

1) RNA 結合タンパク質の異常

伸長したリピート RNA によって、RNA 結合タンパク質である、muscleblind-like splicing regulator (MBNL)、CUGBP, and the Elav-like family member 1 (CELF1)、heterogeneous nuclear ribonucleoprotein H1 (H) (hnRNP H)、staufen double-stranded RNA binding protein 1 (Staufen1) 活性が異常になっているという報告がなされているが (Ho *et al.* 2004, Kanadia *et al.* 2003, Miller *et al.* 2000, Paul *et al.* 2006, Philips *et al.* 1998, Ravel-Chapuis *et al.* 2012, Timchenko *et al.* 1996a)、特に MBNL と CELF1 の活性異常が、一番研究が進んでおり、症状に関与していると考えられている。

MBNL family タンパク質

MBNL family タンパク質には MBNL1、MBNL2、MBNL3 の 3 種類がある。この 3 つの MBNL は、DM 患者筋または細胞の核で、伸長した CUG/CCUG リピート RNA の foci と共局在しており (Fardaei *et al.* 2002)、MBNL1 は CUG/CCUG リピート RNA の長さ依存的に直接結合することが *in vitro* においても確認されている (Miller *et al.* 2000, Kino *et al.* 2004)。以上のことから、DM 患者では伸長したリピートに MBNL が捕捉され、その機能が低下していると考えられ、Mbnl のノックアウトマウスの作製により、その生理的な機能や DM に見られる症状との関与が示されている (Kanadia *et al.* 2003, Hao *et al.* 2008)。ノックアウトマウスである、Mbnl1^{ΔE3/ΔE3} (Mbnl1 の exon 3 が欠損しており、Mbnl1 のタンパク質発現が見られないトランスジェニックマウス)、Mbnl2^{-/-} では、筋強直や組織学的な筋肉の異常、白内障などの症状が見られ、DM 患者や HSA^{LR} で見られる選択的スプライシング異常も検出された (Kanadia *et al.* 2003, Hao *et al.* 2008)。また、MBNL1 は骨格筋で最も多く発現しているが、MBNL2 は生後、骨格筋での発現が減少しており、生後脳内での選択的スプライシングを主に制御していることから (Charizanis *et al.* 2012, Holt *et al.* 2009, Kanadia *et al.* 2003, Wang *et al.* 2012)、MBNL1 は主に筋肉の異常、MBNL2 は主に中枢神経系の異常に関与していると考えられている。Mbnl3^{Δ2/Δ2} は DM で見られる筋症状が軽症で、通常の骨格筋でも MBNL3 は発現していないことから、DM の症状にはあまり関与しないことが示唆されているが、筋再生の際には発現が一時的に高くなることから、筋再生の過程で働く可能性がある (Kanadia *et al.* 2003, Poulos *et al.* 2013)。

さらに MBNL1 は、心筋で重要なマイクロ RNA である miR-1 の合成に関与しており、DM の心筋では miR-1 が減少していると報告されている (Rau *et al.* 2011)。この miR-1 の量は正常より多くても、少なくても、心筋の異常を示すことが知られており (Sayed *et al.* 2007,

Care *et al.* 2007, Yang *et al.* 2007, Zhao *et al.* 2007)、miR-1 のターゲット配列が存在する遺伝子の発現も DM の心筋で増加していた(Rau *et al.* 2011)。したがって、DM で見られる心筋の異常は、MBNL1 の機能低下による miR-1 の減少によるものだと考えられている。

CELF family タンパク質

CELF family タンパク質には 6 種類あり、CELF1、CELF2、CELF3、CELF4、CELF5、CELF6 と呼ばれている。CELF は選択的スプライシング以外に、mRNA の輸送や安定性、翻訳などさまざまな RNA プロセッシングに関与していることが知られている(Barreau *et al.* 2006, Huichalaf *et al.* 2010, Huichalaf *et al.* 2009, Lee *et al.* 2010, Timchenko *et al.* 2005)。当初、CELF1 と CELF2 は *in vitro* で CUG リピートとの結合性があると着目されたが(Lu *et al.* 1999, Timchenko *et al.* 2001)、DM1 患者の細胞でリピート RNA foci と両局在しないこと(Fardaei *et al.* 2002, Mankodi *et al.* 2003, Miller *et al.* 2000)、また生体内で 2 本鎖を形成している CUG リピート RNA とは結合性がないことにより(Takahashi *et al.* 2000)、DM 患者でその活性は低下していないことが示された。しかし、逆に DM1 患者の細胞、骨格筋、心筋やモデルマウスで CELF1 が過剰に発現されていることが示され(Savkur *et al.* 2001, Dansithong *et al.* 2005, Timchenko *et al.*, 1996b)、これらが PKC が制御する高リン酸化による CELF1 の安定化によることが確認された(Kuyumcu-Martinez *et al.* 2007)。また、全体では CELF1 は高リン酸化状態になっているが、DM1 の筋細胞で見られる GSK3 β シグナルの活性化によって Ser302 は脱リン酸化されており、それによって CELF1 の翻訳機能が低下していることが確認されている(Salisbury *et al.* 2008, Jones *et al.* 2012)。また、CELF1 を過剰発現させたトランスジェニックマウスにおいて、DM で見られる筋萎縮、筋力低下、筋組織の異常と選択的スプライシング異常も見られることから、CELF1 の異常な過剰発現は DM の症状に関与していると考えられている(Ward *et al.* 2010)。さらに、モデルマウスの *HSA*^{LR} においても CELF1 の過剰発現が確認されている(Jones *et al.* 2012)。CELF2-6 の発現量やリン酸化状態はまだよく調べられていないが、いくつかのリン酸化サイトが推定されており(Ladd *et al.* 2001, Ladd *et al.* 2004)、DM においても異常になっている可能性がある。また、CELF family の発現をみると、CELF1、CELF2 はユビキタスに発現し、特に心筋、骨格筋、脳、未分化な筋芽細胞 C2C12 での発現量が高く、CELF3、CELF4、CELF5 は主に神経系の組織で、CELF6 は主に神経系、腎臓、精巣での発現が知られている(Brimacombe *et al.* 2007, Choi *et al.* 1998, Choi *et al.* 1999, Good *et al.* 2000, Ladd *et al.* 2001, Ladd *et al.* 2004, Wu *et al.* 2010, Choi *et al.* 2003, Kress *et al.* 2007)。

2) リピート RNA 由来のタンパク質毒性

高次構造を取りやすいリピート RNA は、ATG 非依存的な翻訳(Repeat Associated Non-ATG translation; RAN-translation)が起こりやすく、CAG リピート RNA よりポリグルタミン(poly Q; CAG)、ポリシステイン(poly S; AGC)、ポリアラニン(poly A; GCA)が翻訳され、それらが凝集体を形成してタンパク質毒性を示すことがある。これは翻訳部分にある CAG リピートが伸長して発症するリピート病と同じである(Gatchel and Zoghbi 2005)。DM1 のモデルマウスやヒトの組織において、アンチセンスの CAG リピート RNA が転写され、それから RAN translation によってできたと考えられるポリグルタミンの凝集体が核に多く検出されているものの、通常の筋芽細胞や組織では検出されなかった(Zu *et al.* 2011)。また、DM1 と同様に CTG リピートが 3'-UTR の非翻訳領域に伸長する SCA8 (脊髄小脳失調症 8 型)においては、特にポリアラニンの凝集体が見られている(Zu *et al.* 2011)。さらに DM2 においても、CCUG リピート RNA から RAN-translation によってできたと考えられる、ロイシン、プロリン、アラニン、システインリピート(LPAC motif)が DM2 の脳のさまざまな細胞で検出された(Zu *et al.* 2013)。以上のことより、RAN-translation 由来のポリタンパク質は、DM1、DM2 で見られる中枢神経系の異常の原因である可能性が高いと考えられている。

1.4 選択的スプライシング異常とスプライシング因子

ヒトの遺伝子の 74 %以上は、選択的スプライシングによってタンパク質の多様性を飛躍的に増大させており、選択的スプライシングは、生体機能を制御するために不可欠な生命現象であると考えられている(Johnson *et al.* 2003)。発生や組織特異的に選択される exon が異なり、様々な isoform の mRNA が選択的スプライシングで生じ、異なった機能を持つタンパク質が 1 つの遺伝子から合成される。この選択的スプライシングは、様々なスプライシング因子の競合によって相対的に決まるため、スプライシングが起こる部位でのスプライシング各因子の相対量が重要である。

上項で書いてきたように DM では様々な遺伝子で選択的スプライシングの異常が検出されており、いくつかの重要な遺伝子の選択的スプライシング異常は症状の原因であることが確かめられている。DM 患者や DM モデルマウスで選択的スプライシングの異常が検出されている遺伝子として、chloride channel 1 (*CLCN1*) (Charlet *et al.* 2002b; Mankodi *et al.* 2002)、troponin T type 2 (cardiac) (*TNNT2/cTNT*) (Philips *et al.* 1998)、bridging integrator 1 (*BINI*) (Fugier *et al.* 2011)、ATPase, Ca²⁺ transporting, cardiac muscle, fast

twitch 1 (*ATP2A1*) (Kimura *et al.* 2005)、L-type Ca^{2+} channel and voltage sensor (*Cav1.1*) (Tang *et al.* 2012)、insulin receptor (*INSR*) (Savkur *et al.* 2001)、microtubule-associated protein tau (*MAPT*) (Sergeant *et al.* 2001)、myomesin 1 (*MYOM1*) (Koebis *et al.* 2011)、PDZ and LIM protein 3 (*PDLIM3*) (Ohsawa *et al.* 2010)などが知られている。それらのうち、*CLCN1*、*BIN1*、*INSR*はそれぞれ、筋強直、筋力低下、インスリン抵抗性の原因であることが確認されている (Mankodi *et al.* 2002, Fugier *et al.* 2011, Savkur *et al.* 2001)。もちろんこれ以外のスプライシング異常もDMの症状の原因であることが考えられ、検証が進められている。

上記の *CLCN1*、*TNNT2*、*BIN1*、*ATP2A1*、*INSR*がMBNLやCELFによって直接制御されていることが、minigeneなどを利用した *in vitro*の実験により確認されており、モデルマウスによっても確認されている。そして、MBNL1とCELF1はこれらの選択的スプライシングを拮抗的に制御している。MBNL1は正常な筋肉でのスプライシングを促進し、CELF1はDM筋で見られる異常なスプライシングを促進している。

また、MBNL1やCELF1が制御している選択的スプライシングと一緒に制御しているという報告があるスプライシング因子として polypyrimidine tract binding protein 1 (PTBP1)やfox-1 homolog (*C. elegans*) 1 (RBFOX1/FOX1)がある。PTBP1やそのホモログは、神経系や筋肉での特異的な選択的スプライシングを制御しており、*SRCN1* (Chan and Black 1997)、 α -actinin SM (Southby *et al.* 1999)、 α -tropomyosin exon 2 (Gooding *et al.* 1998)、*GRIN1* exon 5 (Zhang *et al.* 1999)、and *TNNT2* exon 5 (Philips *et al.* 1998, Charlet *et al.* 2002a)が報告されている。またPTBP1の発現量は、神経や筋芽細胞が分化すると発現量が低下し(Boutz *et al.* 2007a, Makeyev *et al.* 2007, Boutz *et al.* 2007b, Bland *et al.* 2010)、生後の心筋の成熟過程においても発現量が低下していく(Zhang *et al.* 2009)。一方、FOX1は骨格筋、心筋、神経で主に発現して、組織特異的なスプライシングを制御しており(Jin *et al.* 2003)、FOX1の発現量は神経芽細胞や筋芽細胞が分化すると増加する(Underwood *et al.* 2005)。したがって、正常な筋肉や神経の発生にはPTBP1の発現量が減少すること、FOX1の発現量が増加することが重要であることが分かる。よって、DM患者においては、PTBP1が増加したり、FOX1が減少している可能性があると考えた。

1.5 *actin binding LIM protein 1 (ABLM1)* について

*ABLM1*は、主に網膜、脳、骨格筋、心筋に発現しており、心筋ではZ膜に局在している構造タンパク質の1つだと考えられている(Roof *et al.* 1997)。Z膜は筋肉での力の発生、力の伝達、核にシグナルを伝達する重要な部位でもあり(Frey *et al.* 2004, Frank *et al.* 2006)、

そこに存在するABLIM1もこれらの機能に寄与していると考えられる。また、マウス筋芽細胞C2C12でABLIM1をノックダウンさせると、筋分化するために必要な遺伝子の転写活性が下がることが報告されており(Barrientos *et al.* 2007)、筋分化における機能を持っていると考えられる。ちなみにABLIM familyタンパク質のABLIM2、ABLIM3においても同様な機能があった。また、*ABLIM1*の線虫のホモログである*UNC-115*は軸索誘導に関与していること(Lin *et al.* 1994)、アクチンと結合できないABLIM1をニワトリで発現させると軸索誘導がうまくいかないことから、神経系でも機能がある可能性がある(Erkman *et al.* 2000)。

ABLIM1 のタンパク質の構造としてはN 末に 4 つの LIM ドメイン、C 末に 1 つの villin headpiece ドメインを持ち、この villin headpiece ドメインを介してアクチンフィラメント (F-actin) と結合している(Roof *et al.* 1997)。LIM ドメインは、タンパク質間相互作用を示すドメインとして知られているが、ABLIM1 の LIM ドメインを介して結合しているタンパク質は未だ同定されていない。*ABLIM1* はヒトだと 4 つの isoform、マウスだと 3 つの isoform が NCBI に登録されている (図 1.2)。これを参照すると、*ABLIM1* exon11 は LIM ドメインの 5 アミノ酸 (aa) 下流の 28 aa をコードしているが、特にドメイン自身をコードしていない。本研究では、*ABLIM1* のスプライシング異常が DM で見られる何らかの症状に関与しているかどうか証明できていないが、その可能性は十分にある。