

厚生労働科学研究研究費補助金

こころの健康科学研究事業

筋強直性ジストロフィーの病態解明と
RNA を介した治療

平成 17 年度 総括研究報告書

主任研究者 石浦 章一

平成 18 (2006) 年 5 月

目 次

I. 総括研究報告	
筋強直性ジストロフィーの病態解明と RNA を介した治療	1
石浦 章一	
II. 分担研究報告	
1. DM1 以外の筋強直性ジストロフィーに関する研究	3
西野 一三	
2. 筋ジストロフィーの分子発病機序としての matrix metalloproteinase による複合体の崩壊に関する研究	5
清水 輝夫	
III. 研究成果の刊行に関する一覧表	7
IV. 研究成果の刊行物・別刷	9

厚生労働科学研究費補助金（こころの健康科学研究事業）
総括研究報告書

筋強直性ジストロフィーの病態解明と RNA を介した治療

総括研究者 石 浦 章 一
東京大学大学院 総合文化研究科 教授

研究要旨

筋強直性ジストロフィー（DM）には 2 つの型があるが、どちらも三または四塩基の繰り返しが増加することで発症する。発症には、スプライシングに関わる MBNL ファミリーと CELF ファミリーという 2 つの RNA 結合タンパク質が関与していることが明らかになっている。しかし、患者筋ではこれらファミリーの発現など、詳細は全く知られていなかった。本年度の研究により、MBNL1, 2, CELF1 の量には変化がないことがわかった。

A. 研究目的

筋強直性ジストロフィー（DM）は我が国で一番多い筋ジストロフィーである。致死性ではないものの、ミオトニア、精神遅滞、糖耐能の異常、性腺萎縮など種々の全身症状が出て、生活の質を改善する薬も見当たらない状態が続いている。原因は、1型は DM キナーゼ（DMPK）の 3'非翻訳領域の CTG リピート、2型はジンクフィンガータンパク質 ZNF9 をコードする遺伝子のイントロンにある CCTG リピートの伸長であることが明らかになっている。私たちは、ここ数年の研究でこれらの RNA リピートに結合するタンパク質として MBNL1-3 と CELF1-6 を同定した。ところが DM 筋では、これらの発現量などの情報全くなかった。そこで本年度、これら 9 種類の RNA 結合タンパク質の発現量をリアルタイム PCR を用いて明らかにした。

B. 研究方法（倫理面の配慮含む）

ヒト cDNA ライブラリーより、MBNL と CELF あわせて 9 種のリピート RNA 結合タンパク質（MBNL1, MBNL2, MBNL3, CUG-BP, CUG-BP2, CELF3, CELF4, CELF5, CELF6）をクローニングした。

スプライシングを調べるアッセイ系には、塩素チャンネル、インスリン受容体、 α アクチニン、c-src などの mini-gene を用い、HEK 細胞にトランスフェクションした後、発現を確認した。リアルタイム PCR は定法どおり行った（本実験では市販の

ヒト cDNA ライブラリーを用いたため、倫理規定に抵触することはない）。

酵母 two-hybrid, 免疫沈降と DNA マイクロアレイは、定法通りに行った。特に後者では CTG130 リピートを含む DMPKcDNA を導入した筋芽細胞 C2C12 を用いた。

DM 患者生検筋は、患者からインフォームドコンセントを取得し、国立精神・神経センター倫理委員会で承認を受けたものを用いたもので、西野一三部長との共同研究である。

C. 研究結果と考察

1) DM 筋における MBNL1 の発現

リアルタイム PCR を用いて MBNL1 の量を、DM 患者 21 例と疾患対象者 12 例で調べたところ、DM の方が相対値 0.85 と少ないような印象があったが、対照と比較し有意検定を行ったところ有意差が検出されなかった。同様に MBNL2, CELF1 についても検討を行ったが、これについても有意差がなかった。

2) MBNL と CELF のスプライシングへの関与

上記 *in vitro* スプライシング系に MBNL や CELF cDNA を導入し、mini-gene のスプライシングパターンが変化するかどうかを調べた。その結果マウス塩素チャンネルを用いた実験では、MBNL のどれもエキソン 7A のスキップ方向による機能的タンパク質の合成方向に働くのに対し、CELF3-6 ではエキソン 7A を含むようにスプライスし、不活性なタンパク質を作らせることがわか

った。

3) 酵母 two-hybrid による RNA 結合タンパク質の相互作用

これによってMBNLファミリーとCELFファミリーのほとんどが相互作用することがわかった。しかしながら免疫沈降時に RNase を作用させると相互作用が弱まることから、結合がリピート RNA を介している可能性が示唆された。

4) DNA マイクロアレイ

C2C12 細胞に DMPK (リピート 130) または DMPK(リピート 5)を導入した安定形質発現細胞でDNA マイクロアレイ解析を行い、リピート130 導入細胞で発現が変化する遺伝子を探索した。その結果、上流に AP1 を持つ遺伝子群の発現が変化する事がわかった。

D. 結論

全身症状を呈する筋強直性ジストロフィーは、塩素チャンネル (ミオトニア)、インスリン受容体 (糖耐能の異常)、トロポニン T (心筋異常) など種々の遺伝子のスプライシングな異常になって起こることが明らかになってきた。例えば、マウス塩素チャンネル遺伝子では、エキソン7Aが入ると途中で停止コドンが入り、短縮されたタンパク質が作られて機能が消失するが、エキソン7A が飛ばされると正常機能型の塩素チャンネルになる。前者は胎児筋で、後者は成熟筋でよくみられるスプライシングである。MBNL や CELF の発現量によってこれらが調節されていることは間違いない。これらの RNA 結合タンパク質の発現量が変わるとこのバランスが崩れ、スプライシングパターンが変わって発症してしまうことが本研究で明らかになった。

本研究ではっきりしたことは、DM 患者筋では MBNL や CELF の量が変わらないことを初めて証明できたことにある。今後、何がスプライシングを調節しているのかを明らかにすることが課題となる。

E. 健康危険情報

なし

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Ishiura, S., Kino, Y., Nezu, Y., Onishi, H., Ohno, E. and Sasagawa, N. (2005) Regulation of splicing by MBNL and CELF family of RNA-binding protein. *Acta Myologica*, 14, 74-77
- 2) Oma, Y., Kino, Y., Sasagawa, N. & Ishiura, S. (2005) Comparative analysis of the cytotoxicity of homopolymeric amino acids. *Biochim. Biophys. Acta* 1748, 174-179
- 3) Mitsuhashi, H., Yoshikawa, A., Sasagawa, N., Hayashi, Y. & Ishiura, S. (2005) Denervation enhances the expression of SHPS-1 in the rat skeletal muscle. *J. Biochem.* 137, 495-502
- 4) 石浦章一. 筋強直性ジストロフィー発症のメカニズム. *日本臨床* 63, 515-521, 2005.
- 5) 笹川昇, 石浦章一. 筋強直性ジストロフィープロテインキナーゼ(DMPK). *生体の科学* 56, 390-391, 2005.
- 6) 石浦章一. RNA病としての筋強直性ジストロフィー. *臨床神経学* 45, 828-830, 2005.
- 7) 笹川昇, 石浦章一. 筋強直性ジストロフィーの分子生物学的発症機構. *臨床検査* 49, 1162-1165, 2005.
- 8) 石浦章一. 筋強直性ジストロフィー発症とRNA機能障害仮説. *Ann. Rev. 神経* 2006 pp.264-268, 20, 2005.

G. 知的財産権の出願・登録状況

なし

厚生労働科学研究費補助金（こころの健康科学研究事業）
(分担)研究報告書

DM1 以外の筋強直性ジストロフィーに関する研究

分担研究者 西野 一三 国立精神・神経センター神経研究所部長

研究要旨

臨床的に筋強直性筋ジストロフィー(Dystrophia myotonia; DM)の可能性が疑われた例の骨格筋 195 検体を検索し、非 DM1 かつ非 DM2 の DM、1 例を初めて見いだした。DM1 は 173 例であったが、DM2 は存在しなかった。

A. 研究目的

筋強直性筋ジストロフィー(Dystrophia myotonia; DM)は、成人における遺伝性筋疾患の中でもっとも頻度が高く、また多くの臓器が傷害される全身性疾患である。これまでに、分子遺伝学的には、少なくとも2つのDM(DM1およびDM2)が存在することが知られているが、本邦においては、これまでのところDM1しか見いだされていない。そこで、本邦において、DM1以外のDM、すなわち、DM2あるいはDM1でもDM2でもない新たなDMが存在するかどうかを検討した。

B. 研究方法

DM1は、19q13.2-q13.3上のDMPK遺伝子3'非翻訳領域にあるCTGリピートの伸張が、DM2は、3q13.3-q24にあるZNF9遺伝子のイントロン1内のCCTGリピートの伸張が、それぞれ遺伝学的原因である。ともに、スプライシング調節因子MBLN1が伸張リピート部に結合するため、MBLN1の機能的欠乏状態となり、各種遺伝子のsplicing異常とその結果としての蛋白質異常を引き起こすことが病態であると考えられている。

そこで、1978年～2005までに国立精神・神経センター生検筋レポジトリに登録された凍結筋検体の内、臨床的にDMと診断されたかあるいはその疑いをかけられた例で、検体量の問題から各種実験が可能な195検体を対象として、DMPK遺伝子

内のCTGリピート及びZNF9遺伝子内のCCTGリピートの延長の有無をPCR法により検出した。また、DMPKのリピート伸張がない例においては、CLC-1、INSR、RYR-1の各遺伝子について、RT-PCRを行いスプライシング・パターンを検討するとともに、CLC-1、MBNL-1について骨格筋の免疫組織染色を行い、蛋白質レベルでの発現を検討した。

(倫理面配慮)

全ての検体について、国立精神・神経センター倫理委員会で承認を受けた「診断と検体の研究使用に関する承諾書」を用い、患者からのインフォームド・コンセントを取得している。

C. 研究結果

195検体中、173検体で、DMPKにおけるCTGリピートの延長を認め、DM1と診断した。残りの22例中1例にのみCLC-1、INSR、RYR-1でのスプライシング異常を認めるとともに、CLC-1蛋白質の発現減少を認めたが、その他の21例では異常を認めなかった。スプライシング異常を認めた例でのみ、MBNL-1の核内凝集を認めた。この1例を含む20例で、ZNF9遺伝子のCCTGリピート部位の正常alleleが2種類増幅され、DM2は否定された。

D. 考察

DMPK内のリピート伸張およびZNF9内のリピート

伸張をともに認めず、スプライシング異常を認める例を初めて見いだした。すなわち、非 DM1、非 DM2 の DM を初めて同定したことになる。従来 DM3 とされていた家系は、DM ではなかったことが明らかにされたことから、本例こそが正当の DM3 と考えられる。2 例において、ZNF9 の正常アレルが 1 本しか増幅されなかったが、これらの例においては、スプライシング異常がなく、また、MBNL-1 の核内凝集も認められなかったことから、DM2 の可能性は否定されると考えた。

E. 結論

非 DM1、非 DM2 の DM (DM3) を初めて見いだした。本邦においては、DM2 は存在しないか、あるいは存在したとしても極めて希である。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

Sugie K, Noguchi S, Kozuka Y, Arikawa-Hirasawa E, Tanaka M, Yan C, Saftig P, Figura KV, Hirano M, Ueno S, Nonaka I, Nishino I: Autophagic Vacuoles with Sarcolemmal Features Delineate Danon Disease and Related Myopathies. J Neuropathol Exp Neurol 64:513-522, 2005.

Nakagawa O, Arnold M, Nakagawa M, Hamada H, Shelton JM, Kusano H, Harris TM, Childs G, Campbell KP, Richardson JA, Nishino I, Olson EN: Centronuclear myopathy in mice lacking a novel muscle-specific protein kinase transcriptionally regulated by MEF2. Genes & Dev 19: 2066-2077, 2005.

Noguchi S, Fujita M, Murayama K, Kurokawa R, Nishino I : Gene expression analyses in X-linked myotubular myopathy. Neurology 65:732-737, 2005.

Yan C, Tanaka M, Sugie K, Nobutoki T, Woo M, Murase N, Higuchi Y, Noguchi S, Nonaka I, Hayashi YK, Nishino I: A New Congenital form of X-linked autophagic vacuolar myopathy. Neurology 65: 1132-1134, 2005.

2. 学会発表

Nishino I, Wu S, Ibarra C, Murayama K, Noguchi S, Hayashi YK, Nonaka I: Central Core Disease is due to RyR1 Mutations in more than 90% of patients. XVIIIth World Congress of Neurology, 5-11 November 2005, Sydney, 11.7, 2005.

H. 知的財産権の出願・登録状況(予定を含む)

1. 特許取得

特になし

2. 実用新案登録

特になし

3. その他

特になし

厚生労働科学研究費補助金（こころの健康科学研究事業）
分担研究報告書

筋ジストロフィーの分子発病機序としての matrix metalloproteinase による
dystroglycan 複合体の崩壊に関する研究

分担研究者 清水輝夫 帝京大学医学部 教授

研究要旨

Dystroglycan (DG) 複合体は細胞外基底膜と細胞内骨格を強固に架橋する分子機構である。本研究では β DG の細胞外ドメインを分解することにより DG 複合体を破壊する matrix metalloproteinase (MMP) 活性を解析した。精製した β DG ならびに β DG の細胞外ドメインの融合蛋白を RT4 細胞、培地、また各種の MMP とインキュベートし分解を見た。RT4 細胞、培地の zymography, RT-PCR を行い MMP の発現を解析した。RT4 細胞培地には β DG の細胞外ドメインを特異的に分解する MMP 活性が存在した、この活性は MMP-2 と 9 の特異的阻害剤で抑制された。 β DG の細胞外ドメインは MMP-2 と 9 により分解された。Zymography, RT-PCR により RT4 細胞による MMP-2 と 9 の産生が確認された。 β DG の細胞外ドメインが分解される過程には細胞から分泌された MMP-2 と 9 が関与すると考えられた。次に sarcoglycan 欠損症, Duchenne 型筋ジストロフィー, 福山型先天性筋ジストロフィー, 炎症性筋疾患, 筋強直性筋ジストロフィーなど各種の筋疾患の生検筋において DG 複合体を破壊する MMP 活性が亢進しているか解析し, sarcoglycan 欠損症, Duchenne 型筋ジストロフィーで特異的に亢進していることを見出した。

A. 研究目的

Dystroglycan (DG) 複合体は様々な細胞の表面膜に発現し発生の初期には基底膜形成の中核となりその後は基底膜と細胞内骨格をつなぎとめる強固な架橋構造として維持される。これを別の角度から見ると生理的状态としての細胞の発生・分化, ならびに病的状態としての癌細胞の転移・侵潤などの過程にはこの架橋構造を特異的にしかも効率良く破壊するメカニズムが存在するはずである。このようなメカニズムとして我々は β DG の細胞外ドメインを特異的に分解する matrix metalloproteinase (MMP) 活性を報告して来た。またこの MMP 活性が sarcoglycan 欠損症, Duchenne 型筋ジストロフィーで亢進していることを明らかにした。これらの成果に基づき, 本研究では β DG の細胞外ドメインを分解することにより DG 複合体を介した細胞内外の架橋構造を破壊する MMP 活性を解析した。さらに sarcoglycan 欠損症, Duchenne 型筋ジストロフィ

一, 福山型先天性筋ジストロフィー, 炎症性筋疾患, 筋強直性筋ジストロフィーなど各種の筋疾患の生検筋において DG 複合体を破壊する MMP 活性が亢進しているかを検討した。

B. 研究方法

- ①ラットシュワン細胞腫由来の RT4 細胞から β DG を精製した。また β DG の細胞内, 細胞外ドメイン, その他の融合蛋白を作成した。これらを RT4 細胞とその培地, また各種の MMP とインキュベートし分解を見た。さらに RT4 細胞, 培地の zymography, RT-PCR を行い MMP の発現を解析した。
- ②sarcoglycan 欠損症, Duchenne 型筋ジストロフィー, 福山型先天性筋ジストロフィー, 炎症性筋疾患など各種筋疾患の生検筋を β dystroglycan のカルボキシル末端を認識する抗体を用いたイムノブロット法で解析した。

C. 研究結果

①RT4細胞培地にはβDGの細胞外ドメインの融合蛋白を特異的に分解するMMP活性が存在した、この活性はRT4細胞から精製したβDGも分解した。βDGの細胞外ドメインの融合蛋白と精製したβDGのRT4細胞培地による分解はMMP-2, MMP-9の特異的阻害剤によって抑制された。βDGの細胞外ドメインの融合蛋白と精製したβDGはMMP-2, MMP-9の活性型酵素により分解された。この分解活性においてMMP-2, MMP-9は相乗効果を示した。Zymography, RT-PCRによりRT4細胞によるMMP-2とMMP-9の産生が確認された。

②MMPによるβdystroglycan細胞外ドメインの分解はsarcoglycan欠損症とDuchenne型筋ジストロフィーで著明に亢進していたが、その他の疾患では正常と差を認めなかった。

D. 考察

βDGの細胞外ドメインが分解される過程には細胞から分泌されたMMP-2と9が関与する。この分解によりDGを介する細胞外基底膜と細胞膜の架橋構造が破綻することが予想される。またdystrophinの一次的な欠損のために二次的にsarcoglycanを欠損するDuchenne型筋ジストロフィーでも同様の現象を認めた。これらの結果は一次的、二次的を問わずsarcoglycanを欠損する筋ではこのmatrix metalloproteinase活性が亢進し、その結果として起こるdystroglycan複合体の崩壊が筋細胞変性に関与していることを示唆した。従ってこれらの蛋白分解酵素を抑制することは筋ジストロフィーの治療法として応用し得ると考える。

E. 結論

MMP-2と9によるβDGの細胞外ドメインの分解によりDGを介する細胞外基底膜と細胞膜の架橋構造が破綻することが予想される。従ってこれらの蛋白分解酵素を抑制することが一部の筋ジストロフィーの治療法として応用し得る可能性が

ある。

F. 研究発表

1. 論文発表

Matsumura, K., Zhong, D., Arai, K., Saito, F., Adachi, K., Kawai, H., Higuchi, I., Nishino, I. and Shimizu, T. (2005) Proteolysis of β-dystroglycan in muscular diseases. *Neuromusc. Disord.* 15, 336-341.

Saito, F., Blank, M., Schröder, J., Many, H., Shimizu, T., Campbell, K.P., Endo, T., Mizutani, M., Kröger, S. and Matsumura, K. (2005) Aberrant glycosylation of α-dystroglycan causes defective binding of laminin in the muscle of chicken muscular dystrophy. *F.E.B.S. Lett.* 579, 2359-2363.

2. 学会発表

Saito, F., Blank, M., Schröder, M., Many, H., Shimizu, T., Campbell, K., Endo, T., Mizutani, M., Kröger, S. and Matsumura, K. Aberrant glycosylation of α-dystroglycan causes defective binding of laminin in the muscle of chicken muscular dystrophy. 18th World Congress of Neurology, November 7, 2005, Sydney, Australia.

齊藤史明, 金川基, Kevin Campbell, 清水輝夫, 松村喜一郎, ジストログリカンの機能ドメインに関する検討. 第46回日本神経学会総会, 平成17年5月25日, 鹿児島
新井謙, 鐘鏑, 齊藤史明, 大井博子, 清水輝夫, 西野一三, 松村喜一郎. 筋疾患におけるβdystroglycanのmatrix metalloproteinaseによる分解. 第46回日本神経学会総会, 平成17年5月25日, 鹿児島

Matsumura, K., Zhong, D., Saito, F., Arai, K., Nishino, I. and Shimizu, T. Proteolytic processing of dystroglycan in muscular diseases. 30th FEBS Congress and 9th IUBMB Congress, July 7, 2005, Budapest, Hungary.

研究成果の刊行に関する一覧表

書籍

著者氏名	論文タイトル名	書籍全体の編集者名	書籍名	出版社名	出版地	出版年	ページ
石浦章一	筋強直性ジストロフィー発症と RNA 機能障害仮説	柳澤 信夫 篠原 幸人 岩田 誠 清水 輝夫 寺本 明	Ann.Rev. 神経 2006	中外医学社	東京	2005	264-268

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Ishiura, S., Kino, Y., Nezu, Y., Onishi, H., Ohno, E. and Sasagawa, N	Regulation of splicing by MBNL and CELF family of RNA-binding protein.	Acta Myologica	14	74-77	2005
Oma, Y., Kino, Y., Sasagawa, N. & Ishiura, S.	Comparative analysis of the cytotoxicity of homopolymeric amino acids.	Biochim. Biophys. Acta	1748	174-179	2005
Mitsuhashi, H., Yoshikawa, A., Sasagawa, N., Hayashi, Y. & Ishiura, S.	Denervation enhances the expression of SHPS-1 in the rat skeletal muscle.	J. Biochem.	137	495-502	2005
笹川昇、石浦章一	筋強直性ジストロフィーの分子生物学的発症機構	臨床検査	49	1162-1163	2005
石浦章一	筋強直性ジストロフィーの発症メカニズム	日本臨床	63	515-521	2005
石浦章一	トリプレットリピート病と蛋白質の進化	医学のあゆみ	214	647-651	2005

Sugie K, Noguchi S, Kozuka Y, Arikawa-Hirasawa E, Tanaka M, Yan C, Saftig P, Figura KV, Hirano M, Ueno S, Nonaka I, Nishino I	Autophagic Vacuoles with Sarcolemmal Features Delineate Danon Disease and Related Myopathies.	J Neuropathol Exp Neurol	64	513-522	2005
Nakagawa O, Arnold M, Nakagawa M, Hamada H, Shelton JM, Kusano H, Harris TM, Childs G, Campbell KP, Richardson JA, Nishino I, Olson EN	Centronuclear myopathy in mice lacking a novel muscle-specific protein kinase transcriptionally regulated by MEF2.	Genes & Dev	19	2066-2077	2005
Noguchi S, Fujita M, Murayama K, Kurokawa R, Nishino I	Gene expression analyses in X-linked myotubular myopathy.	Neurology	65	732-737	2005
Yan C, Tanaka M, Sugie K, Nobutoki T, Woo M, Murase N, Higuchi Y, Noguchi S, Nonaka I, Hayashi YK, Nishino I	A New Congenital form of X-linked autophagic vacuolar myopathy.	Neurology	65	1132-1134	2005
Matsumura, K., Zhong, D., Arai, K., Saito, F., Adachi, K., Kawai, H., Higuchi, I., Nishino, I. and Shimizu, T.	Proteolysis of β -dystroglycan in muscular diseases.	Neuromusc. Disord.	15	336-341	2005
Saito, F., Blank, M., Schröder, J., Manya, H., Shimizu, T., Campbell, K.P., Endo, T., Mizutani, M., Kröger, S. and Matsumura, K.	Aberrant glycosylation of α -dystroglycan causes defective binding of laminin in the muscle of chicken muscular dystrophy.	F. E. B. S. Lett.	579	2359-2363	2005

研究成果の刊行物・別刷

1. 筋強直性ジストロフィー発症とRNA機能障害仮説

東京大学大学院総合文化研究科生命環境科学系教授 石浦章一

key words myotonic dystrophy, RNA-binding proteins, RNA gain-of-function, MBNL, CELF

動 向

筋強直性ジストロフィー (DM) は、1909年に発表された全身性の優性遺伝疾患で、筋ジストロフィーの中で一番多いことが知られている。症状は筋強直 (ミオトニア) とよばれる筋の不随意的・持続的収縮に限らず、心伝導障害、白内障、内分泌異常、そしてインスリン耐性、性腺萎縮、睡眠障害など多くの症状が現れる。まず最初に明らかになった原因は、第19染色体長腕にある *DMPK* (dystrophia myotonica protein kinase) 遺伝子の3'非翻訳領域にあるCTGトリプレットの増加であった。通常ではCTG数が50以下であるが、前変異段階では50から200程度に伸長し、患者では2,000もの繰り返しもつものもある。この遺伝子異常をもつものをDM1 (dystrophia myotonica 1) とよび、この家系では母親から遺伝子を受け継いだときに大幅にリピート数が増加することが多いことが明らかになった。この家系のように、世代を経るごとに発症が早くなり症状も重くなることを「表現促進現象」とよび、これがトリプレットリピート病の特徴になっている¹⁾。

ところが1994年から1995年にかけて、新しいDMが報告された。これらはDM1とは異なる座位に変異があるものの、筋強直などDM1とよく似た全身症状を呈することがわかった。遺伝解析

から、この病気は proximal myotonic myopathy (PROMM) と名づけられた。後にこの遺伝子は第3染色体に存在することがわかり、DM2 (dystrophia myotonica 2) と名づけられた。DM1とDM2には症状的に大きな違いはないが、DM1では精神遅滞などの発達障害を呈する先天型が存在したり筋萎縮が顕著であるのに対し、DM2では顔面筋や前腕の萎縮は通常みられないという点が異なる。以下、DM1とDM2の変異の違いを解説するが、双方に共通な点は、リピートの伸長のみであった^{2,4)}。

A. DM1 と DM2

図1にDM1とDM2の違いをまとめた。

DM1では、3'非翻訳領域にあるCTGの長さは、患者では200リピートを超え、4,000リピートにもなる例が報告されている。一方DM2は、第3染色体の *ZNF9* (zinc finger protein 9) 遺伝子の第1イントロンにあるCCTGリピートの伸長で起こることが2001年に発見された。*ZNF9*は7つのC2H2型ジンクフィンガーモチーフがあるため、DNAまたはRNAに結合する機能があると推測される。しかし、小胞体局在リン酸化酵素 *DMPK*⁵⁾ と転写因子 *ZNF9*の間には何も機能に

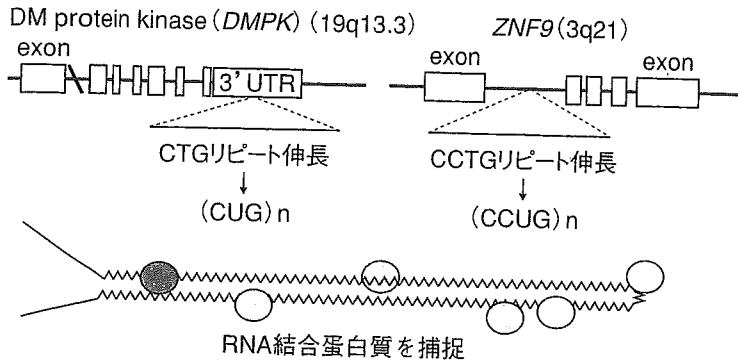


図1 筋強直性ジストロフィー (DM) の責任遺伝子とRNA機能障害仮説

DM1は第19染色体短腕に存在するDMPK遺伝子の3'非翻訳領域にあるCTGリピートの伸長, DM2は第3染色体長腕に存在するZNF9遺伝子の第1イントロンにあるCCTGリピートの伸長で起こる. これらが転写されたRNAリピートに, 結合蛋白質が捕捉されることで症状が出現する, というのがRNA障害仮説である.

ついでに共通性がなく, しかも伸長しているリピートも片方は三塩基CTG, 片方は四塩基CCTGである. しいていえば, 両方とも非翻訳領域にリピートがあることが共通であった. DM2のリピート長は, 患者では75から11,000にも及んだが, DM1のようなりピート長と発症時期の間の逆相関はみられていない. ZNF9のイントロンには, (TG)n(TCTG)n(CCTG)nという繰り返しがあリ, 正常ではこの最後の(CCTG)nのところに入断が入っている.

B. 遺伝子改変マウスを用いた実験

そこでまず, DM1とDMPKとの関係を調べる実験が行われた. DMPKノックアウトマウスを作ったところ, ほとんど症状を再現しない, という結果になった⁶⁾. これは, DMPKの機能喪失が病気の原因ではないという証拠となった. 次に, DM1とDM2の患者さんの筋肉を観察すると, 両方の核内にCUG, CCUGというリピートRNAの凝集体がみつかった. これは, 伸長したRNAが

何らかの病状に関係するという強い証拠となった. 最後に, CTG250リピートをアクチンプロモーターにつなげて発現させたマウスで, 筋強直が再現された⁷⁾. これは, DMPK遺伝子産物の機能異常ではなく, リピート自体の機能によって病気が出現することを示すものであった.

C. リピートRNAに結合する蛋白質 CUG-BP

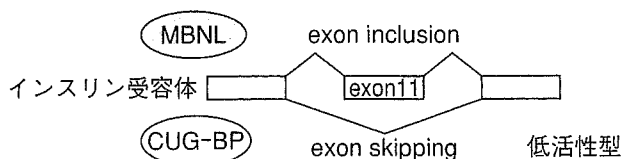
もし, 三塩基もしくは四塩基リピートに結合する分子があつて, その分子がリピートにトラップ(捕捉)されるために正常機能が失われることによってDMが発症するなら, DMの優性遺伝が説明できる(図1). そこでリピート結合蛋白質の探索が始まった.

Timchenkoらは, DNAのCTGリピートまたはmRNAのCUGリピートに結合する分子としてCELFファミリーに属するCUG-BP(CUG-binding protein)を単離した⁸⁾. DMの症状には全身性にいろいろなものがあるが, CUG-BPは心筋トロポニンT(心伝導障害), インスリン受容体(耐糖能), 塩素チャネル(ミオトニア), タウ(精神遅滞), マイオチューブラリン(筋分化)などのmRNAのスプライシングに作用することが明らかにされ⁹⁾(表1参照), CUG-BPがDMに関与する最も重要な因子であるという説が提出され

表1 DMとスプライシング異常 (スプライシング異常が報告されている遺伝子と, DM症状との関連)

chloride channel (CLCN1)	筋強直
insulin receptor (IR)	— インスリン耐性
cardiac troponin T (TNNT2)	— 心筋異常(?)
fast muscle troponin T (TNNT3)	筋分化異常
myotubularin-related 1 (MTMR1)	
(?)	知的障害(?)
tau (MAPT)	
NMDA receptor 1 (GRIN1)	
amyloid precursor protein (APP)	

1. MBNLファミリー (MBNL1, MBNL2, MBNL3)
伸長したCUG・CCUGリピートに捕捉され、機能阻害される
2. CELFファミリー (CUG-BP, ETR-3/CUG-BP2, CELF3-6)
スプライシング制御、翻訳制御など多機能の蛋白質群
DM患者の筋肉では、CUG-BPの発現量が増加している



MBNLとCUG-BPは拮抗的にスプライシングを制御する
→MBNLの捕捉はスプライシング異常につながる

図2 DMに関わるRNA結合蛋白質

2つのファミリー (MBNLファミリーとCELFファミリー) が報告されている。たとえば、CUG-BPは、インスリン受容体のエクソン11をスキップさせ、低活性の受容体を作らせるが、MBNL1にはそのような活性はない。この場合、MBNLとCUG-BPは拮抗的に働いているが、いつでもそうではない。

た。CUG-BPがインスリン受容体のスプライシング異常 (エクソン11のスキッピング) を起こし、機能の低下した非筋型バリエーションが作られて、これがインスリン非感受性を引き起こす (図2)¹⁰⁾ というものである。また筋特異的塩素チャンネルCIC-1のスプライシング異常が膜の過剰興奮を引き起こしミオトニアを導く。CUG-BPはこれらの選択的スプライシングを誘導する因子である、というわけである。

しかし私たちは、RNA結合能を調べる酵母 three hybrid法という系によって、CUG-BPとCUGリピートの相互作用を調べたが、結合能力は非常に弱く、長さ依存性も認められなかった。詳細な検討の結果、CUG-BPはCUG三塩基リピートよりもUG二塩基リピートに強固に結合することがわかった¹¹⁾。

D. MBNLの登場

それでは実際に生体内でCUGリピートに結合する因子は何であろうか。

私たちはMBNL1 (muscleblind-like 1: EXPともよばれていた) という分子に注目した。これはショウジョウバエの筋肉の発生分化や目の光受容体の分化をつかさどる *muscleblind* のオーソログだからである。このMBNL1は、CUGリピートとCCUGリピートの両方に結合することがはじめて証明された。精査の結果、MBNL1は、CHHG (Hはグアニン以外のヌクレオチド) というリピートに最も強く結合することが明らかになった¹²⁾。

MBNL1はC3H型のジンクフィンガーを4つもつRNA結合蛋白質で、DM患者の核内でCUGならびにCCUGリピートと凝集体を作っていることがわかった。またMBNL1ノックアウトマウスがミオトニアや白内障などのDMの症状をよく再現することもわかった¹³⁾。すなわち、MBNL1の機能欠損がDM症状に関わる可能性が高くなった。

ところがヒトゲノムには、MBNL1の他にMBNL2とMBNL3というホモログが存在する¹⁴⁾。これらの機能は図3のように、ほとんどMBNL1と同じである。またこれらホモログはMBNL1同様、数多くのアイソフォームをもっており、局在もさまざまである。将来はこれらホモログの機能、局在などを明らかにしない限り、DM症状を説明することは不可能である。とにかくこれらの実験により、MBNLファミリーがDMの症状を決定する最有力候補に挙げられた。

しかし、MBNLトラップ説には、いろいろ問題もある。たとえば、DM2のCCTGリピートはイントロンにあり、プレmRNAにはCCUGリピートがあるが、スプライスされてしまうと成熟mRNAの中には認められない。MBNL1がトラップされるなら、リピートがプレmRNAに転写されたあと、しかも成熟mRNAになる前であって、それ以降にはトラップされるべきリピートが存在しないからである。

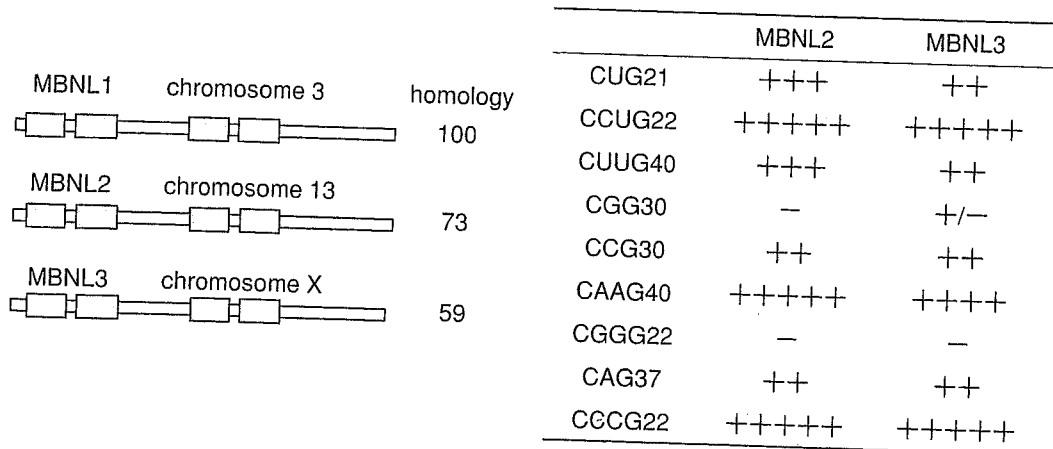


図3 MBNL2とMBNL3のRNA結合特異性
MBNL2とMBNL3は、MBNL1と同様なRNAリピート結合活性をもつ。

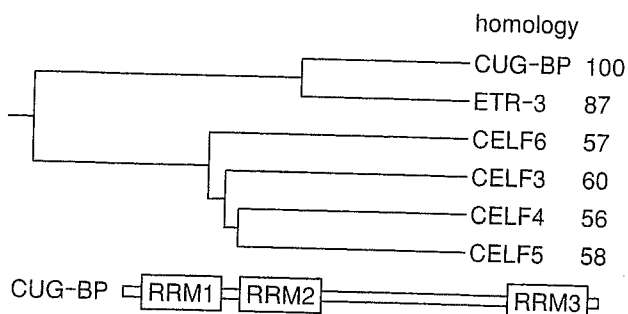
E. MBNLとCELF

CELFファミリーとは、CUG-BPなどの類似のRNA結合蛋白質ファミリーのことで、CUG-BPはCELF1、CUG-BP2/ETR-3はCELF2、というように命名されている。CELFはヒトゲノムには6つ存在しており(図4)、主な機能はスプライシング調節因子または翻訳制御因子と考えられている。先ほどのMBNLファミリーとCELFファミリー、双方合わせて10種類近くの因子がmRNA

のスプライシングに関わっている。

図2のように、インスリン受容体のスプライシングにはMBNL1とCELF1(CUG-BP)が反発しあうように働いており、このような例がいくつかみつかってきている。自験例だが、 α アクチニンのスプライシングではこの両分子は同じ方向にスプライシングを誘導する。すなわち、これら9分子の発現量の違いによってスプライシングパターンが変化する可能性は充分考えられる。今後は、組織・時期特異的発現に研究によって、詳細なスプライシング調節が明らかになるだろう。

CELF (CUG-BP and ETR-3 like factors) ファミリー
→組織特異的スプライシング制御因子



CUG-BPはDM患者の細胞内で発現量が増加している

→インスリン受容体および心筋トロポニンTのスプライシング異常に関わる可能性が示唆されている

図4 CELFファミリー

6種類のCELFファミリーの系統樹。その中でも、CUG-BPの機能異常がDMで報告されている。

むすび—RNA障害仮説からみたDM治療法の開発

DMのすべての症状を軽減させる効果的な治療法はまだみつかっていない。最近の研究によってMBNLファミリーの発現制御が治療に結びつく可能性が大きくなってきている。たとえば、MBNL1の過剰発現を導けば症状が軽減する可能性がある。この場合、ホモログであるMBNL2やMBNL3の代償機能は存在するのか、CELFファミリーが逆に拮抗するのかなども考慮に入れなければならない。基礎研究の充実が望まれる。

文献

- 1) 紀 嘉浩, 笹川 昇, 石浦章一. 病気を起こす反復配列. *日経サイエンス*. 2004; 9: 58-65.
- 2) Ranum LPW, Day JW. Myotonic dystrophy: RNA pathogenesis comes into focus. *Am J Hum Genet*. 2004; 74: 793-804.
- 3) Day JW, Ricker K, Jacobson JF, et al. Myotonic dystrophy type 2: molecular, diagnostic and clinical spectrum. *Neurology*. 2003; 60: 657-64.
- 4) 石浦章一. 筋強直性ジストロフィー発症のメカニズム. *日本臨牀*. 2005; 63: 515-21.
- 5) Sasagawa N, Ishiura S. Myotonic dystrophy protein kinase. *Wiley Encyclopedia Mol Med*. 2002; 5: 2203-5.
- 6) Reddy S, Smith DB, Rich MM, et al. Mice lacking the myotonic dystrophy protein kinase develop a late onset progressive myopathy. *Nat Genet*. 1996; 13: 325-35.
- 7) Mankodi A, Logigian E, Callahan L, et al. Myotonic dystrophy in transgenic mice expressing an expanded CUG repeat. *Science*. 2000; 289: 1769-73.
- 8) Timchenko LT, Timchenko NA, Caskey CT, et al. Novel proteins with binding specificity for DNA CTG repeats and RNA CUG repeats: implication for myotonic dystrophy. *Hum Mol Genet*. 1996; 5: 1115-21.
- 9) Mankodi A, Takahashi MP, Jiang H, et al. Expanded CUG repeats trigger aberrant splicing of CIC-1 chloride channel pre-mRNA and hyperexcitability of skeletal muscle in myotonic dystrophy. *Mol Cell*. 2002; 10: 35-44.
- 10) Savkur RS, Philips AV, Cooper TA. Aberrant regulation of insulin receptor alternative splicing is associated with insulin resistance in myotonic dystrophy. *Nat Genet*. 2001; 29: 40-7.
- 11) Takahashi N, Sasagawa N, Suzuki K, et al. The CUG-binding protein(CUG-BP)binds specifically to UG dinucleotide repeats in a yeast three-hybrid system. *Biochem Biophys Res Commun*. 2000; 277: 518-23.
- 12) Kino Y, Oma Y, Sasagawa N, et al. Muscleblind protein, MBNL1/EXP, binds specifically to CHHG repeats. *Human Mol Genet*. 2004; 13: 495-507.
- 13) Kanadia RN, Johnstone KA, Mankodi A, et al. A muscleblind knockout model for myotonic dystrophy. *Science*. 2003; 302: 1978-80.

Regulation of splicing by MBNL and CELF family of RNA-binding protein

S. ISHIURA*, Y. KINO, Y. NEZU, H. ONISHI, E. OHNO,
AND N. SASAGAWA

Department of Life Sciences, Graduate School of Arts and Sciences, The University of Tokyo,
3-8-1 Komaba, Meguro-ku, Tokyo, Japan 153-8902

Myotonic Dystrophy (DM), the most common form of adult-onset muscular dystrophy, comprises at least 2 subtypes, DM1 and DM2. DM1 is caused by the expansion of a CTG repeat located in the 3' untranslated region of the DM protein kinase (*DMPK*) gene. Recently, the expansion of a CCTG tetranucleotide repeat located in the first intron of the *ZNF9* gene was identified as the mutation responsible for DM2. Since both DM1 and DM2 are caused by the expansion of repetitive sequences, some common factors that interact with these sequences might be involved in the pathogenesis of DM. MBNL1 is a candidate for such factors and is thought to be sequestered by the expanded forms of DM transcripts.

Key words: myotonic dystrophy, RNA repeat, MBNL1

Myotonic dystrophy is the most common form of adult-onset muscular dystrophy [1]. It is inherited by autosomal dominant fashion. Myotonic dystrophy causes a consistent constellation of unrelated clinical features, including myotonia, cardiac conduction defects, cataracts, and specific set of endocrine changes, and so on. The underlying genetic mutation causing myotonic dystrophy is unstable expanded CTG repeat in the 3'-untranslated region of a gene on chromosome 19 encoding a DM protein kinase (*DMPK*) of unknown function [2]. The mutation is transcribed into RNA but not translated into protein. Recently, myotonic dystrophy type 2 (DM2) was found to be caused by a CCTG tetranucleotide expansion in intron 1 of the Zn-finger protein *ZNF-9* gene on chromosome 3 [3]. DM2 is also caused by a transcribed but untranslated repeat expansion. Although DM2 is generally a milder disease than DM1, the DM2 CCTG expansions is much larger than DM1 CTG expansions.

Reddy et al. showed that *DMPK* knockout mice did not fully recapitulate DM. This means

that loss of *DMPK* function is not the main cause of DM [4]. RNA inclusions of CUG/CCUG repeats are observed as foci in the nuclei of DM patients. Transgenic mice expressing CUG repeats under the skeletal muscle actin promoter showed myotonia and abnormal muscle histology [5]. In this case, the severity of phenotype was correlated with the expression level of CUG repeat RNA. These results suggest that abnormality in RNA metabolism is involved in DM [1].

The clinical features common to both DM1 and DM2 may be caused by a gain-of-function RNA mechanism in which the CUG and CCUG repeats alter cellular function by sequestering repeat RNA-binding proteins.

Two families of RNA-binding proteins

Two families of RNA repeat-binding proteins have been implicated in DM pathogenesis: CELF (CUG-BP11 and ETR-3-like factors) and MBNL (muscleblind-like) proteins. Six CELF genes have been identified in human genome and they have been shown to be involved in alternative splicing [6]. Among these, CUG-BP1 regulates alternative splicing of cardiac troponin T (cTnT), insulin receptor (IR) and chloride channel 1 (ClC-1) that are misregulated in DM muscle [7,8]. MBNL is a homologue of *Drosophila* muscleblind which is involved in the differentiation of skeletal muscle and photoreceptor [9]. Three genes (*MBNL1*, 2 and 3) are identified in humans. A mouse knockout reproduced myotonia and cataract, and misregulation of splicing was observed [10].

We investigated the *in vivo* binding-sequence specificity of these proteins using a yeast 3 hybrid

Address for correspondence: correspondence should be addressed to Dr. S.Ishiura*

system [11,12]. In this assay, the association of an RNA-binding protein Y with its cognate RNA X binding site leads to the transcriptional activation of a reporter gene, such as His3 and β -galactosidase, in yeast. We generated a variety of repetitive RNA sequences and examined them.

The results are shown in Table 1. CUG-BP1 (this protein is first identified as a CUG triplet repeat-binding protein) strongly interacted with UG dinucleotide repeat [11]. Neither PKR (protein kinase R), a double stranded nucleotide-binding protein, nor CUG-BP1 interacted strongly with CUG/CCUG repeats. By contrast, MBNL1 showed apparent interactions with both CUG and CCUG repeats.

Table 1. RNA-binding specificity of candidate proteins.

Repeat	CUG-BP1	MBNL1	PKR
UG24	+++++	-	-
CA24	-	-	-
CUG7	-	-	-
CUG16	-	++	-
CUG21	-	+++	-
CUG37	-	++	-
CUG70	-	++	+
CCUG7	+	-	-
CCUG22	-	++++	-
CCUG50	-	+++	-
CAGG22	-	-	-
CAGG50	+	-	-
CGGG20	-	-	-
CCCG21	++	++++	-
UAUG7+CAUA7	-	-	+++++
CAG16+CUG16	-	-	+++++

The transformation of yeast cells and reporter gene assays were performed as previously described [11,12]. We classified the binding activity as (+++++), (++++), (++++) and (++) when yeast grown was observed on the plates containing 1, 0.5, 0.1 and 0mM 3-AT, respectively. (+) yeast grew in the absence of 3-AT after more than 1 week, (-) no growth of yeast transformants was observed even after prolonged incubation.

We confirmed these results by surface plasmon resonance technique. Surface Plasmon Resonance (SPR) is a powerful technique to measure biomolecular interactions in real-time in a label free environment. Protein is immobilized to the sensor surface, and the repeat RNA is passed over the surface. Association and dissociation is measured and displayed in a graph called the sensor-gram. CUG-BP1 strongly interacted with UG-repeat but not CUG repeat, while MBNL1 interacted with

CCUG repeat (data not shown). These results indicate that loss of function of MBNL1, not CUG-BP1, may be important for DM pathogenesis. Sequestration of MBNL1 by the long CUG/CCUG repeat may disrupt normal cellular function of MBNL1, which leads to abnormal phenotype of myotonic dystrophy.

Table 1 also shows that MBNL1 interacted strongly with CCCG, modestly with CUUG and CAUG, but not at all with CGGG and so on. On the other hand, PKR strongly interacted with double-stranded RNAs. All these results suggest MBNL1 binds to repeats with incomplete double strand, but not to the complete one. The deduced target sequence of MBNL1 could be CHHG or CHG repeat, where H is the nucleotide other than G. Secondary structure of CHHG repeat can be calculated as a long hairpin with mismatches. Since MBNL1 does not bind to CUG/CAG double strand repeat without mismatch, the presence of mismatch is necessary for the binding of MBNL1 to the target sequences.

To confirm the results of the three-hybrid analyses, we performed gel retardation analysis [12]. First, we fused MBNL1 with glutathione S-transferase (GST) in the N-terminus and a His-tag in the C-terminus. GST-MBNL1 was expressed in E.Coli and purified. GST-MBNL1 bound to a 32 P-labeled CCUG probe, and supershift was observed when an anti-GST antibody was added. The extent of band shift was reduced by adding non-labeled CCUG RNA. We also examined the dependence of the binding between CCUG repeats and MBNL1 on the repeat length. Free probes of CCUG27 and CCUG35 disappeared at the highest dose of MBNL1. The number of shifted bands represents the variety of RNA-protein complexes, mainly reflecting the number of proteins binding to a single probe.

Structure of MBNL1 and homologues

MBNL1 has at least nine splice variants. MBNL1 has four Zn finger motifs at the N-terminal half of the molecule, which may be involved in the RNA-binding. There is a nuclear localization signal at the C-terminus. Some of the isoforms of MBNL1 was localized at the nucleus. The others were in the cytosol. Therefore, MBNL1 might have many cellular functions. Furthermore, not only MBNL1 but also MBNL2 and 3 are

reported to be colocalized with RNA foci of CUG/CCUG repeats. We have determined the binding specificity of these MBNL families to various RNA repeats. MBNL2 and MBNL3 had almost similar specificity to MBNL1 (data not shown). These MBNL isoforms also showed different localization. Therefore we have to be careful for analyzing the data, because three MBNL proteins have many isoforms and these isoforms may have diverse functions in various tissues.

Regulation of alternative splicing by RNA repeat-binding proteins

Myotonic dystrophy is an example of a disease that alters the function of RNA-binding proteins to cause misregulated alternative splicing [1]. Many misregulated alternative splicing events have been demonstrated for eight pre mRNAs. In all cases, normal mRNA splice variants are produced, but the normal developmental splicing pattern is disrupted, resulting in the expression of fetal protein isoforms.

The insulin resistance and myotonia observed in DM1 correlate with the disruption of splicing of targets, IR and CIC-1. The counter regulation of mRNA splicing by the two proteins, CUG-BP1 and MBNL1 is demonstrated [9]. When cTNT mini-gene was expressed with CUG-BP1, a fetal isoform including exon 5 was predominantly expressed, while coexpression with MBNL1 suppressed the formation of the fetal isoform. In the case of insulin receptor mini-gene, MBNL1 enhanced the formation of long form with exon 11, while CUG-BP1 was not. These results suggest that these two RNA-binding proteins counteracted *in vivo*.

However, in the case of alpha-actinin, MBNL1 may not always act antagonistically against CUG-BP1s. Alpha-actinin has two exons, nonmuscle type and skeletal muscle type. These are exclusively expressed *in vivo*. However, in our assay system, MBNL1 does not act antagonistically against CUG-BP1. Both enhanced the production of non-muscle type (Fig.1). These data also predict that change in expression of these alternative splicing regulators would result in the splicing alterations that have been shown to be characteristic of the myotonic dystrophy. However, all targets of these proteins have never been clarified.

In addition, these regulators appear to express independently.

There have been many reports that excess oxidative stress occurs in the muscle with expanded CTG repeats [13-15]. The stress accelerates an apoptotic process, leading to cell death. The increase in oxidative stress in response to expanded RNA repeats is likely to involve yet unidentified signaling event that remain to be determined. Misregulation of splicing may also be evoked by the cellular signaling processes.

Acknowledgments

This work was supported in part by grants (to S.I.) from the Ministry of Health, Labor and Welfare, Japan, and the Ministry of Education, Science, Sports and Culture, Japan.

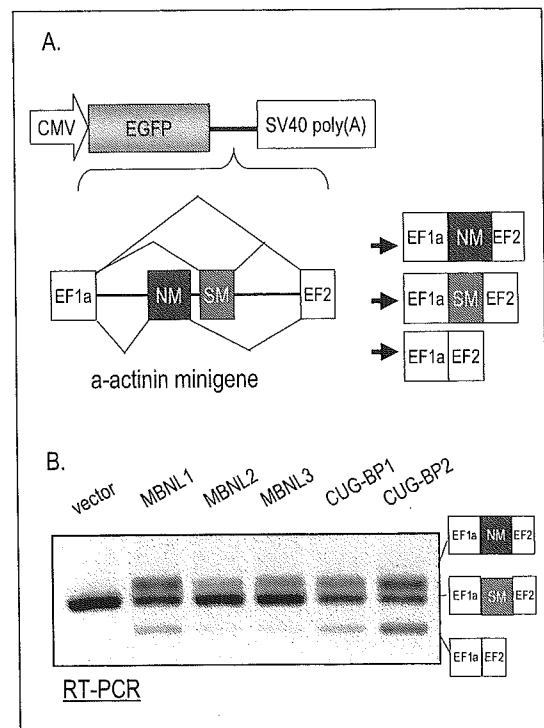


Figure 1. MBNL and CUG-BP1 promote exon skipping.

- The α -actinin minigene contains two exons (non-muscle type NM and smooth muscle type SM) flanked by EF1a and EF2 exons.
- COS cells were cotransfected with the minigene and each of RNA-binding protein expression plasmid. Exon inclusion was assayed by RT-PCR.

References

1. Ranum LPW, Day JW. Myotonic dystrophy:RNA pathogenesis comes into focus. *Am J Hum Genet* 2004;74:793-804.
2. Sasagawa N, Ishiura S. Myotonic dystrophy protein kinase. *Wiley Encyclopedia Mol Med* 2002;5:2203-05.
3. Day JW, Ricker K, Jacobson JF, et al. Myotonic dystrophy type 2:molecular, diagnostic and clinical spectrum. *Neurology* 2003;60:657-64.
4. Reddy S, Smith DB, Rich MM, et al. Mice lacking the myotonic dystrophy protein kinase develop a late onset progressive myopathy. *Nat Genet* 1996;13:325-335.
5. Ladd AN, Nguyen NH, Malhotra K, Cooper TA. CELF6, a member of the CELF family of RNA-binding proteins, regulates muscle-specific enhancer-dependent alternative splicing. *J Biol Chem* 2004;279:17756-64.
6. Mankodi A, Logigian E, Callahan L, et al. Myotonic dystrophy in transgenic mice expressing an expanded CUG repeat. *Science* 2000;289:1769-73.
7. Timchenko LT, Timchenko NA, Caskey CT, Roberts R. Novel proteins with binding specificity for DNA CTG repeats and RNA CUG repeats: implication for myotonic dystrophy. *Hum Mol Genet* 1996;5:1115-21.
8. Ho TH, Bundman D, Armstrong DL, Cooper TA. Transgenic mice expressing CUG-BP11 reproduce splicing mis-regulation observed in myotonic dystrophy. *Hum Mol Genet* 2005;14:1539-47.
9. Ho TH, Charet-B N, Poulos MG, et al. Muscleblind proteins regulate alternative splicing. *EMBO J* 2004;23:3103-12.
10. Kanadia RN, Johnstone KA, Mankodi A, et al. A muscleblind knockout model for myotonic dystrophy. *Science* 2003;302:1978-80.
11. Takahashi N, Sasagawa N, Suzuki K, Ishiura S. The CUG-binding protein (CUG-BP1) binds specifically to UG dinucleotide repeats in a yeast three-hybrid system. *Biochem Biophys Res Commun* 2000;277:518-23.
12. Kino Y, Oma Y, Sasagawa N, Ishiura S. Muscleblind protein, MBNL1/EXP, binds specifically to CHHG repeats. *Human Mol Genet* 2004;13:495-507.
13. Usuki F, Takahashi N, Sasagawa N, Ishiura S. Differential signaling pathways following oxidative stress in mutant myotonin protein kinase cDNA transfected C2C12 cell lines. *Biochem Biophys Res Commun* 2000;267:739-743.
14. Usuki F, Yasutake A, Umehara F, et al. In vivo protection of a water-soluble derivative of vitamin E, Trolox, against methylmercury-intoxication in the rat. *Neurosci Lett* 2001;304:199-203.
15. Takeshita Y, Sasagawa N, Usuki F, Ishiura S. Decreased expression of alpha-B-crystallin in C2C12 cells that express human DMPK/160CTG repeats. *Basic Appl Myol* 2003;13:305-8.