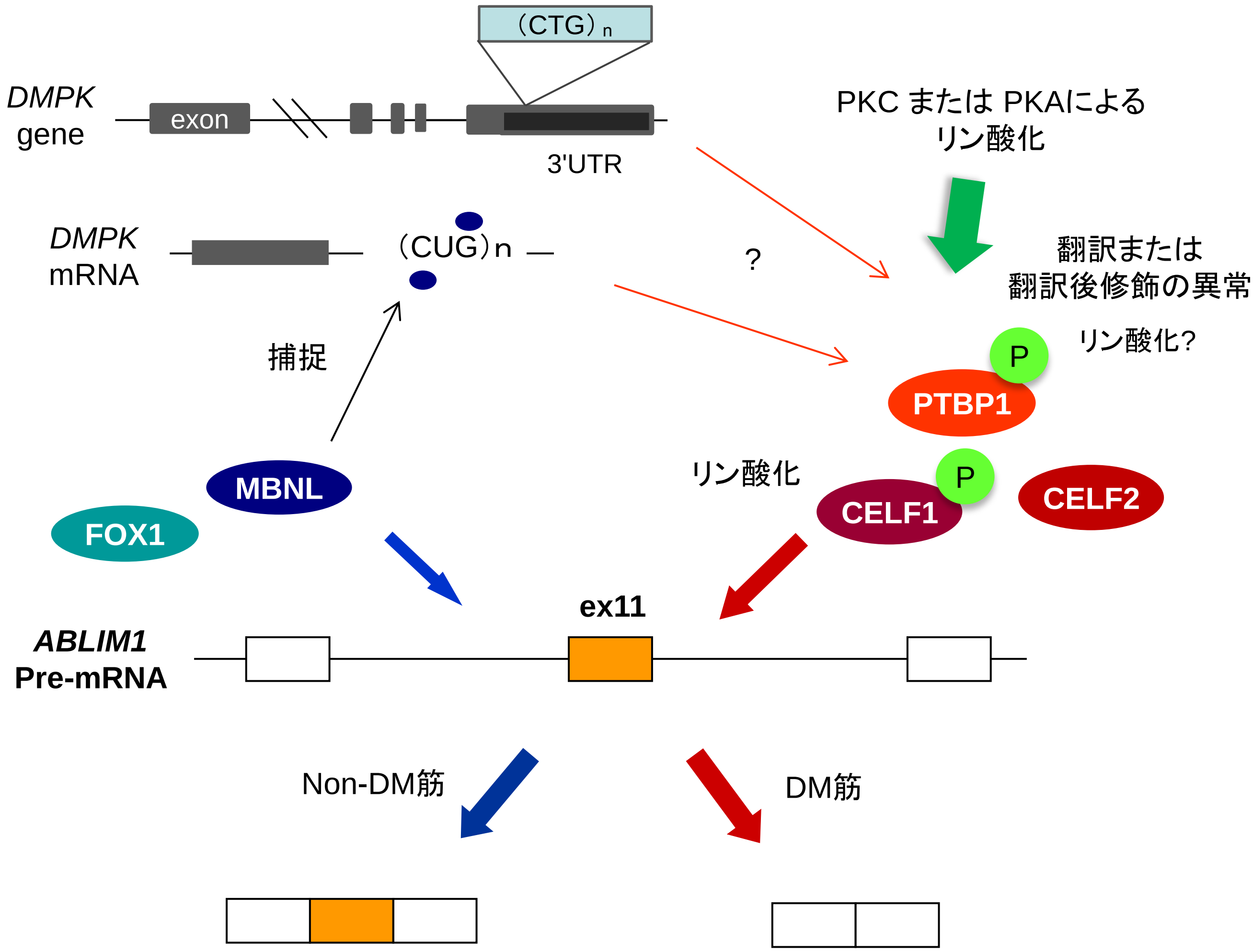

図4.1　本研究の要約　　　　　ABLIM1 ex11 のスプライシングはMBNL、FOX1によって正常筋で見られるex11の入るスプライシングが促進し、CELF、PTBP1、伸長したリピートによってDM筋で見られるex11が脱落するスプライシングが促進され、DMモデルマウスではPTBP1のタンパク質発現量が有意に増加しており、DM患者においても増加傾向が検出された。*PTBP1*のmRNA発現量は、DMモデルマウスとDM患者、それぞれ野生型と正常者の間で変化がなかったので、翻訳または翻訳後修飾などによってPTBP1のタンパク質発現量が増加したと考えられる。CELF1はPKCによって高リン酸化されてタンパク質発現量がDM患者で増加することが報告されていること、またPTBP1はPKAによってリン酸化される報告があることから、PKCまたはPKAによってPTBP1がリン酸化されることでPTBP1が安定化し、タンパク質発現量がDMで増加している可能性がある。

コドン表

1st base	2nd base U	2nd base C	2nd base A	2nd base G	3rd base
U	UUU Phe	UCU Ser	UAU Tyr	UGU Cys	**U**
	UUC Phe	UCC Ser	UAC Tyr	UGC Cys	**C**
	UUA Leu	UCA Ser	UAA end	UGA end	**A**
	UUG Leu	UCG Ser	UAG end	UGG Trp	**G**
C	CUU Leu	CCU Pro	CAU His	CGU Arg	**U**
	CUC Leu	CCC Pro	CAC His	CGC Arg	**C**
	CUA Leu	CCA Pro	CAA Gln	CGA Arg	**A**
	CUG Leu	CCG Pro	CAG Gln	CGG Arg	**G**
A	AUU Ile	ACU Thr	AAU Asn	AGU Ser	**U**
	AUC Ile	ACC Thr	AAC Asn	AGC Ser	**C**
	AUA Ile	ACA Thr	AAA Lys	AGA Arg	**A**
	AUG Met	ACG Thr	AAG Lys	AGG Arg	**G**
G	GUU Val	GCU Ala	GAU Asp	GGU Gly	**U**
	GUC Val	GCC Ala	GAC Asp	GGC Gly	**C**
	GUA Val	GCA Ala	GAA Glu	GGA Gly	**A**
	GUG Val	GCG Ala	GAG Glu	GGG Gly	**G**