

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 18 年度 総括研究報告書

主任研究者 石浦 章一

平成 19 (2007) 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. α -Dystroglycan のプロセッシングに関する検討.....	4
清水 輝夫	
2. DM1 以外の筋強直性ジストロフィーに関する研究.....	6
西野 一三	
III. 研究成果の刊行に関する一覧表	8
IV. 研究成果の刊行物・別刷	11

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) は CTG または CCTG というリピートが伸長することが原因で発症する。伸長したリピート RNA に、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 結合タンパク質が結合し、正常のスプライシング機能を果たせないことが症状につながると考えられている。本年度の研究により、新たに MBNL1 結合タンパク質を同定した。同時に、線虫においても、リピート伸長モデルや MBNL 欠損モデルを作出することに成功した。

A. 研究目的

筋強直性ジストロフィー (DM) は、成人の筋ジストロフィーの中で最も患者が多いが、効果的な治療法はまだ開発されていない。筋ジストロフィーに対する治療薬の開発は、厚生労働行政の中でも大きな課題の 1 つである。

DM の症状は全身にわたっているが原因は最近まで明らかになっていなかった。私たちを含むいろいろな研究によって、塩素チャンネル (ミオトニア)、インスリン受容体 (耐糖能の異常)、マイオチューブラリン (筋分化の遅れ)、トロポニン T (心筋異常) などの遺伝子のスプライシング異常によって、種々の症状が起こることが明らかになった。また本症の治療にとっても、スプライシング制御が標的の 1 つになってきた。

平成 17 年度に始まった本研究は、このスプライシング制御をメインテーマにしている。平成 18 年度は、筋強直性ジストロフィー患者でのスプライシング異常を定量化して病態を把握するとともに、最終的な RNA を介した治療を目指して分子生物学研究を行った。石浦と西野は、国立精神・神経センターに保管してある筋肉バンクの筋強直性ジストロフィー筋 21 例から RNA を抽出し、PCR によってスプライシングを調べたところ、塩素チャンネルやインスリン受容体の幼若型スプライシングを観察した。また、リピート RNA 結合タンパク質である MBNL ファミリーや CELF ファミリー

の発現量を、世界で初めて定量化することに成功した。

同時に、線虫に DM のモデルを作り出すことに成功した。CTG が伸びた線虫、CCTG が伸びた線虫、MBNL が欠損している線虫を作り出し、最後のものは寿命が短縮することを発見した。

B. 研究方法 (倫理面の配慮含む)

1) リアルタイム PCR を用いた DM 生検筋における MBNL1、CELF1 の発現量の定量

RNA リピートの機能を調べることが、筋強直性ジストロフィーの病因を直接明らかにすることになる。まず、DM に特徴的なスプライシングが見られるかどうか、RNA 結合タンパク質の量が変化しているかどうかの 2 点について、筋肉バンク中の DM 筋から RNA を抽出し、発現量を、DM 患者 21 例と疾患対象者 12 例で調べた。

2) 酵母 two-hybrid による MBNL1 結合タンパク質の同定

酵母 two-hybrid 法によって、MBNL1 に結合する新規タンパク質をスクリーニングした。得られたタンパク質をヒト cDNA ライブラリーからクローニングし、発現後、MBNL1 と共免疫沈降するかどうかを調べ、生理的に意味のある結合かどうかを検討した。

3) 線虫に GFP と融合させた CTG5、CTG130、CCTG100 をインジェクションし、筋肉細胞に発現させた (myo3 プロモーター)。また、ヒト MBNL の

ホモログである K02H8.1 遺伝子をクローニングするとともに、K02H8.1 が欠損した線虫を作出した。

(倫理面への配慮)

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。

C. 研究結果

まず、DM 筋でのスプライシングであるが、インスリン受容体ではエクソン 11 を含むスプライシングの割合が激減していた。また心筋トロポニン T では、エクソン 5 を含むスプライシングが有意に増加していた。ここで、筋肉に発現する MBNL ファミリーのうち MBNL1 と MBNL2、CELF ファミリーのうち CUG-BP1 と CUGBP-2 の患者筋での発現量を調べたところ、どれも有意差がなかった。

酵母 two-hybrid による MBNL1 結合タンパク質のスクリーニングの結果、YB-1 という RNA 結合タンパク質が MBNL1 と相互作用することが明らかになった。また、この相互作用は共免疫沈降法によっても確認された。実際に YB-1 が直接、または間接的にスプライシングを左右するとはいえないが、今後の研究の焦点になる可能性がある。

線虫から K02H8.1 遺伝子をクローニングし、それがヒト MBNL1 のホモログ (37%の相同性) であることを発見した。しかし、ヒトのように 4 つの RNA 結合モチーフを持たず、N 末端に 2 つ存在するのみであり、CeMBNL と命名した。CeMBNL はヒト MBNL1 同様、CUG や CCUG リピートに結合することが、酵母 three-hybrid によって明らかになった。また、CeMBNL のエクソン 1 を含む 511 塩基の欠失を持つ変異体 *Tm1563* を分離した。この変異体の寿命は 14 日であった。

D. 考察

昨年度は、RNA リピート結合タンパク質 MBNL ファミリーと CELF ファミリー同士の相互作用を調べたが、これらが RNA を介して結合していることがわかった。そこで本年度は、直接結合する因子をスクリーニングし、YB-1 を得た。今後、YB-1 のスプライシング調節作用、MBNL1 の機能に対す

る効果については、今後、検討する必要がある。

また、筋強直性ジストロフィー患者筋における各種症状に関係する因子のスプライシングと、MBNL1 と 2、CELF1 と 2 の発現量を詳細に調べた。DM 患者筋では、以前からの報告どおりスプライシングは幼若型のパターンを示し、筋の分化の遅れを示唆するものであった。このスプライシングを正常型に変える因子こそ、治療に有効なものと考えられる。現在、培養系を用いてスプライシング調節に有効なものがないか、スクリーニングを開始した。

また、過去の論文によれば、MBNL や CELF (特に CUG-BP) の発現が DM 患者と正常では違っていると予想されていたが、私たちの研究によって発現量には差がないことがわかった。これは、MBNL や CELF 以外の因子の関与を示唆するものであった。

線虫の MBNL 欠損変異体である *Tm1563* の寿命が正常の 7 割ほどであることがわかり、これが早老症のモデルになることがわかった。今後は、DM で見られるスプライシング異常があるかどうかを検討したい。また、これは治療の良いモデルになると考えられた。

E. 結論

筋強直性ジストロフィー症状の主なものを占めるミオトニアや耐糖能異常は、塩素チャネルとインスリン受容体のスプライシング異常によって起こることがわかったが、これは DM 患者の MBNL や CELF の発現量の違いに起因するものではないことが明らかになった。このことは、リピート RNA に結合する因子の他に、この RNA 結合タンパク質の機能を変える因子があることを示唆するものである。その意味で、YB-1 の発見は新しい方向性の開発になるものと考えられた。

また、RNA 結合タンパク質の発現量を人工的に変化させることができれば、スプライシングを自由に制御でき、新しい治療法となる可能性がある。現在、カテキン類の投与によって、スプライシングの変化が見られるかどうかを検討している。今後は、この方向の実験も重要になる。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Sasagawa, N. & Ishiura, S. (2006) A simple, one step cloning method to obtain long artificial triplet repeats. *Anal. Biochem.* 357, 308-310
- 2) Sasagawa, N. & Ishiura, S. (2006) Molecular basis of myotonic dystrophy: A new molecular mechanism called RNA gain-of-function. In *Frontiers in Life Sciences* (eds. Fujiwara, Sato, Ishiura) pp.15-26, Research Signpost, India
- 3) Nezu, Y., Kino, Y., Sasagawa, N., Nishino, I. & Ishiura, S. (2007) Expression of MBNL and CELF mRNA transcripts in muscles with myotonic dystrophy. *Neuromuscular Disorders* in press
- 4) 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.264-286, 2005.
- 5) 石浦章一. 筋強直性ジストロフィーの分子病態。 *医学のあゆみ* 219, 249-252, 2006.

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

α -Dystroglycan のプロセッシングに関する検討

分担研究者 清水 輝夫 帝京大学医学部

研究要旨

培養細胞に発現する α -DG は PC により切断され、その N 末端ドメインは α -DG-N として培養上清中に分泌されていることを示した。生体においては α -DG-N は髄液等の体液中と、神経の軸索に豊富に存在していることを明らかにした。

A. 研究目的

近年、福山型先天性筋ジストロフィーをはじめとする先天性筋ジストロフィーにおいて遺伝子異常が相次いで明らかにされた。これらの疾患は、 α -dystroglycan (α -DG) の糖鎖修飾の異常により基底膜の laminin との連携が断たれることがその筋細胞壊死の原因と推測され、 α -dystroglycanopathy と総称されている。また最近、 α -DG が laminin との結合能を獲得するためには α -dystroglycanopathy の一病型である MDC1D の原因遺伝子産物 Large が α -DG の N 末端ドメインと結合することが不可欠であること、糖鎖修飾の完了後にこの N 末端ドメインは protein convertase (PC) によって切断されることが示された。本研究は α -DG と α -dystroglycanopathy 遺伝子産物の相互作用を明らかにすることを目的として、 α -DG の N 末端ドメインのプロセッシングに関する検討を行った。

B. 研究方法（倫理面の配慮含む）

合成ペプチドをウサギに免疫し、 α -DG コア蛋白質の N 末端ドメインに対する抗体 (AP1528) および C 末端ドメインに対する抗体 (AP1530) を作製した。これらの抗体と α -DG の糖鎖部分に対する抗体 (IIH6) を用いて、C2C12 培養筋芽細胞における α -DG の N 末端ドメインのプロセッシングを検討した。また、ラットやヒトの組織における N 末端ドメイン断片の発現をウエスタンブロット法、免疫蛍光抗

体法により検討した。 α -DG の laminin 結合能はブロットオーバーレイ法を用いて解析した。

C. 研究結果

AP1528 により、C2C12 の培養上清中に分子量約 35KD のバンドを認めた。このバンドはウエスタンブロットにおいて経時的に density が増強したことから、培養細胞から分泌された蛋白質と考えられた。同様のバンドは RT4、COS7、Hela、HEK293 等の培養細胞の上清中にも認められた。PC の阻害剤である CMK を添加すると培養上清中の同バンドは認められなくなった。一方で AP1530 や IIH6 により C2C12 のホモジネート中に認められた α -DG は CMK の添加により分子量が約 130kD から 165kD へと増大した。これらのうち 165kD のバンドは AP1528 によっても認識されたが、130kD のバンドは認識されなかった。これらのことから、培養細胞に発現した内在性の α -DG は PC によって切断され、N 末端ドメイン断片が培養上清中に分泌されていることが明らかとなり、これを α -DG-N と名付けた。 α -DG-N は IIH6 では検出されず、ブロットオーバーレイ法にて laminin 結合能は認められなかった。次に、ラットの各組織における α -DG-N の発現を AP1528 によるウエスタンブロットにより検討したところ、大脳と末梢神経に高度に発現していることが明らかとなった。免疫蛍光抗体法による観察では大脳、末梢神経ともに軸索に α -DG-N の局在を認めた。さらに α -DG-N はウエスタンブロットによりヒト

の髄液と血清中にも認められた。

D. 考察

培養上清中の α -DG-N は筋芽細胞の他にシュワン細胞、胎児腎細胞、子宮頸癌、リンパ球等の株化細胞の培養上清中にも検出されたことから、PC による α -DG の切断は筋組織のみならず生体内の広範な組織において生じているものと考えられた。そして生体において α -DG-N は筋組織へは局在せず、むしろ髄液や血清中に検出されることから、切断後には速やかにこれら体液中へ移行するものと考えられた。さらに興味深いことに α -DG-N はこれまでに α -DG の発現が確認されていない神経細胞の軸索に強い局在を示した。一つの仮説として、他組織から体液中へ分泌された α -DG-N が神経終末から再取り込みされた可能性を考えている。

E. 結論

培養細胞に発現する α -DG は PC により切断され、その N 末端ドメインは α -DG-N として培養上清中に分泌される。生体においては α -DG-N は髄液等の体液中と、神経の軸索に豊富に存在している。

F. 研究発表

Zhong D, et al. Characterization of the protease activity that cleaves the extracellular domain of b-dystroglycan. Biochem Biophys Res Commun. 2006; 345: 867-871.

Saito, F., et al. Defective peripheral nerve myelination and neuromuscular junction formation in fukutin-deficient chimeric mice.

J. Neurochem., in press.

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

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

本邦に DM2 例が存在するかどうかを検討すべく、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 検体を検索した。DM1 と確認できた例は 174 例であった。DM2 例は存在しなかった

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（倫理面の配慮含む）

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、174 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。昨年度報告した非 DM1/非 DM2 例は、その後の再検討で、DM1 であることが確認された。スプライシング異常を認めた例では、MBNL-1 の核内凝集を認めた。21 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

今回の検討では、DM2 は見出されなかった。本邦では、DM2 は存在しないか、あるいは存在しても極めて希だと考えられる。DM の診断に CLC-1 や MBNL-1 の免疫染色が役立つ可能性が初めて示された。

E. 結論

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

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

Goto K, Nishino I, Hayashi YK: Rapid and accurate diagnosis of facioscapulohumeral muscular dystrophy. *Neuromuscul Disord* 16:256-261. 2006.

Taniguchi M, Kurahashi H, Noguchi S, Fukudome T, Okinaga T, Tsukahara T, Tajima Y, Ozono K, Nishino I, Nonaka I, Toda T: Aberrant neuromuscular junctions and delayed terminal muscle fiber maturation in α -dystroglycanopathies. *Hum Mol Genet* 15:1279-1289. 2006.

Wu S, Ibarra MCA, Malicdan MCV, Murayama K, Ichihara Y, Kikuchi H, Nonaka I, Noguchi S, Hayashi YK, Nishino I: Central core disease is due to RYR1 mutations in more than 90% of patients. *Brain* 129: 1470-1480, 2006.

Malicdan MC, Noguchi S, Nonaka I, Hayashi, YK, Nishino I: A Gne knockout mouse expressing human V572L mutation develops features similar to distal myopathy with rimmed vacuoles or hereditary inclusion body

myopathy. *Hum Mol Genet* 16: 115-128, 2007.

2. 学会発表

Nishino I, Wu S, Ibarra C, Malicdan M, Murayama K, Noguchi S, Hayashi YK, Nonaka I: Central Core Disease Is Due to RYR1 Mutations in More Than 90% of Patients. 58th Annual Meeting of American Academy of Neurology. San Diego, CA, USA. 4.5, 2006.

西野一三, Wu Shiwen, Ibarra Carlos, Malicdan May, 村山久美子, 埜中征哉, 野口悟, 林由起子: セントラルコア病の大半は RYR1 変異による. 第 47 回日本神経学会総会, 東京, 5.11, 2006.

H. 知的財産権の出願・登録状況

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

研究成果の刊行に関する一覧表レイアウト (参考)

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
Sasagawa, N. & Ishiura, S.	Molecular basis of myotonic dystrophy: A new molecular mechanism called RNA gain-of-function.	Fujiwara, M. Sato, N. Ishiura, S.	Frontiers in Life Sciences	Research Signpost	India	2006	15-26

雑誌

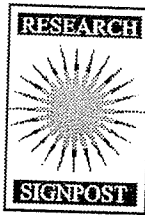
発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Sasagawa, N. & Ishiura, S.	A simple, one step cloning method to obtain long artificial triplet repeats.	Anal.Biochem	357	308-310	2006
Fuke, S., Minami, N., Kokubo, H., Yoshikawa, A., Yasumatsu, H., Sasagawa, N., Saga, Y., Tsukahara, T. & Ishiura, S.	The <i>Hesr1</i> knockout mice exhibit behavioral alterations through the dopaminergic nervous system.	J.Neurosci. Res.	84	1555-1563	2006
Sasabe, T., Furukawa, A., Matsushita, S., Higuchi, S. & Ishiura, S.	Association analysis of the dopamine receptor D2 (DRD2) SNP rs1076560 in alcoholic patients.	Neurosci. Lett.	412	139-142	2007
Nezu, Y., Kino, Y., Sasagawa, N., Nishino, I. & Ishiura, S.	Expression of MBNL and CELF mRNA transcripts in muscles with myotonic dystrophy.	Neuromuscular Disorders	in press		2007

Yamakawa, H., Oyama, S., Mitsuhashi, H., Sasagawa, N., Uchino, S., Kohsaka, S. & Ishiura, S.	Neuroligins 3 and 4X interact with syntrophin- γ 2, and the interactions are affected by autism-related mutations.	Biochem.Biop hys.Res.Com mun.	355	41-46	2007
石浦章一	筋強直性ジストロフィー の分子病態	医学のあゆみ	219	249-252	2006
Zhong D, Saito F, Saito Y, Nakamura A, Shimizu T, Matsumura K.	Characterization of the protease activity that cleaves the extracellular domain of b-dystroglycan.	Biochem Biophys Res Commun.	345	867-871	2006
Saito F, Masaki T, Saito Y, Nakamura A, Takeda S, Shimizu T, Toda T, Matsumura K.	Defective peripheral nerve myelination and neuromuscular junction formation in fukutin-deficient chimeric mice.	J. Neurochem.	in press		
Goto K, Nishino I, Hayashi YK	Rapid and accurate diagnosis of facioscapulohumeral muscular dystrophy.	Neuromuscul. Disord.	16	256-261	2006
Tanicguchi M, Kurahashi H, Noguchi S, Fukudome T, Okinaga T, Tsukahara T, Tajima Y, Ozono K, Nishino I, Nonaka I, Toda T	Aberrant neuromuscular junctions and delayed terminal muscle fiber maturation in α -dystroglycanopathies.	Hum. Mol. Genet.	15	1279-1289	2006
Wu S, Ibarra MCA, Malicdan MCV, Murayama K, Ichihara Y, Kikuchi H, Nonaka I, Noguchi S, Hayashi YK, Nishino I:	Central core disease is due to RYR1 mutations in more than 90% of patients.	Brain	129	1470-1480	2006

Malicdan MC, Noguchi S, Nonaka I, Hayashi, YK, Nishino I	A Gne knockout mouse expressing human V572L mutation develops features similar to distal myopathy with rimmed vacuoles or hereditary inclusion body myopathy.	Hum. Mol. Genet.	16	115-128	2007
Osawa M, Liewluck T, Ogata K, Iizuka T, Hayashi YK, Nonaka I, Sasaki M, Nishino I	Familial reducing body myopathy.	Brain Dev.	29	112-116	2007

研究成果の刊行物・別刷

Research Signpost
37/661 (2), Fort P.O., Trivandrum-695 023, Kerala, India



Frontiers in Life Sciences, 2006: 15-26 ISBN: 81-308-0071-3
Editors: Makoto Fujiwara, Naoki Sato and Shoichi Ishiura

2

Molecular basis of myotonic dystrophy: A new molecular mechanism called RNA gain-of-function

Noboru Sasagawa and Shoichi Ishiura
Department of Life Science, Graduate School of Arts and Sciences
University of Tokyo, Tokyo 153-8902, Japan

Abstract

Myotonic dystrophy (dystrophia myotonica, DM) is one of the most common human muscular dystrophies, occurring with a frequency of about one in 8,000. Clinical features in DM include myotonia, cataracts, insulin abnormality, dementia, and frontal baldness. DM is an autosomal dominant condition and is classified into two types, DM1 and DM2, each caused by a different gene mutation. The gene responsible for DM1 is DM protein kinase (DMPK).

Correspondence/Reprint request: Dr. Noboru Sasagawa, Department of Life Science, Graduate School of Arts and Sciences, University of Tokyo, Tokyo 153-8902, Japan. E-mail: csasa@mail.ecc.u-tokyo.ac.jp

Surprisingly, the DMPK mutation in DM1 patients is not in the coding region but is an increased number of CTG triplet repeats in the 3'-untranslated region of the gene. The CTG repeat number in DM1 patients is hundreds to thousands, whereas normal controls have only five to 30 CTG repeats. The gene responsible for DM2 is ZNF9. Similar to the DMPK mutation in DM1, the ZNF9 mutation causing DM2 is an expanded CCTG quadruplet repeat in the intron of the gene, with thousands of repeats reported in DM2 patients. Neither DM1 nor DM2 has any mutation in the coding region of the transcribed mRNA, and normal proteins are translated in DM patients. The molecular basis of DM1 and DM2 appears to lie in the RNA transcription stage, and the same mechanism could cause DM symptoms in both DM1 and DM2 patients. The transcribed CUG or CCUG repeat RNA forms a hairpin structure, an abnormal secondary structure observed only in DM patients. A specific RNA-binding protein recognizes and binds to the expanded number of repeats, trapping the RNA in this abnormal hairpin form and disturbing normal RNA-binding protein functions such as splicing and/or editing of other genes. As a result, splicing abnormalities could occur in many genes, leading to the variety of symptoms seen in DM patients.

Introduction

Myotonic dystrophy (dystrophia myotonica, DM) is a major muscular dystrophy, occurring with a frequency of one in 8,000 to 10,000. Its main symptom is myotonia (a tension in distal skeletal muscles) and muscle weakness. Multisystemic symptoms, such as cataracts, insulin abnormality, dementia, and frontal baldness, have also been described in DM patients [1]. In 1992, reverse genetics and positional cloning studies revealed a gene responsible for DM and its mutation in DM patients. An expanded number of CTG triplet repeats was observed on chromosome 19q13.3 in DM patients. These patients had hundreds to thousands of CTG repeats, whereas normal controls had only five to 30 repeats [2-4] (Fig. 1). It was reported that the greater the number of CTG repeats, the more severe the symptoms and the earlier the age of DM onset (called anticipation) [2, 5]. DM is categorized as a triplet repeat disease, as are Huntington's disease and Fragile X syndrome. However, unlike the other triplet repeat diseases, the unique feature in DM is that the gene mutation in the responsible gene is located in the 3'-untranslated region (3'-UTR) of the mRNA, in spite that DM is inherited in an autosomal dominant manner. Generally, autosomal dominant hereditary diseases are caused by gene mutations in coding regions, which produce amino acid conversions leading to translated proteins with altered activities. DM apparently does not follow this general rule.

In 2001, a different gene mutation was identified in a group of DM patients who did not exhibit the CTG repeat expansion. Instead, these patients

had an expanded CCTG quadruplet repeat region in the intron of a gene named *ZNF9*, located on chromosome 3q21 [6] (Fig. 1). In these DM patients, 5000 quadruplet repeats were found, whereas normal controls had up to 100 repeats. Since the discovery of a second non-coding repeat expansion, the major form of DM attributable to the CTG repeat expansion has been designated DM type 1 (DM1), and the type caused by the CCTG repeat expansion has been named DM type 2 (DM2). Both DM1 and DM2 have gene mutations in a non-coding region, indicating that no abnormal proteins are translated.

Here, we describe the results of recent studies on DM, which suggest a new point of view on the molecular mechanisms of some genetic diseases; alterations in the RNA sequence itself may be a key factor in some exceptional genetic diseases.

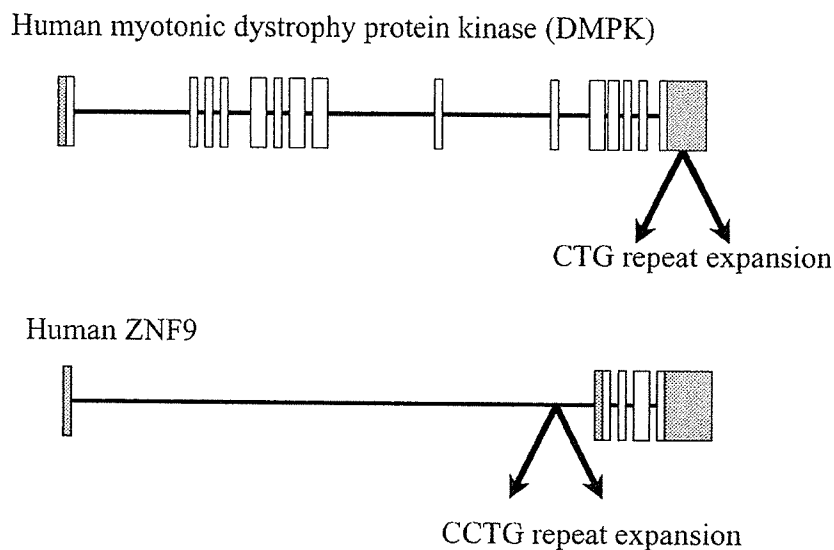


Figure 1. Diagram showing the gene structures of *DMPK* and *ZNF9*, the genes responsible for DM. The boxes represent exons. Open boxes are coding regions, and gray boxes are non-coding regions. The lines represent introns. The CTG triplet repeat is located in the 3'-UTR of *DMPK*, and the CCTG quadruplet repeat is located in the intron of *ZNF9*.

Gene responsible for myotonic dystrophy type 1

The gene responsible for DM1 encodes a serine/threonine protein kinase called dystrophia myotonica protein kinase (DMPK) [5, 7]. DMPK protein is distributed in skeletal muscle, cardiac muscle, brain, and stomach in humans [7-11]. The full-length human DMPK protein has a leucine-rich domain at the N-terminus, a serine/threonine kinase domain in the middle, and a hydrophobic region at the C-terminus. Six major spliced forms of human DMPK have been reported [12] (Fig. 2), and these are classified into two main subgroups, the DMPK-A and -B group and the DMPK-C and -D group. All of the isoforms

have the same kinase domain; the primary differences lie in the C-terminus. Both groups have hydrophobic C-termini, but they share no homology. The DMPK-A and -B group has higher hydrophobic amino acid content than the DMPK-C and -D group. Although the relationship between the expression of DMPK isoforms and the symptoms of DM is unclear, the C-terminus of each DMPK isoform might have an important physiological function, as the C-terminus of DMPK is reported to regulate its localization [13]. DMPK-A and -C are reported to be localized in mitochondria and endoplasmic reticulum [14], whereas an immunoelectron microscopy study revealed that DMPK-C or D is found mainly in the terminal cisternae of the sarcoplasmic reticulum [15].

DMPK is a member of the serine/threonine protein kinase family, and several homologs/orthologs have been reported from the mouse, rat, *Caenorhabditis elegans*, and *Drosophila melanogaster*. These genes are thought to constitute a myotonic dystrophy family of protein kinases (MDFPK) [16, 17]. Several MDFPK members have been shown to interact with small GTPases. The over-expression of DMPK protein in cultured cells, fission yeast, and budding yeast has indicated that DMPK functions as a regulator of cytoskeletal reorganization and/or cell division [18-20]. The physiological substrates for DMPK are not clear, although it can phosphorylate dihydropyridine receptor [21], myosin phosphatase I [13, 22], phospholemman [23], and phospholamban [24] *in vitro*. We have also confirmed that recombinant DMPK exhibits autophosphorylation [19].

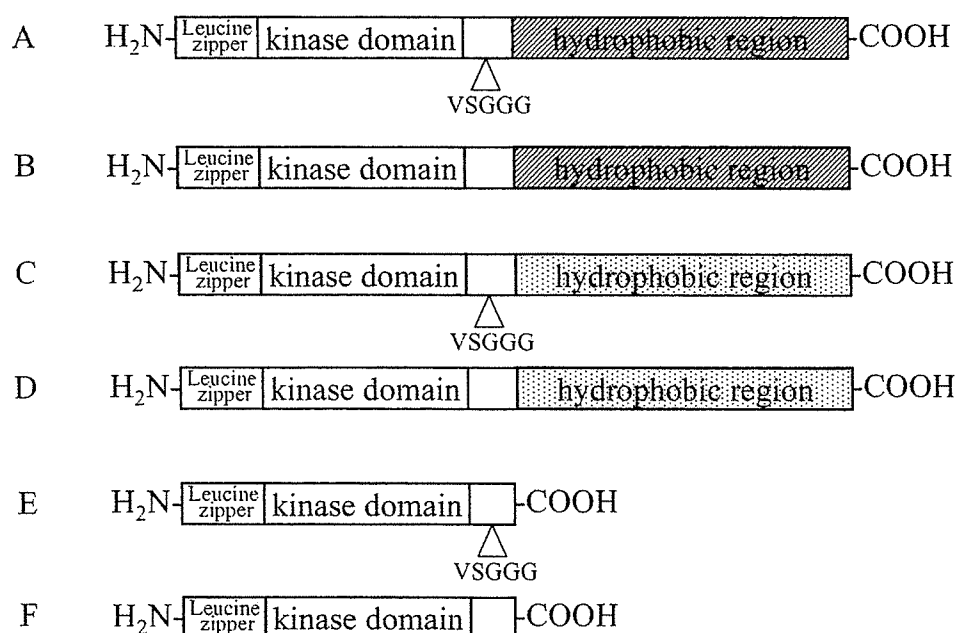


Figure 2. The six major splicing isoforms of human and murine DMPK. The isoforms are distinguished by an insertion of five amino acids (VSGGG) and differences in their hydrophobic C-terminal regions.

Gene responsible for myotonic dystrophy type 2

The gene responsible for DM2 encodes a zinc-finger protein named ZNF9 [25], also called cellular nucleic acid-binding protein (CNBP). ZNF9 has seven tandem zinc fingers and is thought to bind to chromosomal DNA and to function as a transcription factor. The ZNF9 amino acid sequence is highly conserved among *Xenopus laevis*, chickens, mice, and humans. ZNF9 is reported to be involved in the early development of the forebrain formation in mice [26].

Gene-manipulated model mice for DMPK and ZNF9

DMPK knockout and transgenic mice have been established and used to study not only the physiological function of DMPK but also the dose effect of DMPK on the DM phenotype. Given that the gene mutation (CTG repeat expansion) expressed in DMPK mRNA is not located in the coding region but in the 3'-untranslated region, the CTG repeat expansion might exert a *cis* effect on the expression level of DMPK, and the altered DMPK expression level might cause DM1 symptoms through a haplo-insufficiency mechanism. Two research groups independently reported the establishment of DMPK knockout mice, both showing a myopathy [27, 28]. DMPK deficiency resulted in sodium current abnormalities in skeletal muscle [29] and cardiac muscle [30]. DMPK knockout mice showed a decrease in the decremental potentiation, with a duration of 30 to 180 min, that accompanies long-term synaptic potentiation [31]. Cultured skeletal muscle cells from DMPK knockout mice showed smaller and slower calcium responses [32]. There are contradictory reports of decreased [33] and increased [34] calcium uptake by the sarcoplasmic reticulum in DMPK knockout mice, but both studies showed abnormal calcium cycling in DMPK-deficient cells.

The DMPK transgenic mice, expressing human *DMPK* with 20 CTG repeats, are reported to represent only myotonic myopathy [28], hypertrophic cardiomyopathy, and hypotension traits [35]. As a result, these knockout and transgenic mice showed only mild phenotypes and lacked other clear phenotypes characteristic of DM patients, such as myotonia and cataracts. Considering that knockout mice do not express DMPK but DM patients have a certain amount of DMPK protein, the phenotypic changes in the mice were much less than expected. Although it is still possible that abnormal DMPK expression may cause some of the DM phenotype, lower or higher DMPK expression levels do not appear to be able to explain the entire DM phenotype.

ZNF9 knockout mice show developmental abnormalities, especially in forebrain induction and specification [26]. Currently, there is little evidence that these phenotypical changes contribute to DM symptoms. Thus, both *DMPK* and *ZNF9* gene-targeting experiments have indicated that the genes responsible for DM are not responsible for, or have only little effect on, DM symptoms.

Models for the over-expression of CUG repeat RNA

A mouse model that over-expresses the CTG repeat has been reported. The transgenic mouse expressing the untranslated CUG repeat driven by the human skeletal actin promoter exhibited myotonia and myopathy, which are typical symptoms in DM patients [36]. Transgenic mice carrying the human genomic sequence for the DMPK region (~45 kb) with a long CTG repeat region showed histological muscle abnormalities and myotonia [37].

Primary human DM muscle cells show delayed differentiation [38], and the over-expression of the 3'-UTR of DMPK inhibited myoblast differentiation in cultured mouse C2C12 cells [39]. Moreover, the over-expression of DMPK cDNA with a long CTG repeat region in the 3'-UTR also inhibited myogenic differentiation in cultured C2C12 cells compared to the over-expression of DMPK cDNA with a normal repeat [40, 41]. The inhibition of differentiation required not only the CTG repeat but also the other part of the DMPK 3'-UTR [41], and the MyoD pathway was involved in the inhibition [42]. It was also reported that C2C12 cells transfected with human DMPK cDNA with a long CTG repeat in the 3'-UTR show higher sensitivity to oxidative stress [43, 44].

These results in a mouse model and in cultured cells strongly suggest that the long CUG repeat RNA, which is transcribed from the long CTG repeat in the chromosome, has an important physiological function, despite the fact that its location in the 3'-UTR means that it is not translated into amino acids.

RNA-binding proteins contributing to DM pathogenesis

In the late 1990s, a new proposal for DM pathogenesis was that the long CTG repeat in DM patients had a function at the RNA transcription stage. The CUG repeat of the RNA transcript can form a hairpin structure. If this abnormal structure were to have a physiological function in cells, it might disturb the regulation of cellular gene expression, perhaps in response to certain signals (RNA gain-of-function). The presence of a protein that binds to the CUG repeat RNA would make this hypothesis feasible.

In 1996, a protein that binds to eight repeats of the CUG triplet was reported. This protein, named CUGBP1, was the first molecule shown to bind CUG repeat RNA [45], making it a candidate protein for the molecular pathway of DM pathogenesis. Mice over-expressing CUGBP1 exhibited developmental delay of skeletal muscle [46]. CUGBP1 transgenic mice were established and shown to have histological changes of skeletal muscle and abnormalities of splicing for several genes [47].

However, an electron microscopic study revealed that the binding of CUGBP1 to the CUG repeat was not proportional to the CUG repeat length

[48], which did not correlate with the observation that longer repeat lengths were associated with more severe symptoms in DM patients. Moreover, CUGBP1 preferentially bound the UG dinucleotide repeat and showed only weak binding to the CUG repeat [49]. Creating further uncertainty about the role of CUGBP1 are two inconsistent reports: one indicating that CUGBP1 accumulates in the nucleus in DM patients [50] and another showing that CUGBP1 localizes similarly in fibroblasts of both normal and DM patients [48]. Although evidence exists that CUGBP1 and its homolog family proteins (CUGBP1-like and ETR-3-like factors, CELF) have an important role in DM, it is ambiguous whether CUGBP1 and CELF family proteins are the prime factors in DM pathogenesis.

A second candidate protein that binds CUG repeat RNA has been reported. This molecule, called muscleblind-like 1 (MBNL1), was first shown to bind CUG repeat RNA in an UV cross-linking experiment [51]. MBNL1 is an ortholog of *Drosophila* muscleblind, which belongs to a family of zinc-finger proteins and is required for eye development [52]. The binding of MBNL1 is dependent upon the repeat length [51], which is consistent with the repeat-length dependence of the severity of DM symptoms. Moreover, MBNL1 was reported to bind not only to CUG repeat RNA but also to CCUG repeat RNA [53]. Thus, MBNL1 is a more likely candidate than CUGBP1 for directly binding CUG/CCUG repeat RNA. MBNL1 knockout mice exhibited cataracts as well as electrophysiological and histological abnormalities in skeletal muscle, which are commonly observed in DM patients [54]. These indicate that MBNL1 might play an important role in DM pathogenesis.

The co-expression of the expanded CUG repeat and MBNL1 protein creates foci in the nucleus [55, 56], but the foci do not include CUGBP1, further supporting a key role for MBNL1 in DM pathogenesis. The formation of these foci suggests that MBNL1 might be trapped by the CUG repeat RNA, consequently exhausting the supply of functional MBNL1 protein. However, it has also been suggested that the co-localization of MBNL1 and the CUG repeat RNA in nuclear foci is separable from the molecular pathogenesis of DM [57]. Even if MBNL1 were the molecule responsible for DM symptoms, the mechanism of its action would remain to be elucidated.

Splicing abnormalities in a DM mouse model and in DM cells

Although the relationship between the expanded CUG/CCUG repeat and RNA-binding proteins such as CUGBP1 and MBNL1 needs further investigation, many studies have reported that the splicing of several genes is disturbed in a DM mouse model and in DM cells. The splicing pattern of cardiac troponin T (cTNT) was altered in DM patients, a finding confirmed by