

博士論文

筋強直性ジストロフィーの分子病態

小穴 康介

目次

略語	2
1. 序章	4
2. 第一章	
2.1 序論	10
2.2 材料と方法	13
2.3 結果	17
2.4 考察	20
3. 第二章	
3.1 序論	40
3.2 材料と方法	42
3.3 結果	45
3.4 考察	47
4. まとめ	60
5. 参考文献	62
謝辞	68

略語

ASO	antisense oligo nucleotide
BIN1	bridging integrator 1
BPB	bromophenol blue
CELF	CUGBP, Elav-like family
CLCN1	chloride channel 1
CLIP	cross-linking immunoprecipitation
CNBP	CCHC-type zinc finger, nucleic acid binding protein
cDNA	complementary DNA
cont.	control
DNA	deoxyribonucleic acid
DM	myotonic dystrophy (<i>dystrophia myotonica</i>)
DMEM	Dulbecco's modified Eagle's medium
DMPK	dystrophia myotonica-protein kinase
DMSO	dimethyl sulfoxide
DTT	dithiothreitol
EGFP	enhanced green fluorescent protein
Fluc	firefly luciferase
Fw	forward
GAPDH	glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase
HRP	horseradish peroxidase
IR	insulin receptor
MBNL	muscleblind-like
mRNA	messenger RNA
miRNA	micro RNA
NP-40	Nonidet P40
PAGE	polyacrylamide gel electrophoresis
PBS	phosphate-buffered saline
PCR	polymerase chain reaction
PFA	paraformaldehyde
PIM	protease inhibitor mixture
PVDF	polyvinylidene difluoride
RNA	ribonucleic acid
RNase	ribonuclease
RT	reverse transcription

Rv	reverse
SDS	sodium dodecyl sulfate
Serca1	sarcoplasmic/endoplasmic reticulum calcium ATPase 1
siRNA	small interfering RNA
SV40	simian virus 40
TBST	Tris-buffered saline and tween 20
Tris	tris (hydroxymethyl) aminomethane
UTR	untranslated region
WT	wild type

Nucleotides

A	adenosine
T	thymidine
G	guanosine
C	cytosine or cytidine
U	uridine

1. 序章

1.1 はじめに

筋強直性ジストロフィー (DM) は筋強直を特徴とする筋疾患で、未だに治療法が確立しておらず、またその発症機構に関しても不明なことが多い。第一章では、DMの特徴的な分子病態である選択的スプライシングの異常に注目し、治療に応用出来る低分子化合物を探索した。第二章では、DMで生じている選択的スプライシング以外の異常な現象に着目し、DMの新しい発症機構のメカニズムを明らかにしようと試みた。以下に本研究の背景を述べる。

1.2 筋強直性ジストロフィー (DM)

筋強直性ジストロフィーは成人で最も頻度の高い筋ジストロフィーである (1)。筋強直性ジストロフィーという疾患名は、筋強直という特徴的な症状と進行性の筋力低下が見られることに由来する。その他のDMの症状としては、心伝導障害や耐糖能障害、白内障、高次脳機能障害、睡眠障害などがある (1-3)。そのため、DMは筋ジストロフィーであるが、筋肉の症状以外に全身にも様々な症状があらわれるのが特徴である。重要なこととして、DM患者では上記に記した全ての症状が必ずしも1人の患者で見られる訳ではなく、個々の患者により症状が異なる。さらにDMは発症年齢や症状の重篤度もかなり異なるという特徴もある。

1.3 DMの分子機構

DMには、DM1とDM2の二つがある。どちらも常染色体優性の形式で遺伝する疾患であるが、異なる遺伝子に変異が生じている (4)。DM1は第19番染色体上の*DMPK*遺伝子の3'側非翻訳領域 (UTR) 内のCTG繰り返し配列 (リピート) の異常伸長 (5-7) が発見された。*DMPK*内のCTGリピート数は非DM1患者では5~37であり、DM1患者ではCTGリピート数が50~2000になっている。DM1患者では、CTGリピート数と症状の重症度に関連があり、症状が軽症のDM1患者や、成人型のDM1患者ではCTGリピート数が50~150となっており、先天型のDM1患者では、CTGリピート数は1000を超える。DM1患者の家系内においては、*DMPK*内のCTGリピート数が世代を経るに連れて多くなる表現促進現象が見られる。

DM1の発症機構について、(i) *DMPK*発現量低下によるハプロ不全、(ii) *DMPK*近傍遺伝子の発現量変化の影響、(iii) 異常伸長したCUGリピートを持つ*DMPK* RNAによる毒性、の3つの説が提唱された。ここで、これまでになされた (i) から (iii) の検証についてまとめる。

(i) DMPKハプロ不全説

DM1患者の筋生検サンプルを使った研究から、DMPKのmRNA量やタンパク質量が低下していた(8)。このため、DM1の発症機構としてハプロ不全説が提唱された。*Dmpk*ノックアウトマウスを用いた研究では、筋肉の症状として、晩期にごく軽微なミオパチーが見られるに留まった(9, 10)。一方で、心伝導障害は観察された(11)。このことから、DMPKタンパク質の不足は心伝導障害などの症状に関わることが示唆されたが、これだけではDM1のあらゆる症状の説明がつかないことが明らかになった。

(ii) DMPK近傍遺伝子の発現量変化の影響

DMPK遺伝子座の上流にDMWD遺伝子、下流にSIX5遺伝子が位置している。各遺伝子の機能はよく似ており、遺伝子座の相対的位置はマウスでも保存されている(図1-1)。DMWD遺伝子の発現量とDMPK内CTGリピート数の関連ははっきりしない。CTGリピート数の増加に伴いDMWD遺伝子の発現量が減少するという報告(12, 13)と変わらないという報告がある(14, 15)。DMPK内のCTGリピート領域は下流のSIX5遺伝子のプロモーター領域に相当する。CTGリピートの増加と共にSIX5遺伝子の発現が抑制されている(16, 17)。Six5ノックアウトマウスを用いた研究では、白内障の症状が見られた(18, 19)。また、心伝導障害(20)も観察された。しかしながら、筋肉に関しては特筆すべき異常はなかった(21)。従って、DMPK近傍遺伝子の発現量の変化はDM1の症状の主要な原因ではないと考えられている。

(iii) 異常伸長したCUGリピートRNAの持つ毒性

DM2の原因遺伝子は2001年に同定された(22)。DM2では、第3番染色体上のCNBP遺伝子内の最初のイントロン内にCCTG繰り返し配列が異常伸長していることが報告された。DM1とDM2では臨床的にも似た症状が見られる一方で、DMPK遺伝子とCNBP遺伝子の機能に類似性は無い。そこで、DM1とDM2の両方で共通している異常伸長したCUG、CCUGリピートRNAの毒性が検証された。そのために、3'UTR内に250のCTGリピートを持つヒト骨格筋アクチン遺伝子を導入した遺伝子改変マウスであるHSA^{LR}(Human Skeletal Actin Long Repeat)マウスが作製された(23)。HSA^{LR}マウスでは、筋強直やDM1に似たミオパチーが観察され、DM1の主要な症状を再現するのに、伸長したCUG RNAが必要であることが分かった。

以上のことから、現在は異常伸長したCUGまたCCUGリピート配列を有するRNAの機能獲得を介したDMの発症機構が強く支持されている（図1-2）。

伸長したCUGリピートRNAはそのGC結合を介して、核内でヘアピン構造を取る（24）。この伸長したCUGリピートRNAに結合するRNA結合タンパク質として、MBNLファミリー（25）が同定された。MBNLファミリーはMBNL1、MBNL2、MBNL3の3種類のタンパク質から構成されている。MBNLは異常伸長したCUGリピートRNAと核内で共局在をしている（25, 26）。そこで、異常伸長したCUGリピートRNAが核内でMBNLを捕捉してその機能を阻害していることが予想された。Mbnl1欠損マウスを用いた研究では、筋強直や白内障やDMに似た筋症状を再現した。さらに、前述したDM1モデルマウス*HSA^{LR}*マウスにAAVベクターを用いてMbnl1を過剰発現させたところ、筋強直に改善が見られた（27）。このことから、CUGリピートRNAによるMBNLの機能阻害がDMの一部の症状の再現に必要なと考えられるようになった。

また、異常伸長したCUGリピートRNAはRNA結合タンパク質CELF1の活性化を引き起こすことも知られている。現在までに、DM1患者の筋肉や心臓（28）、またDM2患者由来の培養筋細胞からCELF1の活性化が報告されている（29）。しかしながら、DMでCELF1の活性化が生じる詳細なメカニズムについてはまだ分かっていない。

1.4 DMにおけるmRNA転写後調節異常

MBNLファミリーはスプライシングパターンを胎児型から成人型へと変化させるのに働くのに対し（30）、CELF1は積極的にスプライシングパターンを胎児型へと促進する（31）。発生に伴い、核内のCELF1量は減少し（32）、MBNL1量は増えることも知られている（33）。DMでは異常伸長したCUG/CCUGリピートRNAにより、MBNLファミリーの機能阻害とCELF1の活性化が生じる。このためか、DMでは胎児型の選択的スプライシング産物が多く見られる（33-36）。

次世代シーケンサーを用いた解析により、MBNLファミリーとCELF1は共にRNAの3'UTRに多く結合していることが明らかになった（37-40）。現在、MBNLファミリーとCELF1による選択的スプライシング以外の転写後調節機構に注目が集まっている。

CELF1は選択的スプライシング以外にも、mRNAの翻訳や安定性などの転写後調節機構にも寄与することが知られている（41-43）。特にCELF1は筋細胞において、mRNAの3'UTRに結合すると、mRNAの半減期を減少させることが報告されている（43）。MBNL1もmRNAの3'UTRに結合して、mRNAの局在やmRNAの遺伝子発現を変化させることが報告されている（38, 39）。しかしながら、MBNLファミリーもCELF1も3'側非翻訳領域を介したmRNAの制御について、その詳細なメカニズムについては解明されていない。

1.6 本研究の概要

本研究では、DMでのRNA結合タンパク質の挙動の変化による分子病態に着目した。第一章ではDMで筋強直の原因となる*Clen1*遺伝子の異常スプライシングを改善する低分子化合物の探索と*Clen1*遺伝子の新しいスプライシング調節機構について研究を行った(44)。第二章では3'UTRを介したMBNLファミリーの機能について研究を行った。

第19番染色体

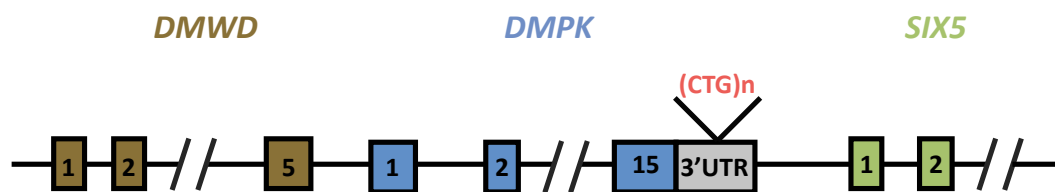


図1-1 DM1遺伝子座

*DMPK*遺伝子上流に*DMWD*遺伝子があり下流に*SIX5*遺伝子がある。*SIX5*遺伝子のプロモーター領域に*DMPK* 3'UTR内のCTGリピートが含まれる。DM1遺伝子座はヒトとマウスで強く保存されている。

2. 第一章

2.1 序論

2.1.1 はじめに

DMでは多くの遺伝子で選択的スプライシングの異常な制御が生じているため、DMはスプライシング異常症とも呼ばれる。本章では、DMにおける異常スプライシング制御の改善を目的とした低分子化合物の探索、そしてDMにおけるスプライシング制御機構の新たな解明を目的とした。

2.1.2 DMにおける選択的スプライシング異常

近年のマイクロアレイを用いた研究では、DMでは200を超える遺伝子で異常スプライシングが生じていることが報告されている (45, 46)。これは、DMにおいてMBNLファミリーとCELF1の挙動に異常が生じているためと考えられている。これまでに、いくつかの遺伝子の選択的スプライシング異常はDMの症状との関連が報告されている。

マウスを用いた研究により、筋強直はクロライドチャンネル遺伝子*Clcn1*の異常スプライシングにより生じることが分かった (47, 48)。DMでは、*Clcn1*の胎児型スプライシングが優位となり、中途停止コドンを生じるエクソンが挿入される (図2-1)。このため、*Clcn1*転写産物はnonsense-mediated mRNA decay (NMD)により分解されるか、あるいは機能を持たない短い*Clcn1*タンパク質が産生する。その結果として、*Clcn1*タンパク質の発現量低下が生じ、筋強直が生じると考えられている。DMモデルマウス*HSA^{LR}*で、*Clcn1*遺伝子のスプライシング異常の改善によって筋強直症状の回復が見られた (49)。DMでは耐糖能異常を呈する患者がいる。DM患者の筋生検よりインスリン受容体遺伝子*IR*の異常スプライシングが見つかり、これによりインスリン応答性の低い受容体が発現することが原因ではないかと考えられている (50)。また、DMにおける心伝導障害は、心筋トロポニンT遺伝子*cTNT*が異常な選択的スプライシングを受けて、本来成人では発現しない胎児型のスプライシング産物が生じることと関係があると考えられている (51)。さらに近年の研究で、筋肉のT管形成に*BINI*遺伝子の選択的スプライシング異常が関係していることも示された (52)。

また、いくつかの遺伝子の選択的スプライシング異常はDMの症状の重篤さと関わりがあることが分かった (45)。症状の重篤さや治療の効果を測定するバイオマーカーとしてスプライシング異常を測定する試みもなされている。

2.1.3 筋強直

筋強直はDMで見られる特徴的な症状の1つである。筋強直とは、筋肉が収縮した後、急に円滑な弛緩が行われない病態を示す。例えばDM患者では、強く握手を交わした後すぐに手を離せないことや、しばらく座っていた後にすぐに立ち上がれないといった日常生活での支障がある。

DMで認められる筋強直は、骨格筋クロライドチャンネルタンパク質Clcn1の発現量低下が原因とされている。クロライドチャンネルは興奮して収縮した筋細胞で働き、Cl⁻イオンを細胞内に流入させることで筋肉の興奮を抑制している。DMでは、骨格筋でクロライドチャンネルの発現量が低下しているため、筋肉の興奮状態が続き、収縮したままになることが筋強直の原因と考えられている。DMでクロライドチャンネルの発現量が低下することは前述したように、クロライドチャンネル遺伝子*Clcn1*が異常な選択的スプライシング制御を受けるためである。なお、新生マウスにおいてはエクソン7Aを持つ*Clcn1*スプライシングパターンが多く見られる。エクソン7Aを含む産物はNMDの標的となり分解されると考えられる。新生マウスにおいて、エクソン7Aを含むスプライシング産物が多く見られるのは、選択的スプライシングを利用して発生段階でClcn1の量を調節しているためと考えられている (53)。

選択的スプライシングによって中途終止コドンが生じ、NMDの標的となるスプライシング産物は1000を超える遺伝子で見つかっている (54)。いくつかの遺伝子では、実際に選択的スプライシングによってNMDの標的となるスプライシング産物を産生し、タンパク質量を調節することが報告されている (55, 56)。

2.1.4 DMの治療研究

現在までにDMの治療法は確立していないが、これまでに数多くの研究者によってDMの治療を目的とした試みは多くなされてきた。ここでは、(i) 異常CUGリピートRNAの破壊、(ii) アンチセンスオリゴヌクレオチド (ASO) によるスプライシングの改善、(iii) 低分子化合物によるスプライシングの改善の3つのアプローチについて紹介する。

(i) 異常CUGリピートRNAの分解

DMでは、異常CUGリピートRNAが病気の原因となるので、この発現を抑制することはDMの根本的な治療となる。現在までにGapmer と呼ばれる、DNAと2'-O-methoxyethyl RNA (MOE) からなるASOをDMPKに結合させ、そこにRNA分解酵素であるRNase Hを呼び込むことで異常CUGリピートRNAを含むDMPKを分解する方法が試された。モデルマウスを用いた研究では、異常スプライシングや筋強直症状の回復が見られた (57)。しかしながら、この方法では異常CUGリピートRNAと共にDMPKの発現量も抑制してしまう。*Dmpk*ノックアウトマウスを用いた研究では、顕著な表現型は観察されなかったものの (9, 10)、DMPKの発現を抑えてしまうこの手法には慎重な見方もある。

(ii) ASOによるスプライシングの改善

*Clcn1*遺伝子の異常スプライシングは筋強直の原因であるため、ASOによるスプライシング正常化がなされ、筋強直の改善が見られた(48, 58)。しかしながら、DMでは多くの遺伝子で選択的スプライシング異常が見られるため、単一の遺伝子でのスプライシング改善では根本的な治療に結びつかない。そこで、ASOを異常CUGリピートRNAに結合させることで、MBNLファミリーをCUGリピートから解放させるアプローチが取られた(59)。(CAG)₂₅のASOを投与した結果、異常スプライシングや筋強直の改善が見られた(59)。ASOは一般的に個体への導入率が高くないが、バブルリポソーム法を用いることで、個体への導入効率を上げる試みもなされている(58)。

(iii) 低分子化合物によるスプライシングの改善

臨床応用の際のコストの問題を考えると、ASOより低分子化合物に利がある。DMにおける異常スプライシングの改善に効果のある低分子化合物も発見されてきた。その多くの作用機序は、MBNLファミリーよりもCUGリピートRNAに結合するものである(60-62)。中でも最も効果のあった化合物はpentamidineという化合物で、これはHIV患者で見られるカリニ肺炎の治療薬として用いられているものであった。pentamidineによってDMモデル細胞でスプライシングの改善効果が見られ、DMモデルマウスでもスプライシングの改善が見られた。しかしながら、pentamidineは個体への毒性が強く、臨床応用は難しいと考えられている(61)。

2.1.5 第一章の目的

DMでは、未だに選択的スプライシングを改善する決定的な低分子化合物は見つかっていない。そこで、本章ではまずランダムに筋強直の原因となる*Clcn1*の異常スプライシングを改善する低分子化合物の探索を行った。

2.2 材料と方法

2.2.1 プラスミド

マウスのエクソン6からエクソン7までのゲノム配列を発現ベクターpEGFP-C1 (Invitrogen) に組み込んだ*Clcn1*ミニジーンは当研究室の紀によって構築された (63)。本研究で用いたミニジーンは、紀のベクターを改変して成人型スプライシングパターンが起きるとルシフェラーゼが翻訳されるように作製した。ルシフェラーゼ遺伝子は紀の作製したミニジーンの*Clcn1*エクソン7の直後の*Sal* Iと*Bam*H Iサイトを利用して挿入した。挿入するルシフェラーゼ遺伝子のDNA断片はルシフェラーゼ遺伝子を発現するベクターpGL3-P (Promega) からPCRにより増幅した。PCRの際には、PfuUltra High-Fidelity DNA Polymerase (Stratagene) を用い、アガロースゲルにより目的のDNA断片を分離後、GenElute Agrose Spin Columns (SIGMA) によりゲルからのDNA断片の抽出を行った。その後、DNA Ligation Kit (TaKaRa) を用いてライゲーションを行い、XL-10 Goldコンピテントセルを用いて形質転換した。培養した大腸菌から抽出したプラスミドDNAの配列は、CEQ DTCS-Quick Start Kit (Beckman Coulter) を用いてDNAシーケンサーのCEQTM8000 Genetic Analysis System (Beckman Coulter) で確認した。

また、CUG18リピート、CUG480リピートを発現するDM18、DM480は当研究室の紀によって構築されたものである (63)。これらはCUGリピートを発現するベクターとして用いた。

ルシフェラーゼアッセイの際に、トランスフェクションによる遺伝子導入効率を補正するために、ウミシイタケルシフェラーゼ遺伝子を持つpRL-TK (Promega) を用いた。

2.2.2 細胞培養と遺伝子導入

細胞培養は37°C、5%CO₂環境に設定したインキュベーター内で行った。

C2C12細胞とヒト骨格筋細胞は20%の仔ウシ血清 (Life Technologies) を含むDMEM培地 (Sigma-Aldrich) で培養した。継代の際には培地を除き、PBSで細胞を洗浄し、トリプシン (Sigma-Aldrich) を用いて細胞を剥がした。37°Cに温めたDMEMを加えて、遠心分離により細胞を回収し、適宜希釈して新しい培地へ蒔き直した。尚、ヒト骨格筋細胞を培養する際にはコラーゲンでコートされた培養皿 (IWAKI) を用いた。

C2C12細胞に対して遺伝子導入を行う際には、トランスフェクション試薬のLipofectamine 2000 (Life Technologies) と無血清培地のOpti-MEM (Life Technologies) を用いた。ミニジーンとCUGリピートを発現させるときには、1mLの培地に対してミニジーンとCUG発現ベクターが共に1.0µgとなるように使用した。さらに、そこにトランスフェクション効率標準化用のpRL-TKを50ng使用した。siRNAを発現させるときには、上記の条件に追加して、100pmolのsiRNAを使用した。siRNAはSigma-Aldrich社から購入した。用いた

siRNAの配列は表2-1に記載した。コントロールsiRNAとして、MISSION siRNA Universal Negative Control (Sigma-Aldrich) を用いた。

ヒト骨格筋細胞は、Cambrex社から購入したのヒト骨格筋細胞と国立精神・神経医療研究センターで採取された筋細胞を用いた。

ヒト骨格筋細胞を筋芽細胞から筋管細胞に分化させるときは、培養細胞が80~100%コンフルエントの状態、20%の仔ウシ血清を含むDMEM培地から5%ウマ血清を含むDMEM培地へと交換し、10日間培養して筋分化を促した。

また、アデノウイルスを用いて*MyoD*遺伝子を導入してから筋分化を誘導する実験も行った。この際は、pAxCawtit2 (NIPPON GENE) に全長の*MyoD*遺伝子を組み込んで、作製したアデノウイルスを用いた。アデノウイルスは生物タイターが 10^9 PFU/mLに調製したものを用いた。培養細胞が80~100%コンフルエントの状態、培地にウイルス液を20倍希釈したものを加えて、37°Cで1時間インキュベートし、アデノウイルスを感染させた。感染1時間後に培地を適量加えて培養した。アデノウイルスを感染させて24時間後に、5%ウマ血清を含むDMEM培地へ変えて、10日間培養し筋分化を促した。

2.2.3 スクリーニングとルシフェラーゼアッセイ

C2C12細胞にトランスフェクションして24時間後に、低分子化合物を培地の0.1%量加えた。用いた低分子化合物ライブラリーは、ICCB Known Bioactives (Enzo Life Science) の約400種類のものを使用した。ICCB Known Bioactivesは国立精神・神経医療研究センターの武田伸一先生よりご供与頂いた。低分子化合物を加えて24時間後に、ルシフェラーゼアッセイを行った。ルシフェラーゼアッセイは、Dual-Glo Luciferase Assay System (Promega) 試薬を用いてルミノメーターCentro LB 960 (Berthold) を用いてルシフェラーゼ発光を測定した。ルシフェラーゼ活性値は、ミニジーンによるホタルルシフェラーゼ発光を遺伝子導入効率標準化のためのpRL-TKによるレニラルシフェラーゼ発光で標準化した値を採用した。

2.2.4 マウスへの筋肉内投与

DM1のモデルマウスである*HSA^{LR}*マウスはロチェスター大学のCharles A. Thornton先生の研究室で開発され、大阪大学の高橋正紀先生の協力により、当研究室にご供与頂いた。対照のマウスとしては、FVBn/Jcl (日本クレア) を用いた。manumycin Aは6週齢の*HSA^{LR}*マウスに筋肉内投与した。投与の際には、30ゲージ注射針のマイショット (ニプロ) を用いた。マウスにネンブタールを腹腔内投与し麻酔し、前脛骨筋を覆う体毛を市販の除毛クリームにより除いた。そして、manumycin Aをマウス前脛骨筋に投与した。1個体に対して、各脚の前脛骨筋にmanumycin Aとvehicle controlを投与した。投与するmanumycin Aは0.1%のDMSOを含む生理食塩水に75ng/ μ Lになるように調製し、40 μ Lを投与した。逆脚の前脛骨

筋には、対照として0.1%のDMSOを含む生理食塩水をvehicle controlとして40 μ L投与した。投与して5日後に、前脛骨筋を回収した。

なお、マウスを扱う実験に際しては「東京大学動物実験実施マニュアル」を遵守し、適切に行った。

2.2.5 RT-PCR

C2C12細胞、マウスの前脛骨筋からは、GenElute Mammalian Total RNA Miniprep Kit (Sigma-Aldrich) を用いてRNAを抽出した。ミニジーンのスプライシングを解析する際には、トランスフェクション後48時間後にRNAを抽出した。total RNA 500ng以下を鋳型として、PrimeScript 1st Strand cDNA Synthesis Kit (TaKaRa) により逆転写反応を行った。合成されたcDNAを10倍希釈したcDNA溶液をEx-Taq (TaKaRa) を用いてPCRを行った。

ヒト骨格筋からは、Trizol (Life Technologies) とPureLink RNA Mini Kitを (Ambion) を用いてRNAを抽出した。total RNA500ng以下を鋳型として、SuperScript III Reverse Transcriptase (Life Technologies) により逆転写反応を行った。合成されたcDNAを10倍希釈したcDNA溶液をAmpliTaq Gold (Applied Biosystems) を用いてPCRを行った。

PCR産物は5%或は8%ポリアクリルアミドゲルを用いて分離し、エチジウムブロマイド溶液に20分間入れてから、LAS-3000 (FUJIFILM) により紫外線を照射して撮影し、画像データを取得した。画像データは、画像解析ソフトMulti Gauge (FUJIFILM) を用いてバンドの輝度を定量した。

PCRに用いたプライマーは表2-2にまとめた。

2.2.6 ウェスタンブロッティング

培養細胞からは、PBSを用いて細胞を回収し、氷上でSonicationバッファー (1% TrironX-100、0.1% PIM) で懸濁した。超音波処理で細胞を破碎した後に、16,000gで30分間遠心して、上清を回収した。DC protein Assay (BioRad) によりタンパク質を定量し、sonication バッファーを用いて、サンプル間のタンパク質濃度を揃えた。2x sampleバッファー (0.1M Tris-HCl [pH6.8]、4% SDS、20% グリセロール、0.2% BPB、8.3% 2-メルカプトエタノール) を加えて、100°Cで5分間加熱した。タンパク質は25 μ gを用いて、10%のアクリルアミドゲルを用いたSDS-PAGEによって分離した。分離後にタンパク質をPVDF膜に転写し、そのメンブレンを5%スキムミルク溶液 (ブロッキング溶液) でブロッキングした。一次抗体を室温で一時間或は一晩反応させ、メンブレンをTBST溶液でよく洗った後に、二次抗体を室温で一時間反応させた。バンドの検出にはECL Prime (GE Health Care) を用いた。

一次抗体として、1:500に希釈したマウス抗MBNL1抗体 (3A4-1E9、Sigma-Aldrich) 、1:500に希釈したマウス抗CELF1抗体 (3B1、MBL) 、1:500に希釈したウサギ抗actin抗体 (A2066、Sigma-Aldrich) 、1:200に希釈したマウス抗H-Ras抗体 (C-20、Santa Cruz) を用

いた。一次抗体の希釈はブロッキング溶液で行った。二次抗体としては、HRP標識された抗マウスIgG抗体またはHRP標識された抗ウサギIgG抗体をTBST溶液で1:10000に希釈したものをを用いた。

2.2.7 免疫染色

コラーゲンが塗布された35mmの細胞培養皿上で培養した細胞を免疫染色した。培地を除き、PBSでよく洗浄した後、固定液（4% PFA、0.1M NaPi [pH7.4]）を加えて室温で15分間放置して細胞を固定した。PBSで洗浄した後、0.25%のTrironX-100を含むPBS溶液を加えて氷上で20分間放置して、膜透過処理を行った。PBSで洗浄して、2%カゼインを含むPBS溶液（ブロッキング液）を加えて室温で1時間ブロッキングし、その後ブロッキング液で1:200に希釈した抗デスミン抗体（ab15200、Abcam）を加えて、1時間反応させた。PBSで洗浄した後、ブロッキング液で1:600に希釈したAlexa-488標識された抗ウサギIgG抗体と1:1000に希釈したDAPIを加えて、30分間暗所で反応させた。その後、PBSでよく洗って、蛍光顕微鏡（BZ-9000、KEYENCE）を用いて観察し、BZ-II Analyzer 1.03（KEYENCE）を用いて画像を取得した。

2.3 結果

2.3.1 *Clcn1*スプライシング機構を利用したスクリーニング

DMにおける異常*Clcn1*スプライシングを改善する低分子化合物を探索するために、成人型*Clcn1*スプライシングが生じた際にだけルシフェラーゼ遺伝子が発現するミニジーンを複製した(図2-2 A)。このミニジーンでは、胎児型*Clcn1*スプライシングが生じてエクソン7Aが挿入されると、ルシフェラーゼ遺伝子の直前に中途終止コドンを含み、ルシフェラーゼ遺伝子が発現しない(図2-2 B)。ルシフェラーゼの活性で*Clcn1*スプライシングパターンを評価できることで、大量の化合物を一度に試験することが可能となる。

実際に、ミニジーンのスプライシングパターンとルシフェラーゼ活性が同じ挙動を示すのかを検証した。C2C12細胞にミニジーンと共にDM18或はDM480を発現させた。DM18はCUG18リピートを、DM480はCUG480リピートを発現する。ミニジーンとDM480を共発現させた際には、エクソン7Aを含む胎児型スプライシングパターンが増加した(図2-2 C, D)。一方で、この際のルシフェラーゼ活性は減少した(図2-2 E)。ミニジーンの胎児型スプライシングパターンが増えると、ルシフェラーゼ活性が減少することを確認した。

スクリーニングに際しては、C2C12細胞にミニジーンとDM480を共発現させて行った。用いた低分子化合物は約400種類で、その中でも高いルシフェラーゼ活性を示したものは10個見つかった(図2-3)。この中には、プロテアソーム阻害剤MG-132、PKC阻害剤Ro 31-8220などがあった。また、DNAトポイソメラーゼ阻害剤であるcamptothecinや10-hydroxycamptothecinは低いルシフェラーゼ活性を示した。

2.3.2 manumycin Aによる*Clcn1*スプライシングの改善

ミニジーンのルシフェラーゼ活性を利用したスクリーニングで見つかった10個の低分子化合物の内、C2C12細胞に用いた際に細胞毒性の少なかったmanumycin Aに着目した。C2C12細胞にmanumycin Aを加えた際に(20 μ M)、ミニジーンのルシフェラーゼ活性は上昇した(図2-4 A)。この際のミニジーンのスプライシングパターンを見るとエクソン7Aの挿入率が減少していた(図2-4 C, D)。さらに、C2C12細胞にmanumycin Aを添加する濃度を変化させて(10 μ M、20 μ M、40 μ M)ミニジーンのスプライシングを解析した。その結果、manumycin Aのミニジーンに対する濃度依存的なスプライシング改善効果が確認された(図2-5)。

ミニジーンは遺伝子の一部の領域を用いているため、必ずしもミニジーンで生じるスプライシングが内在性の遺伝子で生じるスプライシングを再現するとは限らない。そこで、manumycin Aの内在性の*Clcn1*スプライシングに対する効果を調べるために、DMモデルマウスを用いてmanumycin Aの効果を調べた。DMモデルマウスHSA^{LR}マウスでは、250のCTGリピートが骨格筋で発現している。前脛骨筋における*Clcn1*のスプライシングパターンを調

べると、WT型マウスに比べてエクソン7Aを含む胎児型スプライシングパターンが増加している（図2-6 A, B）。*HSA^{LR}*マウスの全脛骨筋にmanumycin Aを筋肉内投与した後に、*Clcn1*のスプライシングパターンを調べるとエクソン7Aを含む胎児型スプライシングパターンが減少していた（図2-6 C, D）。さらに、manumycin Aにより*Clcn1*以外の異常スプライシングが変化が生じたかどうか検討するため、他の遺伝子の異常スプライシングについて解析した。*Serca1*、m-Titinのスプライシングに対しては、変化は無かった（図2-7）。DMでは、MBNLファミリーの機能低下とCELF1の活性化が生じることが報告されている。また、*Clcn1*、*Serca1*、m-Titinの選択的スプライシングはMBNL1により制御され（33）、さらに*Serca1*の選択的スプライシングはCELF1によって制御されることも知られている（64）。そこで、C2C12細胞を用いて、manumycin AがMBNL1とCELF1の発現量を調べたところ、どちらのタンパク質発現量にも変化は認められなかった（図2-8）。

2.3.3 Rasノックダウンによる*Clcn1*スプライシングへの効果

manumycin Aを*HSA^{LR}*マウスに筋肉内投与した際に、*Clcn1*のスプライシングに改善は見られたが、*Serca1*とm-Titinでは変化が無かった。また、manumycin AをC2C12細胞に添加した際に、MBNL1とCELF1の発現量に変化が無かった。この2つの結果から、manumycin Aは従来のDMで提唱されているMBNLファミリーやCELF1による選択的スプライシング制御以外の制御機構に作用して*Clcn1*のスプライシングを改善すると考えられた。

manumycin AはRasのファルネシル化を阻害する作用を持つことが知られている（65）。そこで、C2C12細胞でRas遺伝子の発現をsiRNAにより抑制した際のミニジーンのスプライシングを解析した。RNAiによりH-Ras、K-Ras、N-Rasの3つの主要なRas遺伝子の発現を抑制した。H-RasとN-Rasの発現を抑制した際に、ミニジーンでエクソン7Aを含む胎児型スプライシングの割合が減少した（図2-9）。中でも、H-Rasの発現を抑制したときに最も胎児型スプライシングの割合が減少した。本実験で用いたH-RasのsiRNAにより、H-Rasのタンパク質の発現量は確かに減少していた（図2-10 A）。この際のミニジーンのスプライシングはエクソン7Aを含む胎児型スプライシングが減少している（図2-10 B, C）。

DMでは、*Clcn1*の胎児型スプライシングが増加する。また、H-Rasの発現抑制が*Clcn1*の胎児型スプライシングを減少させる。この2つの事実から、DMではH-Rasの発現量の増加が起きているのか検証した。C2C12細胞にDM480を発現させた場合では、DM18を発現させたときに比べてH-Rasのタンパク質発現量の増加は見られなかった（図2-10 D, E）。

2.3.4 ヒト*CLCN1*へのmanumycin Aの効果の検証

ヒト*CLCN1*は複雑なスプライシングパターンを生じる（図2-11 A）。実際にDM患者の筋生検よりヒト*CLCN1*のスプライシングを検出すると、マウス*Clcn1*に比べて多様なスプライシングパターンが観察された（図2-11 B）。DM患者では成人型の*CLCN1_N*のスプライシン

グパターンが減少し、CLCN1_Nよりも多くのエクソンが挿入されるCLCN1_{Δ6}やCLCN1_{6b7a}のスプライシングパターンが増加する。最後に、manumycin AがヒトCLCN1に対してスプライシング改善をもたらすか、DM患者細胞を用いて検証した。

CLCN1は成熟した筋細胞で発現する。DM患者筋芽細胞を分化培地に交換して、筋管細胞へと分化させたところ、ほとんど筋管細胞へ分化しなかった(図2-12)。これは、使用したDM患者細胞中の筋芽細胞の割合が少ないためと考えられた。そこで、ウイルスを用いてDM患者細胞にMyoD遺伝子を導入した後に、分化培地へ交換して筋管細胞への分化を誘導した(図2-13 A, B)。MyoD遺伝子は筋分化を制御するマスター遺伝子で、筋細胞でのみ発現が認められる。MyoDの強制発現により、線維芽細胞や脂肪芽細胞、骨芽細胞などが筋芽細胞へと転換する。MyoDの強制発現させ分化誘導を行った細胞からCLCN1スプライシングを解析したところ、DM患者細胞では対照として用いた細胞に比べて成人型のCLCN1_N以外のスプライシングパターンが多く見られた(図2-13 C)。この条件でmanumycin AをDM患者細胞へと添加した。C2C12細胞と同様にmanumycin Aを20μMの濃度でDM患者細胞に加えたところ、細胞は死滅した。そこでDM患者細胞に対して、manumycin Aを1μM、5μM、10μMの濃度で添加した。しかしながら、各処理を施した細胞からRNAを回収し、逆転写によって得られた同一のcDNAから、3回PCRを行い電気泳動により解析したところ、各回で電気泳動のバンドパターンが異なり、RT-PCRの結果が安定しなかった(図2-14 A, B)。

2.4 考察

2.4.1 ルシフェラーゼアッセイによるスプライシング評価系

RNA-seqを用いてRNAを網羅的に解析した近年の研究によると、ヒト遺伝子の90%は選択的スプライシングを受けることが報告された(66)。選択的スプライシングについては、組織や発生段階に応じた制御やストレスなどの生理応答による制御などが報告されている(67)。それ故に、特定の遺伝子の選択的スプライシングの異常な制御は疾患を生じる原因となる。そこで、選択的スプライシングを制御するタンパク質や低分子化合物を明らかにすることは、疾患の発症機構の解明や治療に寄与するため重要な課題となる。

選択的スプライシングを調べるのはRT-PCRによる解析が一般的だが、スクリーニングのような大量のサンプルの処理には適さない。そこで、選択的スプライシングをレポーター遺伝子を用いて解析する方法が考えられる。

レポーター遺伝子を用いたスプライシングパターンの利用はこれまでも例があり、例えば線虫においては、2種類のスプライシングパターンによって別の蛍光タンパク質を発現する個体も作製された(68)。

本研究では、ルシフェラーゼアッセイを用いて選択的スプライシングパターンを評価する系を作製した。DMにおいて筋強直の原因となる胎児型*Clcn1*スプライシングパターンが増えるとルシフェラーゼ活性が減少するように働いた。これは、胎児型スプライシングパターンでは中途終止コドンが生じるのを利用したものである。しかし、異常な選択的スプライシングの中にはスプライシングパターンが変化しても中途終止コドンが生じないものがある。この場合はミニジーンなどのあるエクソンの最後に中途終止コドンを作製しておく方法がある(69)。

レポーター遺伝子を用いたスプライシング評価系によって、これから選択的スプライシングを制御する重要な物質が発見されることが期待される。

2.4.2 manumycin Aの*Clcn1*スプライシングへの作用機序

本研究により、抗がん剤であるmanumycin Aが*Clcn1*の異常スプライシングを改善することが分かった。DMでは選択的スプライシングを制御するRNA結合タンパク質であるMBNLファミリーの機能が低下しCELFIの活性が強まる。そのため、多くの遺伝子の選択的スプライシングが異常な制御を受けると考えられる。*Clcn1*のスプライシングもMBNLファミリーやCELFIにより制御されることが知られている。そこで、manumycin AがMBNL1やCELFIの発現に対する影響を調べたところ、どちらのタンパク質の発現量にも変化は見られなかった。さらに、manumycin Aを筋肉内投与した前脛骨筋から*Clcn1*、*Sercaf*、m-Titinのスプライシングを解析したところ、*Clcn1*以外のスプライシングの改善は観察されなかつ

た。従って、manumycin AはDMで生じる異常なスプライシング全般に対して効果を示すのではなく、*Clcn1*のスプライシングに対してのみ効果を示すことが示唆された。

manumycin AはRasのファルネシル化を阻害することが知られている。そこで、RasファミリーのH-Ras、K-Ras、N-Rasの3つをsiRNAにより発現を抑制したところ、H-RasとN-Rasの発現を抑制した際に*Clcn1*の胎児型スプライシングパターンが減少した。また、N-Rasに比べてH-Rasの方が発現を抑制したときの方はスプライシングに与える効果が大きかった。

H-Ras、K-Ras、N-Rasは低分子G-タンパク質で、翻訳後終修飾としてファルネシル化またはゲラニルゲラニル化を受けることで、細胞膜への局在が可能となり、細胞外からの刺激に応答して下流のRasシグナルを活性化する。H-Rasはファルネシル化されるのに対して、N-RasとK-Rasはファルネシル化またはゲラニルゲラニル化される。そのため、ファルネシル化特異的阻害剤のmanumycin Aによって、H-Rasの低分子G-タンパク質としての機能が最も阻害されると考えられる。siRNAの実験でもH-Rasの発現抑制で最も*Clcn1*の胎児型スプライシングパターンが減少したことから、manumycin Aがファルネシル化を阻害し、特にH-Rasの機能が低下することで*Clcn1*スプライシングに変化が生じたと考えられる。

Rasは下流の様々なシグナルを調節しており、スプライシングを制御するRNA結合タンパク質のSRタンパク質をリン酸化し、選択的スプライシングを制御するシグナル経路も報告されている(70, 71)。このことから、H-Rasの下流に*Clcn1*スプライシング制御に関わるSRタンパク質が存在している可能性が考えられる。

また、スクリーニングの結果より、DNAトポイソメラーゼ阻害剤であるcamptothecinや10-hydroxycamptothecinが低いルシフェラーゼ活性を示した。DNAトポイソメラーゼ阻害剤は、DNAとI型DNAトポイソメラーゼと三者複合体を形成し、RNAポリメラーゼIIの働きを抑制することが知られている。RNAポリメラーゼIIの機能阻害により、選択的スプライシングに変化が生じ、中途終止コドンを含みNMDの標的となるスプライシング産物の割合が増えることが知られている(72)。そのため、DNAトポイソメラーゼ阻害剤を用いた際にエクソン7Aを含む産物が増えたと考えられる。

2.4.3 マウス*Clcn1*スプライシングとヒト*CLCN1*スプライシング

マウス*Clcn1*はエクソン7Aが脱落する成人型スプライシングパターンとエクソン7Aが挿入される胎児型スプライシングパターンの2つが主に観察される。エクソン7Aはヒトとマウスで保存されており、ヒト*CLCN1*もエクソン7Aを含んだスプライシングパターンが見られる。エクソン7Aを含む*CLCN1*のスプライシング産物はマウス同様に中途終止コドンを含むことになり、*CLCN1*タンパク質が減少し筋強直の原因となると考えられている。エクソン7Aのスプライシング制御機構を解明するために、これまでにマウスの*Clcn1*のスプライシングの研究が多くなされてきた。例えば、モデルマウスを用いてエクソン7Aの脱落を促進するASOの配列が同定されたり、マウス*Clcn1*ミニジーンを用いてMBNL1-3はエクソン7Aの

脱落を促進し、成人型スプライシングの割合を増やすことも発見された (63)。

一方、ヒトの*CLCN1*のスプライシングにはマウスの*Clcn1*のスプライシングと異なり、エクソン7Aを含むスプライシングパターンが複数ある。近年、ヒト*CLCN1*のミニジーンを用いた研究が行われ、MBNL1は成人型スプライシングを促進するがMBNL2とMBNL3は成人型スプライシングを促進しないことが報告された (73)。さらに、DMでヒト*CLCN1*はイントロン2がスプライシングされずに残ってしまう異常スプライシングも報告されている (47)。イントロン2がスプライシングされずに残った産物でも中途終止コドンを生じるため、*CLCN1*タンパク質の発現量の低下につながると考えられる。

このように、マウス*Clcn1*スプライシングとヒト*CLCN1*スプライシングは異なる点も存在する。マウス*Clcn1*スプライシングで成人型スプライシングを促進するmanumycin Aがヒト*CLCN1*スプライシングでも成人型スプライシングを促進するか実験を試みた。ヒト*CLCN1*ミニジーンを用いた研究では、骨格筋では生じないスプライシングパターンが観察されたため、本研究ではDM患者由来の筋細胞を用いてヒト*CLCN1*スプライシングの解析を試みた。培養筋芽細胞の*Clcn1*のmRNA量は成熟した筋組織に比べると0.01%ほどしかない (74)。筋芽細胞から筋管細胞へと分化させることで、*CLCN1*のタンパク質が確認出来た報告を参考に (75)、DM患者由来の筋芽細胞を筋管細胞へと分化させ、*CLCN1*スプライシングの検出を試みた。しかしながら、今回の実験系では再現よく*CLCN1*スプライシング産物を検出することは出来なかった。*CLCN1*の異常スプライシングは筋強直の原因となるので、*CLCN1*スプライシング産物を検出できる系の構築は重要であると考えられる。

2.4.4 manumycin AのDM治療への応用

DMモデルマウスにおいてmanumycin Aは筋強直の原因となる*Clcn1*の異常スプライシングを改善する効果が見られた。残念ながら、*Clcn1*以外の異常スプライシングの改善が見られなかった。そのため、manumycin AはDMの根本的な治療に応用は出来ないが、筋強直の改善薬として応用することが出来ると考えられる。実際にDM治療への可能性を検証するために、DM患者由来の筋細胞を用いて*CLCN1*のスプライシングへの効果の解析を試みたが成功しなかった。筋芽細胞から筋管細胞へと分化させても得られた筋管細胞は少なく回収したRNAの中の*CLCN1*のmRNA量が少ないため、RT-PCRの結果が安定しなかったと考えられる。

ヒト*CLCN1*スプライシングはマウス*Clcn1*スプライシングと比べて複雑なため、ヒト*CLCN1*スプライシングへのmanumycin Aの効果を検析することは重要だと考えられる。本実験で用いたDM患者細胞には筋芽細胞以外の細胞の割合が多いので、アデノウイルスを用いてMyoD遺伝子を導入し強制的に筋芽細胞の割合を増やしたが、それでも筋芽細胞以外の細胞も存在した。結果として得られた筋管細胞が少なかった。そこで、例えばセルソーターを用いて筋芽細胞のみを特異的に分取することで、多くの筋管細胞を得ることができ

るかもしれない。また、近年は筋ジストロフィーの研究分野で患者iPS細胞を作製して研究が盛んに行われている。デュシェンヌ型筋ジストロフィーや三好型筋ジストロフィーでは患者iPS細胞の作製及び効率的な骨格筋細胞の分化に成功している。DM患者由来のiPSより骨格筋を作製することでも、DM患者に対するmanumycin Aの効果が解析できる可能性がある。

表2-1 用いたsiRNAの配列

遺伝子名		siRNA配列 (5'→3')
H-Ras	センス鎖	GUUGCAUCACAGUAAAUUAdTdT
	アンチセンス鎖	UAAUUUACUGUGAUGCAACdTdT
K-Ras	センス鎖	GAAACCUGUCUCUUGGAUAdTdT
	アンチセンス鎖	UAUCCAAGAGACAGGUUUCdTdT
N-Ras	センス鎖	GAGAUACGCCAGUACCGA AdTdT
	アンチセンス鎖	UUCGGUACUGGCGUAUCUCdTdT

表2-2 用いたプライマーの配列

遺伝子名		プライマー配列 (5'→3')
<i>Clcn1</i> (ミニジーン)	Fw	CATGGTCCTGCTGGAGTTCGTG
	Rv	CTCCAAGTGGTGTTCCAAACAGC
<i>Clcn1</i> (内在性)	Fw	GCTGCTGTCCTCAGCAAGTT
	Rv	CTGAATGTGGCTGCAAAGAA
<i>Serca1</i>	Fw	ATCTTCAAGCTCCGGGCCCT
	Rv	CAGCTTTGGCTGAAGATGCA
m-Titin	Fw	GTGTGAGTCGCTCCAGAAACG
	Rv	CCACCACAGGACCATGTTATTTTC
<i>Gapdh</i>	Fw	TGCTGAGTATGTCGTGGAGTCTA
	Rv	AGTGGGAGTTGCTGTTGAAGTCG
<i>H-Ras</i>	Fw	AAAGTGCCTCACTGGTTGCT
	Rv	ACTTCACCCAATTCCACTCG
<i>K-Ras</i>	Fw	ACATTAACCTCCCAGCCGTG
	Rv	TGGCCAAGGATTGAGGACAC
<i>N-Ras</i>	Fw	AGTGTGTACAATGGAGGCGG
	Rv	GACGGCACGCATGGAAATAC
<i>CLCN1</i>	Fw	CATCTCTCCCAGGCTGT
	Rv	GCATCCTTGTTCCACACT

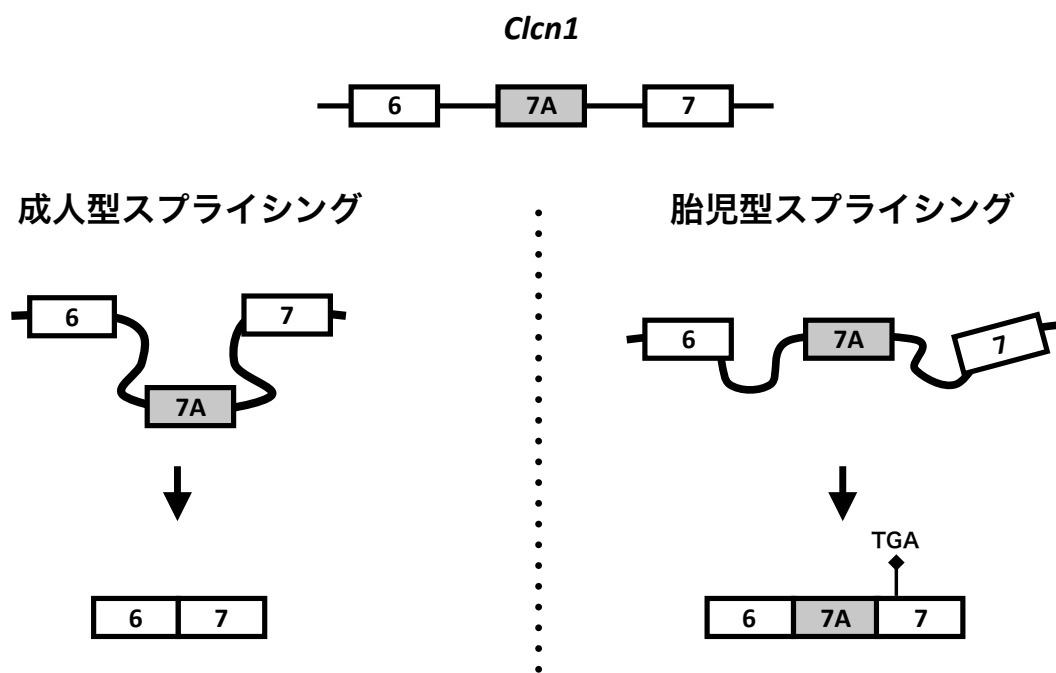


図2-1 *Clcn1*遺伝子のスプライシング

エクソン7Aが脱落したスプライシングパターンが成人型スプライシング（左）でエクソン7Aが挿入されると胎児型スプライシングパターンとなる（右）。胎児型スプライシングパターンが生じ、エクソン7Aが挿入されると、翻訳フレームがずれてエクソン7の前半部に中途終止コドンが出来る。

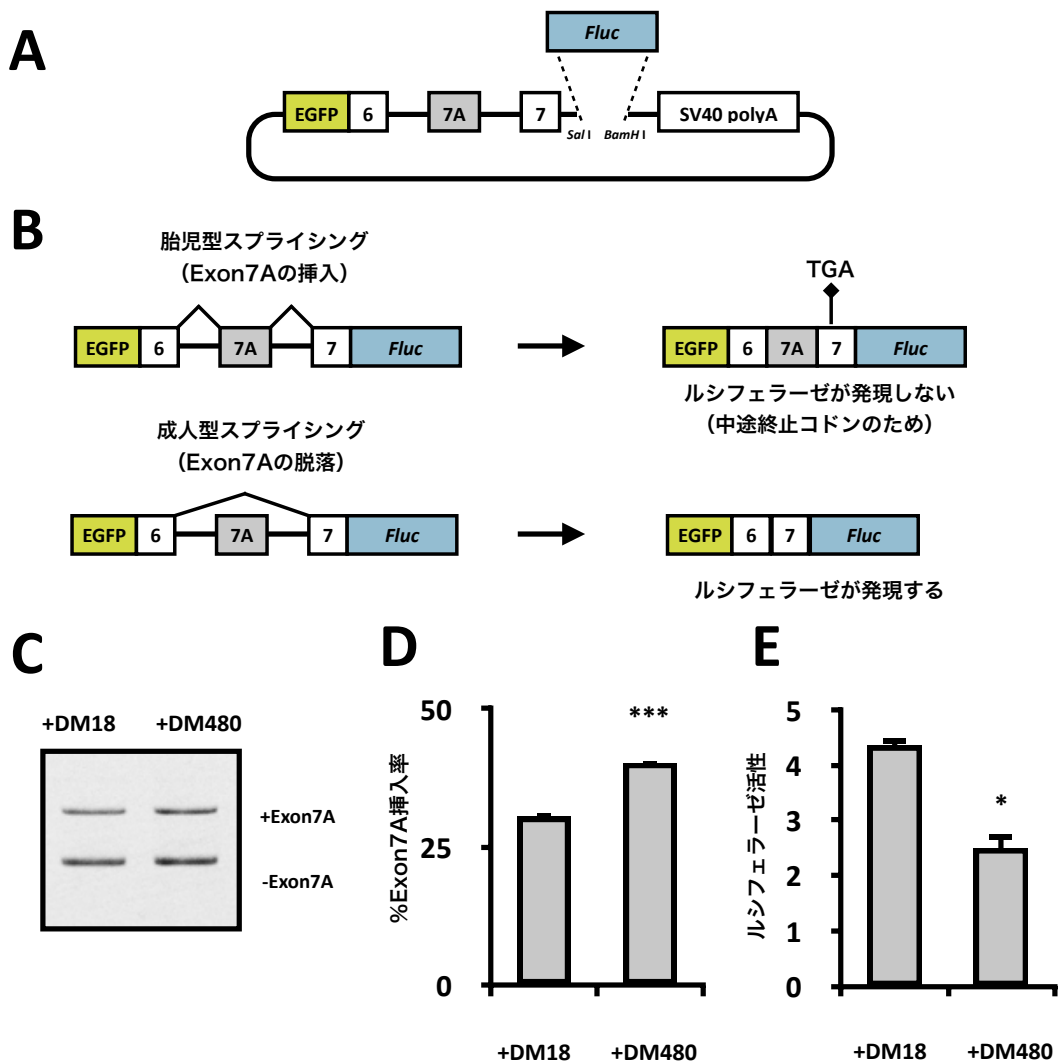


図2-2 *Clcn1*スプライシング機構を利用したスクリーニング系

- (A) 作製したミニジーンの構造。
- (B) ミニジーンのスプライシングパターンとレポーター遺伝子の関係。
- (C) C2C12細胞にDM18或はDM480をミニジーンと共発現させたときのミニジーンのスプライシングをRT-PCRにより検出した。
- (D) (C) のバンド強度を定量したグラフ (Mean + SEM, n=4)。
- (E) C2C12細胞にDM18或はDM480をミニジーンと共発現させたときのルシフェラーゼ活性を定量したグラフ (Mean + SEM, n=3)。
- (D) と (E) ではt-testを用いて有意差を解析した (* $p < 0.05$ 、*** $p < 0.001$)。Oana, K. et al., 2013, Sci. Rep. 3, 2142 (44) の図を改変して使用した。

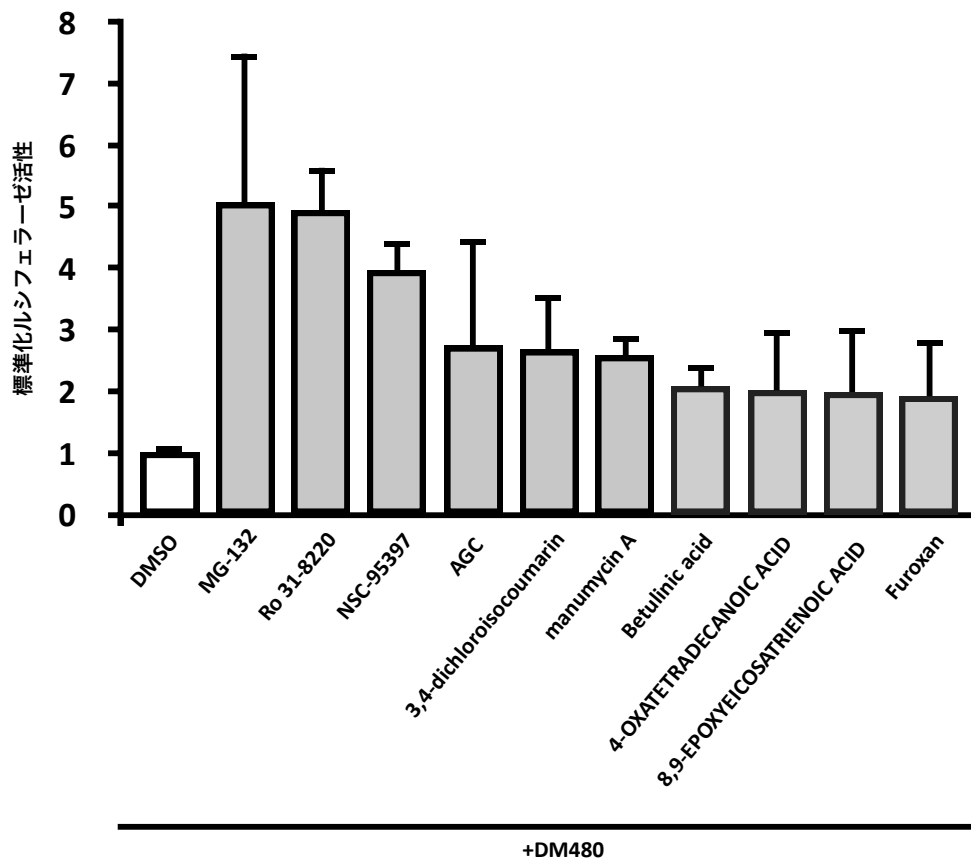


図2-3 低分子化合物スクリーニングまとめ

高いルシフェラーゼ活性を示した低分子化合物の上位10個の結果のグラフ。各グラフの値は、DMSOを加えた際のルシフェラーゼ活性を1としたときの標準化ルシフェラーゼ活性値を表す (Mean + SEM, n=3)。Oana, K. et al., 2013, Sci. Rep. 3, 2142 (44) の図を改変して使用した。

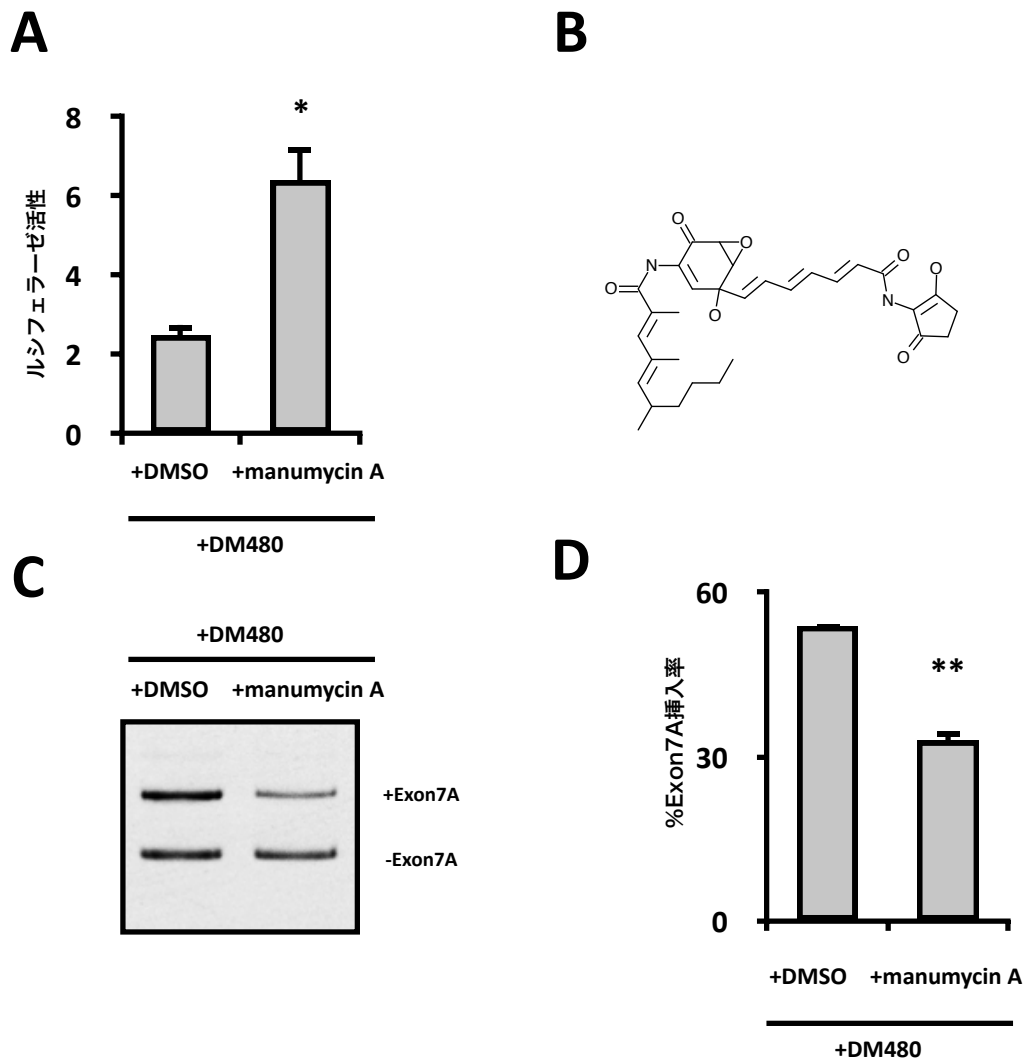


図2-4 C2C12細胞におけるmanumycin Aの効果

(A) manumycin Aを加えた際のルシフェラーゼ活性 (Mean + SEM, n=3)。

(B) manumycin A ($C_{31}H_{38}N_2O_7$) の構造式。

(C) manumycin Aを加えた際のミニジーンのスプライシングをRT-PCRにより検出した結果。

(D) (C) のバンド強度を定量したグラフ (Mean + SEM, n=3)。

(A) と (D) ではt-testを用いて有意差を解析した (* $p < 0.05$ 、** $p < 0.01$)。Oana, K. et al., 2013, Sci. Rep. 3, 2142 (44) の図を改変して使用した。

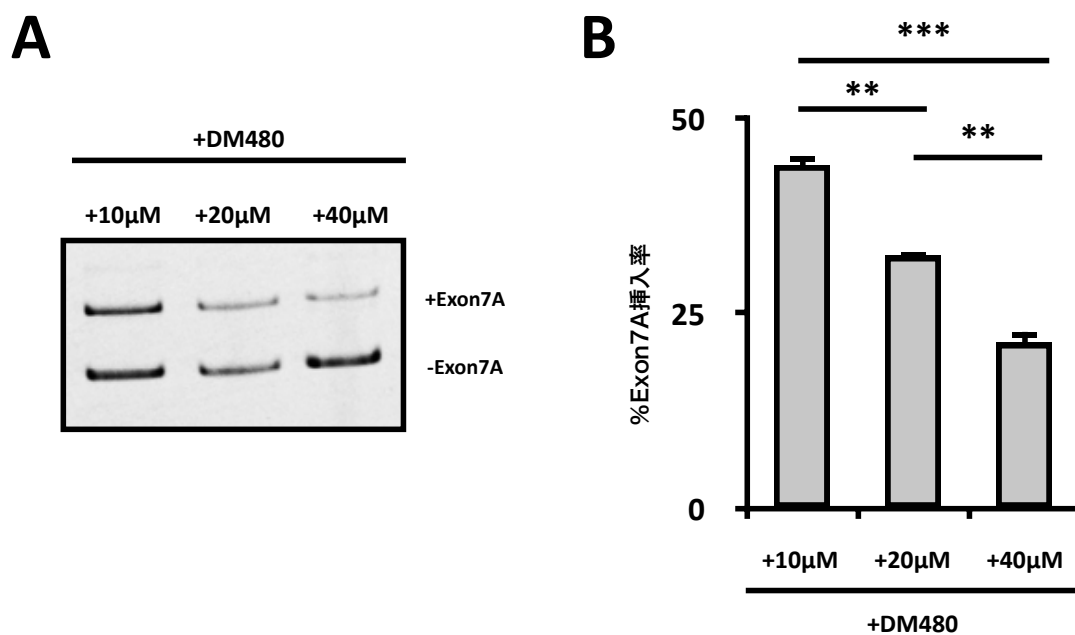


図2-5 C2C12細胞におけるmanumycin Aの濃度依存的効果

- (A) 様々な濃度の manumycin A を加えた際のミニジーンのスプライシングをRT-PCRにより検出した結果。
- (B) (A) のバンド強度を定量したグラフ (Mean + SEM, n=3)。
- (B) では、Tukey's multiple comparison test を用いて有意差を解析した (** $p < 0.01$ 、*** $p < 0.001$)。Oana, K. et al., 2013, Sci. Rep. 3, 2142 (44) の図を改変して使用した。

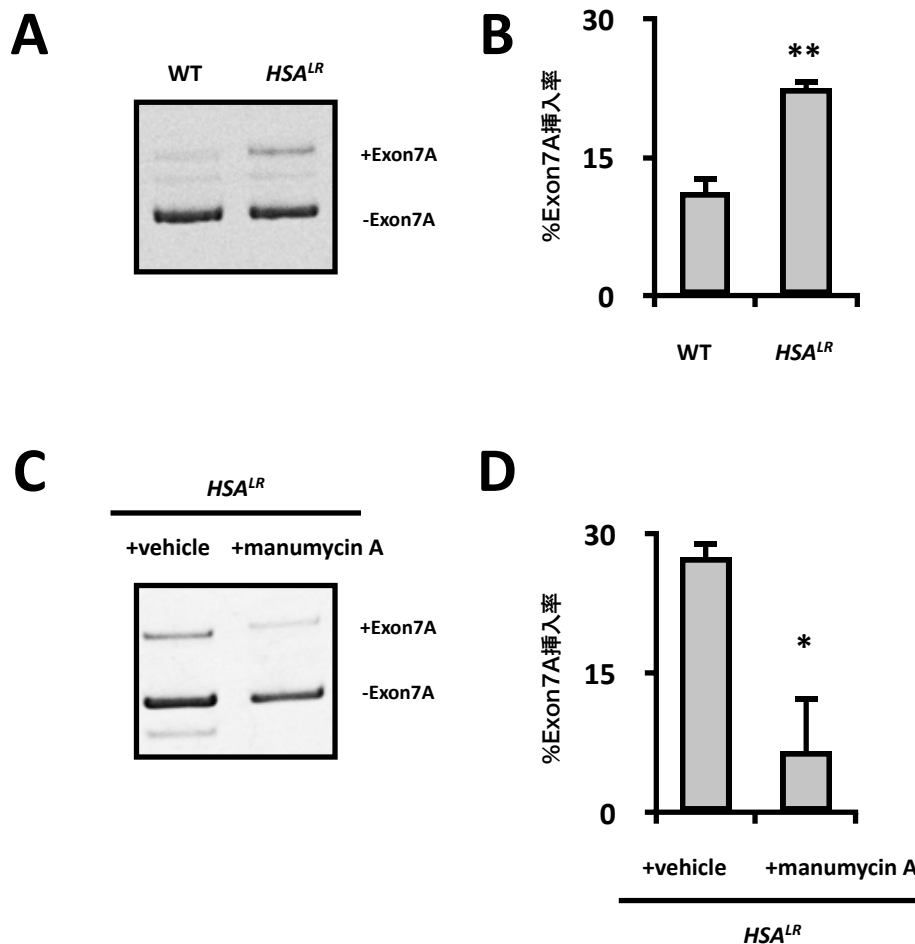


図2-6 マウスにおけるmanumycin Aの*Clcn1*スプライシングに対する効果

- (A) WTマウスとDMモデルマウスHSA^{LR}マウスにおける*Clcn1*スプライシングを検出したRT-PCRの結果。
- (B) (A) のバンド強度を定量したグラフ (Mean + SEM, n=3)。
- (C) HSA^{LR}マウスにmanumycin Aを筋肉内投与した際の*Clcn1*スプライシングを検出したRT-PCRの結果。
- (D) (C) のバンド強度を定量したグラフ (Mean + SEM, n=3)。
- (B) と (D) では *t*-test を用いて有意差を解析した (** $p < 0.01$ 、* $p < 0.05$)。Oana, K. et al., 2013, Sci. Rep. 3, 2142 (44) の図を改変して使用した。

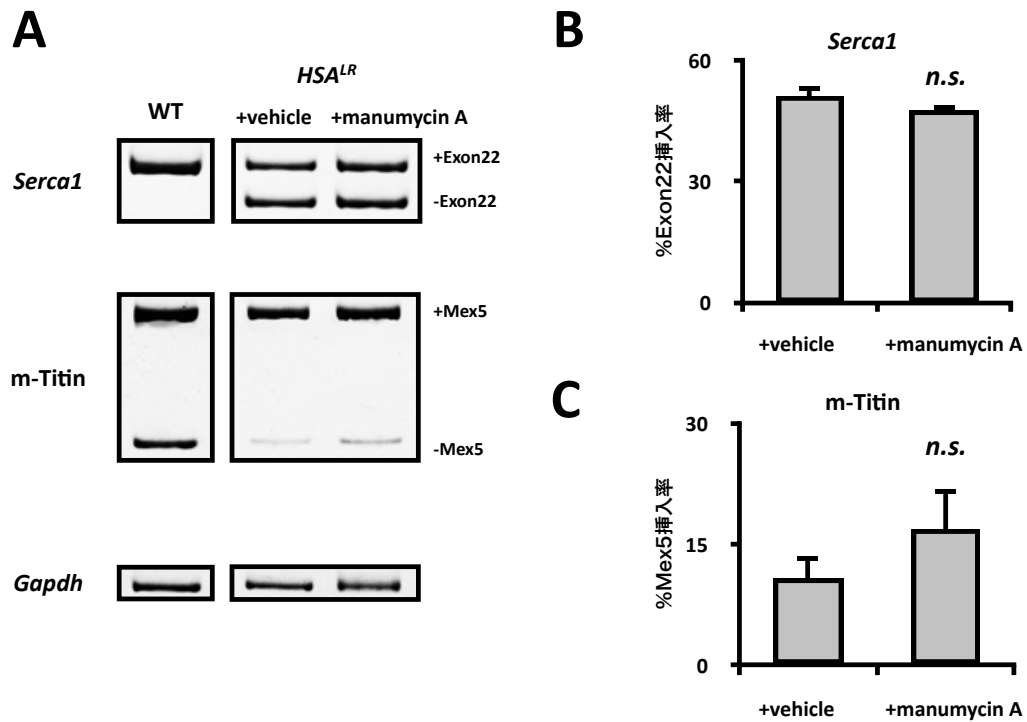


図2-7 マウスにおけるmanumycin Aの*Clcn1*以外のスプライシングに対する効果

(A) *HSA^{L/R}*マウスにmanumycin Aを筋肉内投与した際の*Serca1*、m-Titinスプライシングを検出したRT-PCRの結果。

(B) (A) の*Serca1*のスプライシングのバンド強度を定量したグラフ (Mean + SEM, n=3)。

(C) (A) のm-Titin1のスプライシングのバンド強度を定量したグラフ (Mean + SEM, n=3)。

(B) と (C) ではの *t*-test を用いて有意差を解析した。Oana, K. et al., 2013, Sci. Rep. 3, 2142 (44) の図を改変して使用した。

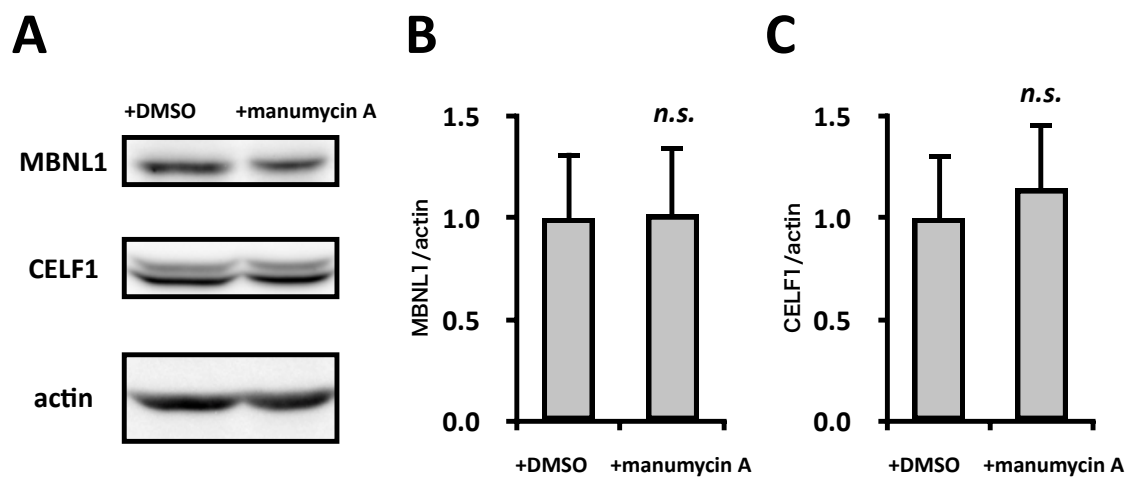


図2-8 C2C12細胞におけるmanumycin AのMBNL1とCELF1の発現量への影響

- (A) C2C12細胞にmanumycin Aを加えた際のMBNL1、CELF1の発現をウェスタンブロットにより検出した結果。
- (B) (A)のMBNL1のバンド強度をactinのバンド強度で標準化して定量したグラフ (Mean + SEM, n=3)。
- (C) (A)のCELF1のバンド強度をactinのバンド強度で標準化して定量したグラフ (Mean + SEM, n=3)。
- (B)と(C)ではt-testを用いて有意差を解析した。Oana, K. et al., 2013, Sci. Rep. 3, 2142 (44)の図を改変して使用した。

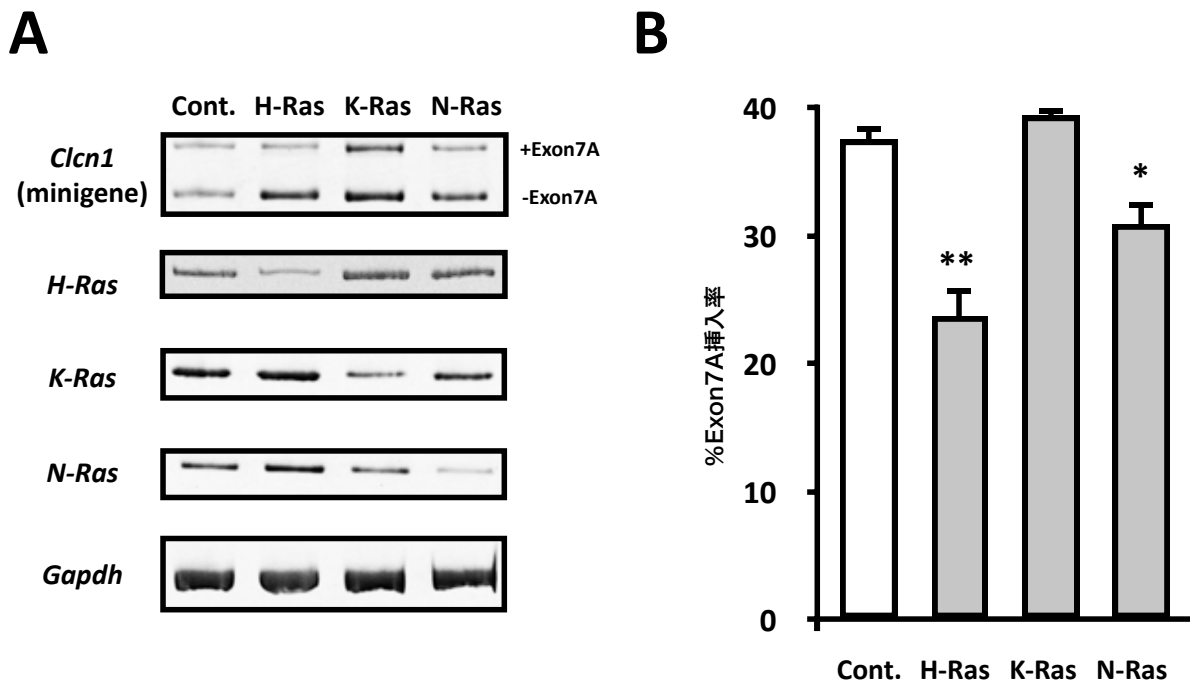


図2-9 Rasノックダウンの*Clcn1*スプライシングへの効果

(A) C2C12細胞にてH-Ras、K-Ras、N-Rasをノックダウンした際のミニジーンのスプライシングをRT-PCRにより検出した結果。

(B) (A) のミニジーンのスプライシングのバンド強度を定量したグラフ (Mean + SEM, n=3)。

(B) では Dunnett's Multiple Comparison Testを用いて有意差を解析した (* $p < 0.05$ 、** $p < 0.01$)。

Oana, K. et al., 2013, Sci. Rep. 3, 2142 (44) の図を改変して使用した。

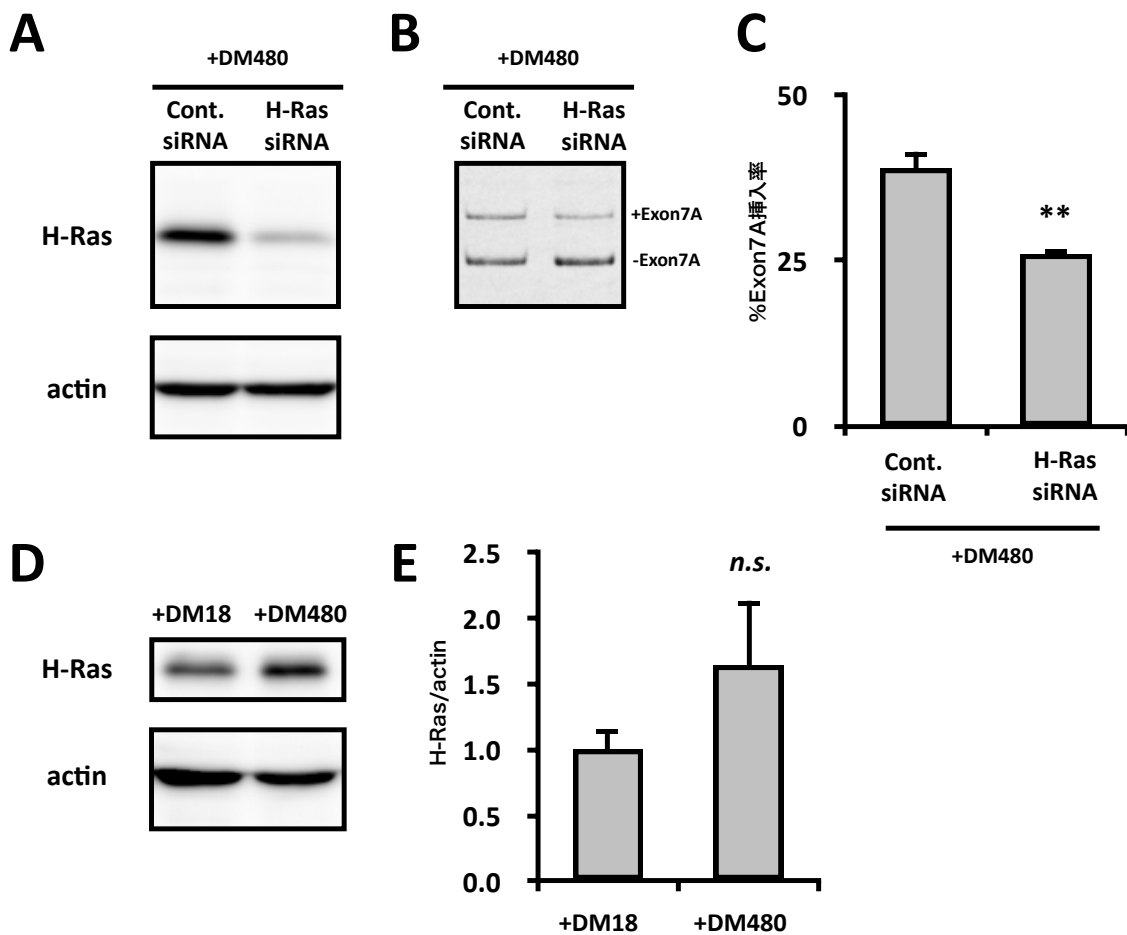
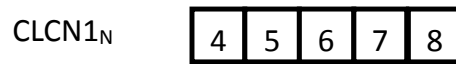
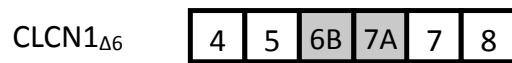
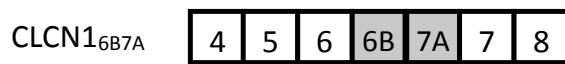
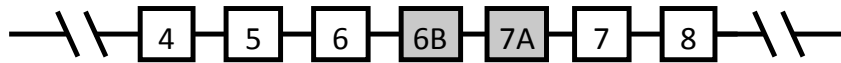


図2-10 H-RasノックダウンのClcn1スプライシングへの効果

- (A) C2C12細胞にてH-Rasをノックダウンした際のH-Ras発現量をウェスタンブロットにより検出した結果。
- (B) C2C12細胞にてH-Rasをノックダウンした際のミニジーンのスプライシングをRT-PCRにより検出した結果。
- (C) (B) のミニジーンのスプライシングのバンド強度を定量したグラフ (Mean + SEM, n=3)。
- (D) C2C12細胞でDM18或はDM480を発現させた際のH-Ras発現量をウェスタンブロットにより検出した結果。
- (E) (D) のH-Rasのバンド強度をactinのバンド強度で標準化して定量したグラフ (Mean + SEM, n=3)。
- (C) と (E) では *t*-test を用いて有意差を解析した (** $p < 0.01$)。Oana, K. et al., 2013, Sci. Rep. 3, 2142 (44) の図を改変して使用した。

A*CLCN1***B**

対照群

DM1患者

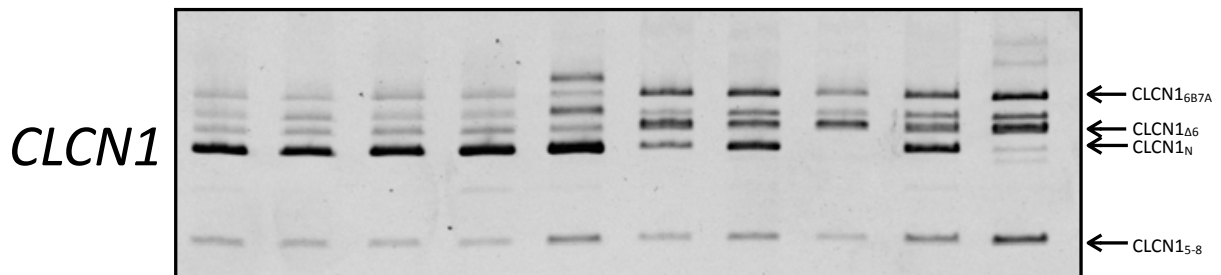


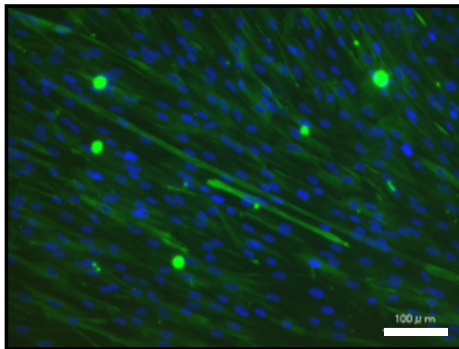
図2-11 ヒト *CLCN1* のスプライシング

(A) ヒト *CLCN1* のスプライシングパターン。

(B) 各5名の対照群とDM患者からの筋生検から *CLCN1* のスプライシングをRT-PCRにより検出した結果。

A

control cell

**B**

DM cell

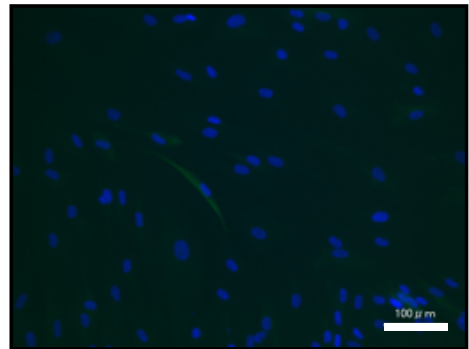


図2-12 DM患者細胞における筋分化誘導

(A) 分化培地に変えて10日後の対照細胞の様子。

(B) 分化培地に変えて10日後のDM患者細胞の細胞の様子。

免疫染色に際しては抗デスミン抗体（緑）とDAPI（青）を用いた。スケールバーは100 μ m。

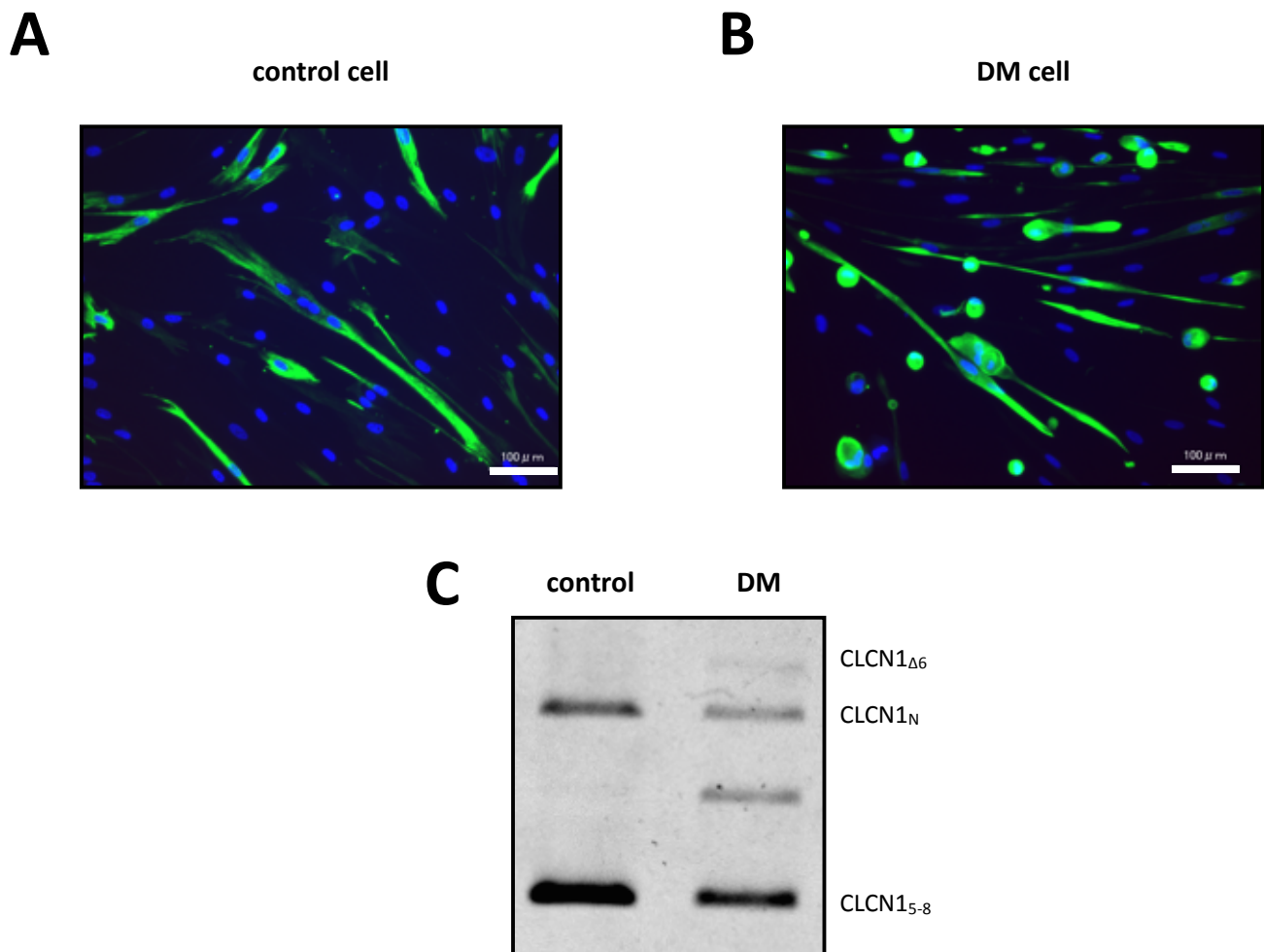


図2-13 DM患者細胞におけるMyoD遺伝子導入を経ての筋分化誘導

(A) MyoD遺伝子導入後翌日に分化培地に変えて10日後の対照細胞の様子。

(B) MyoD遺伝子導入後翌日に分化培地に変えて10日後のDM患者細胞の様子。

免疫染色に際しては抗デスミン抗体（緑）とDAPI（青）を用いた。スケールバーは100 μ m。

(C) 誘導後のCLCN1スプライシングをRT-PCRによって検出した結果。

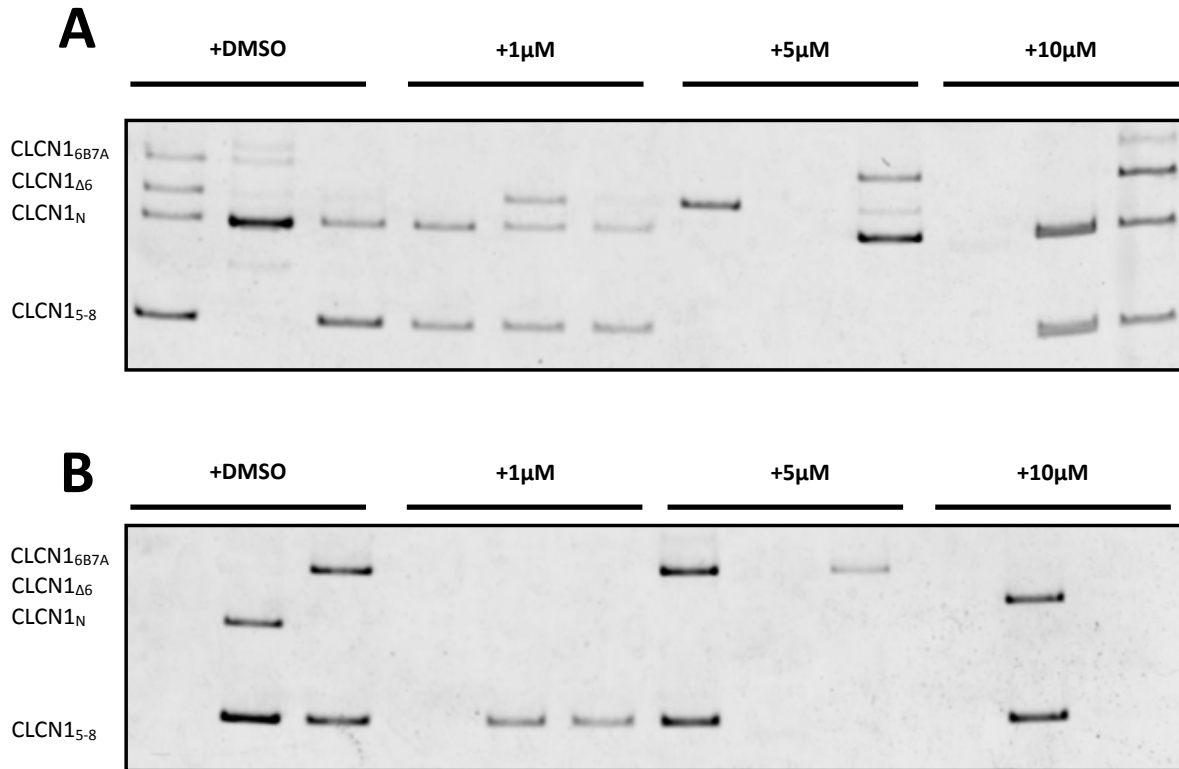


図2-14 DM患者細胞のCLCN1スプライシングへのmanumycin Aの効果

DM患者細胞にmanumycin Aを加えた後、CLCN1スプライシングをRT-PCRによって検出した。manumycin Aは終濃度が1 μ M、5 μ M、10 μ Mとなるように細胞に添加した。各郡の3レーンは同一サンプル (n=1) より3回PCRを行ったものを電気泳動している。(A) と (B) の電気泳動写真はそれぞれ異なるDM1患者由来の細胞からRT-PCRを行ったものである。

3. 第二章

3.1 序論

3.1.1 はじめに

DMの発症機構解明のため、これまで多くの遺伝子で選択的スプライシング異常が報告されてきた。しかしながら、明確にDMの症状を異常スプライシングで説明できるものは、筋強直以外に見つかっていない。DMにおいて、MBNLファミリーは異常CUG/CCUGリピートRNAに捕捉されることで機能が低下している。本章では、スプライシング調節以外のMBNLの機能を解明することで、DMにおける新しい分子病態の解明に迫ろうと試みた。

3.1.2 DMにおけるスプライシング異常以外の分子病態

DMではスプライシング異常以外の分子病態がいくつか報告されている。DMにおいて、伸長したCUGリピートRNAから開始コドンを使用せずにリボソームによってタンパク質が翻訳されることが分かった (75)。この機構はRepeat-associated non-ATG translation (RAN翻訳) と呼ばれる。RAN翻訳により、DMではリピートRNAから3種類のホモポリアミノ酸が産生される。中でもポリグルタミンが細胞に対して毒性を持つことが疑われている。現在までにRAN翻訳の制御機構やDMの症状との関連は不明なことが多く、これからのさらなる研究が期待される。

他方DMでは、いくつかのmiRNAの発現が異常な制御を受けることが報告されている (77-79)。DMでmiRNAの発現量が増加している詳細な機構はまだ不明である。miRNAの発現量が増加することで、miRNAのターゲット遺伝子の発現を変化させることで、DMの症状に関与する可能性がある (80)。興味深いことに、DMで見られるmiRNAの発現の変化の中には、DMDや他の筋疾患で見られるmiRNAの発現の変化と一致するものが多いことが報告されている (81)。

3.1.3 MBNL1の新たな機能

近年、次世代シーケンサーを用いたCLIP-seq法によって、RNA結合タンパク質が結合するRNAを網羅的に探索する研究が行われている。MBNL1とCELF1に対しても、CLIP-seq法により結合するRNAが同定された。RNAの結合している場所を調べると、驚くべき事にMBNL1もCELF1も3'UTRに最も結合していることが分かった。一般にRNAのエクソンやイントロンはRNAスプライシング制御に関わる配列であるが、3'UTRはRNAの輸送や安定性や翻訳に関わるとされる (82)。また、MBNL1とCELF1にはRNA結合タンパク質として、

選択的スプライシング以外にRNAの転写後調節機構に関わる可能性があることが示唆された。その後の研究で、MBNL1は3'UTRを介して、mRNA輸送や遺伝子発現の制御や選択的ポリアダニレーションに関わる事が示されたが、その詳細な制御機構は不明である。

3.1.4 第二章の目的

MBNL1が3'UTRを介して遺伝子発現を調節する制御機構の解析を目的とした。RNA結合タンパク質MBNL1の選択的スプライシング以外の制御機構が分かる事で、DMの新しい分子病態の解明に寄与できるかもしれないと考えている。

3.2 材料と方法

3.2.1 プラスミド

マウス*Gapdh*遺伝子の3'UTR領域のクローニングは、以下のように行った。まず、マウスゲノムDNAを鋳型としてPrimeSTAR GXL DNA polymerase (TaKaRa) を用いたPCRによりDNA断片を増幅した。増幅した鋳型はホタルルシフェラーゼ遺伝子を発現するpGL3-Pのルシフェラーゼ遺伝子の終止コドンの後に位置する*Xba* Iと*Sal* Iサイトに挿入した。これにより、pGL3-Pに元来あるSV40 polyA signal部分は、*Gapdh*遺伝子の3'UTR領域に置換される。ルシフェラーゼ遺伝子はSV40 polyA signalではなく*Gapdh*の3'UTR領域にあるpoly A signalを使うことになる。ベクターとインサートのライゲーションはRapid DNA Ligation Kit (Roche) を用いて行い、XL10 Goldコンピテントセルに形質転換した。培養した大腸菌から、GenElute Plasmid Miniprep Kit (Sigma-Aldrich) を用いてプラスミドを抽出し、シーケンス解析を行い (FASMAC) 配列を確認した。マウス*Gapdh*遺伝子の3'UTR領域をホタルルシフェラーゼ遺伝子の3'UTR領域に持つこのベクターをpGL3-mGと-(CCUG)₀した。

続いて、pGL3-mGが3'UTR領域にMBNL1の結合モチーフであるCCUG/CUGを発現するように、pGL3-mGの3'UTR領域にCCTG/CTGの反復配列を挿入した。挿入の際にはn個のCCTG/CTGが並んだ (CCTG)_n / (CTG)_n のオリゴDNAをアニーリングさせたものをpGL3-mGの*Xba* Iサイトに挿入し作製した。

ドキシサイクリンによって転写を制御するために、pGL3-mGのSV40プロモーターをテトラサイクリン応答因子 (TRE) プロモーターに置換したTet-pGL3-mGも作製した。TREプロモーターを持つpTRE2-hygから、*Xho* Iと*Hind* IIIサイトによりTREプロモーター断片を得た。pGL3-mGから*Xho* Iと*Hind* IIIをサイトによりSV40プロモーター配列を排除し、そこにTet制御プロモーターを挿入しTet-pGL3-mGを作製した。

ルシフェラーゼアッセイを行う際の遺伝子導入効率標準化用には、ウミシイタケルシフェラーゼ発現ベクターpGL4.73 (Promega) を用いた。

MBNL発現ベクターは、当研究室の紀により作製されたものを用いた (63)。MBNL遺伝子は、ほ乳細胞発現ベクターであるpSecDKに挿入されている。

3.2.2 細胞培養と遺伝子導入

HEK293細胞とHEK293 Tet-Off細胞 (Clontech) の培養は37°C、5%CO₂環境に設定したインキュベーター内で行った。HEK細胞を培養する際は10%の仔ウシ血清 (Life Technologies) を含むDMEM培地 (Sigma-Aldrich) で培養した。継代の際には培地を除き、PBSで細胞を洗浄し、トリプシン (Sigma-Aldrich) を用いて細胞を剥がした。37°Cに温め

たDMEMを加えて、遠心分離により細胞を回収し、適宜希釈して新しい培地へ蒔き直した。

プラスミドDNAの遺伝子導入の際には、トランスフェクション前日に24ウェル細胞培養プレート (IWAKI) にHEK細胞を 0.8×10^5 個まいた。トランスフェクションは、50ngのルシフェラーゼ発現ベクターと0.5ngのウミシイタケルシフェラーゼ発現ベクター-pGL4.73と200ngのMBNL発現ベクターを0.8 μ LのFuGENE6 (Promega) を用いて行った。10cm培養皿に遺伝子導入を行う際は、スケールを上げて行った。

プラスミドDNAとsiRNAの遺伝子導入の際には、トランスフェクション前日に24ウェル細胞培養プレート (IWAKI) にHEK293細胞を 2.0×10^5 個まいた。トランスフェクションは、200ngのルシフェラーゼ発現ベクターと1ngのウミシイタケルシフェラーゼ発現ベクター-pGL4.73、800ngのMBNL発現ベクター、100pmolのsiRNAと3.0 μ LのLipofectamine 2000 (Life Technologies) を用いて行った。用いたsiRNAはSigma-Aldrich社から購入した。用いたsiRNAの配列は表3-1に記載した。コントロールsiRNAとして、MISSION siRNA Universal Negative Control (Sigma-Aldrich) を用いた。

HEK293 Tet-Off細胞を用いてレポーターベクターのTREプロモーター下流の遺伝子発現を抑制する際には、ドキシサイクリンを培地に終濃度が1 μ g/mLとなるように加えた。

3.2.3 ルシフェラーゼアッセイ

遺伝子導入をして48時間後にDual-Luciferase Reporter Assay System (Promega) を用いて行った。ルシフェラーゼ活性はホタルルシフェラーゼの発光量をウミシイタケルシフェラーゼの発光量で補正した値を相対ルシフェラーゼ活性として算出した。さらにその後、遺伝子導入の際にmockとしてpSecDKを用いたサンプルの相対ルシフェラーゼ活性を1とした標準化ルシフェラーゼ活性を算出した。

3.2.4 RT-qPCR

GenElute Mammalian Total RNA Miniprep Kit (Sigma-Aldrich) をtotal RNAを抽出した。total RNA 400ngを鋳型として、PrimeScript 1st Strand cDNA Synthesis Kin (TaKaRa) により逆転写反応を行い、合成されたcDNAを5倍希釈したcDNA溶液をqPCRに用いた。qPCRは、StepOne plus リアルタイムPCRシステム (Life Technologies) とPower SYBR Green PCR Master Mix (Life Technologies) を用いて行った。用いたプライマーの配列は表3-2にまとめた。内部標準遺伝子には、*GAPDH*遺伝子を用いた。

HEK293 Tet-Off細胞を用いてレポーターmRNAの半減期を解析する際には、ドキシサイクリンを添加してから0時間後、1時間後、2.5時間後、5時間後の時間毎に細胞を回収した。

3.2.5 ポリソーム分画

10cm培養皿で培養し、遺伝子導入を行って、48時間後のHEK293細胞から、Polysome Lysisバッファー（10mM HEPES-KOH [pH7.4]、150mM NaCl、5mM MgCl₂、0.5mM DTT、0.1% NP-40、0.1mg/mL シクロヘキシミド、0.1mg/mL ヘパリン）を用いて細胞を回収し、27Gの注射針（テルモ）を用いてホモジナイズした後、12,000gで10分間遠心して上清を回収した。この上清をGradient Master（BIOCOMP）を用いて作製した15%-60%スクロースグラジエントに重層した。36,000rpmで2.5時間超遠心した後に、Gradient Fractionator（BIOCOMP）を用いて、ポリソーム分画を行った。分画は、UV254nmの波長を持続的に測定しながら行った。分画後、各分画液を5つのフラクションにまとめた。

分画したサンプルからは、TCA沈殿によりタンパク質を抽出した。その後、ウェスタンブロッティングにより、トランスフェクションしたMBNL1をマウス抗myc抗体（Invitrogen）を用いて検出した。

3.3 結果

3.3.1 MBNLに3'UTRを介した遺伝子発現制御

MBNL1の3'UTRを介した遺伝子発現制御を調べるために、*Gapdh*遺伝子の3'UTRにMBNL1が結合するCCUGリピートやCUGリピートを導入したルシフェラーゼレポーターベクターを作製した(図3-1)。CLIP-seqを用いた研究から、*Gapdh*遺伝子の3'UTRにはMBNL1が結合しないことは既に報告がある(39)。

MBNL1は選択的スプライシングを経て、様々なアイソフォームを産生する。MBNL1による3'UTRを介した遺伝子発現制御にアイソフォーム毎の違いがあるのかルシフェラーゼアッセイを用いて検証した。今回は、MBNL1-40、MBNL1-40s、MBNL1-42の3つのアイソフォームを用いた(図3-2)。MBNL1-40は核と細胞質のどちらにもおよそ均等に局在するが、MBNL1-40sは主に細胞質に局在し、MBNL1-42は主に核に局在しているという違いが見られる(83)。骨格筋では、MBNL1-40が最も多く発現している(84)。MBNL1はCCUGリピートRNAよりもCUGリピートRNAの方が結合能が高い(26)。そこでまず、*Gapdh*遺伝子の3'UTRに異なる長さのCCUGリピートを導入したものに、MBNL1アイソフォームを発現させた。

*Gapdh*遺伝子の3'UTRに(CCUG)₆以下のリピート数が導入されている場合には、どのMBNL1アイソフォームを発現させてもルシフェラーゼ活性に変化は見られなかった。(CCUG)₁₂のリピートが*Gapdh*遺伝子の3'UTRに導入されたものでは、MBNL1-40sを発現させるとルシフェラーゼ活性が有意に減少した。3'UTRに(CCUG)_{12x2}以上のリピート数が導入されたものでは、3つのMBNL1アイソフォーム全てでルシフェラーゼ活性が有意に減少した(図3-3)。

続いて、*Gapdh*の3'UTRにCUGリピートを導入したもので、同様の実験を行った。この場合は3'UTRに(CUG)₁₄が導入されたもので、用いた全てのMBNL1アイソフォームでルシフェラーゼ活性の減少が見られた(図3-4)一方で、CAGリピート導入での変化は見られなかった。

3.3.2 MBNLファミリーの3'UTRを介した遺伝子発現制御

MBNLファミリーであるMBNL2とMBNL3は、MBNL1と高いアミノ酸の相同性を持つ(図3-5)。MBNL2とMBNL3でもMBNL1と同様に3'UTRを介した遺伝子発現制御が行われるのか検証した。MBNL1でルシフェラーゼの活性の減少が見られた3'UTRに(CCUG)_{12x3}を導入したレポーターベクターを用いてルシフェラーゼアッセイを行った。すると、MBNL2とMBNL3もMBNL1と同様に有意にルシフェラーゼ活性を減少させることが分かった(図3-6)。CAGGリピートの導入での変化は見られなかった。

3.3.3 MBNLは3'UTRを介してmRNA分解に影響しない

MBNL1が3'UTRを介してmRNAを分解することで、遺伝子発現制御を抑制している可能性を検証した。そこで、mRNA分解に関わる因子をsiRNAでノックダウンした状態で、*Gapdh*の3'UTRに(CCUG)_{12x3}を導入したレポーターとMBNL1-40を発現させてルシフェラーゼアッセイを行った。ここで用いた因子はXRN1、DCP2、EXOSC10、CNOT6、CNOT8、PAN2、PAN3の7つを用いた。多くのmRNAはデアデニレーション酵素によってポリAが除去された後、脱キャップ化酵素によってキャップ構造が除去され、5'→3'エキソリボヌクレアーゼであるXRN1か3'→5'エキソリボヌクレアーゼであるエキソソーム複合体によって分解される(85, 86)。DCP2は脱キャップ化酵素であり、EXOSC10はエキソソーム複合体に含まれる。CNOT6、CNOT8、PAN2、PAN3はデアデニレーション酵素である。これらの因子のノックダウン効率はqPCRにより確認した(図3-7 A)。しかしながら、MBNL1によるルシフェラーゼ活性の減少を回復できるものは無かった(図3-7 B)。この結果からでは、mRNA分解が生じていないのか、それとも今回ノックダウンした因子以外がレポーターのmRNA分解に寄与しているか分からない。そこで、各MBNLを発現させた状態でレポーターmRNAの転写を止めて、時間毎にレポーターmRNA量を検出した(図3-8 A)。その結果、MBNL1-40、MBNL1-42、MBNL1-40s、MBNL2、MBNL3を発現させてもレポーターmRNAの半減期に変化はなく、MBNLは3'UTRを介してmRNA分解に影響しないことが分かった(図3-8 B)。

3.3.4 MBNL1はポリソームに存在しない

ポリソーム分画したフラクションから、ウェスタンブロッティングによりMBNL1-40の発現を確認したところ、MBNL1-40は軽い非ポリソーム分画から発現が確認できた(図3-9)。

3.4 考察

3.4.1 MBNL1アイソフォーム毎の3'UTRを介した遺伝子発現制御

*MBNL1*は選択的スプライシングを経て多くのアイソフォームを産生する (87, 26)。これまでにアイソフォーム毎で、選択的スプライシングを変化させる機能が異なることが示された (84)。本研究で用いた3つのアイソフォームに限ると、MBNL1-42、MBNL1-40、MBNL1-40sの順にスプライシングを変化させる力が強い。これは、MBNL1が核に局在している割合と一致した結果となっている。現在までにスプライシング以外にMBNL1のアイソフォーム毎の機能の違いは示されていない。

*MBNL1*のエクソン7には核移行シグナル配列が同定されており (84)、エクソン7を含むアイソフォームはMBNL-42である。MBNL1はMBNL1自身でその遺伝子の選択的スプライシングを制御しており、通常はエクソン7の脱落を促進する。核内にMBNL1が多いと、核内のMBNL1によってエクソン7が脱落したMBNL1が増加し、結果的には核内のMBNL1量を減少させる。一方で、核内のMBNL1が少ないと、エクソン7が挿入したスプライシング産物が増加し、核内のMBNL1量が増加する。このようにして、MBNL1はMBNL1自身によって核内に存在する量を制御している (84)。

興味深いことに、DMでは*MBNL1*遺伝子においても異常スプライシングが生じ、エクソン7が挿入された産物が増加している (33)。DMでは CUG/CCUG リpeat RNAにより核内のMBNL1の機能が低下している。そのため、*MBNL1*のスプライシングはエクソン7の挿入が促進すると考えられる。

本研究の結果より、3'UTRに十分な CCUG/CUG リpeat配列がある場合は、MBNL1-40、MBNL1-40s、MBNL1-42の3つのアイソフォームは遺伝子発現を抑制する作用があることが分かった。一方で、3'UTRに (CCUG)₁₂ が導入された場合には、MBNL1-40sでのみ遺伝子発現の抑制が見られた。この結果から、3'UTRを介したMBNL1による遺伝子発現制御には、(i) MBNL1-40sが持つエクソン11に重要なドメインが存在する、(ii) 細胞質でMBNL1が機能することが重要である、の2つの仮説が考えられた。(i) について、web上のInterProScan (www.ebi.ac.uk/interpro/) を用いてMBNL1-40とMBNL1-40sについてドメイン探索を行った。その結果、MBNL-40sだけが持つドメインは見つからなかった。web上で見つからなかっただけで (i) の仮説は否定出来ないが、(ii) の仮説の可能性について考えてみたい。MBNL-40sはMBNL-40やMBNL-42よりも細胞質に多く局在する。従って、今回見られた遺伝子発現の抑制が細胞質で生じている現象だと考えると、同じ量のMBNL1アイソフォームを発現させた場合に、MBNL-40sが最も遺伝子発現を抑制することが出来ると考えられる。さらに、MBNL1-42の核移行シグナルに変異を導入し、細胞質への局在が増加したMBNL1-42変異体を用いると、レポーターベクターのルシフェラーゼ活性がより減少する傾向が見られた (data not shown)。また、DMでは CUG/CCUG リpeatによって

核内のMBNL1の機能が低下している上に、MBNL1の選択的スプライシングは核内に強く局在するアイソフォームが多く産生する方に傾くので、細胞質に局在するMBNL1の量は少なくなることが予想される。主に細胞質でMBNL1が3'UTRを介して遺伝子発現の制御を行っているとは仮定すると、この機能はDMでは低下していることが考えられる。

3.4.2 MBNLファミリーの3'UTRを介した遺伝子発現制御

MBNLファミリーは構造の類似性が高く、どれも4つのCCCH型Zinc Fingerドメイン有する。MBNL1とMBNL2はあらゆる組織にユビキタスな発現が見られる。どの組織でもMBNL1の方が発現量が多いが、脳ではMBNL2の方が優位に発現している。他方、MBNL3は発生段階の初期のステージでは発現が確認されているが(40)、胎盤を除くと基本的に成人の組織からの発現はほとんど見られない(88)。DMではCUG/CCUGリピートRNAにより、MBNLの機能が阻害される。そのため、骨格筋ではMBNL1の機能阻害により選択的スプライシングの異常が生じ、脳ではMBNL2の機能阻害により選択的スプライシング異常が生じる。

本研究により、MBNLファミリーであるMBNL1、MBNL2、MBNL3は全て3'UTRを介して遺伝子発現を抑制していることが分かった。DMでは、全身でCUG/CCUGリピートRNAが発現するため、あらゆる組織でのMBNLファミリーの機能低下が生じる。骨格筋や脳などあらゆる組織でMBNLファミリーによる遺伝子発現の抑制に異常が生じている可能性がある。

3.4.3 MBNLによる3'UTRを介した遺伝子発現制御機構

MBNLファミリーは3'UTRを介してどのように遺伝子発現を抑制するのか。(i) MBNLが3'UTRに結合することで、mRNA分解に関わる因子をリクルートする、(ii) MBNLが3'UTRに結合することでmRNAの翻訳効率を阻害する、の2つ仮説を考えた。(i)の説だが、mRNA分解に関わる主要な因子をノックダウンしても、MBNL1による遺伝子発現の抑制は生じたままであった。また、MBNLを発現させた場合に、3'UTRを介してレポーターmRNAの分解速度に変化が生じるか解析したところ、mRNA半減期に差は見られなかった。このことから、MBNL1は3'UTRを介してmRNA分解を起こすことで、遺伝子発現を制御するしていないことが分かった。

本研究では、MBNL1はポリソームからは検出されなかった。このことから、3'UTRを介してMBNL1と結合したmRNAは翻訳状態に変化が生じている可能性も示唆された。

残念ながら、本研究ではMBNLファミリーの3'UTRを介した遺伝子発現抑制機構を解明することは出来ず、今後さらに詳しく解析する必要がある。この制御機構が明らかになることで、DMの新しい分子病態がまた1つ明かされると信じている。

表3-1 用いたsiRNAの配列

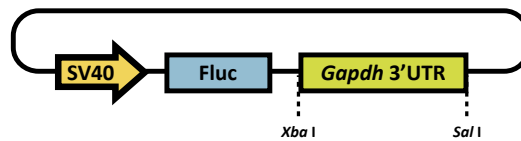
遺伝子名		siRNA配列 (5'→3')
XRN1	センス鎖	UGAUGAUGUUCACUUUAGAdTdT
	アンチセンス鎖	UCUAAAGUGAACAUCAUCAdTdT
DCP2	センス鎖	GAAAUUGCCUUGUCAUAGAdTdT
	アンチセンス鎖	UCUAUGACAAGGCAAUUUCdTdT
EXOSC10	センス鎖	AAGUUUCGAGAGAAGAUUGAUdTdT
	アンチセンス鎖	AUCAAUCUUCUCUCGAAACUdTdT
CNOT6	センス鎖	GATGTGAAGTTGGTACAAAdTdT
	アンチセンス鎖	UUUGUACCAACUUCACAUCdTdT
CNOT8	センス鎖	GAGAAATCGTGCTCAGTTAdTdT
	アンチセンス鎖	UAACUGAGCACGAUUUCUCdTdT
PAN2	センス鎖	GCCGATATCTTTCATGTGAdTdT
	アンチセンス鎖	UCACAUGAAAGAUUUCGGCdTdT
PAN3	センス鎖	CAAGCGAGTTTATTCTAAAdTdT
	アンチセンス鎖	UUAGGAAUAAACUCGCUUGdTdT

表3-2 用いたプライマーの配列

遺伝子名		プライマー配列 (5'→3')
Fluc	Fw	GTTCCATCTGCCAGGTATCA
	Rv	CCACAACCTTCGCTTCAAAA
GAPDH	Fw	GCAAATTCATGGCACCGT
	Rv	TCGCCCCACTTGATTTTGG
XRN1	Fw	AGTGGGCACCTCAACTTACCT
	Rv	TTCCTGGCCCTTTAACTTTTTCT
DCP2	Fw	AGAACACACCAGGATTACCTCA
	Rv	AGCAAAAACGGACAATGACTGA
EXOSC10	Fw	GCAACCAAATCCGACGGAGA
	Rv	ACCCAAGAGCAAACCTTCACAA
CNOT6	Fw	CCTGACCCTCGGAGGATGTAT
	Rv	GCTTGGCAATGTCTGAAGGAA
CNOT8	Fw	CAGCACTTGTGGAGAATAGCC
	Rv	ATTGCACCGCAGAAGCTGATA
PAN2	Fw	ACCCAAGTCTGCTACAGAATGT
	Rv	CACGCTGTGCAATTCAGAGTA
PAN3	Fw	TGGATGGAGGTGCTTTAACTGA
	Rv	GATCATGGGCTGAATATGGCTT

A

pGL3-mG-(CCUG)₀



B

pGL3-mG-(CCUG)₃



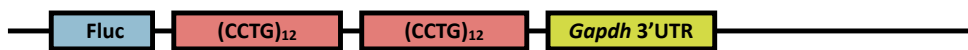
pGL3-mG-(CCUG)₆



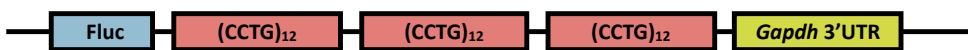
pGL3-mG-(CCUG)₁₂



pGL3-mG-(CCUG)_{12x2}



pGL3-mG-(CCUG)_{12x3}



pGL3-mG-(CUG)₁₄



図3-1 本研究で用いた3'UTRルシフェラーゼベクター

(A) pGL3-PのXba I/Sal I サイトを用いてGapdh 3'UTRを挿入した。

(B) (A) で作製したベクターのXba Iサイトを用いて様々なリピート配列を挿入した。

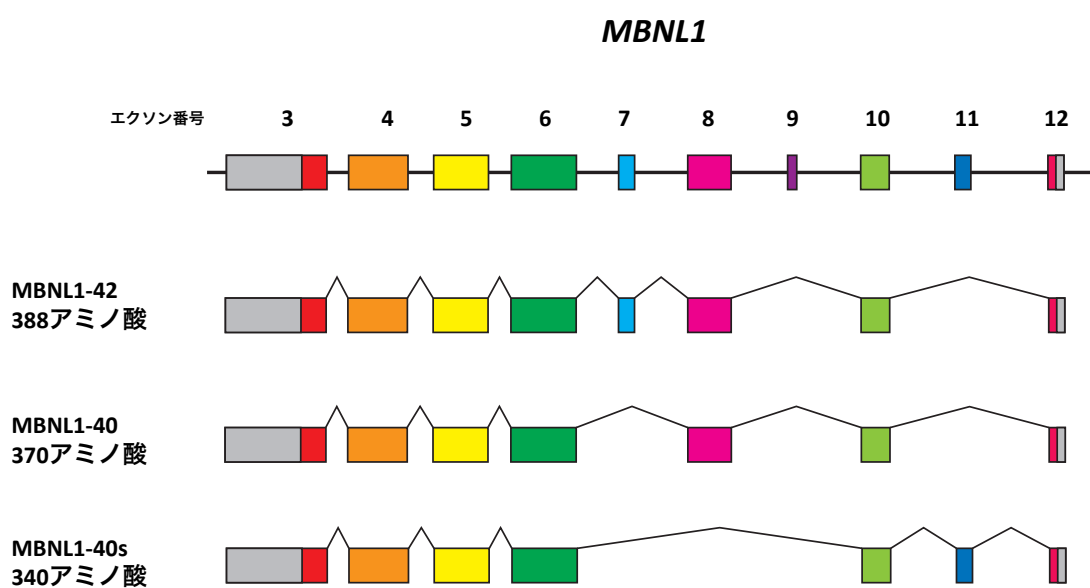


図3-2 本研究で用いたMBNL1アイソフォーム

本研究で用いたMBNL1アイソフォームであるMBNL1-42、MBNL1-40、MBNL1-40sのスプライシングパターン。

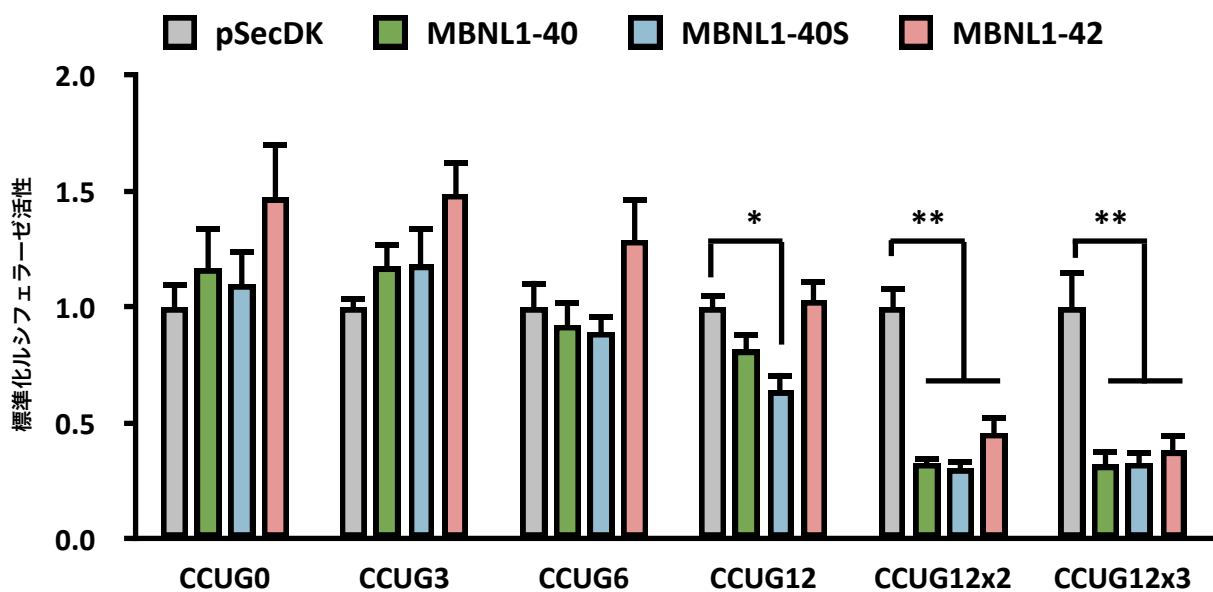


図3-3 MBNL1アイソフォームの3'非翻訳領域のCCUGに対する効果

3'非翻訳領域に異なるCCUG数を導入したレポーターに対するMBNL1-40、MBNL1-40s、MBNL1-42の効果。CCUGを導入したレポーターに対してMBNL1アイソフォームを発現させた際のルシフェラーゼ活性は、pSecDKを発現させた際の活性を1.0に標準化したものを表示している (Mean + SEM, n=3-4)。

Dunnett's Multiple Comparison Testを用いて有意差を解析した (* $p < 0.05$ 、** $p < 0.01$)。

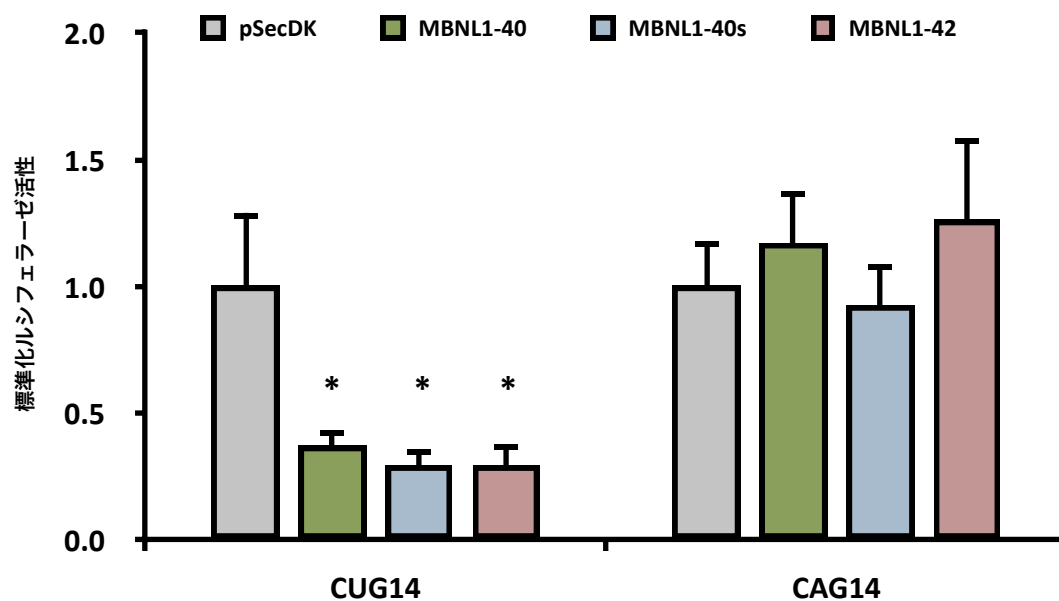


図3-4 MBNL1アイソフォームの3'非翻訳領域のCUGに対する効果

3'非翻訳領域に異なるCUG/CAG数を導入したレポーターに対するMBNL1-40、MBNL1-40s、MBNL-42の効果。。各レポーターに対してMBNL1アイソフォームを発現させた際のルシフェラーゼ活性は、pSecDKを発現させた際の活性を1.0に標準化したものを表示している（Mean + SEM, n=4）。Dunnett's Multiple Comparison Testを用いて有意差を解析した（* $p < 0.05$ ）。

```

MBNL1-40 1 MAVSVTPIRDTKWLTLEVCREFORGTCSRFDTECKFAHPSKSCOVENGRVIACFDSLKGR
MBNL2 1 MAINVAPVRDTRKWLTLVCRQFORGTCSRSDTECKFAHPPKSCOVENGRVIACFDSLKGR
MBNL3 1 TAVNVALIRDTRKWLTLVCREFORGTCSRADADCKFAHPPRVCHVENGRVVIACFDSLKGR

MBNL1-40 61 CSRENCKYLHPPHLKTOLEINGRNNLIQOK-NMAMLAQOMQLANAMMPGAPLQPVPMFS
MBNL2 61 CSRENCKYLHPPHLKTOLEINGRNNLIQOKTAAAMLAQOMQF---MFPGLPLHPVPTFP
MBNL3 61 CTRENCKYLHPPHLKTOLEINGRNNLIQOKTAAAMFAQOMQL---MLQNAQMSLGSFP

MBNL1-40 120 VAPSLATNASAAAFNPYLGPVSP--SLVPAEILPTAPMLVTGNPQVVPVAAAAAAOKLM
MBNL2 118 VGPALGTN-TATSFAPYLAPVTPGVGLVPTTEILPTTPVIVPGSP--PVTVPGSTATOKLL
MBNL3 118 MTPSIPAN-PPMAFNPYIP--HPGMGLVPAELVPNTPLVLPGNP--PLAMPGAVG-PKLM

MBNL1-40 178 RTDRLEVCREVQRGNCNRGENDCRFADSTMDITNDNTVTVCMQDIKGRCSREKCKYF
MBNL2 175 RTDKLEVCREFORGNCAARGEIDCFADSTMDITSDNTVTVCMQDIKGRCSREKCKYF
MBNL3 172 RSDKLEVCREFORGNCTRGENDCRVAHPTDASMIEASDNTVTVCMQDIKGRCSREKCKYF

MBNL1-40 238 HPPAHLOAKIKAAQYQVNOAAAAQAAATAAA--MGIPOAVLPLPKRPALEKINGATAVF
MBNL2 235 HPPAHLOAKIKAAQHQAQAAVAAQAAAAATVMAPPGALHPLPKRQALEKINGTSAVF
MBNL3 232 HPPAHLOARLKAAHQMNHSAASA-----MALOPGTLQLPKRQALEKINGATPVF

MBNL1-40 296 NTGIFQYQOALANMLOOHTAFLPP-----VPMVHGATPATVSAATTSATSVP
MBNL2 295 NPSVLHYQOALTSALOQHAAFIPT-----VPMMSATSATVSAATTPATSVP
MBNL3 283 NPTVFHCQOALTNLQLPOP-AFIPAGPILCMAPASNI VPMMHGATPTTVSAATTPATSVP

MBNL1-40 344 FAATATANQIPIISAEHLTSHKYVTQM
MBNL2 343 FAATATANQIILK-----
MBNL3 342 FAAPTTGNQLKF-----

```

図3-5 MBNLファミリーのアミノ酸配列の比較

MBNL1、MBNL2およびMBNL3のアミノ酸配列。ClustalW ([http:// clustalw.ddbj.nig.ac.jp](http://clustalw.ddbj.nig.ac.jp))によるアラインメントをもとに、BoxShade(http:// www.ch.embnet.org/software/BOX_form.html)で描画した。

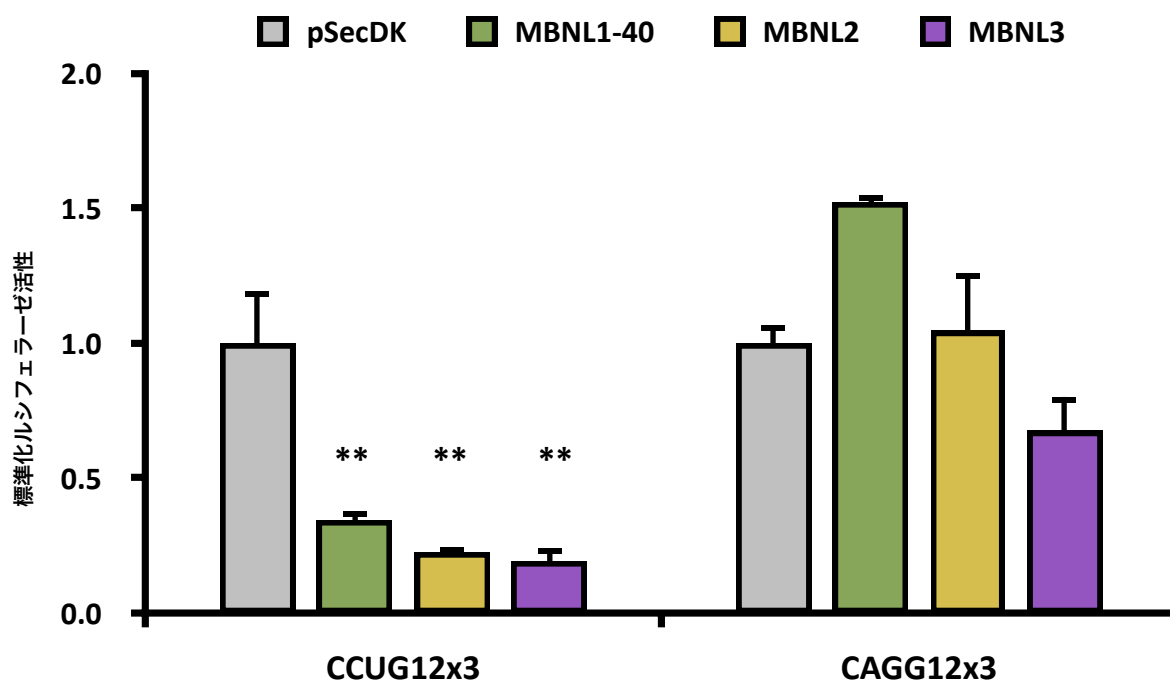


図3-6 MBNLファミリーの3'非翻訳領域のCCUGに対する効果

3'非翻訳領域にCCUG/CAGG数を導入したレポーターに対するMBNL1-40、MBNL2、MBNL3の効果。各レポーターに対してMBNLファミリーを発現させた際のルシフェラーゼ活性は、pSecDKを発現させた際の活性を1.0に標準化したものを表示している (Mean + SEM, n=3)。Dunnett's Multiple Comparison Testを用いて有意差を解析した (** $p < 0.01$)。

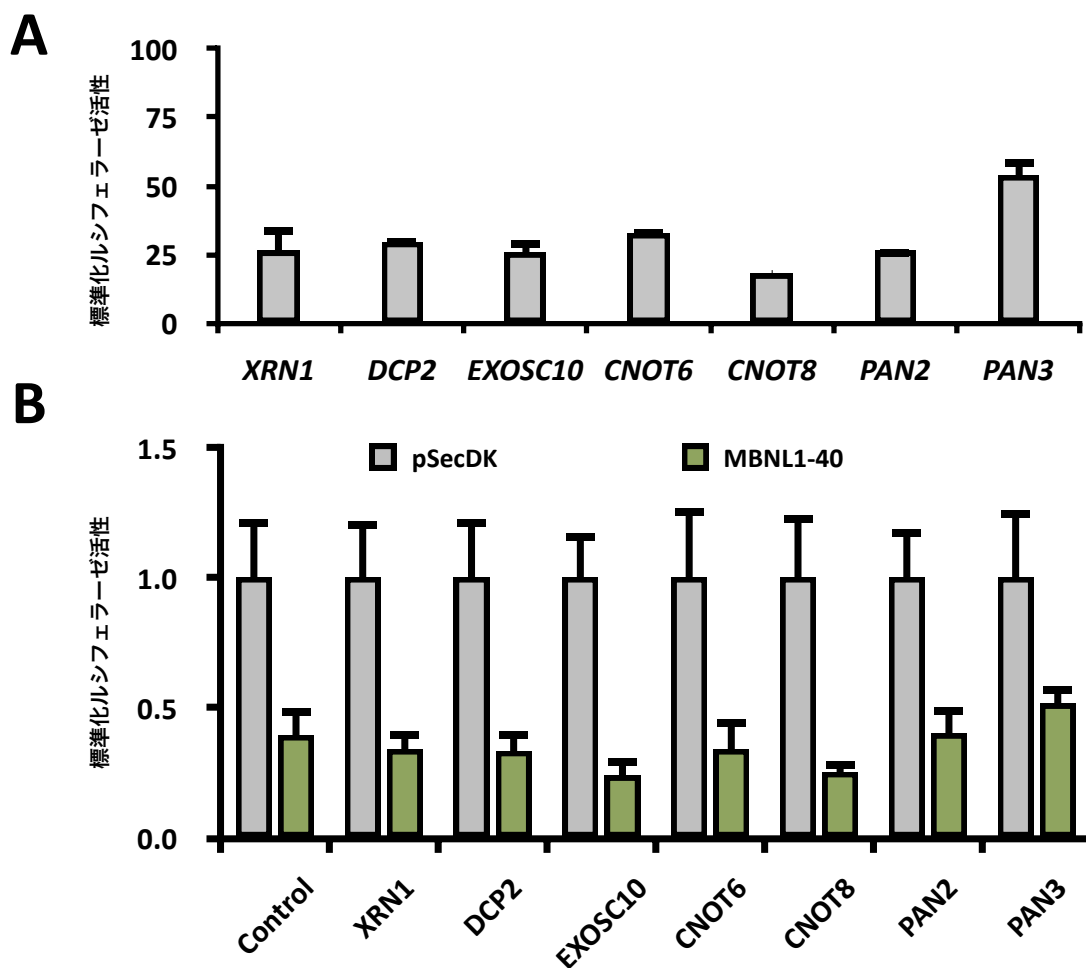


図3-7 mRNA分解に関わる因子の影響

- (A) mRNA分解に関わる因子をsiRNAでノックダウンした際の各因子のmRNA発現量をqPCRにより定量した結果 (Mean + SEM, n=3)。
- (B) mRNA分解に関わる因子をノックダウンした状態で、3'非翻訳領域にCCUG12*3を持つレポーター遺伝子に対するMBNL1-40の効果。それぞれのsiRNAを導入下さいのMBNL1-40を発現させた際のルシフェラーゼ活性は、pSecDKを発現させた際の活性を1.0に標準化したものを表示している (Mean + SEM, n=3)。

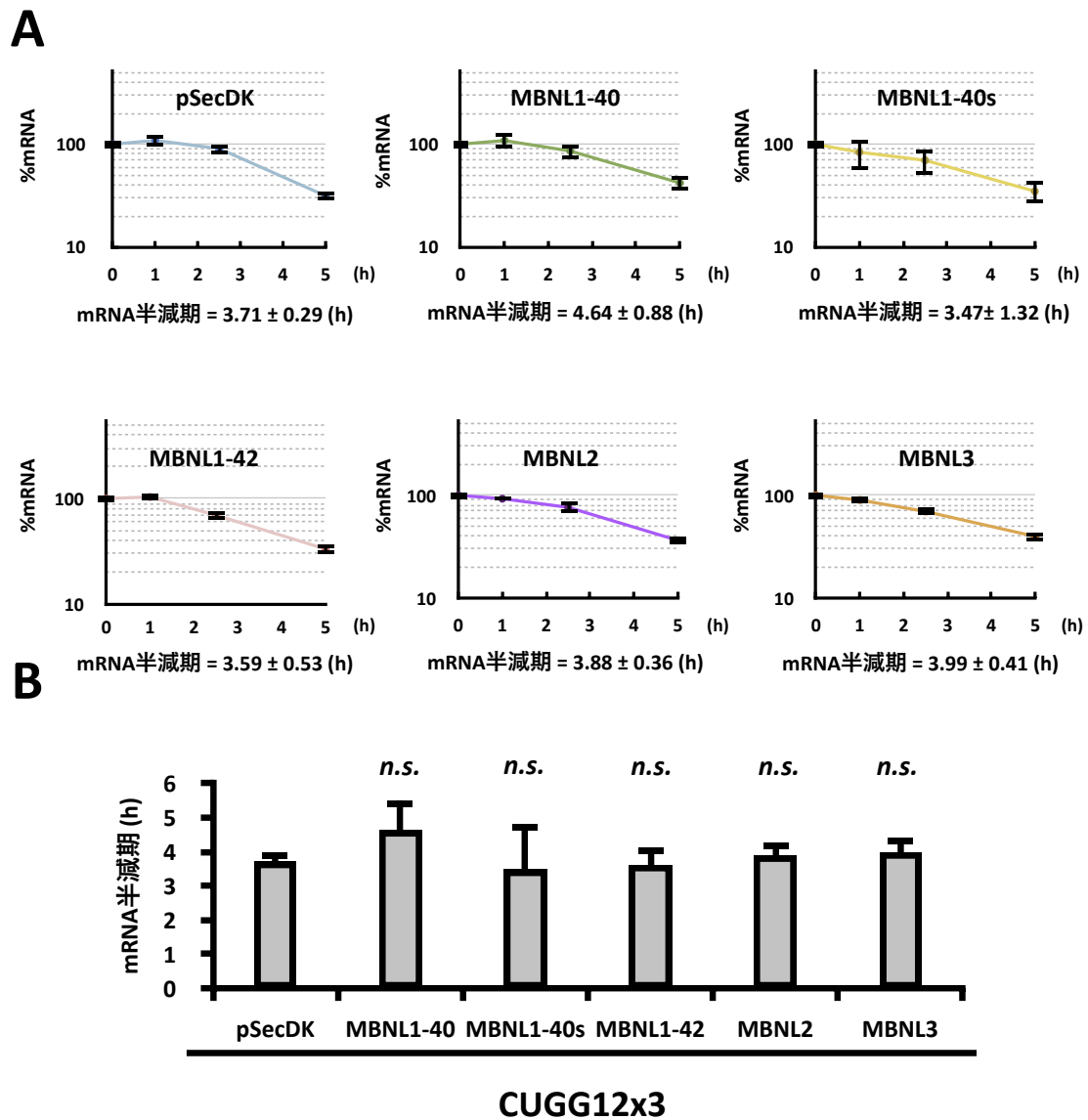


図3-8 MBNLがレポーター-mRNAの分解速度に及ぼす効果

- (A) 3'側非翻訳領域にCCUG12x3を導入したレポーターベクターの転写をドキシサイクリンにより止めてから0h、1h、2.5h、5hのmRNA量。縦軸は0h時のmRNA量を100%としたときの各時間のmRNA量を表す (Mean + SEM, n=3-4)。
- (B) (A) のグラフより算出した各ベクターを発現させた際のレポーター遺伝子のmRNA半減期 (Mean + SEM, n=3-4)。Dunnett's Multiple Comparison Testを用いて有意差を解析したが有意差は検出されなかった。

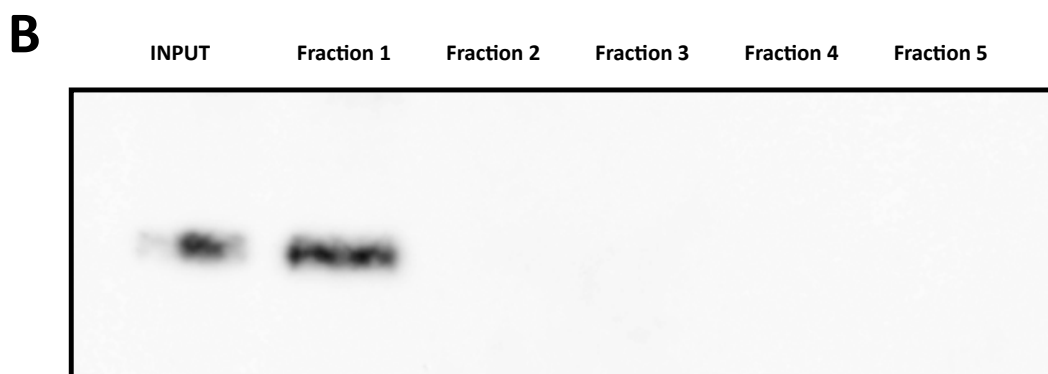
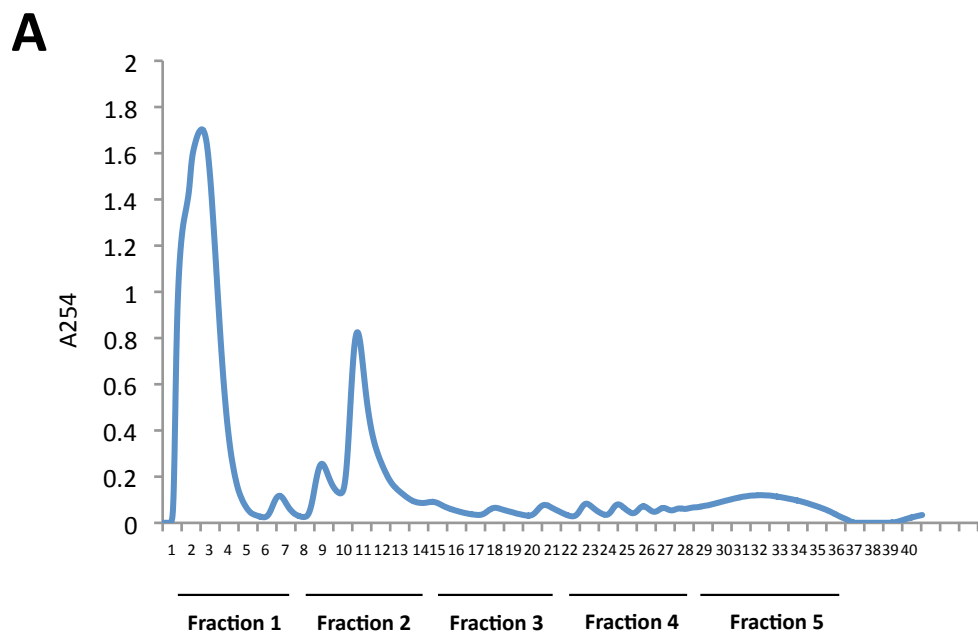


図3-9 ポリソーム分画とMBNL1

(A) ポリソーム分画。縦軸はA254nmの吸光度を表す。横軸は回収した分画液の番号を示す。回収した分画液はその後、5つのフラクションまとめた。

(B) 5つにまとめた各フラクションからのMBNL1-40のウェスタンブロット。

4. まとめ

DMは今日までに治療法が確立しておらず、またその発症機構に関して不明なことが多い。本研究ではDMの治療に応用出来るような低分子化合物の発見とDMの新たな分子病態を明らかにしようと試みた。

第一章では、DMにおいて筋強直症状の原因となる*Clcn1*のスプライシングを改善する低分子化合物を探索した。その結果、Rasファルネシル化阻害剤であるmanumycin AがDMでの*Clcn1*異常スプライシングを改善することが分かった。また、*Clcn1*スプライシングはH-Rasによって制御されることも分かった。ところで、ヒトの*CLCN1*遺伝子の選択的スプライシングはマウス*Clcn1*遺伝子の選択的スプライシングと比べるとずっと複雑である。そこで、manumycin AがDM患者細胞の異常*CLCN1*スプライシングを改善するかどうか試みた。残念ながら、培養細胞を用いた実験では、安定して*CLCN1*のmRNAを解析する実験系を構築することが出来ず、manumycin Aが*CLCN1*スプライシングに対して効果を示すかどうか解析することは、今後の課題である。

第二章では、DMでCUG/CCUGリピートRNAにより捕捉されて機能の低下しているMBNLファミリーのスプライシング制御以外の機能に注目した。細胞内での局在の異なるMBNL1アイソフォームを用いた実験では、細胞質への局在量が多いアイソフォームの方が3'UTRを介した遺伝子発現の抑制が強いことが示唆された。このことから、3'UTRを介した遺伝子発現の抑制は細胞質におけるMBNL1が重要な役割を果たすのかもしれない。また、MBNL2とMBNL3でも3'UTRを介した遺伝子発現の抑制が見られた。現在までのところ、MBNLファミリーの3'UTRを介した遺伝子発現制御機構に関してははっきりとした結果が得られていない。今後詳細な解析を行う事で、DMの新しい発症機構が明らかになることを期待している。

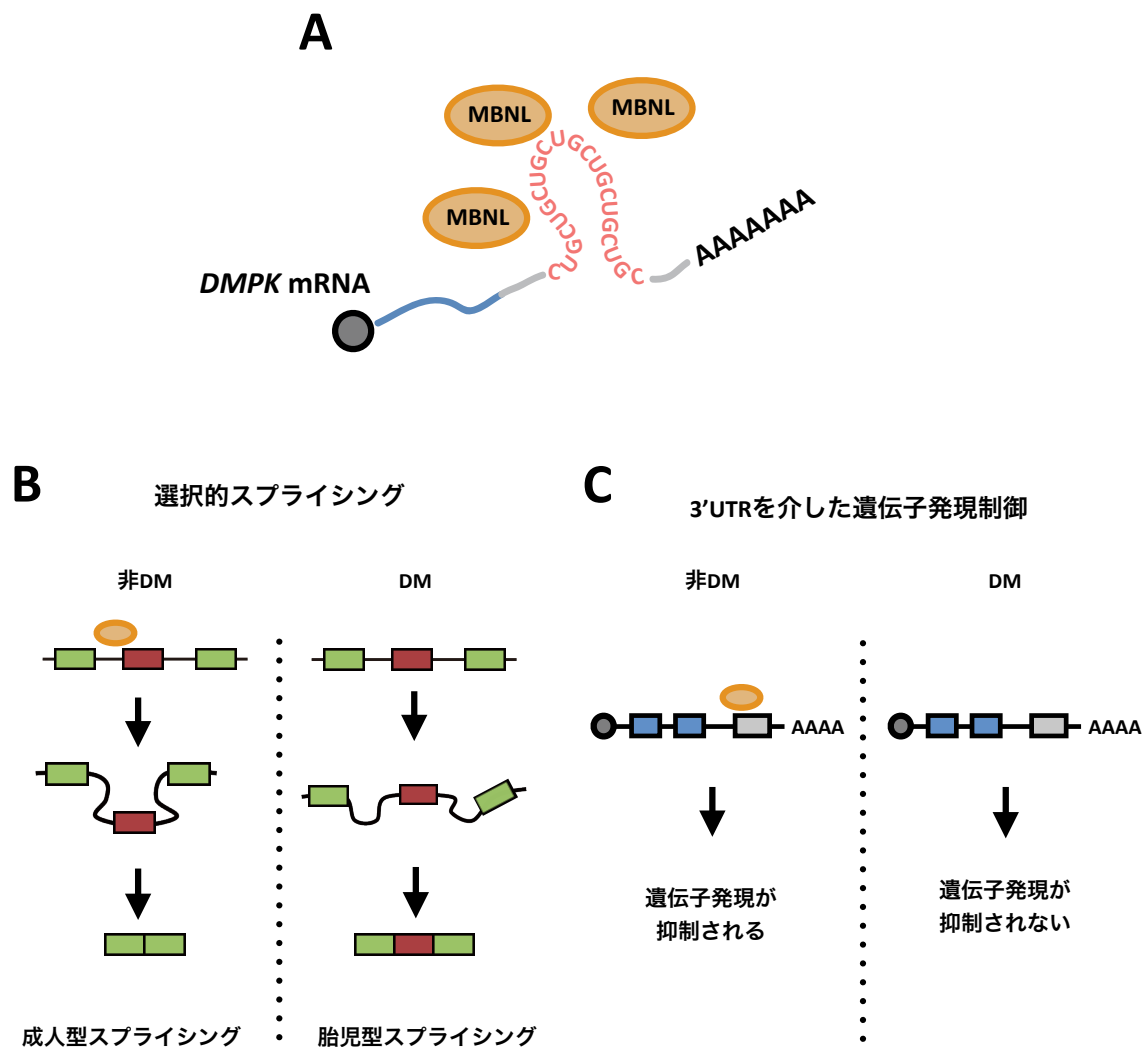


図4 本研究のまとめ

- (A) DM1では、DMPK mRNAの異常伸長したCUGリピートにRNA結合タンパク質であるMBNL1が捕捉され、機能を奪われている。
- (B) MBNL1が選択的スプライシングの制御に関わる。DMでは、MBNL1の機能が低下するため、多くの遺伝子で異常スプライシングが生じる。筋強直はClcn1の選択的スプライシング異常によって生じる。第一章では、Clcn1の選択的スプライシング異常を改善する低分子化合物を探索し、manumycin Aを発見した。
- (C) MBNL1は3'UTRに結合することで、遺伝子発現を制御する。第二章では、レポーターベクターを用いてMBNL1の遺伝子発現制御機構について解析を行った。

5. 参考文献

- 1 Harper, P. Myotonic dystrophy. 3WB Saunders. London, UKrd edn (2001).
- 2 Ranum, L. P. & Day, J. W. Myotonic dystrophy: clinical and molecular parallels between myotonic dystrophy type 1 and type 2. *Curr Neurol Neurosci Rep* 2, 465-470 (2002).
- 3 Ranum, L. P. & Day, J. W. Myotonic dystrophy: RNA pathogenesis comes into focus. *Am J Hum Genet* 74, 793-804, doi:10.1086/383590 (2004).
- 4 Ranum, L. P. & Cooper, T. A. RNA-mediated neuromuscular disorders. *Annu Rev Neurosci* 29, 259-277, doi:10.1146/annurev.neuro.29.051605.113014 (2006).
- 5 Aslanidis, C. et al. Cloning of the essential myotonic dystrophy region and mapping of the putative defect. *Nature* 355, 548-551, doi:10.1038/355548a0 (1992).
- 6 Brook, J. D. et al. Molecular basis of myotonic dystrophy: expansion of a trinucleotide (CTG) repeat at the 3' end of a transcript encoding a protein kinase family member. *Cell* 69, 385 (1992).
- 7 Mahadevan, M. et al. Myotonic dystrophy mutation: an unstable CTG repeat in the 3' untranslated region of the gene. *Science* 255, 1253-1255 (1992).
- 8 Fu, Y. H. et al. Decreased expression of myotonin-protein kinase messenger RNA and protein in adult form of myotonic dystrophy. *Science* 260, 235-238 (1993).
- 9 Jansen, G. et al. Abnormal myotonic dystrophy protein kinase levels produce only mild myopathy in mice. *Nat Genet* 13, 316-324, doi:10.1038/ng0796-316 (1996).
- 10 Reddy, S. et al. Mice lacking the myotonic dystrophy protein kinase develop a late onset progressive myopathy. *Nat Genet* 13, 325-335, doi:10.1038/ng0796-325 (1996).
- 11 Berul, C. I. et al. DMPK dosage alterations result in atrioventricular conduction abnormalities in a mouse myotonic dystrophy model. *J Clin Invest* 103, R1-7, doi: 10.1172/JCI5346 (1999).
- 12 Alwazzan, M., Newman, E., Hamshere, M. G. & Brook, J. D. Myotonic dystrophy is associated with a reduced level of RNA from the DMWD allele adjacent to the expanded repeat. *Hum Mol Genet* 8, 1491-1497 (1999).
- 13 Eriksson, M., Ansved, T., Edstrom, L., Anvret, M. & Carey, N. Simultaneous analysis of expression of the three myotonic dystrophy locus genes in adult skeletal muscle samples: the CTG expansion correlates inversely with DMPK and 59 expression levels, but not DMAHP levels. *Hum Mol Genet* 8, 1053-1060 (1999).
- 14 Hamshere, M. G., Newman, E. E., Alwazzan, M., Athwal, B. S. & Brook, J. D. Transcriptional abnormality in myotonic dystrophy affects DMPK but not neighboring genes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94, 7394-7399 (1997).
- 15 Frisch, R. et al. Effect of triplet repeat expansion on chromatin structure and expression of DMPK and neighboring genes, SIX5 and DMWD, in myotonic dystrophy. *Mol Genet Metab* 74, 281-291, doi:10.1006/mgme.2001.3229 (2001).

- 16 Klesert, T. R., Otten, A. D., Bird, T. D. & Tapscott, S. J. Trinucleotide repeat expansion at the myotonic dystrophy locus reduces expression of DMAHP. *Nat Genet* 16, 402-406, doi:10.1038/ng0897-402 (1997).
- 17 Thornton, C. A., Wymer, J. P., Simmons, Z., McClain, C. & Moxley, R. T., 3rd. Expansion of the myotonic dystrophy CTG repeat reduces expression of the flanking DMAHP gene. *Nat Genet* 16, 407-409, doi:10.1038/ng0897-407 (1997).
- 18 Klesert, T. R. et al. Mice deficient in Six5 develop cataracts: implications for myotonic dystrophy. *Nat Genet* 25, 105-109, doi:10.1038/75490 (2000).
- 19 Sarkar, P. S. et al. Heterozygous loss of Six5 in mice is sufficient to cause ocular cataracts. *Nat Genet* 25, 110-114, doi:10.1038/75500 (2000).
- 20 Wakimoto, H. et al. Characterization of cardiac conduction system abnormalities in mice with targeted disruption of Six5 gene. *J Interv Card Electrophysiol* 7, 127-135 (2002).
- 21 Personius, K. E., Nautiyal, J. & Reddy, S. Myotonia and muscle contractile properties in mice with SIX5 deficiency. *Muscle Nerve* 31, 503-505, doi:10.1002/mus.20239 (2005).
- 22 Liquori, C. L. et al. Myotonic dystrophy type 2 caused by a CCTG expansion in intron 1 of ZNF9. *Science* 293, 864-867, doi:10.1126/science.1062125 (2001).
- 23 Mankodi, A. et al. Myotonic dystrophy in transgenic mice expressing an expanded CUG repeat. *Science* 289, 1769-1773 (2000).
- 24 Napierala, M. & Krzyzosiak, W. J. CUG repeats present in myotonin kinase RNA form metastable "slippery" hairpins. *J Biol Chem* 272, 31079-31085 (1997).
- 25 Miller, J. W. et al. Recruitment of human muscleblind proteins to (CUG)(n) expansions associated with myotonic dystrophy. *EMBO J* 19, 4439-4448, doi:10.1093/emboj/19.17.4439 (2000).
- 26 Kino, Y. et al. Muscleblind protein, MBNL1/EXP, binds specifically to CHHG repeats. *Hum Mol Genet* 13, 495-507, doi:10.1093/hmg/ddh056 (2004).
- 27 Kanadia, R. N. et al. Reversal of RNA missplicing and myotonia after muscleblind overexpression in a mouse poly(CUG) model for myotonic dystrophy. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103, 11748-11753, doi:10.1073/pnas.0604970103 (2006).
- 28 Timchenko, N. A. et al. RNA CUG repeats sequester CUGBP1 and alter protein levels and activity of CUGBP1. *J Biol Chem* 276, 7820-7826, doi:10.1074/jbc.M005960200 (2001).
- 29 Salisbury, E. et al. Expression of RNA CCUG repeats dysregulates translation and degradation of proteins in myotonic dystrophy 2 patients. *Am J Pathol* 175, 748-762, doi:10.2353/ajpath.2009.090047 (2009).
- 30 Pascual, M., Vicente, M., Monferrer, L. & Artero, R. The Muscleblind family of proteins: an emerging class of regulators of developmentally programmed alternative splicing. *Differentiation* 74, 65-80, doi:10.1111/j.1432-0436.2006.00060.x (2006).

- 31 Ladd, A. N., Charlet, N. & Cooper, T. A. The CELF family of RNA binding proteins is implicated in cell-specific and developmentally regulated alternative splicing. *Mol Cell Biol* 21, 1285-1296, doi:10.1128/MCB.21.4.1285-1296.2001 (2001).
- 32 Ladd, A. N., Stenberg, M. G., Swanson, M. S. & Cooper, T. A. Dynamic balance between activation and repression regulates pre-mRNA alternative splicing during heart development. *Dev Dyn* 233, 783-793, doi:10.1002/dvdy.20382 (2005).
- 33 Lin, X. et al. Failure of MBNL1-dependent post-natal splicing transitions in myotonic dystrophy. *Hum Mol Genet* 15, 2087-2097, doi:10.1093/hmg/ddl132 (2006).
- 34 Osborne, R. J. & Thornton, C. A. RNA-dominant diseases. *Hum Mol Genet* 15 Spec No 2, R162-169, doi:10.1093/hmg/ddl181 (2006).
- 35 Kalsotra, A. et al. A postnatal switch of CELF and MBNL proteins reprograms alternative splicing in the developing heart. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105, 20333-20338, doi:10.1073/pnas.0809045105 (2008).
- 36 Du, H. et al. Aberrant alternative splicing and extracellular matrix gene expression in mouse models of myotonic dystrophy. *Nat Struct Mol Biol* 17, 187-193, doi:10.1038/nsmbl.1720 (2010).
- 37 Charizanis, K. et al. Muscleblind-like 2-mediated alternative splicing in the developing brain and dysregulation in myotonic dystrophy. *Neuron* 75, 437-450, doi:10.1016/j.neuron.2012.05.029 (2012).
- 38 Wang, E. T. et al. Transcriptome-wide regulation of pre-mRNA splicing and mRNA localization by muscleblind proteins. *Cell* 150, 710-724, doi:10.1016/j.cell.2012.06.041 (2012).
- 39 Masuda, A. et al. CUGBP1 and MBNL1 preferentially bind to 3' UTRs and facilitate mRNA decay. *Sci Rep* 2, 209, doi:10.1038/srep00209 (2012).
- 40 Poulos, M. G. et al. Progressive impairment of muscle regeneration in muscleblind-like 3 isoform knockout mice. *Hum Mol Genet* 22, 3547-3558, doi:10.1093/hmg/ddt209 (2013).
- 41 Timchenko, N. A., Welm, A. L., Lu, X. & Timchenko, L. T. CUG repeat binding protein (CUGBP1) interacts with the 5' region of C/EBPbeta mRNA and regulates translation of C/EBPbeta isoforms. *Nucleic Acids Res* 27, 4517-4525 (1999).
- 42 Zhang, L., Lee, J. E., Wilusz, J. & Wilusz, C. J. The RNA-binding protein CUGBP1 regulates stability of tumor necrosis factor mRNA in muscle cells: implications for myotonic dystrophy. *J Biol Chem* 283, 22457-22463, doi:10.1074/jbc.M802803200 (2008).
- 43 Lee, J. E., Lee, J. Y., Wilusz, J., Tian, B. & Wilusz, C. J. Systematic analysis of cis-elements in unstable mRNAs demonstrates that CUGBP1 is a key regulator of mRNA decay in muscle cells. *PLoS One* 5, e11201, doi:10.1371/journal.pone.0011201 (2010).
- 44 Oana, K. et al. Manumycin A corrects aberrant splicing of Clcn1 in myotonic dystrophy type 1 (DM1) mice. *Sci Rep* 3, 2142, doi:10.1038/srep02142 (2013).

- 45 Nakamori, M. et al. Splicing biomarkers of disease severity in myotonic dystrophy. *Ann Neurol* 74, 862-872, doi:10.1002/ana.23992 (2013).
- 46 Perfetti, A. et al. Genome wide identification of aberrant alternative splicing events in myotonic dystrophy type 2. *PLoS One* 9, e93983, doi:10.1371/journal.pone.0093983 (2014).
- 47 Charlet, B. N. et al. Loss of the muscle-specific chloride channel in type 1 myotonic dystrophy due to misregulated alternative splicing. *Mol Cell* 10, 45-53 (2002).
- 48 Mankodi, A. et al. Expanded CUG repeats trigger aberrant splicing of CIC-1 chloride channel pre-mRNA and hyperexcitability of skeletal muscle in myotonic dystrophy. *Mol Cell* 10, 35-44 (2002).
- 49 Wheeler, T. M., Lueck, J. D., Swanson, M. S., Dirksen, R. T. & Thornton, C. A. Correction of CIC-1 splicing eliminates chloride channelopathy and myotonia in mouse models of myotonic dystrophy. *J Clin Invest* 117, 3952-3957, doi:10.1172/JCI33355 (2007).
- 50 Savkur, R. S., Philips, A. V. & Cooper, T. A. Aberrant regulation of insulin receptor alternative splicing is associated with insulin resistance in myotonic dystrophy. *Nat Genet* 29, 40-47, doi:10.1038/ng704 (2001).
- 51 Philips, A. V., Timchenko, L. T. & Cooper, T. A. Disruption of splicing regulated by a CUG-binding protein in myotonic dystrophy. *Science* 280, 737-741 (1998).
- 52 Fugier, C. et al. Misregulated alternative splicing of BIN1 is associated with T tubule alterations and muscle weakness in myotonic dystrophy. *Nat Med* 17, 720-725, doi:10.1038/nm.2374 (2011).
- 53 Lueck, J. D. et al. Chloride channelopathy in myotonic dystrophy resulting from loss of posttranscriptional regulation for CLCN1. *Am J Physiol Cell Physiol* 292, C1291-1297, doi:10.1152/ajpcell.00336.2006 (2007).
- 54 Lewis, B. P., Green, R. E. & Brenner, S. E. Evidence for the widespread coupling of alternative splicing and nonsense-mediated mRNA decay in humans. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100, 189-192, doi:10.1073/pnas.0136770100 (2003).
- 55 Lamba, J. K. et al. Nonsense mediated decay downregulates conserved alternatively spliced ABCC4 transcripts bearing nonsense codons. *Hum Mol Genet* 12, 99-109 (2003).
- 56 Wollerton, M. C., Gooding, C., Wagner, E. J., Garcia-Blanco, M. A. & Smith, C. W. Autoregulation of polypyrimidine tract binding protein by alternative splicing leading to nonsense-mediated decay. *Mol Cell* 13, 91-100 (2004).
- 57 Wheeler, T. M. et al. Targeting nuclear RNA for in vivo correction of myotonic dystrophy. *Nature* 488, 111-115, doi:10.1038/nature11362 (2012).
- 58 Koebis, M. et al. Ultrasound-enhanced delivery of morpholino with Bubble liposomes ameliorates the myotonia of myotonic dystrophy model mice. *Sci Rep* 3, 2242, doi:10.1038/srep02242 (2013).

- 59 Wheeler, T. M. et al. Reversal of RNA dominance by displacement of protein sequestered on triplet repeat RNA. *Science* 325, 336-339, doi:10.1126/science.1173110 (2009).
- 60 Gareiss, P. C. et al. Dynamic combinatorial selection of molecules capable of inhibiting the (CUG) repeat RNA-MBNL1 interaction in vitro: discovery of lead compounds targeting myotonic dystrophy (DM1). *J Am Chem Soc* 130, 16254-16261, doi:10.1021/ja804398y (2008).
- 61 Warf, M. B., Nakamori, M., Matthys, C. M., Thornton, C. A. & Berglund, J. A. Pentamidine reverses the splicing defects associated with myotonic dystrophy. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106, 18551-18556, doi:10.1073/pnas.0903234106 (2009).
- 62 Arambula, J. F., Ramisetty, S. R., Baranger, A. M. & Zimmerman, S. C. A simple ligand that selectively targets CUG trinucleotide repeats and inhibits MBNL protein binding. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106, 16068-16073, doi:10.1073/pnas.0901824106 (2009).
- 63 Kino, Y. et al. MBNL and CELF proteins regulate alternative splicing of the skeletal muscle chloride channel CLCN1. *Nucleic Acids Res* 37, 6477-6490, doi:10.1093/nar/gkp681 (2009).
- 64 Ward, A. J., Rimer, M., Killian, J. M., Dowling, J. J. & Cooper, T. A. CUGBP1 overexpression in mouse skeletal muscle reproduces features of myotonic dystrophy type 1. *Hum Mol Genet* 19, 3614-3622, doi:10.1093/hmg/ddq277 (2010).
- 65 Hara, M. et al. Identification of Ras farnesyltransferase inhibitors by microbial screening. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90, 2281-2285 (1993).
- 66 Pan, Q., Shai, O., Lee, L. J., Frey, B. J. & Blencowe, B. J. Deep surveying of alternative splicing complexity in the human transcriptome by high-throughput sequencing. *Nat Genet* 40, 1413-1415, doi:10.1038/ng.259 (2008).
- 67 Kalsotra, A. & Cooper, T. A. Functional consequences of developmentally regulated alternative splicing. *Nat Rev Genet* 12, 715-729, doi:10.1038/nrg3052 (2011).
- 68 Kuroyanagi, H., Kobayashi, T., Mitani, S. & Hagiwara, M. Transgenic alternative-splicing reporters reveal tissue-specific expression profiles and regulation mechanisms in vivo. *Nat Methods* 3, 909-915, doi:10.1038/nmeth944 (2006).
- 69 Nasim, M. T. & Eperon, I. C. A double-reporter splicing assay for determining splicing efficiency in mammalian cells. *Nat Protoc* 1, 1022-1028, doi:10.1038/nprot.2006.148 (2006).
- 70 Weg-Remers, S., Ponta, H., Herrlich, P. & Konig, H. Regulation of alternative pre-mRNA splicing by the ERK MAP-kinase pathway. *EMBO J* 20, 4194-4203, doi:10.1093/emboj/20.15.4194 (2001).
- 71 Blaustein, M. et al. Concerted regulation of nuclear and cytoplasmic activities of SR proteins by AKT. *Nat Struct Mol Biol* 12, 1037-1044, doi:10.1038/nsmb1020 (2005).
- 72 Ip, J. Y. et al. Global impact of RNA polymerase II elongation inhibition on alternative splicing regulation. *Genome Res* 21, 390-401, doi:10.1101/gr.111070.110 (2011).
- 73 Nakamura, T. et al. Splicing of human chloride channel 1. *Biochemistry and Biophysics Reports* (2015).

- 74 Bardouille, C., Vullhorst, D. & Jockusch, H. Expression of chloride channel 1 mRNA in cultured myogenic cells: a marker of myotube maturation. *FEBS Lett* 396, 177-180 (1996).
- 75 O'Leary, D. A. et al. HTS-Compatible Patient-Derived Cell-Based Assay to Identify Small Molecule Modulators of Aberrant Splicing in Myotonic Dystrophy Type 1. *Curr Chem Genomics* 4, 9-18, doi:10.2174/1875397301004010009 (2010).
- 76 Zu, T. et al. Non-ATG-initiated translation directed by microsatellite expansions. *Proc Natl Acad Sci U S A* 108, 260-265, doi:10.1073/pnas.1013343108 (2011).
- 77 Gambardella, S. et al. Overexpression of microRNA-206 in the skeletal muscle from myotonic dystrophy type 1 patients. *J Transl Med* 8, 48, doi:10.1186/1479-5876-8-48 (2010).
- 78 Perbellini, R. et al. Dysregulation and cellular mislocalization of specific miRNAs in myotonic dystrophy type 1. *Neuromuscul Disord* 21, 81-88, doi:10.1016/j.nmd.2010.11.012 (2011).
- 79 Rau, F. et al. Misregulation of miR-1 processing is associated with heart defects in myotonic dystrophy. *Nat Struct Mol Biol* 18, 840-845, doi:10.1038/nsmb.2067 (2011).
- 80 Latronico, M. V. & Condorelli, G. MicroRNAs and cardiac pathology. *Nat Rev Cardiol* 6, 419-429, doi:10.1038/nrcardio.2009.56 (2009).
- 81 van Rooij, E., Liu, N. & Olson, E. N. MicroRNAs flex their muscles. *Trends Genet* 24, 159-166, doi:10.1016/j.tig.2008.01.007 (2008).
- 82 Mignone, F., Gissi, C., Liuni, S. & Pesole, G. Untranslated regions of mRNAs. *Genome Biol* 3, REVIEWS0004 (2002).
- 83 Kino, Y. et al. Nuclear localization of MBNL1: splicing-mediated autoregulation and repression of repeat-derived aberrant proteins. *Hum Mol Genet* 24, 740-756, doi:10.1093/hmg/ddu492 (2015).
- 84 Botta, A. et al. MBNL142 and MBNL143 gene isoforms, overexpressed in DM1-patient muscle, encode for nuclear proteins interacting with Src family kinases. *Cell Death Dis* 4, e770, doi:10.1038/cddis.2013.291 (2013).
- 85 Chen, C. Y. & Shyu, A. B. Mechanisms of deadenylation-dependent decay. *Wiley Interdiscip Rev RNA* 2, 167-183, doi:10.1002/wrna.40 (2011).
- 86 Schoenberg, D. R. & Maquat, L. E. Regulation of cytoplasmic mRNA decay. *Nat Rev Genet* 13, 246-259, doi:10.1038/nrg3160 (2012).
- 87 Fardaei, M. et al. Three proteins, MBNL, MBLL and MBXL, co-localize in vivo with nuclear foci of expanded-repeat transcripts in DM1 and DM2 cells. *Hum Mol Genet* 11, 805-814 (2002).
- 88 Kanadia, R. N. et al. Developmental expression of mouse muscleblind genes Mbnl1, Mbnl2 and Mbnl3. *Gene Expr Patterns* 3, 459-462 (2003).

謝辞

本研究は数多くの方々の協力や助言を頂いて遂行されました。国立精神・神経医療研究センターの方々には大変お世話になりました。武田伸一所長には、低分子化合物のライブラリーをご供与頂きました。また、疾病研究第一部 西野一三部長には実験設備を使用させて頂き、DM患者の培養細胞を用いた研究を行わせて頂きました。また、野口悟室長、小川恵研究助手には実験を行う際に大変お世話になりました。さらに、小澤鉄二郎名誉所長には、新小平での研究生活を刺激的なものにして頂きました。厚く御礼申し上げます。

DMについて研究している他の研究者の方々にも大変お世話になりました。DM1モデルマウスのHSA^{LR}マウスはロチェスター大学のCharles A. Thornton教授と大阪大学の高橋正紀講師によりご供与頂きました。心より感謝申し上げます。

また、東京大学学内の方々にも大変お世話になりました。ポリソーム分画の実験を行うあたり、現名古屋大学 元村一基博士には多くの助言を頂きました。東京大学 太田邦史教授にはスクロースグラジエント作製装置やポリソーム分画装置の使用を快諾頂きました。さらに、太田研究室の三木敦子さんにはポリソーム分画を行う際に大変お世話になりました。大変感謝しております。

指導教員である東京大学 石浦章一教授には、学部4年生の頃から6年間もの長い間ご指導賜りました。心より感謝申し上げます。石浦研究室のOBの方々にも数多の協力や助言を頂きました。埼玉医科大学 大間陽子講師には、石浦研究室に来て、右も左も分からない私を親切に指導していただきました。埼玉医科大学 周防諭講師と東海大学 三橋弘明講師には、何度も研究で貴重な助言を頂きました。重ねて御礼申し上げます。

また、石浦研究室でDM研究の先輩である東京大学 古戎道典助教、東京大学 趙一夢助教、東京大学 吉田奈摘 特任助教には、実験の進め方や研究の議論などで大変お世話になりました。私がこの6年間を日々楽しく過ごせたのは石浦研究室で研究生活を共にした先輩や後輩たちのおかげです。本当に楽しかったです。

最後に常日頃支えてくれた家族にも心から感謝しています。

みなさん、どうもありがとうございました。