

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% CO₂ 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*TM 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 μm 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 μl の TRIzol Reagent を加え、ペッスルでホモジナイズした。さらに 300 μl 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 μl 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 μl 、グリコーゲン 10 μg 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 μl 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 μl 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) で破碎して 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 μl 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 μl 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 μl 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 μl で、Oligo (dT) primer を用いて、筋生検は 0.5 μg 、組織は 1 μg 、培養細胞は 0.4-2.5 μg 、マウス筋は 0.2 μg 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 μg 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 μ 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 μ g) を 4 μ 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 μ g) とスプライシング因子発現ベクターまたはリピート発現ベクター (1.3 μ g)、またスプライシング因子とリピ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 μ 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 として *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[®] Trypton

0.5 % Bacto[®] Yeast Extract

1 % 塩化ナトリウム

培地の調製に用いた Bacto[®] Trypton、Bacto[®] Yeast Extract は DIFCO Laboratories 社より、AGAR[®]は伊那食工業より購入した。また、LB プレートには、1.5 % AGAR[®]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 Na₂HPO₄ · 12H₂O

2.68mM KCl

1.47mM KH₂PO₄

- 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 μ 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 µg、スプライシング因子発現ベクター1.3 µg 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 µg、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 μg +)、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 μg 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 μg 、リピート発現ベクター (DM0、DM18、DM480) 0.7 μg と Mock (pSecDK) または MBNL1 発現ベクター 0.7 μg 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*^{LR} 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^{LR}* 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、シーケ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^{LR}* 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^{LR}* 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^{LR} 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^{LR} 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^{LR} 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^{LR} 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^{LR}* の平均は各 0.85 と 0.71 であり、わずかに *HSA^{LR}* 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^{LR}* 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^{LR}* 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^{LR}* 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^{LR}* 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。