

東京大学大学院総合文化研究科博士学位論文

*ABLIM1* の選択的スプライシング分子機構  
の解析

Molecular mechanism of *ABLIM1*  
alternative splicing

東京大学大学院 総合文化研究科  
広域科学専攻 生命環境科学系 石浦研究室

大澤 奈摘

## 目次

略語	2
第 1 章 序論	5
第 2 章 材料と方法	15
第 3 章 結果	33
第 4 章 考察	61
第 5 章 参考文献	67
謝辞	80

## 略字

aa	amino acid
ABLM1	actin binding LIM domain 1 (1 から 3 までである)
ATP2A1	sarcoplasmic/endoplasmic reticulum Ca <sup>2+</sup> -ATPase
BIN1	bridging integrator 1
Cav1.1	L-type Ca <sup>2+</sup> channel and voltage sensor
cDNA	complementary DNA
CELF	CUG-BP and ETR-3 like factor (1 から 6 までである)
CLCN1	chloride channel 1
CLIP-seq	cross-linked immunoprecipitation followed by next generation sequencing
CNBP/ZNF9	CCHC-type zinc finger and nucleic acid binding protein
DM	myotonic dystrophy
DM1/2	myotonic dystrophy type 1/2
DMPK	dystrophia myotonica protein kinase
DNA	deoxyribonucleic acid
ex	exon
F-actin	F-アクチン (アクチンフィラメント)
FN1	fibronectin 1
FOX1	fox-1 homolog (C. elegans) 1
GFP	green fluorescent protein
GRIN1	glutamate receptor, ionotropic, N-methyl D-aspartate 1
GSK3β	glycogen synthase kinase 3 beta (セリン/スレオニンリン酸化酵素の 1 つ)
hnRNP H	heterogeneous nuclear ribonucleoprotein H1 (H)
<i>HSA</i> <sup>LR</sup>	ヒト骨格筋アクチン ( <u>H</u> uman <u>S</u> keletal <u>A</u> ctin) 3'-UTR に伸長した CUG リピート ( <u>L</u> ong <u>R</u> epeat) を持つトランスジェニックマウス
INSR	insulin receptor
MAPT	microtubule-associated protein tau
MBNL	muscleblind-like (1 から 3 までである)
miR	micro ribonucleic acid

MYOM1	myomesin 1
mRNA	messenger ribonucleic acid
NMD	nonsense-mediated mRNA decay
nt	nucleotide
PCR	polymerase chain reaction
PDLIM3/ALP	PDZ and LIM domain 3/ $\alpha$ -actinin-associated LIM protein
PKA	protein kinase A
PKC	protein kinase C
PTBP1	polypyrimidine tract binding protein 1
qPCR	quantitative polymerase chain reaction = リアルタイム PCR
RFP	red fluorescent protein
RAN-translation	Repeat Associated Non-ATG translation (リピート配列による ATG 非依存的な翻訳)
RNA	ribonucleic acid
RT-PCR	reverse transcription-polymerase chain reaction
SCA8	spinocerebellar ataxia type 8
SRC	SRC proto-oncogene, non-receptor tyrosine kinase
Staufen1	staufen double-stranded RNA binding protein 1
TNNT2/cTNT	troponin T type 2 (cardiac)
UNC-115	ABLIM1 の線虫のホモログ
3'-UTR	3'-untranslated region
Nucleotides	
A	adenine
C	cytosine
G	guanine
T	thymine
U	uridine

コドン表（アミノ酸 1 文字表記、3 文字表記、カタカナ表記）

本文で登場する塩基配列とそれに対応するアミノ酸のみ記載。

最終ページに全てのコドン表を記載。

CAG	Q	Gln	グルタミン
AGC	S	Ser	セリン
GCA/GCC	A	Ala	アラニン

CUG	L	Leu	ロイシン
CCU	P	Pro	プロリン
TGC	C	Cys	システイン

#### 試薬類の略語

2-ME	2-mercaptoethanol
Amp	ampicillin
APS	ammonium persulfate
BSA	bovine serum albumin
CIA	chloroform+isoamylalcohol
DNase	deoxyribonuclease
EDTA	ethylenediaminetetraacetic acid
EtBr	ethidium bromide
IPTG	isopropyl thio- $\beta$ -galactoside
NP-40	nonidet-40
PBS	phosphate-buffered saline
PCI	phenol+chloroform+isoamylalcohol
PIM	protease inhibitor mix
PMSF	phenylmethanesulfonyl fluoride
PVDF	polyvinylidene difluoride
RNase	ribonuclease
SDS	sodium dodecyl sulfate
TAE	Tris+acetic acid+EDTA
TEMED	<i>N, N, N', N'</i> -tetramethylethylenediamine
TBE	Tris+boric acid+EDTA
Tris	hydroxymethyl aminomethane
X-gal	5-bromo-4-chloro-3-indolyl- $\beta$ -D-galactoside
Fw	forward
PAGE	polyacrylamide gel electrophoresis
Rv	reverse

# 第 1 章 序論

## はじめに

本研究では、筋強直性ジストロフィー(DM)症状の主原因と考えられる選択的スプライシング異常に着目し、新たに *ABLIM1* exon 11 の選択的スプライシング異常を DM 患者の骨格筋より同定した。さらに *ABLIM1* exon 11 のスプライシングの分子機構を解析することで、DM 患者で異常を示しているスプライシング因子を探索することを目的として研究を行ったところ、DM モデルマウスにおいて、新たに PTBP1 のタンパク質発現量が上昇しており、これがスプライシング異常に関与していることを発見した。

## 1.1 筋強直性ジストロフィー (DM) の病態

筋強直性ジストロフィー(*Dystrophia Myotonica*: DM)は、常染色体優性遺伝し、成人の遺伝性筋疾患の中で最も多くの患者を有し、8 千人あたり 1 人程度が発症する(Meola *et al.* 2014)。症状としては、筋萎縮にともなう筋力低下、筋肉の弛緩が困難な筋強直といった骨格筋の症状のほかに、白内障、心伝導障害に伴う不整脈、インスリン耐性による糖尿病、消化器の平滑筋障害、脱毛、男性の性腺機能低下、知能障害、睡眠障害、肺換気障害、内分泌異常による免疫系異常など、全身にわたって見られる。発症年齢の違いや個人によって、見られる症状は様々で、一人の患者がこれら全ての症状を呈するわけではない(Harper 2001)。また、DM の組織学的特長は、筋線維の太さが均一ではなく大小不同で、他の筋ジストロフィーに見られる筋線維の壊死と再生はあまり見られないこと、核が筋線維表面ではなく中心部に多く見られ(中心核)、核の数も多くなっていることである。筋収縮の妨げとなる核は分化中に、中心部から表面に移動するため、筋分化の遅延または脱分化が促進されていると考えられる。また核の増加は、何らかの原因で筋衛星細胞が増加したためだと考えられているが、それらの詳細は分かっていない。また、Type I の筋線維(遅筋)の小径化(萎縮)が見られるが、進行例だと Type I 線維優位となる。これら組織学的な異常も発症年齢の違いなどで見え方が異なる(埜中ら 2005)。

## 1.2 DM の責任遺伝子

DM にはタイプ 1 (DM1) とタイプ 2 (DM2) が報告されており、それぞれ 19q13.3 にある DM protein kinase (*DMPK*) 遺伝子の 3' 非翻訳領域(3'-UTR)に CTG リピート配列が

50-4000 程度伸長すること、3q21 にある CCHC-type zinc finger and nucleic acid binding protein (*CNBP/ZNF9*) 遺伝子の intron 1 に CCTG リピート配列が 75-11000 程度伸長することが、発症の原因である(Brook *et al.* 1992, Mahadevan *et al.* 1992, Fu *et al.* 1993, Liquori *et al.* 2001)。DM1 は世界中に広く患者がいるが、DM2 はヨーロッパで患者が多く、日本では 1 例のみの報告しかなく、正確な発症率はまだ分かっていない。この 2 つの型には多くの類似した症状が見られるが、DM1 では主に遠位筋が、DM2 では近位筋が侵されやすく、先天性の DM 患者は DM1 ではいるが、DM2 では 8 歳以上でしか発症例がないため、いない。また、DM1 は他のリピート病と同様に表現促進現象が見られ、世代を経るごとにリピート数が増え、症状が重篤化し、発症年齢が低下することが知られているが(Mahadevan *et al.* 1992)、DM2 では世代を経るとリピートが短くなることが多く、表現促進現象は見られない(Day *et al.* 2003)。このような違いは、DM1 と DM2 でリピートのゲノム上の位置やリピートの配列が多少異なることが引き起こしていると考えられる。しかし、どちらの DM においても、体細胞のリピート数はモザイク性を示すことが知られており、伸長した CTG 又は CCTG リピートは不安定性が高いことが分かる(Bachinski *et al.* 2009, Bachinski *et al.* 2003, Liquori *et al.* 2001, Monckton *et al.* 1995)。このリピートの不安定性の要因などはまだよく分かっていない。

また近年、伸長したリピート部分には異なる配列のリピートが挿入されている患者がおり(Braida *et al.* 2010, Leeflang *et al.* 1995, Musova *et al.* 2009, Santoro *et al.* 2013)、DM1 では伸長した CTG リピートの配列の中に他のリピートが含まれていると、症状が軽症なことが報告されている(Musova *et al.* 2009)。また、伸長していない CCTG リピート内には GCTG、TCTG、ACTG のモチーフが 1 つ以上含まれているが、DM2 で見られる異常に伸長した CCTG リピートにはこれらモチーフが含まれず、純粋な CCTG リピートであることが報告されている(Bachinski *et al.* 2009, Bachinski *et al.* 2003, Liquori *et al.* 2001)。以上のことから、伸長した純粋なリピート配列中に異なる配列などが挿入されていると、症状は緩和することが考えられる。

### 1.3 発症機構と RNA 獲得仮説

DM の発症機構としては、RNA に転写されたリピート RNA が毒性を示し各種の症状を引き起こすという「RNA 機能獲得仮説」が有力である。責任遺伝子の非翻訳領域の CTG/CCTG リピートが伸長することで発症すること、また優性遺伝することなどから、この仮説が提唱され、患者の細胞やモデルマウスなどで確かめられている。DM1/2 の患者由来の培養細胞や筋組織では、CUG/CCUG リピートの凝集体が核内に形成されていることが

示されており、その凝集体には様々な RNA 結合タンパク質が捕捉されていることが確認されている(Taneja *et al.*, Davis *et al.* 1997, Liquori *et al.* 2001)。また、伸長した CUG リピートを骨格筋で発現するトランスジェニックマウス *HSA<sup>LR</sup>* において、DM 患者で見られるミオトニアや筋組織の異常を示すことから、伸長したリピート RNA が発症の原因であることが示されている(Mankodi *et al.* 2000)。

伸長したリピート RNA がどのような分子的な異常を示すのか現在までに分かっていることを図 1.1 にまとめた。図 1.1 のように DM での分子異常の径路には、複数あることが考えられており、大きく分けて次の 2 つがある。

- 1) RNA 結合タンパク質の異常による、
  - 1-1) 選択的スプライシングの異常
  - 1-2) miRNA 制御の異常
  - 1-3) 翻訳制御の異常
- 2) アンチセンスリピート RNA による、  
ATG 非依存的な翻訳によってできるタンパク質毒性



## 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<sup>ΔE3/ΔE3</sup> (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<sup>-/-</sup>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<sup>LR</sup>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<sup>Δ2/Δ2</sup> 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 $\beta$  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*<sup>LR</sup> 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はいるものの、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, Ca<sup>2+</sup> transporting, cardiac muscle, fast

twitch 1 (*ATP2A1*) (Kimura *et al.* 2005)、L-type  $\text{Ca}^{2+}$  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)、 $\alpha$ -actinin SM (Southby *et al.* 1999)、 $\alpha$ -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 (*ABLIM1*) について

*ABLIM1*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。

## 第 2 章 材料と方法

### 2.1 材料

#### 2.1.1 患者の筋生検

DM1 患者 10 名と non-DM (Control) 患者 10 名の筋生検を用いた。この筋生検は上腕二等筋、大腿四頭筋から、インフォームドコンセントを得て採取されたもので、DM1 患者はリピートの伸長が確認されており、non-DM 患者は、患者本人は何らかの病識はあるものの、DM ではないことが確認されている。すべての DM1 患者には筋力低下と筋強直が認められており、詳細な異常は表 2.1 にまとめた。他の筋ジストロフィーに比べ、筋線維の脂肪化、繊維化、壊死と再生は乏しいが、発症より時間が経つと中心核が現れるなどの幼若筋のような特徴を示す。また、ヘマトキシリン&エオシン染色された筋組織 (non-DM 患者 1 名、DM1 患者 6 名) も載せる (図 2.1)。

以上の筋生検、染色された筋組織は国立精神・神経医療研究センター神経研究所疾病研究第一部部長の西野一三博士に分譲していただいた。

#### 2.1.2 トランスジェニックマウス (DM1 モデルマウス)

*HSA*<sup>LR</sup> マウスは、University of Rochester の Charles A. Thornton 教授の研究室で作製されたトランスジェニックマウスであり (Mankodi *et al.* 2000)、大阪大学大学院医学系研究科の高橋正紀助教の研究室を経て、当研究室に導入された。*HSA*<sup>LR</sup> マウスは、ヒト骨格筋アクチン (*HSA*) プロモーターの制御下で、3-UTR に (CTG)<sub>250</sub> をもつ *HSA* 遺伝子をホモ接合で持っている。交配の過程で CTG リピートが縮小する傾向があり、本研究で用いたマウスはおよそ 170 ~ 200 リピートを保持していた。野生型としては FVBn/Jcl (日本クレア株式会社) を用いた。動物実験に際しては、「東京大学動物実験実施マニュアル」を遵守した。

表 2.1. 筋生検の情報

疾患	患者 No.	年齢	性別	DMPK 3'UTR リピート伸長	発症 年齢	特徴的な症状	脂肪 化	線維化	中心 核	再生	type1 線維優 性	type 1 線維萎 縮
DM1	DM-1	7 ヶ月	女	伸長+	先天性	Type1 線維優性	-	-	-	-	-	-
	DM-2	8 ヶ月	男	1567 リピート	先天性		-	minimal	-	-	50-60%	+
	DM-3	2 歳	男	1400 リピート	先天性		mild	-	a few	-	-	+
	DM-4	4 歳	女	1900 リピート	先天性		-	minimal	some	-	-	+
	DM-5	11 歳	男	伸長+	10 歳	Type1 線維優性, 糖尿病	-	-	a few	-	-	-
	DM-6	31 歳	男	伸長+	17 歳		mild	mild	many	1~2%	80%	-
	DM-7	8 ヶ月	女	1400 リピート	先天性							
	DM-8	2 歳	男	伸長+	先天性							
	DM-9	11 ヶ月	男	伸長+	先天性							
	DM-10	8 ヶ月	男	1900 リピート	先天性							
non-DM (Control)	C-1	8 ヶ月	男	正常	-	正常	-	-	-	-	-	-
	C-2	2 歳	男			正常						
	C-3	2 ヶ月	男			若干の筋萎縮						
	C-4	4 歳	男			Type2 線維のみ萎縮						
	C-5	11.5 歳	男			正常						
	C-6	31 歳	女			若干の筋萎縮						
	C-7	8 ヶ月	女									
	C-8	1 歳	男									
	C-9	2 歳	男									
	C-10	11 ヶ月	女									

DMPK 3'UTR リピート伸長: 伸長+は CTG リピートの伸長を確認済。正常は CTG リピートの伸長が検出されなかった

### 2.1.3 培養細胞

- ・ ヒト胎児由来腎臓培養細胞：HEK293 細胞
- ・ ヒト子宮頸部腫瘍細胞：HeLa 細胞
- ・ ヒト神経芽腫細胞：SH-SY5Y 細胞
- ・ マウス筋芽細胞：C2C12 細胞

すべての細胞株は 37 °C、5% CO<sub>2</sub> の環境下で培養した。HEK293、HeLa、SH-SY5Y および C2C12 細胞はそれぞれ 10% および 20% の仔ウシ血清 (FBS、Life technologies) を加えた DMEM 培地 (Sigma) で培養した。また、それぞれの細胞株は細胞密度が 90 ~ 100 % (HEK293)、70 ~ 80 % (C2C12) コンフルエントに達した段階で、培養液を除いて PBS で洗い、2.5% トリプシン (Sigma) を加えて室温または 37°C で 3 ~ 5 分間、細胞の形が丸くなるまで放置し、ディッシュをたたいて細胞をはがした。37°C の DMEM 培地 (FBS 入り) を適当量 (10cm dish の場合 2 ml) 加えて細胞を懸濁し、約 10 分の 1 量を継代した。

### 2.1.4 コンストラクト (*ABLIM1* の minigene、スプライシング因子発現ベクター、DMPK リピート発現ベクター)

*ABLIM1* minigene は、pEGFP-C1 (Clontech) にヒト *ABLIM1* ゲノムの exon10 から exon 12 をインサートして作製した。その際、intron 10 と intron 11 が非常に長かったため、スプライシングへの影響が少ないと思われる intron の中間部分は削除した (図 3.6 参照)。まず始めに、ヒトから抽出したゲノム DNA から *PfuUltra*<sup>TM</sup> High-Fidelity DNA Polymerase (Stratagene) を用いて、3 か所 (exon 10-intron 10、intron 10-exon 11-intron 11、intron 11-exon 12) を増幅させた。次にそれぞれ *Bgl*II - *Sac*I、*Sac*I - *Eco*RI、*Eco*RI - *Kpn*I で処理して一つずつ pEGFP-C1 にインサートした。利用した primer は表 2.2 の *ABLIM1* minigene 1 ~ 3 である。この minigene コンストラクトはシーケンス解析をし、GFP 蛍光観察で培養細胞での発現を確認した。

スプライシング因子 (MBNL1、MBNL2、MBNL3、CELF1、CELF2、CELF3、CELF4、CELF5、CELF6、FOX1、PTBP1) は、pSecDK にクローニングしたものを利用した (Kino *et al.* 2009)。pSecDK は pSecTagA (Life technologies) より Igk chain leader sequence を取り除いたもので、C 末に Myc-tag と 6 x His-tag が付いており、Myc または His の抗体で検出して発現チェックを行った。FOX1 のみウェスタンブロットで検出できなかったため、qPCR で発現を確認した。その他のスプライシング因子 (hnRNP A1、hnRNP H) は pcDNA3.1/V5-His (Life technologies) にクローニングしたものを利用し (Sasabe *et al.* 2011)、発現チェックは V5 抗体で検出した。



DMPK リピートコンストラクトは、mRFP の後ろにヒト DMPK の最後の 2 つの exon が挿入されており、その 3'UTR に CTG リピートが 18 個 (DM18) または 480 個 (DM480) 入っているものを利用した(Kino *et al.* 2009)。また、リピートが 0 個の DM0 は DM18 を鋳型にして逆 PCR をかけて作製した。利用した primer は表 2.2 の DM0-Fw, Rv である。これらは制限酵素処理またはシーケンス解析を行い、RFP 蛍光観察によって培養細胞での発現を確認した。

表 2.2 Primer 配列

Primer 名		配列 5' → 3'	Annealing Temp.
ABLIM1 minigene 1	Fw	GAAGATCTGGCTCCACCGTTTGGC	60°C
	Rv	CGAGCTCCAAAACAGTCTGGTGAGGTC	
ABLIM1 minigene 2	Fw	CGAGCTCCAAAACAGTCTGGTGAGGTC	60°C
	Rv	GGAATTCTTCTTGCCTATGAGGCTGGATC	
ABLIM1 minigene 3	Fw	GGAATTCGGAGGCCATTGCAATAATCT	60°C
	Rv	GCGGTACCGATACTTACATAGATAGTATGACCT	
DM0	Fw	AAAGTCGACGGGGGATCACAGACCATTTC	65°C
	Rv	AAAGTCGACCATTCCCGGCTACAAGGACC	
ABLIM1_ex11 (9-13)	Fw	CAGCAGATGCAACCAGATGT	64°C
	Rv	TGTTTGTTCATCATAGCCCGA	
ABLIM1_ex4 (3-5)	Fw	ACTGCCATAAATGTGGGGAG	64°C
	Rv	GCACAGAGTTGACAAAGGCA	
SERCA1_ex22 (21-23)	Fw	ATCTTCAAGCTCCGGGCCCT	63.5°C
	Rv	CAGCTCTGCCTGAAGATGTG	
mouse ABLIM1_ex11 (9-14)	Fw	TCTGCAAGGTTCTACCGTGT	64°C
	Rv	TTCAGAGGAGGTCCTGGTG	
mouse SERCA1_ex22 (21-23)	Fw	ATCTTCAAGCTCCGGGCCCT	64°C
	Rv	CAGCTTTGGCTGAAGATGCA	
pEGFP	Fw	CATGGTCCTGCTGGAGTTCGTG	60°C
	Rv	GCAAGTAAAACCTCTACAAATGTGG	
PTBP1 (ex15)_qPCR	Fw	CGCAAGATGGCACTGATCCA	65°C
	Rv	CCTGCCTCTCTCTGGTGTGA	
GAPDH	Fw	GCCAAAAGGGTCATCATCTCT	65°C
	Rv	CATGCCAGTGAGCTTCCCGT	
FOX1_qPCR	Fw	ACGGCGTTGGTGCCATGAAT	62°C
pSecDK_qPCR	Rv	TCGACGGCGCTATTCAGATCC	
Mouse Rpl13a_qPCR	Fw	GGGCAGGTCTGGTATTGGAT	62°C
	Rv	GGCTCGGAAATGGTAGGGG	
Mouse Ptpb1_qPCR	Fw	TCTACCCAGTGACCCTGGAC	62°C
	Rv	GAGCTTGGAGAAGTCGATGC	

### 2.1.5 Stealth si RNAs

ノックダウン実験に利用した Stealth si RNAs (Life technologies) の配列は表 2.3 に記載する。Negative Control siRNA としては、GC 含量が低い用 (35-45%) の Stealth RNAi™ siRNA Negative Control Lo GC (45-2002) と中程度用 (45-55%) の Stealth RNAi™ siRNA Negative Control Med GC Duplex #2 (12935-112) の 2 種類を利用した。

また、ノックダウン効率はウェスタンブロットで確認した。なお、MBNL1 と CELF1 についてはヒト用の siRNA 配列であるが、マウスの Mbnl1、Celf1 と相溶性が高い配列では、ウェスタンブロットでマウス内在性の Mbnl1 と Celf1 がノックダウンできることを確認した。さらに、BLAST (NCBI) で調べた所、マウスでのオフターゲットになる配列もなかったので本実験で利用した。Celf2 と Ptbp1 においては、マウス用に作製された siRNA の配列である。

表 2.3 siRNA 配列

ターゲット遺伝子	No	siRNA 配列 5' → 3'	GC 含量	C2C12 KD 効率
MBNL1	HSS142882	GCUCCAGGGAGAACUGCAAAUAUCU	Med	強
	HSS142883	GCAGUUGGAGAUAAAUGGACGCAAU	Low	弱
CELF1	HSS173815	CCACUCUGUACAACCAGAAUCUUCU	Low	弱
	HSS173816	GGUCCAGAGGGAGCCAACCUGUUCA	High	強
	HSS116447	GGACAGAUUGAAGAAUGCCGGAUUAU	Low	強
Celf2	MSS204011	CCUUAUGGAGCUGUCUACCAGAUCA	Med	強
	MSS204012	GCUGGAGCCACUGUCGGAUUGAAUA	Med	強
Ptbp1	MSS276537	GGUGUGGUCAAAGGCUUCAAGUUCU	Med	強
	MSS276538	CAGUGCUUCGUGGACAGCCCAUCUA	High	中

## 2.2 方法

### 2.2.1 筋生検、マウス筋、各組織の total RNA 抽出

筋生検はクリオスタットによって 10  $\mu\text{m}$  厚の筋薄片 50 枚を切り出し、total RNA の抽出試薬 TRIzol (Life technologies) を用い、製品説明書に従って total RNA を抽出した。500  $\mu\text{l}$  の TRIzol Reagent を加え、ペッスルでホモジナイズした。さらに 300  $\mu\text{l}$  TRIzol Reagent を加えて混ぜ合わせ、室温で 5 分間静置した後、12000 x g、4°C で 10 分間遠心して上清を回収した。この上清にクロロホルム 160  $\mu\text{l}$  を加えて 15 秒間激しく混合し、室温で 3 分間放置した。12000 x g、4°C で 15 分間遠心後、上層を回収し、2-プロパノール 400  $\mu\text{l}$ 、グリコーゲン 10  $\mu\text{g}$  を加えて転倒混和し、室温で 10 分間放置した。12000 x g、4°C で 10 分間遠心して、核酸をペレットにした。その後、75%エタノール 500  $\mu\text{l}$  加えて 5 分間遠心し、上清を取り除く作業を 2 回繰り返した。ペレットを風乾してから、12  $\mu\text{l}$  の RNase フリーの純水に懸濁した。同様に 28~33 週齢のマウスから、前脛骨筋 (TA 筋) を取り出した後、液体窒素で凍結させ、TRIzol (Life technologies) で RNA 抽出を行った。TA 筋に 1ml の TRIzol Reagent を加え、ホモジナイザー (出力 6 で 10 秒) で破砕して 12000 x g、4°C で 10 分間遠心して上清を取り出す。以下、筋生検と同様に RNA 抽出を行ったが、2-プロパノール 500  $\mu\text{l}$  を利用し、グリコーゲンは加えてない。ペレットは 5 分間風乾させて、RNase フリーの純水 20  $\mu\text{l}$  に懸濁し、55°C で 10 分間、静置する。ヒト組織の RNA は、Human Total RNA Master Panel II (Clontech) を利用した。

### 2.2.2 培養細胞からの total RNA 抽出

遺伝子導入後 48 時間後の培養細胞から total RNA を抽出するのは、GenElute Mammalian Total RNA Extraction Kit (Sigma) を用いた。使用法は取扱説明書に従ったが、total RNA 溶出の際の Elution buffer 量を 10  $\mu\text{l}$  に変更した。また、抽出の際には DNase I 処理は行わなかった。

### 2.2.3 RNA の逆転写 (RT)

PrimeScript 1st strand cDNA Synthesis Kit (TaKaRa) を用い、製品説明書に従って逆転写を行い cDNA を合成した。Total scale 10  $\mu\text{l}$  で、Oligo (dT) primer を用いて、筋生検は 0.5  $\mu\text{g}$ 、組織は 1  $\mu\text{g}$ 、培養細胞は 0.4-2.5  $\mu\text{g}$ 、マウス筋は 0.2  $\mu\text{g}$  の RNA を鋳型として逆転写を行った。なお、qPCR 用の cDNA を合成する際は、0.5  $\mu\text{g}$  以下の RNA を鋳型に利用した。逆転写産物は、基本的に純水で 5 倍に希釈して cDNA サンプルとした。以下に手順をまとめ

る。

RNA 溶液を以下のように調整する。

RNA(0.2-2.5 µg) + 滅菌水	4 µl
Oligo(dT) primer (50 µM)	0.5 µl
dNTP mixture (10mM each)	0.5 µl
Total	5 µl

65°C、5 分間インキュベート。

氷上で急冷。

以下の溶液を調整し、上記の RNA 溶液に加える。

滅菌水	2.25 µl
5 x PrimeScript Buffer	2 µl
RNase inhibitor (40 U/µl)	0.25 µl
PrimeScript RTase (200U/µl)	0.5 µl
Total	5 µl

下記の条件で反応を行う。

42°C	50 - 60 分間
72°C	15 分間
4°C	∞

cDNA溶液を滅菌水で50 µlにメスアップ（5倍希釈）。

また、胎児骨格筋のcDNA（BioChain）は、妊娠20週齢の男児の胎児のtotal RNAより逆転写されたものである。

## 2.2.4 PCR 反応によるスプライシングの検出

合成したcDNAを鋳型とし、Ex taq（TaKaRa）を利用しPCR反応を行った。以下に基本的なPCR反応液とPCR条件を載せる。なお、全てのprimerはNCBI primer BLASTで設計し、グライナージャパン社に発注した。また、すべてのPCR産物はシーケンスを読んで特異的なバンドであることを確認した（FASMAC）。

### ➤ PCR反応液（total 10µl / 1 tube）

10× Ex Taq buffer	1 µl
dNTP Mix (2.5 mM)	0.8 µl
cDNA	1 µl
Fw primer (10 µM)	0.5 µl
Rv primer (10 µM)	0.5 µl
Ex taq (1.25U)	0.05 µl

滅菌水

6.15  $\mu$ l

➤ PCR条件

96°C	2 min	} × サイクル数
96°C	30 sec	
annealing Temp.	30 sec	
72°C	1 min	
72°C	5 min	
4°C	∞	

※ annealing Temp.は各Primerで最適化を行い、サイクル数はPCR産物が指数関数的に増幅される範囲に設定した。

PCR産物は、8%アクリルアミドゲルで電気泳動し、EtBr染色液に10-15分間振盪させて染色した。LAS3000 (FUJIFILM) でバンドを検出し、解析ソフトのMultigauge software (FUJIFILM) で定量を行った。スプライシングの定量は、あるexonがinclusionしたisoformが全isoformに占める割合[%]を算出して行った。例えば、*ABLIM1*の% ex11 inclusionは、ex11をinclusionしているisoformのバンドの輝度 / 全isoformのバンドの輝度の合計 x 100として計算した。同様に他の遺伝子のスプライシングもexonがinclusionしたisoformの割合を算出して比較定量した。2群間の比較定量をする場合は、スチューデントの t 検定を行い、有意差 ( $P < 0.05$ ) が認められた遺伝子exonを選択的スプライシング異常とした。3群間以上の比較定量では、多重間比較のダネット検定 (MockやControlに対してのみの多重間比較の時) またはチューキー検定 (群間の全ての組み合わせで多重間比較する時) を行い、いずれも有意差 ( $P < 0.05$ ) があるものについてスプライシングが変化したことにした。

## 2.2.5 培養細胞への遺伝子導入

内在性の *ABLIM1* または *ATP2A1* のスプライシングアッセイでは、12 well plate に、HEK293 細胞を 90-95 %コンフルエントにし、スプライシング因子を発現するベクターDNA (1.6  $\mu$ g) を 4  $\mu$ l Lipofectamine 2000 Reagent (Life technologies) で遺伝子導入し、48 時間後に RNA 抽出を行った。その後の逆転写、PCR の条件は上項に記載している。また、遺伝子導入 24 時間後にタンパク質サンプル化を行った。

*ABLIM1* の minigene のスプライシングアッセイでは、12 well plate に、C2C12 細胞を 70-80 %コンフルエントにし、minigene (0.3  $\mu$ g) とスプライシング因子発現ベクターまたはリポート発現ベクター (1.3  $\mu$ g)、またスプライシング因子とリポートの競合実験では

minigene (0.15 µg) とスプライシング因子発現ベクターまたはリピーター発現ベクター (計 1.4 µg になるように Mock (pSecDK) で合わせる) を 8 µl Lipofectamine 2000 Reagent (Life technologies) で遺伝子導入し、48 時間後に RNA 抽出を行った。また、最初の実験では遺伝子導入 24 時間後に、競合実験では 48 時間後にタンパク質サンプル化を行った。

スプライシング因子ノックダウン実験では、12 well plate に、C2C12 細胞を 50 %コンフルエントにし、minigene (0.6 µg) と duplex RNAs (48 pmol) を 8 µl Lipofectamine 2000 Reagent (Life technologies) で遺伝子導入し、48 時間後に RNA 抽出を行った。ノックダウンされているかどうか確認する実験では、6 well plate を利用して、遺伝子導入 48 時間後にタンパク質サンプル化を行った。なお、すべての溶液を 12 well plate の 2.5 倍量にして遺伝子導入を行った。

## 2.2.6 タンパク質サンプル化

培養細胞、組織からそれぞれ以下のようにサンプル化したタンパク質をウェスタンブロットに利用した。

### <培養細胞からのタンパク質サンプル化>

遺伝子導入した24～48時間後の、6 wellまたは12 well plateの培養細胞よりタンパク質サンプル化を行った。全ての作業は4℃で以下のような手順で行った。

1. 培地を取り除き、1 x PBS で 1 回洗浄
2. Lysis buffer (Triton X-100 (HEK: 0.1%、C2C12: 1%)、PIM (HEK: 0.1%、C2C12: 1%)) 60-100 µl を加え、セルリフターで細胞をはがす。
3. 1.5ml チューブに移し、ソニケーション (Duty cycle 10, Output Control 3 で 10-20 回)
4. 10 分間、4℃で静置
5. 13200 rpm、20 分間、4℃で遠心。
6. 上清をサンプルとし、DC protein assay kit (Bio-Rad) でタンパク質濃度を測定する。
7. 2 x SDS sample buffer を 1 x になるようにサンプルに加え、95℃、5 分間、静置

#### ・ Lysis buffer

0.1 ~ 1 %      Triton-X100

0.1 ~ 1 %      PIM (プロテアーゼ阻害剤ミックス)

利用直前に 1 x PBS に上記の濃度になるように加える

#### <マウス骨格筋からのタンパク質サンプル化>

9～19 週齢のマウスの前脛骨筋 (TA 筋) を取り出した後、速やかに液体窒素で瞬間凍結し、-80℃保存した組織よりタンパク質サンプル化を行った。全ての作業は 4℃で以下のような手順で行った。なお、すぐにサンプル化する際は凍結せずに以下の手順を行う。

1. 10 [μl] x 重量 [mg] の骨格筋抽出 Buffer を組織に加え、ホモジナイザーで破砕する (Power 2～4)
2. 4℃、1 時間、転倒混和
3. 10000 x g (1.5 ml tube)、10 分間、4℃で遠心。
4. 上清をサンプルとし、DC protein assay (Bio-Rad) でタンパク質濃度を測定する。
5. 2 x SDS sample buffer を 1 x になるようにサンプルに加え、95℃、5 分間、静置。

#### ・ 骨格筋抽出 buffer

10mM Tris-HCl (pH7.5)

50mM NaCl

1mM EDTA (pH8.0)

1% NP-40

1mM DTT

1mM PMSF

0.1% PIM

DTT、PMSF、PIM は直前に加える

#### <生検筋からのタンパク質サンプル化>

生検筋にタンパク質抽出バッファー 300 μl を加え、ホモジナイザーで破砕(出力 2 で 10 秒を 2 回)し、15,000 x g、20 分間、4℃で遠心して、上清をタンパク質サンプルとして、タンパク質濃度を測定する。タンパク質濃度が低かったので、4 x SDS sample buffer を 1 x になるようにサンプルに加え、95℃、5 分間、静置。

#### ・ タンパク抽出 buffer

10% sucrose

10mM MOPS-KOH(pH7.0)

0.1mM EDTA

0.1% PIM

#### 2.2.7 ウェスタンブロット解析



タンパク質サンプルを SDS-PAGE（上段 4.5 %（10 mA）、下段 12 %アクリルアミドゲル（20mA））を行い、PVDF 膜に 200mA、2 時間（または 300mA、1.5 時間）でトランスファーし、スキムミルク（5% in PBST）でブロッキング（常温で 1 時間振盪）した後に、上記のスキムミルクまたは PBST で希釈した一次抗体（下記記載の通り）と、4℃で一晩反応させ、それぞれにあった動物種の二次抗体（1:5000 in PBST）を常温で 1 時間、反応させた。その後、ECL prime（GE）を用いて発色反応を行った。なお、ブロッキングから各操作の間には、膜を PBST で 5 分間 3 回の洗浄を行った。

#### <ゲルの組成>

##### 分離ゲル(下段)

375mM Tris-HCl pH8.8  
0.1% SDS  
0.08% APS  
0.0017% TEMED

##### 濃縮ゲル(上段)

125mM Tris-HCl pH6.8  
0.1% SDS  
0.08% APS  
0.0017% TEMED

#### <利用した一次抗体>

	作製動物
anti-Myc (1:5000, R950-25, Life technologies)	mouse
anti-His (1:2000, 34670, Qiagen)	mouse
anti-V5 (1:5000, R960-25, Life technologies)	mouse
anti-Actin (1:400, A2066, Sigma)	rabbit
anti-MBNL1 (1:1000, [3A4-1E9], Sigma)	mouse
anti-MBNL2 (1:1000, [3B4], Santa cruz)	mouse
anti-CELF1 (1:1000, [3B1], Ribonomics)	mouse
anti-CELF2 (1:200, [1H2], Santa cruz)	mouse
anti-PTBP1 (1:250, 32-4800, Life technologies)	mouse

#### <二次抗体>

anti-マウス IgG-HRP（Cell Signaling）  
anti-ウサギ IgG-HRP（Cell Signaling）

### 2.2.8 リアルタイム PCR (qPCR)

上項で記載したように、RNA 抽出、cDNA 合成を行い、それを鋳型にしてリアルタイム PCR を行った。利用した Primer は表 2.2 にまとめた。試薬は Power SYBR Green PCR Master Mix (Life technologies) を製品説明書通りに利用したが、1 well 10  $\mu$ l スケールで行った。 *PTBP1* と *FOX1*、 *mPtbp1* の定量ではそれぞれ内部標準遺伝子に *GAPDH* と *mRpl13a* を用い、primer 濃度 500 mM と 200mM、アニーリングと伸長反応 65°C と 62°C で 1 分間または 50 秒間、2 step PCR、40 サイクルで行った。StepOne™ 96well 装置を利用し、比較 Ct 法により StepOne™ Software v2.1 でデータ解析を行った。*PTBP1* では胎児筋で発現する *PTBP1* を 1 とした時の non-DM 筋と DM 筋での *PTBP1* 発現相対量 (RQ) を算出し、*FOX1* では FOX1 発現コンストラクトを遺伝子導入していない培養細胞からのサンプルを 1 とした時の *FOX1* 発現相対量 (RQ) を算出した。*mPtbp1* は、野生型マウスの TA 筋での発現を 1 とした *mPtbp1* 発現相対量 (RQ) を算出した。なお、PCR 産物は全てシーケンス解析をしており、特異性を確認している。

### 2.2.9 C2C12 細胞の分化

35 mm dish に C2C12 を培養し、分化培地 (10% Horse Serum in DMEM 培地) に培地を入れ替え、分化を誘導した。その日を 0 日目として、2 日ごとに分化培地を交換した。また、RNA サンプルとして、0、2、4、6、8、12 日目の細胞を回収した。以降、上項の 2.2.2 と同じ。

## 2.3 その他

機器やキット、試薬の組成などをまとめた。

### 2.3.1 装置・器具

- DNA、RNA 測定装置 : Nano drop (Nano drop)
- PCR 装置 : Mastercycler gradient (Eppendorf)
- 電気泳動電源 : myPower II300 AE-8135 (ATTO)
- 電気泳動槽 : ミニゲルスラブ電気泳動装置 (日本エイドー)
- トランスファー電源 : Electrophoresis Power Supply EPS301 (GE)

- ・ トランスファー槽：TE 22 Mini Tank Transfer Unit (GE)
- ・ ルミノ・イメージアナライザー：LAS-3000 (FUJIFILM)
- ・ 遠心機：Biofuge fresco (Heraeus)、Centrifuge 5415 R (Eppendorf)
- ・ 超音波破碎機：Sonifier 450 (BRANSON)
- ・ 吸光度計：U-2000 Spectrophotometer (日立)
- ・ ホモジナイザー：HG30 Homogenizer (日立)
- ・ リアルタイム PCR 装置：StepOne™ 96well (Life technologies)
- ・ 倒立型蛍光顕微鏡：Olympus IX70

### 2.3.2 ソフトウェア

- ・ 核酸アミノ酸配列解析ソフト：GENETYX-Win Ver.3.2.0 (ソフトウェア開発)
- ・ 電気泳動解析ソフト：MultiGauge (FUJIFILM)
- ・ 解析ソフト：GraphPad Prism 4 (GraphPad Software)
- ・ リアルタイム PCR 解析ソフト：StepOne™ Software v2.1 (Life technologies)

### 2.3.3 キット類

- ・ 逆転写キット：PrimeScript 1st strand cDNA Synthesis Kit (TaKaRa)
- ・ PCR キット類：Ex Taq polymerase PCR kit (TaKaRa)  
*PfuUltra™* High-Fidelity DNA Polymerase (Stratagene)
- ・ ゲル DNA 抽出キット：GenElute™ Agarose Spin Column (Sigma)  
MinElute™ Gel Extraction Kit (Qiagen)
- ・ Ligation キット：Rapid DNA Ligation Kit (Roche)
- ・ RNA 抽出キット：GenEluteMammalian Total RNA Miniprep Kit (Sigma)
- ・ プラスミド精製用キット：QIAfilter Plasmid Midi Kit (Qiagen)  
GenElute™ PLASMID MINI-PREP KIT (Sigma)
- ・ タンパク質量定量キット：DC protein assay kit (Bio-Rad)
- ・ ウェスタンブロット発色キット：ECL prime (GE)

### 2.3.4 大腸菌

クローニング用：XL10-Gold (TaKaRa)、DH5α (TaKaRa)

### 2.3.5 核酸操作試薬

- 制限酵素  
NEB または TaKaRa のものを使用説明書通りに利用した。
- 3 M NaOAc (DNA 用)  
3 M 酢酸ナトリウム  
滅菌水でこの濃度に調製し、酢酸で pH 5.2 にした。
- 平衡化中性フェノール (DNA 用)  
65°C にて融解したフェノールに 0.1 % ヒドロキシキノリンを加えた。0.5 M EDTA (pH 8.0) を含む 0.1 M Tris-HCl (pH 8.0) を等量加え十分に攪拌し、水層を捨て、水層の pH が中性になるまで繰り返した。
- CIA (DNA 用)  
クロロホルム : イソアミルアルコール = 24 : 1
- PCI  
中性フェノール溶液に等量のクロロホルムを加えた。  
フェノール : クロロホルム = 1 : 1
- 50×TAE  
Trizma base            242.0 g  
酢酸                    57.1 ml  
EDTA・2Na            18.6 g  
MilliQ 水で 1 L にメスアップし、その後 50 倍希釈して、1×TAE にして使用した。
- 10×TBE  
Trizma base            108 g  
ホウ酸                55 g  
EDTA・2Na            9.2 g  
MilliQ 水で 1 L にメスアップする。0.5×TBE にして使用した。
- 電気泳動用色素  
10×Loading Buffer (TaKaRa)
- EtBr 染色液  
TAE : 1×TAE 490 ml、EtBr 25 µl を混合した。  
TBE : 1×TBE を 250 ml、EtBr 12.5 µl を混合した。
- 回収 buffer (アクリルアミドゲルからの DNA 回収用)  
0.5 M 酢酸アンモニウム  
1 mM EDTA

滅菌水でこの濃度に調整した。

- LB 培地

1 %            Bacto<sup>®</sup> Trypton

0.5 %          Bacto<sup>®</sup> Yeast Extract

1 %            塩化ナトリウム

培地の調製に用いた Bacto<sup>®</sup> Trypton、Bacto<sup>®</sup> Yeast Extract は DIFCO Laboratories 社より、AGAR<sup>®</sup>は伊那食工業より購入した。また、LB プレートには、1.5 % AGAR<sup>®</sup>を加えてからオートクレーブし、10 cm シャーレに流し込んで固めて使用した。

- Amp (アンピシリン溶液)

50 mg / ml の濃度で milliQ 水に溶解したものを 1000 倍希釈して利用した。

- IPTG 溶液

1 M の濃度に IPTG を滅菌水で溶解した。

- X-gal 溶液

20 mg / ml の濃度に X-gal をジメチルホルムアミドで溶解した。

### 2.3.6 タンパク操作試薬など

下の全ての試薬は MilliQ 水で各濃度に希釈した。

- 2×SDS sample buffer

0.16M          Tris-HCl (pH6.8)

4%            SDS

20%           Glycerol

0.1%          BPB

8.3%          2-mercaptoethanol (2-ME)

使用前に 2-ME は加える。

- SDS-PAGE 用の 10×泳動 buffer

0.25M          Tris-HCl

1.92M          グリシン

1%            SDS

- トランスファーbuffer

25mM          Tris-HCl

192mM          グリシン

20%           メタノール

- PBS

137mM          NaCl

8.1mM          Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> · 12H<sub>2</sub>O

2.68mM     KCl

1.47mM     KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>

- PBST

PBS に Tween-20 を 0.05%希釈したもの。

- PVDF 膜 : Immobilon-P Transfer Membrane (Millipore)
- プロテアーゼ阻害剤ミックス (PIM) : Complete Mini EDTA-free EASYPack protease inhibitor Cocktail Tablets (Roche)

## 第 3 章 結果

先行研究より、DM では様々な遺伝子の選択的スプライシングが異常であることが同定されているが、本研究では新たに選択的スプライシング異常を同定すること、さらにこのスプライシング分子機構を解析することで、DM 患者で異常を示しているスプライシング因子を探索することを目的とした。

### 3.1 DM1 患者における *ABLIM1* exon 11 の異常な選択的スプライシング

先行研究で DM1 患者と non-DM 者の骨格筋より、exon array が行われており (Koebis *et al.* 2011)、その結果より、*ABLIM1* の exon 4、exon 11 のスプライシング異常が予測された (図 3.1)。*ABLIM1* の exon 11 のスプライシングは DM 患者の心筋において異常であることが確認されており (Koshelev *et al.* 2010)、骨格筋においても異常である可能性が高いと考え、*ABLIM1* の研究に着手した。

Exon array の結果は偽陽性が多いため、non-DM 者 (Control) と DM1 患者のそれぞれ 6 名ずつの筋生検を用いて RNA 抽出を行った後、RT-PCR を行い、スプライシング異常が起こっているか検出した (図 3.2 A-C)。すると *ABLIM1* exon 11 において、non-DM 者では exon 11 の入った isoform (Ex11+) が全 isoform の 40%程度存在するが、DM1 患者では exon 11 が入った isoform がほとんど検出されないことが明らかになった。図 3.2 B のように exon 11 の inclusion の割合 (% ex11 inclusion) を算出すると、non-DM 者と DM1 患者間で有意差がつき、DM1 患者で有意に *ABLIM1* exon 11 が脱落するスプライシング異常が検出できた。一方、*ABLIM1* exon 4 においては、non-DM 者と DM1 患者ともに exon 4 が inclusion したバンドのみ検出され、スプライシングの異常は検出されなかった。なお、DM1 患者の骨格筋でスプライシング異常を示すことが知られている *ATP2A1* exon 22 をポジティブコントロールとして実験を行ったところ、DM1 患者では有意に exon 22 が脱落していることから、今回の RT-PCR によるスプライシングの検出方法は正確性が高いと考えられた。図 3.2 C ではそれぞれの RT-PCR で用いたプライマーを矢型で示し、その間のゲノム構造 (exon-intron 構造) を模式化したものを記載した。

### 3.2 ヒトの各組織、筋成熟過程における *ABLIM1* exon 11 のスプライシング

胎児と成人の各組織（骨格筋、脳、肝臓）における、*ABLIM1* exon 11 のスプライシングを 3.1 と同様に RT-PCR によって検出したところ（図 3.3A）、正常な成人の骨格筋でのみ *ABLIM1* Ex11+ のバンドが検出されが、胎児筋と他の組織（胎児、成人においても）では Ex11+ のバンドは検出できなかった。同様に DM1 筋では成人であっても、骨格筋特異的に検出できる Ex11+ のバンドが検出できず、胎児筋や他の組織と同じスプライシングが起きていることが分かる。

このように骨格筋でのみ特異的にスプライシングが変化している *ABLIM1* exon 11 のスプライシングが、発生や筋成熟のどの段階で変化しているか調べるために RT-PCR によって検出したのが、図 3.3B である。胎児筋ではほとんど Ex11+ のバンドが検出されていないが、8 ヶ月で約 10%、4 歳で約 60% となっており、生後から 4 歳までに成人と同程度の exon 11 inclusion 率になっていた。したがって、*ABLIM1* exon 11 のスプライシング変化は生後から筋肉が成熟する 4 歳までの過程で変化することが分かった。

成人組織の中で骨格筋以外に、Ex11+ が発現していないかどうか調べるために、成人の各組織を RT-PCR をしたのが、図 3.3C である。その結果、心筋と骨格筋でのみ Ex11+ が検出されたが、中枢神経系、内臓、腺組織、生殖組織などでは検出できなかった。一方、*ABLIM1* exon 11 が脱落した isoform (Ex11-) は全組織で発現が検出され、発現が少ない組織もあるもののユビキタスに発現していた。

### 3.3 スプライシング因子の MBNL は内在性の *ABLIM1* exon 11 のスプライシングを制御する

DM 筋で異常を確認できた *ABLIM1* ex11 のスプライシングがどのように制御されているか調べるために、スプライシング因子の発現コンストラクトを培養細胞 HEK293（ヒト胎児由来腎臓培養細胞）に遺伝子導入して過剰発現させ、内在性の *ABLIM1* exon 11 のスプライシングがどのように変化するか調べた。まずは、DM で活性が低くなっているタンパク質 family の MBNL1、MBNL2、MBNL3 と、逆に活性が高くなっていることが知られている CELF1 とそのタンパク質 family の CELF2、CELF3、CELF4、CELF5、CELF6 がそれぞれ pSecDK（空ベクター）に入った発現コンストラクトを、12 well plate で 90-95% コンフルエントに培養した HEK293 細胞に 1.6  $\mu$ g 遺伝子導入し、48 時間後に RNA 抽出して、RT-PCR で *ABLIM1* exon 11 のスプライシングを検出した。今回利用した培養細胞の HEK293 は遺伝子導入効率が高いため、今回のスプライシングアッセイに用いた。



すると、MBNL1、MBNL2、MBNL3を過剰発現すると、Ex11+のバンドがpSecDK(Mock)を遺伝子導入したものより有意に多く検出できた(図 3.4A)。MBNL1は核局在している2つの isoform の EXP40 と EXP42 を用いたが、特に2つの isoform 間で違いがなかったため、以後の実験では核のみに局在することが知られている EXP42 を利用した。なお、スプライシング因子の過剰発現はウェスタンブロットによって確認した(図 3.4B)。また、MBNL1によって直接制御されていることが知られている *ATP2A1* exon 22 のスプライシングも、この内在性スプライシングアッセイで、MBNL1-3を過剰発現させるとスプライシングが有意に変化することから、このスプライシングアッセイが正確に機能していることが分かる(図 3.5)。

しかし、培養細胞の内在性の *ABLIM1* は、ほとんど Ex11-しか発現していないため、exon 11 を脱落させるスプライシングを活性化する因子を探索することはできなかった。また、HEK293 以外の培養細胞 HeLa (ヒト子宮頸部腫瘍細胞)、SH-SY5Y (ヒト神経芽腫細胞)、未分化な C2C12 (マウス筋芽細胞) いずれにおいても内在性の *ABLIM1* は Ex11-しか発現していなかった。

### 3.4 *ABLIM1* の minigene のスプライシングは MBNL、CELF、PTBP1 によって制御される

#### 3.4.1 スプライシング因子の過剰発現による *ABLIM1* minigene のスプライシングの変化

結果の 3.3 で示したように、内在性の *ABLIM1* を用いたスプライシングアッセイでは、exon 11 を脱落させるスプライシングを活性化する因子を探索することはできない。したがって、*ABLIM1* exon 11 の上流下流の exon-intron 構造を pEGFP-C1 に組み込んだものを minigene として作製した(図 3.6) なお minigene の作製の際、*ABLIM1* の intron が非常に長かったため、exon から上下 350bp 程度の intron を残して中間部分の intron は取り除いた。基本的に exon の上下 150bp の intron にスプライシング制御に重要な配列(cis-element)が含まれていることが多く、それ以外の intron を除いて minigene を作製する方法は確立されている(Cooper 2005)。

また、MBNL や CELF1 以外のスプライシング因子が DM で異常になっているか、またそれら因子と同様な作用を持つ因子が他に存在しないかどうか調べるために、FOX1、PTBP1、hnRNP A1、hnRNP H の発現コンストラクトも加えた。これら因子は、DM で異常を示す可能性があるものや、他の筋疾患などで異常が確認されているもの、筋分化の過程で発現量が変化するものなどに着目した。内在性の *ABLIM1* のスプライシングを検出する場合は遺伝子導入効率が良くないと、スプライシングが変化しづらいと考え HEK293 を

用いたが、今回は minigene も遺伝子導入するため、より筋肉の状態に近いマウス筋芽細胞 C2C12 を用いた。12 well plate で 75-80%コンフルエントに培養した C2C12 に minigene 0.3  $\mu$ g、スプライシング因子発現ベクター1.3  $\mu$ g を遺伝子導入し、48 時間後に RNA を回収して minigene のスプライシングアッセイを行った (図 3.7A)。なお、スプライシング因子の過剰発現はウェスタンブロットまたは qPCR によって確認した (図 3.7B、図 3.8)。293HEK の時と比べるとタンパク質の発現量が総じて低く、FOX1 においてはウェスタンブロットで検出できなかったため、qPCR によって検出した。

すると、内在性の *ABLIM1* と同様に MBNL1、MBNL2、MBNL3 を過剰発現させると、minigene の Ex11+のバンドが増加し、有意に% ex11 inclusion が上昇した (図 3.7)。したがってこの minigene は、内在性の *ABLIM1* と同じスプライシングの影響を受けていることから、内在性のスプライシングの影響を疑似的に示していると思われる。また、FOX1 においても、わずかだが有意に% ex11 inclusion が上昇した。逆に、CELF1、CELF2、CELF6、PTBP1 を過剰発現すると、有意に% ex11 inclusion が減少し、PTBP1 はその作用が特に強かった。CELF1、CELF2、CELF6 以外の CELF family と hnRNP A1、hnRNP H (図の記載なし) の過剰発現では、スプライシングは変化しなかった。

### 3.4.2 スプライシング因子のノックダウンによる *ABLIM1* minigene のスプライシングの変化

スプライシング因子を過剰発現させた時に minigene のスプライシングを有意に変えたスプライシング因子の中で、特に大きく変化させた MBNL1、CELF1、CELF2、PTBP1 の発現をノックダウンした時に、過剰発現した時とは逆方向にスプライシングが変化するかどうか確認した。スプライシング因子の発現は RNAi 干渉法によってノックダウンさせて minigene のスプライシングアッセイを行った。ノックダウンの方法には miRNA と siRNA を利用した 2 つの方法がある。当初、miRNA のコンストラクトを遺伝子導入した方が長く miRNA を発現させることができ、先行研究で利用されていることから、miRNA を利用していた。しかしながら、タンパク質レベルで発現がノックダウンされないことから、siRNA を用いた方法に変更した。siRNA は miRNA より一過的に遺伝子導入され、持続性は低いですが、miRNA よりノックダウン効率がよいという利点がある。

12 well plate で 50%コンフルエントに培養した C2C12 に minigene 0.6  $\mu$ g、duplex RNAs 48 pmol を遺伝子導入し、48 時間後に RNA を回収して minigene のスプライシングアッセイを行った (図 3.9A)。なお、siRNA によるスプライシング因子のノックダウンはウェスタンブロットによって確認しており (図 3.9B)、その中でノックダウン効率がよい siRNA

をスプライシングアッセイでは利用した。利用した siRNA のノックダウン効率は siMBNL1 (No.82) は 84%、siCELF1(No.16) は 55%、siCELF1(No.47) は 60%、siCelf2(No.11) は 83%、siCelf2(No.12) は 86%、siPtbp1(No.37) は 84%、siPtbp1(No.38) は 74%、それぞれ発現量が低下していた。コントロール siRNA としては、GC 含量が低い用 (Low) と中程度用 (Medium) の 2 種類を利用した。また、全て大文字で書いてある MBNL1 と CELF1 の siRNA はヒト用にデザインされた配列であるが、マウスの配列と 24 bp / 25 bp (96%) 相同性があり、BLAST (NCB) によってその他の遺伝子と相同性がないこと (オフターゲットがないこと) を確認して利用した。Celf2 と Ptbp1 の siRNA はマウス用にデザインしたものである。

すると、Mbnl1 をノックダウンすると過剰発現とは逆に Ex11+ が有意に減少した。しかし、Celf1 をノックダウンしてもスプライシングは変化しなかった。さらに、siCelf2(No.16)、siPtbp1(No.37)、siPtbp1(No.38) でノックダウンすると、過剰発現とは逆に Ex11+ が有意に増加した。しかし、siCelf2(No.12) でノックダウンしてもスプライシングの変化は見られなかった。

### 3.5 CELF family、PTBP1 と伸長した CUG リピートは MBNL1 と拮抗して、*ABLIM1* のスプライシングを制御する

#### 3.5.1 CELF1、CELF2、CELF6 と PTBP1 は MBNL1 の *ABLIM1* スプライシングに対する効果を打ち消す (スプライシング因子競合実験)

CELF、PTBP1 と MBNL1 は *ABLIM1* のスプライシングに対して逆の作用を示すことが今までの結果から分かるが、両者がどのように *ABLIM1* のスプライシングを逆に制御するか詳しく調べるために、それら 2 種類のスプライシング因子を共発現させた時の *ABLIM1* minigene のスプライシングアッセイを行った (図 3.10A、3.11A)。なお、スプライシング因子の発現はウェスタンブロットによって確認した (図 3.10B、3.11B)。12 well plate で 75-80%コンフルエントに培養した C2C12 に、minigene 0.15 µg、MBNL1 発現ベクター 0.7 µg (+++MBNL1) と CELF1 または、CELF2、CELF6、PTBP1 の発現ベクターを 0.23 µg (+) または 0.7 µg (+++)、遺伝子導入し、48 時間後に RNA を回収して minigene のスプライシングアッセイを行った (図 3.10A)。また、CELF2 と PTBP1 は 0.02 µg (1/350) または 0.07 µg (1/100)、0.14 µg (1/50)、遺伝子導入してスプライシングアッセイを行った (図 3.11A) なお、遺伝子導入する発現ベクターの DNA 量は Mock (pSecDK) で合計 1.4 µg なるように全て調節した。また、遺伝子導入したベクター量とウェスタンブロットでのタンパク質発現量において相関はとれているが、異なるスプライシング因子を同じベクタ

一量を遺伝子導入しても、タンパク質レベルでの発現量には差がある。

すると 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、段階的に打ち消した (図 3.10A)。しかし、CELF2 と PTBP1 においては遺伝子導入量が少なくても (0.23  $\mu\text{g}$  +)、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+を減少させた。しかし、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  $\mu\text{g}$  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 よりも強かった。

### 3.5.2 伸長したリピート CUG は *ABLIM1* のスプライシングを変化させ、MBNL1 の効果を打ち消す (MBNL とリピートの競合実験)

伸長したリピートを培養細胞 C2C12 で発現させた時に、DM 患者と同様に *ABLIM1* のスプライシングが異常になるか (Ex11+が減少するか) どうかを調べた (図 3.12)。これは DM 患者の筋肉の症状などで二次的にスプライシングが変化したのではなく、伸長したリピートが発現していることがこのスプライシング異常の原因であることを示すことにもなる。また、伸長したリピートと MBNL1 を共発現させた時に、MBNL1 のスプライシング効果を伸長したリピートが取り消すかどうかを検証した (図 3.12)。3.5.1 と同様に C2C12 に minigene 0.15  $\mu\text{g}$ 、リピート発現ベクター (DM0、DM18、DM480) 0.7  $\mu\text{g}$  と Mock (pSecDK) または MBNL1 発現ベクター 0.7  $\mu\text{g}$  を遺伝子導入して、スプライシングアッセイを行った。なお、通常の人でも CUG リピート数 18 (健常者 5~37) の人はおり、リピート数が 50 以上で DM を発症することが知られているので、伸長したリピート数としては 480 リピートを用いた。

すると 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。同様に MBNL1 の存在下においても、DM480 を発現させると DM0 や DM18 に比べて有意に Ex11+が減少し、伸長したリピートが、MBNL1 の効果を完全に打ち消した。

### 3.6 DM モデルマウス *HSA*<sup>LR</sup> における *ABLIM1* のスプライシング異常

伸長した CUG リピートが培養細胞だけでなく、マウス *in vivo* においても *ABLIM1* のスプライシングを異常にするかどうか調べた。利用したマウスはヒト骨格筋アクチン (Human Skeletal Actin) の 3'-UTR に伸長した CUG リピート (Long Repeat) を持つト

ランスジェニックマウスで *HSA<sup>LR</sup>* と呼ばれており、DM モデルマウスとして知られている。このマウスでは骨格筋で CUG リピートが発現することが確認されている。野生型 (WT) としてはトランスジェニック作成の際に用いている FVBn/Jcl を利用した。以上のマウスから前脛骨筋 (TA 筋) または腓腹筋 (Gast.筋) を取り出して、RNA 抽出を行い、RT-PCR によってスプライシング異常を示すかどうか調べた (図 3.13A)。すると NCBI には記載がないスプライシング isoform のバンドが検出され、シークエンス解析をしたところ、マウスの *Ablim1* のゲノム構造はヒトと若干異なり、human exon 10 と exon 12 の間に exon 11 以外にもう一つ exon が存在した (図 3.13B)。この exon を mouse の exon 12 とすると、exon 11 と exon 12 の両方が入った isoform I、exon 11 のみが入った isoform II、exon 11 と exon 12 の両方が脱落した isoform III が RT-PCR で検出された。% ex11 inclusion は  $I + II / \text{全 isoform (I+II+III)} \times 100$  として算出すると、*HSA<sup>LR</sup>* は WT に比べ、有意に Ex11+ (isoform I と isoform II) が少ないことが示された。したがって、DM モデルマウスの *HSA<sup>LR</sup>* においても *Ablim1* exon 11 のスプライシング異常を呈することが分かった。以上のことより、伸長した CUG リピートが発現すると培養細胞だけでなく、マウス *in vivo* においても *Ablim1* のスプライシングが異常になることを示すことができた。

### 3.7 マウス筋芽細胞 C2C12 を分化させた時の *Ablim1* スプライシング変化

*ABLIM1* exon 11 のスプライシングは、図 3.3 A のように DM 筋では胎児筋で見られるスプライシングパターンを示し Ex11+が検出されない。これは未分化なマウス筋芽細胞 C2C12 においても同様で、内在性の *Ablim1* Ex11+ (I と II) は検出されなかった。すなわち、未分化な C2C12 と DM 筋や胎児筋では、存在するスプライシング因子のバランスが類似していると考えられる。また、C2C12 を分化させると Mbnl1 や Fox1 の発現量が上昇し、逆に Celf1 や Ptbp1 の発現量が減少することが報告されており、図 3.7 の *ABLIM1* minigene スプライシングアッセイより、これらの因子が *ABLIM1* のスプライシングを制御していることが確認できた。したがって、C2C12 を分化させれば、内在性のマウス *Ablim1* のスプライシングもこれら因子の発現量の変化によって Ex11+ (I と II) が検出できるように変化すると考え、C2C12 を分化させ、日をおって RNA を回収して、*Ablim1* exon 11 のスプライシングを RT-PCR によって検出した (図 3.14)。

すると、分化させて 2 日目から ex11+ (II) がわずかに検出され、2~6 日にかけて Ex11+ (I と II) が増加していることを確認できた。したがって、マウス筋芽細胞が筋管細胞に分化する過程において *Ablim1* のスプライシングが変化することを確認できた。このような変化は、生後から幼児期にかけての筋肉の成熟過程において起こっている可能性が高く、特

に先天性 DM 患者ではこのような変化が起こりにくく、しっかりとした筋管形成が阻害されている可能性があると思われる。

### 3.8 DM1 患者と DM1 モデルマウス *HSA<sup>LR</sup>* の *PTBP1* の発現量

#### 3.8.1 DM1 患者の *PTBP1* の mRNA 発現量

培養細胞を用いたスプライシングアッセイにおいて、*PTBP1* を過剰発現させると、DM 患者と同様に有意に *Ex11+*が減少し、*ABLIM1*において異常なスプライシングを促進していることが検出された。したがって、DM 患者において、*PTBP1*の発現が上昇している可能性があると考え、DM 患者の *PTBP1* の mRNA の発現量を qPCR によって定量した (図 3.15)。なお、鋳型として利用した cDNA は DM 患者筋のスプライシングを検出した際に作製したものをを用いた。発現量の補正として *GAPDH* を用い、胎児筋における *PTBP1* の mRNA の発現量を 1 とした時、Contorol (non-DM) と DM1 は共に平均約 3.4 で、発現量に差は見られなかった。したがって、*PTBP1* の mRNA の発現量は、non-DM 筋と DM1 筋で同程度であると結論づけた。

#### 3.8.2 DM1 患者の *PTBP1* のタンパク質発現量

non-DM 患者と DM1 患者の生検筋における *PTBP1* の発現量をウェスタンブロットによって検出したところ、DM 患者で増加傾向は見られたが、有意差はなかった (図 3.16)。同様に DM 患者で発現量が増加していることが知られている *CELF1* においても検出したが、増加傾向はあるものの、有意差はなかった。利用した生検筋は、スプライシングを検出するために利用したものとは異なり、表 2.1 に記載している non-DM 患者と DM 患者共に No.7-10 の生検筋を利用している。なお、内部標準コントロールとして *Actin* を用いて、*PTBP1* と *CELF1* のバンドの輝度を *Actin* のバンドの輝度で補正している。

#### 3.8.3 DM モデルマウス *HSA<sup>LR</sup>* の *Ptbp1* の mRNA 発現量

次に、*Ablim1* ex11 のスプライシング異常を DM 患者と同様に呈する DM モデルマウス *HSA<sup>LR</sup>*における *Ptbp1* の mRNA 発現量を調べるために、9~19 週齢のマウスから TA 筋を摘出し、RNA を抽出した後に、RT-qPCR によって定量した。すると、ヒトと同様にマウスにおいても野生型と *HSA<sup>LR</sup>*で *Ptbp1* の mRNA 量に差は検出されなかった。発現量の補

正として *mRpl13a* を用い、ある 1 匹の野生型マウスにおける *Ptbp1* の mRNA 発現量を 1 とした時の相対値を算出したところ、野生型 (WT) と *HSA<sup>LR</sup>* の平均は各 0.85 と 0.71 であり、わずかに *HSA<sup>LR</sup>* の発現量が低い、有意差はなく、mRNA 発現量に差はないと結論づけた。

#### 3.8.4 DM モデルマウス *HSA<sup>LR</sup>* の PTBP1 のタンパク質発現量

次に *Ptbp1* のタンパク質レベルでの発現量に差があるかどうか調べるために、3.8.3 と同様の 9~19 週齢の野生型マウス (WT) と DM モデルマウス *HSA<sup>LR</sup>* の前脛骨筋 (TA 筋) からタンパク質を抽出し、ウェスタンブロットによってマウスの *Ptbp1* を検出した (図 3.16)。なお、発現量は *Actin* で補正した割合で算出した。すると、*HSA<sup>LR</sup>* の TA 筋では *Ptbp1* のタンパク質発現量が有意に増加していた。また、以前より *HSA<sup>LR</sup>* の TA 筋で発現量が増加することが知られていた *Celf1* の発現量も有意に増加していた。したがって、伸長した CUG リピート RNA が *CELF1* だけでなく *PTBP1* のタンパク質レベルでの発現量を上昇させている可能性がある。

#### 3.8.5 伸長したリピートを培養細胞に発現しても *PTBP1*、*CELF1*、*MBNL1* などのスプライシング因子のタンパク質発現は変化しない

3.8.4 で示した *Ptbp1* のタンパク質発現が DM 患者と DM モデルマウスで上昇しているのは、筋症状などの二次的な変化である可能性があるため、培養細胞において伸長したリピートを発現させた時に *Ptbp1* などのタンパク質発現量が上昇していないかウェスタンブロットによって検出した (図 3.19)。しかし、*Celf1* をはじめ、*Ptbp1*、*Mbnl1* などのスプライシング因子のタンパク質発現量は変化しなかった。これは、*C2C12* は遺伝子導入効率が低いことが知られているので、リピートの発現量がこれらタンパク質量の変化する閾値に達していないことが考えられるが、DM モデルマウスで見られる *Ptbp1* や *Celf1* のタンパク質発現量の増加は筋症状などの二次的な要因に起因している可能性があることも示唆している。DM 患者では  $[Ca^{2+}]$  が高い状態であることから、*PKC* などの活性が高くなって様々なタンパク質がリン酸化され、タンパク質が安定して存在するという仮説が知られているので、それによって *Celf1* や *Ptbp1* の発現量が高い状態に保たれている可能性もある。

## 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と考えられる。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られている。

#### 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 µg 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 α/βII (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。

## 第 5 章 参考文献

- Bachinski, L.L., Czernuszcwicz, T., Ramagli, L.S., Suominen, T., Shriver, M.D., Udd, B., Siciliano, M.J. & Krahe, R. (2009) Premutation allele pool in myotonic dystrophy type 2. *Neurology* **72**, 490-497.
- Bachinski, L.L., Udd, B., Meola, G. *et al.* (2003) Confirmation of the type 2 myotonic dystrophy (CCTG)<sub>n</sub> expansion mutation in patients with proximal myotonic myopathy/proximal myotonic dystrophy of different European origins: a single shared haplotype indicates an ancestral founder effect. *Am J Hum Genet* **73**, 835-848.
- Barreau, C., Paillard, L., Mereau, A. & Osborne, H.B. (2006) Mammalian CELF/Bruno-like RNA-binding proteins: molecular characteristics and biological functions. *Biochimie* **88**, 515-525.
- Barrientos, T., Frank, D., Kuwahara, K., Bezprozvannaya, S., Pipes, G.C., Bassel-Duby, R., Richardson, J.A., Katus, H.A., Olson, E.N. & Frey, N. (2007) Two novel members of the ABLIM protein family, ABLIM-2 and -3, associate with STARS and directly bind F-actin. *J Biol Chem* **282**, 8393-8403.
- Bland, C.S., Wang, E.T., Vu, A., David, M.P., Castle, J.C., Johnson, J.M., Burge, C.B. & Cooper, T.A. (2010) Global regulation of alternative splicing during myogenic differentiation. *Nucleic Acids Res* **38**, 7651-7664.
- Boutz, P.L., Chawla, G., Stoilov, P. & Black, D.L. (2007) MicroRNAs regulate the expression of the alternative splicing factor nPTB during muscle development. *Genes Dev* **21**, 71-84.
- Boutz, P.L., Stoilov, P., Li, Q., Lin, C.H., Chawla, G., Ostrow, K., Shiue, L., Ares, M., Jr. & Black, D.L. (2007) A post-transcriptional regulatory switch in polypyrimidine tract-binding proteins reprograms alternative splicing in developing neurons. *Genes Dev* **21**, 1636-1652.
- Braida, C., Stefanatos, R.K., Adam, B., Mahajan, N., Smeets, H.J., Niel, F., Goizet, C., Arveiler, B., Koenig, M., Lagier-Tourenne, C., Mandel, J.L., Faber, C.G., de Die-Smulders, C.E., Spaans, F. & Monckton, D.G. (2010) Variant CCG and GGC repeats within the CTG expansion dramatically modify mutational dynamics and likely contribute toward unusual

symptoms in some myotonic dystrophy type 1 patients. *Hum Mol Genet* **19**, 1399-1412.

Brimacombe, K.R. & Ladd, A.N. (2007) Cloning and embryonic expression patterns of the chicken CELF family. *Dev Dyn* **236**, 2216-2224.

Brook, J.D., McCurrach, M.E., Harley, H.G., Buckler, A.J., Church, D., Aburatani, H., Hunter, K., Stanton, V.P., Thirion, J.P., Hudson, T. & et al. (1992) 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.

Care, A., Catalucci, D., Felicetti, F. *et al.* (2007) MicroRNA-133 controls cardiac hypertrophy. *Nat Med* **13**, 613-618.

Chan, R.C. & Black, D.L. (1997) The polypyrimidine tract binding protein binds upstream of neural cell-specific c-src exon N1 to repress the splicing of the intron downstream. *Mol Cell Biol* **17**, 4667-4676.

Charizanis, K., Lee, K.Y., Batra, R. *et al.* (2012) Muscleblind-like 2-mediated alternative splicing in the developing brain and dysregulation in myotonic dystrophy. *Neuron* **75**, 437-450.

Charlet, B.N., Logan, P., Singh, G. & Cooper, T.A. (2002) Dynamic antagonism between ETR-3 and PTB regulates cell type-specific alternative splicing. *Mol Cell* **9**, 649-658.

Charlet, B.N., Savkur, R.S., Singh, G., Philips, A.V., Grice, E.A. & Cooper, T.A. (2002) Loss of the muscle-specific chloride channel in type 1 myotonic dystrophy due to misregulated alternative splicing. *Mol Cell* **10**, 45-53.

Choi, D.K., Ito, T., Mitsui, Y. & Sakaki, Y. (1998) Fluorescent differential display analysis of gene expression in apoptotic neuroblastoma cells. *Gene* **223**, 21-31.

Choi, D.K., Ito, T., Tsukahara, F., Hirai, M. & Sakaki, Y. (1999) Developmentally-regulated expression of mNapor encoding an apoptosis-induced ELAV-type RNA binding protein. *Gene* **237**, 135-142.

Choi, D.K., Yoo, K.W., Hong, S.K., Rhee, M., Sakaki, Y. & Kim, C.H. (2003) Isolation and

expression of Napor/CUG-BP2 in embryo development. *Biochem Biophys Res Commun* **305**, 448-454.

Cooper, T.A. (2005) Use of minigene systems to dissect alternative splicing elements. *Methods (San Diego, Calif)* **37**, 331-340.

Dansithong, W., Paul, S., Comai, L. & Reddy, S. (2005) MBNL1 is the primary determinant of focus formation and aberrant insulin receptor splicing in DM1. *J Biol Chem* **280**, 5773-5780.

Davis, B.M., McCurrach, M.E., Taneja, K.L., Singer, R.H. & Housman, D.E. (1997) Expansion of a CUG trinucleotide repeat in the 3' untranslated region of myotonic dystrophy protein kinase transcripts results in nuclear retention of transcripts. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**, 7388-7393.

Day, J.W., Ricker, K., Jacobsen, J.F., Rasmussen, L.J., Dick, K.A., Kress, W., Schneider, C., Koch, M.C., Beilman, G.J., Harrison, A.R., Dalton, J.C. & Ranum, L.P. (2003) Myotonic dystrophy type 2: molecular, diagnostic and clinical spectrum. *Neurology* **60**, 657-664.

Erkman, L., Yates, P.A., McLaughlin, T., McEvilly, R.J., Whisenhunt, T., O'Connell, S.M., Krones, A.I., Kirby, M.A., Rapaport, D.H., Bermingham, J.R., O'Leary, D.D. & Rosenfeld, M.G. (2000) A POU domain transcription factor-dependent program regulates axon pathfinding in the vertebrate visual system. *Neuron* **28**, 779-792.

Fardaei, M., Rogers, M.T., Thorpe, H.M., Larkin, K., Hamshire, M.G., Harper, P.S. & Brook, J.D. (2002) 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.

Frank, D., Kuhn, C., Katus, H.A. & Frey, N. (2006) The sarcomeric Z-disc: a nodal point in signalling and disease. *J Mol Med (Berl)* **84**, 446-468.

Frey, N., Barrientos, T., Shelton, J.M., Frank, D., Rutten, H., Gehring, D., Kuhn, C., Lutz, M., Rothermel, B., Bassel-Duby, R., Richardson, J.A., Katus, H.A., Hill, J.A. & Olson, E.N. (2004) Mice lacking calsarcin-1 are sensitized to calcineurin signaling and show accelerated cardiomyopathy in response to pathological biomechanical stress. *Nat Med* **10**, 1336-1343.

Fu, Y.H., Friedman, D.L., Richards, S., Pearlman, J.A., Gibbs, R.A., Pizzuti, A., Ashizawa, T., Perryman, M.B., Scarlato, G., Fenwick, R.G., Jr. & et al. (1993) Decreased expression of myotonin-protein kinase messenger RNA and protein in adult form of myotonic dystrophy. *Science* **260**, 235-238.

Fugier, C., Klein, A.F., Hammer, C. *et al.* (2011) Misregulated alternative splicing of BIN1 is associated with T tubule alterations and muscle weakness in myotonic dystrophy. *Nat Med* **17**, 720-725.

Gatchel, J.R. & Zoghbi, H.Y. (2005) Diseases of unstable repeat expansion: mechanisms and common principles. *Nat Rev Genet* **6**, 743-755.

Good, P.J., Chen, Q., Warner, S.J. & Herring, D.C. (2000) A family of human RNA-binding proteins related to the Drosophila Bruno translational regulator. *J Biol Chem* **275**, 28583-28592.

Gooding, C., Roberts, G.C. & Smith, C.W. (1998) Role of an inhibitory pyrimidine element and polypyrimidine tract binding protein in repression of a regulated alpha-tropomyosin exon. *RNA* **4**, 85-100.

Hao, M., Akrami, K., Wei, K., De Diego, C., Che, N., Ku, J.H., Tidball, J., Graves, M.C., Shieh, P.B. & Chen, F. (2008) Muscleblind-like 2 (Mbnl2) -deficient mice as a model for myotonic dystrophy. *Dev Dyn* **237**, 403-410.

Harper, P. (2001) Myotonic Dystrophy. 3rd ed. (W.B. Saunders Company)

Hino, S., Kondo, S., Sekiya, H., Saito, A., Kanemoto, S., Murakami, T., Chihara, K., Aoki, Y., Nakamori, M., Takahashi, M.P. & Imaizumi, K. (2007) Molecular mechanisms responsible for aberrant splicing of SERCA1 in myotonic dystrophy type 1. *Hum Mol Genet* **16**, 2834-2843.

Ho, T.H., Charlet, B.N., Poulos, M.G., Singh, G., Swanson, M.S. & Cooper, T.A. (2004) Muscleblind proteins regulate alternative splicing. *EMBO J* **23**, 3103-3112.

Holt, I., Jacquemin, V., Fardaei, M., Sewry, C.A., Butler-Browne, G.S., Furling, D., Brook, J.D. & Morris, G.E. (2009) Muscleblind-like proteins: similarities and differences in normal



and myotonic dystrophy muscle. *Am J Pathol* **174**, 216-227.

Huichalaf, C., Sakai, K., Jin, B., Jones, K., Wang, G.L., Schoser, B., Schneider-Gold, C., Sarkar, P., Pereira-Smith, O.M., Timchenko, N. & Timchenko, L. (2010) Expansion of CUG RNA repeats causes stress and inhibition of translation in myotonic dystrophy 1 (DM1) cells. *FASEB J* **24**, 3706-3719.

Huichalaf, C., Schoser, B., Schneider-Gold, C., Jin, B., Sarkar, P. & Timchenko, L. (2009) Reduction of the rate of protein translation in patients with myotonic dystrophy 2. *J Neurosci* **29**, 9042-9049.

Jin, Y., Suzuki, H., Maegawa, S., Endo, H., Sugano, S., Hashimoto, K., Yasuda, K. & Inoue, K. (2003) A vertebrate RNA-binding protein Fox-1 regulates tissue-specific splicing via the pentanucleotide GCAUG. *EMBO J* **22**, 905-912.

Johnson, J.M., Castle, J., Garrett-Engele, P., Kan, Z., Loerch, P.M., Armour, C.D., Santos, R., Schadt, E.E., Stoughton, R. & Shoemaker, D.D. (2003) Genome-wide survey of human alternative pre-mRNA splicing with exon junction microarrays. *Science* **302**, 2141-2144.

Jones, K., Wei, C., Iakova, P., Bugiardi, E., Schneider-Gold, C., Meola, G., Woodgett, J., Killian, J., Timchenko, N.A. & Timchenko, L.T. (2012) GSK3beta mediates muscle pathology in myotonic dystrophy. *J Clin Invest* **122**, 4461-4472.

Kalsotra, A., Xiao, X., Ward, A.J., Castle, J.C., Johnson, J.M., Burge, C.B. & Cooper, T.A. (2008) 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.

Kanadia, R.N., Johnstone, K.A., Mankodi, A., Lungu, C., Thornton, C.A., Esson, D., Timmers, A.M., Hauswirth, W.W. & Swanson, M.S. (2003) A muscleblind knockout model for myotonic dystrophy. *Science* **302**, 1978-1980.

Kanadia, R.N., Urbinati, C.R., Crusselle, V.J., Luo, D., Lee, Y.J., Harrison, J.K., Oh, S.P. & Swanson, M.S. (2003) Developmental expression of mouse muscleblind genes Mbnl1, Mbnl2 and Mbnl3. *Gene Expr Patterns* **3**, 459-462.

Kim, A.C., Peters, L.L., Knoll, J.H., Van Huffel, C., Ciciotte, S.L., Kleyn, P.W. & Chishti,

A.H. (1997) Limatin (LIMAB1), an actin-binding LIM protein, maps to mouse chromosome 19 and human chromosome 10q25, a region frequently deleted in human cancers. *Genomics* **46**, 291-293.

Kimura, T., Nakamori, M., Lueck, J.D., Pouliquin, P., Aoike, F., Fujimura, H., Dirksen, R.T., Takahashi, M.P., Dulhunty, A.F. & Sakoda, S. (2005) Altered mRNA splicing of the skeletal muscle ryanodine receptor and sarcoplasmic/endoplasmic reticulum Ca<sup>2+</sup>-ATPase in myotonic dystrophy type 1. *Hum Mol Genet* **14**, 2189-2200.

Kino, Y., Mori, D., Oma, Y., Takeshita, Y., Sasagawa, N. & Ishiura, S. (2004) Muscleblind protein, MBNL1/EXP, binds specifically to CHHG repeats. *Hum Mol Genet* **13**, 495-507.

Kino, Y., Washizu, C., Oma, Y., Onishi, H., Nezu, Y., Sasagawa, N., Nukina, N. & Ishiura, S. (2009) MBNL and CELF proteins regulate alternative splicing of the skeletal muscle chloride channel CLCN1. *Nucleic Acids Res* **37**, 6477-6490.

Klinck, R., Fourrier, A., Thibault, P., Toutant, J., Durand, M., Lapointe, E., Caillet-Boudin, M.L., Sergeant, N., Gourdon, G., Meola, G., Furling, D., Puymirat, J. & Chabot, B. (2014) RBFOX1 cooperates with MBNL1 to control splicing in muscle, including events altered in myotonic dystrophy type 1. *PLoS One* **9**, e107324.

Knoch, K.P., Meisterfeld, R., Kersting, S., Bergert, H., Altkruger, A., Wegbrod, C., Jager, M., Saeger, H.D. & Solimena, M. (2006) cAMP-dependent phosphorylation of PTB1 promotes the expression of insulin secretory granule proteins in beta cells. *Cell Metab* **3**, 123-134.

Koebis, M., Ohsawa, N., Kino, Y., Sasagawa, N., Nishino, I. & Ishiura, S. (2011) Alternative splicing of myomesin 1 gene is aberrantly regulated in myotonic dystrophy type 1. *Genes Cells* **16**, 961-972.

Koshelev, M., Sarma, S., Price, R.E., Wehrens, X.H. & Cooper, T.A. (2010) Heart-specific overexpression of CUGBP1 reproduces functional and molecular abnormalities of myotonic dystrophy type 1. *Hum Mol Genet* **19**, 1066-1075.

Kress, C., Gautier-Courteille, C., Osborne, H.B., Babinet, C. & Paillard, L. (2007) Inactivation of CUG-BP1/CELF1 causes growth, viability, and spermatogenesis defects in mice. *Mol Cell Biol* **27**, 1146-1157.

- Kuyumcu-Martinez, N.M., Wang, G.S. & Cooper, T.A. (2007) Increased steady-state levels of CUGBP1 in myotonic dystrophy 1 are due to PKC-mediated hyperphosphorylation. *Mol Cell* **28**, 68-78.
- Ladd, A.N., Charlet, N. & Cooper, T.A. (2001) The CELF family of RNA binding proteins is implicated in cell-specific and developmentally regulated alternative splicing. *Mol Cell Biol* **21**, 1285-1296.
- Ladd, A.N., Nguyen, N.H., Malhotra, K. & Cooper, T.A. (2004) CELF6, a member of the CELF family of RNA-binding proteins, regulates muscle-specific splicing enhancer-dependent alternative splicing. *J Biol Chem* **279**, 17756-17764.
- Lee, J.E., Lee, J.Y., Wilusz, J., Tian, B. & Wilusz, C.J. (2010) 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.
- Leeflang, E.P. & Arnheim, N. (1995) A novel repeat structure at the myotonic dystrophy locus in a 37 repeat allele with unexpectedly high stability. *Hum Mol Genet* **4**, 135-136.
- Lin, C.H., Thompson, C.A. & Forscher, P. (1994) Cytoskeletal reorganization underlying growth cone motility. *Curr Opin Neurobiol* **4**, 640-647.
- Lin, X., Miller, J.W., Mankodi, A., Kanadia, R.N., Yuan, Y., Moxley, R.T., Swanson, M.S. & Thornton, C.A. (2006) Failure of MBNL1-dependent post-natal splicing transitions in myotonic dystrophy. *Hum Mol Genet* **15**, 2087-2097.
- Liquori, C.L., Ricker, K., Moseley, M.L., Jacobsen, J.F., Kress, W., Naylor, S.L., Day, J.W. & Ranum, L.P. (2001) Myotonic dystrophy type 2 caused by a CCTG expansion in intron 1 of ZNF9. *Science* **293**, 864-867.
- Lu, C., Huang, X., Ma, H.F., Gooley, J.J., Aparacio, J., Roof, D.J., Chen, C., Chen, D.F. & Li, T. (2003) Normal retinal development and retinofugal projections in mice lacking the retina-specific variant of actin-binding LIM domain protein. *Neuroscience* **120**, 121-131.
- Lu, X., Timchenko, N.A. & Timchenko, L.T. (1999) Cardiac elav-type RNA-binding protein

(ETR-3) binds to RNA CUG repeats expanded in myotonic dystrophy. *Hum Mol Genet* **8**, 53-60.

Lundquist, E.A., Herman, R.K., Shaw, J.E. & Bargmann, C.I. (1998) UNC-115, a conserved protein with predicted LIM and actin-binding domains, mediates axon guidance in *C. elegans*. *Neuron* **21**, 385-392.

Mahadevan, M., Tsilfidis, C., Sabourin, L. *et al.* (1992) Myotonic dystrophy mutation: an unstable CTG repeat in the 3' untranslated region of the gene. *Science* **255**, 1253-1255.

Makeyev, E.V., Zhang, J., Carrasco, M.A. & Maniatis, T. (2007) The MicroRNA miR-124 promotes neuronal differentiation by triggering brain-specific alternative pre-mRNA splicing. *Mol Cell* **27**, 435-448.

Mankodi, A., Logigian, E., Callahan, L., McClain, C., White, R., Henderson, D., Krym, M. & Thornton, C.A. (2000) Myotonic dystrophy in transgenic mice expressing an expanded CUG repeat. *Science* **289**, 1769-1773.

Mankodi, A., Takahashi, M.P., Jiang, H., Beck, C.L., Bowers, W.J., Moxley, R.T., Cannon, S.C. & Thornton, C.A. (2002) Expanded CUG repeats trigger aberrant splicing of ClC-1 chloride channel pre-mRNA and hyperexcitability of skeletal muscle in myotonic dystrophy. *Mol Cell* **10**, 35-44.

Mankodi, A., Teng-Umnuay, P., Krym, M., Henderson, D., Swanson, M. & Thornton, C.A. (2003) Ribonuclear inclusions in skeletal muscle in myotonic dystrophy types 1 and 2. *Ann Neurol* **54**, 760-768.

Meola, G. & Cardani, R. (2014) Myotonic dystrophies: An update on clinical aspects, genetic, pathology, and molecular pathomechanisms. *Biochim Biophys Acta* [Epub]

Miller, J.W., Urbinati, C.R., Teng-Umnuay, P., Stenberg, M.G., Byrne, B.J., Thornton, C.A. & Swanson, M.S. (2000) Recruitment of human muscleblind proteins to (CUG)(n) expansions associated with myotonic dystrophy. *EMBO J* **19**, 4439-4448.

Monckton, D.G., Wong, L.I., Ashizawa, T., Caskey, C.T. (1995) Somatic mosaicism, germline expansions, germline reversions and intergenerational reductions in myotonic

dystrophy males: small pool PCR analyses. *Hum Mol Genet* **4**, 1–8.

Musova, Z., Mazanec, R., Krepelova, A., Ehler, E., Vales, J., Jaklova, R., Prochazka, T., Koukal, P., Marikova, T., Kraus, J., Havlovicova, M. & Sedlacek, Z. (2009) Highly unstable sequence interruptions of the CTG repeat in the myotonic dystrophy gene. *Am J Med Genet* **149A**, 1365-1374.

Ohsawa, N., Koebis, M., Suo, S., Nishino, I. & Ishiura, S. (2011) Alternative splicing of PDLIM3/ALP, for alpha-actinin-associated LIM protein 3, is aberrant in persons with myotonic dystrophy. *Biochem Biophys Res Commun* **409**, 64-69.

Ohsawa, N., Koebis, M., Mitsuhashi, H., Nishino, I. & Ishiura, S. (2014) ABLIM1 splicing is abnormal in skeletal muscle of patients with DM1 and regulated by MBNL, CELF and PTBP1. *Genes Cells* [Epub].

Paul, S., Dansithong, W., Kim, D., Rossi, J., Webster, N.J., Comai, L. & Reddy, S. (2006) Interaction of muscleblind, CUG-BP1 and hnRNP H proteins in DM1-associated aberrant IR splicing. *EMBO J* **25**, 4271-4283.

Philips, A.V., Timchenko, L.T. & Cooper, T.A. (1998) Disruption of splicing regulated by a CUG-binding protein in myotonic dystrophy. *Science* **280**, 737-741.

Poulos, M.G., Batra, R., Li, M., Yuan, Y., Zhang, C., Darnell, R.B. & Swanson, M.S. (2013) Progressive impairment of muscle regeneration in muscleblind-like 3 isoform knockout mice. *Hum Mol Genet* **22**, 3547-3558.

Poulos, M.G., Batra, R., Li, M., Yuan, Y., Zhang, C., Darnell, R.B. & Swanson, M.S. (2013) Progressive impairment of muscle regeneration in muscleblind-like 3 isoform knockout mice. *Hum Mol Genet* **22**, 3547-3558.

Rau, F., Freyermuth, F., Fugier, C. *et al.* (2011) Misregulation of miR-1 processing is associated with heart defects in myotonic dystrophy. *Nat Struct Mol Biol* **18**, 840-845.

Ravel-Chapuis, A., Belanger, G., Yadava, R.S., Mahadevan, M.S., DesGroseillers, L., Cote, J. & Jasmin, B.J. (2012) The RNA-binding protein Stauf1 is increased in DM1 skeletal muscle and promotes alternative pre-mRNA splicing. *J Cell Biol* **196**, 699-712.

Roof, D.J., Hayes, A., Adamian, M., Chishti, A.H. & Li, T. (1997) Molecular characterization of abLIM, a novel actin-binding and double zinc finger protein. *J Cell Biol* **138**, 575-588.

Salisbury, E., Sakai, K., Schoser, B., Huichalaf, C., Schneider-Gold, C., Nguyen, H., Wang, G.L., Albrecht, J.H. & Timchenko, L.T. (2008) Ectopic expression of cyclin D3 corrects differentiation of DM1 myoblasts through activation of RNA CUG-binding protein, CUGBP1. *Exp Cell Res* **314**, 2266-2278.

Santoro, M., Masciullo, M., Pietrobono, R., Conte, G., Modoni, A., Bianchi, M.L., Rizzo, V., Pomponi, M.G., Tasca, G., Neri, G. & Silvestri, G. (2013) Molecular, clinical, and muscle studies in myotonic dystrophy type 1 (DM1) associated with novel variant CCG expansions. *J Neurol* **260**, 1245-1257.

Sasabe, T., Futai, E. & Ishiura, S. (2011) Polypyrimidine tract-binding protein 1 regulates the alternative splicing of dopamine receptor D2. *J Neurochem* **116**, 76-81.

Savkur, R.S., Philips, A.V. & Cooper, T.A. (2001) Aberrant regulation of insulin receptor alternative splicing is associated with insulin resistance in myotonic dystrophy. *Nat Genet* **29**, 40-47.

Savkur, R.S., Philips, A.V., Cooper, T.A., Dalton, J.C., Moseley, M.L., Ranum, L.P. & Day, J.W. (2004) Insulin receptor splicing alteration in myotonic dystrophy type 2. *Am J Hum Genet* **74**, 1309-1313.

Sayed, D., Hong, C., Chen, I.Y., Lypowy, J. & Abdellatif, M. (2007) MicroRNAs play an essential role in the development of cardiac hypertrophy. *Circ Res* **100**, 416-424.

Schmeichel, K.L. & Beckerle, M.C. (1994) The LIM domain is a modular protein-binding interface. *Cell* **79**, 211-219.

Sergeant, N., Sablonniere, B., Schraen-Maschke, S., Ghestem, A., Maurage, C.A., Wattez, A., Vermersch, P. & Delacourte, A. (2001) Dysregulation of human brain microtubule-associated tau mRNA maturation in myotonic dystrophy type 1. *Hum Mol Genet* **10**, 2143-2155.

- Southby, J., Gooding, C. & Smith, C.W. (1999) Polypyrimidine tract binding protein functions as a repressor to regulate alternative splicing of alpha-actinin mutually exclusive exons. *Mol Cell Biol* **19**, 2699-2711.
- Takahashi, N., Sasagawa, N., Suzuki, K. & Ishiura, S. (2000) The CUG-binding protein binds specifically to UG dinucleotide repeats in a yeast three-hybrid system. *Biochem Biophys Res Commun* **277**, 518-523.
- Taneja, K.L., McCurrach, M., Schalling, M., Housman, D. & Singer, R.H. (1995) Foci of trinucleotide repeat transcripts in nuclei of myotonic dystrophy cells and tissues. *J Cell Biol* **128**, 995-1002.
- Tang, Z.Z., Yarotsky, V., Wei, L., Sobczak, K., Nakamori, M., Eichinger, K., Moxley, R.T., Dirksen, R.T. & Thornton, C.A. (2012) Muscle weakness in myotonic dystrophy associated with misregulated splicing and altered gating of Ca(V)1.1 calcium channel. *Hum Mol Genet* **21**, 1312-1324.
- Timchenko, L.T., Miller, J.W., Timchenko, N.A., DeVore, D.R., Datar, K.V., Lin, L., Roberts, R., Caskey, C.T. & Swanson, M.S. (1996a) Identification of a (CUG)<sub>n</sub> triplet repeat RNA-binding protein and its expression in myotonic dystrophy. *Nucleic Acids Res* **24**, 4407-4414.
- Timchenko, L.T., Timchenko, N.A., Caskey, C.T. & Roberts, R. (1996b) Novel proteins with binding specificity for DNA CTG repeats and RNA CUG repeats: implications for myotonic dystrophy. *Hum Mol Genet* **5**, 115-121.
- Timchenko, N.A., Cai, Z.J., Welm, A.L., Reddy, S., Ashizawa, T. & Timchenko, L.T. (2001) RNA CUG repeats sequester CUGBP1 and alter protein levels and activity of CUGBP1. *J Biol Chem* **276**, 7820-7826.
- Timchenko, N.A., Wang, G.L. & Timchenko, L.T. (2005) RNA CUG-binding protein 1 increases translation of 20-kDa isoform of CCAAT/enhancer-binding protein beta by interacting with the alpha and beta subunits of eukaryotic initiation translation factor 2. *J Biol Chem* **280**, 20549-20557.
- Underwood, J.G., Boutz, P.L., Dougherty, J.D., Stoilov, P. & Black, D.L. (2005) Homologues

of the *Caenorhabditis elegans* Fox-1 protein are neuronal splicing regulators in mammals. *Mol Cell Biol* **25**, 10005-10016.

Vermeulen, W., Vanhaesebrouck, P., Van Troys, M., Verschueren, M., Fant, F., Goethals, M., Ampe, C., Martins, J.C. & Borremans, F.A. (2004) Solution structures of the C-terminal headpiece subdomains of human villin and advillin, evaluation of headpiece F-actin-binding requirements. *Protein Sci* **13**, 1276-1287.

Wang, E.T., Cody, N.A., Jog, S., Biancolella, M., Wang, T.T., Treacy, D.J., Luo, S., Schroth, G.P., Housman, D.E., Reddy, S., Lecuyer, E. & Burge, C.B. (2012) Transcriptome-wide regulation of pre-mRNA splicing and mRNA localization by muscleblind proteins. *Cell* **150**, 710-724.

Ward, A.J., Rimer, M., Killian, J.M., Dowling, J.J. & Cooper, T.A. (2010) CUGBP1 overexpression in mouse skeletal muscle reproduces features of myotonic dystrophy type 1. *Hum Mol Genet* **19**, 3614-3622.

Wu, J., Li, C., Zhao, S. & Mao, B. (2010) Differential expression of the Brunol/CELF family genes during *Xenopus laevis* early development. *Int J Dev Biol* **54**, 209-214.

Xie, J., Lee, J.A., Kress, T.L., Mowry, K.L. & Black, D.L. (2003) Protein kinase A phosphorylation modulates transport of the polypyrimidine tract-binding protein. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**, 8776-8781.

Yang, B., Lin, H., Xiao, J., Lu, Y., Luo, X., Li, B., Zhang, Y., Xu, C., Bai, Y., Wang, H., Chen, G. & Wang, Z. (2007) The muscle-specific microRNA miR-1 regulates cardiac arrhythmogenic potential by targeting GJA1 and KCNJ2. *Nat Med* **13**, 486-491.

Zhang, J., Bahi, N., Llovera, M., Comella, J.X. & Sanchis, D. (2009) Polypyrimidine tract binding proteins (PTB) regulate the expression of apoptotic genes and susceptibility to caspase-dependent apoptosis in differentiating cardiomyocytes. *Cell Death Differ* **16**, 1460-1468.

Zhang, L., Liu, W. & Grabowski, P.J. (1999) Coordinate repression of a trio of neuron-specific splicing events by the splicing regulator PTB. *RNA* **5**, 117-130.



Zhao, Y., Ransom, J.F., Li, A., Vedantham, V., von Drehle, M., Muth, A.N., Tsuchihashi, T., McManus, M.T., Schwartz, R.J. & Srivastava, D. (2007) Dysregulation of cardiogenesis, cardiac conduction, and cell cycle in mice lacking miRNA-1-2. *Cell* **129**, 303-317.

Zu, T., Gibbens, B., Doty, N.S. *et al.* (2011) Non-ATG-initiated translation directed by microsatellite expansions. *Proc Natl Acad Sci U S A* **108**, 260-265.

Zu, T., Cleary, J., Liu, Y., Reid, T., Banez-Coronel, M., Xia, G., Ashizawa, T., Yachnis, A., Ranum, L. (2013) RAN Proteins From Intronic CCTG Expansions in DM2 Patient Brains, IDMC9, San Sebastian, Spain, October 16-19.

## 謝辞

本研究の遂行にあたり、数多くの方々にご協力やご助言を頂きました。国立精神・神経医療研究センター神経研究所疾病研究第一部 西野一三部長とその研究室の方々には、DM患者の生検筋サンプルや組織写真をご供与頂き、深く御礼申し上げます。

また、東京大学大学院総合文化研究科 石浦章一教授には、素晴らしい研究環境を与えてくださると共に、時に優しく、時に厳しくご指導していただきましたこと、心より感謝申し上げます。学部4年次より6年もの長い間、国際学会やその他の会議での研究発表、総説の執筆など、数多くの貴重な機会を与えて頂きました。また、研究以外の様々な面でもサポートして下さり、研究を続けられたのも一重に先生のお蔭だと感謝しております。

石浦研の歴代の助教の方々と石浦研のOBの方々には、幾多のご協力とご助言を頂きました。特に、東海大学工学部 笹川昇准教授、東北大学大学院農学研究科 二井勇人准教授、東京大学大学院総合文化研究科 周防諭助教、明治薬科大学 紀嘉浩講師、埼玉医科大学 大間陽子講師、東京大学生命科学ネットワーク 三橋弘明特任助教、東京大学教養教育高度化機構 王旻特任助教、東京理科大学理工学部 古戎道典研究員には、実験手法から研究の方向性に至るまで、多くのご指導とご助言を頂きました。重ねて御礼申し上げます。

この6年間の研究生活が充実したものとなったのは、石浦研究室で同じ時間を過ごした先輩や同期、後輩たちのお蔭です。日々のちょっとした議論から、様々な相談にまでつてくれ、本当に感謝しております。そして色々なことがあっても、前向きに、かつ研究に打ち込む気力を持たせてもらえたのは、皆さんがいたからこそだと思います。

最後に、これまで暖かく見守り支えてくれた家族に心からの感謝を込めて、私の博士論文の筆をおかせて頂きます。本当にありがとうございました。

大澤 奈摘