

200730012A

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 19 年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 石浦 章一

平成 20 (2008) 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. 先天性筋強直性筋ジストロフィーとミオチューブラーミオパチーの
病理学的鑑別に関する研究 4

西野一三

2. 筋ジストロフィーにおける dystroglycan のプロセッシングの解析
..... 7

清水輝夫

III. 研究成果の刊行に関する一覧表 9

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・分担研究報告書

筋強直性ジストロフィーの病態解明と RNA を介した治療

主任研究者 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) の症状を緩和する目的で、塩素チャネル遺伝子のスプライシングを標的とする治療法の開発を行った。その結果、二糖類であるトレハロースが、成熟型のスプライシングを加速させることを見出した。

A. 研究目的

筋強直性ジストロフィー (DM) は全身性の症状が特徴であるが、これらは、塩素チャネル (筋強直)、トロポニン T (筋分化異常)、インスリン受容体 (耐糖能異常) などのスプライシング異常で起こることが明らかになってきた。発症は、DM 患者の伸びた CUG または CCUG リピート RNA に MBNL1 をはじめとするスプライシング調節因子が結合することによって、本来のスプライシング機能が損なわれ、全身症状として出現するものと考えられている。我々は昨年度、ヒト DM 筋でのスプライシング活性を定量した結果、正常筋に比べてトロポニン T やインスリン受容体で胎児型の有意な発現上昇を認めた反面、MBNL1 自体の発現には患者と正常との差違は認めなかった。また平成 17 年からの研究により、9 種類のスプライシング遺伝子を単離し生理機能を明らかにしたが、本年度は其中でも大きな役割を担っていると考えられる MBNL1 依存性スプライシングに焦点を絞り、スプライシングパターンを変える薬剤がないかどうかについてスクリーニングを行った。これは、機能を保持した塩素チャネルの発現を導く薬剤を探すもので、MBNL1 の

発現を間接的に上昇させる化合物を探す目的もある。

B. 研究方法

筋強直に一番関係が深いと考えられている塩素チャネルのミニジーンを用いて、試験管内スプライシングアッセイを行った。マウス塩素チャネルのエキソン 6, 7A, 7 を含むコンストラクトを使ったこのアッセイは、エキソン 7A を含む胎児型 (6-7A-7) と 7A を含まない成熟型 (6-7) の比を検出するものである。胎児型では停止コドンが入るため、機能のない遺伝子が作られる。このミニジーンをトランスフェクトした COS 細胞に各種因子を添加し、時間を追って mRNA を抽出して、PCR 法によってスプライシング活性を検討した。

もう 1 つのスクリーニングとして、筋芽細胞 C2C12 を用いて分化させ、そこで見られるマイオチューブラリン関連タンパク質 1 (MTMR1) のアイソフォームを PCR 法で検討した。筋管細胞特異的なアイソフォーム C の出現を分化の指標として、分化を促進させる因子の検出も行った。

(倫理面への配慮)

本研究は、ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針に基づいて行われた。

C. 研究結果と考察

まず塩素チャネルのスプライシングを指標に、DM 患者で認められる酸化ストレスに対して防御の効果のあるビタミン E、N アセチルシステインの効果を見た。ビタミン E 添加については、5 μ M で効果が認められたが、それ以上の濃度では有意差が認められなかった。N アセチルシステインでは、100 μ M まで効果が認められなかった。この他に、抗生物質のネオマイシンも効果がなかった。次に、二糖類であるトレハロースの効果を調べた。その結果、100mM 以上の濃度で、塩素チャネルの正常型スプライシングを促進することが明らかになった。

残念ながら、C2C12 を用いたアッセイによって、はっきりと筋分化を促進させる因子は現在のところ見つかっていない。特に、カテキン、アスタキサンチンなどの分子の効果は認められなかった。

D. 結論

本研究によって、ネオマイシンをはじめとする抗生物質の添加によっては、塩素チャネル遺伝子のスプライシングパターンは変化しなかった。しかし、二糖類のトレハロースは明らかに塩素チャネルの成熟型スプライシングを促進した。今後は、これ以外に効果のあるものはないかを探索する予定である。

また、筋分化に応じてスプライシング因子の発現が変化するかをマウス C2C12 細胞で調べたところ、MBNL1-3 の発現にはほとんど変化が認められなかったが、マイオチューブラリン関連タンパク質 1 (MTMR1) の選択的スプライシングが大きく変化し、

MTMR1 のスプライシングは分化の良い指標になることが明らかになった。

E. 結論

本年度の研究の結果、トレハロースにスプライシングを変えるはたらきがあることがわかった。薬剤でスプライシングを変化させることは、全く新しい方向の治療と考えられ、その意味で、候補物質が挙げられたことは今後の治療の進展を占う上で、重要な知見と考えられた。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

Onishi, H., Kino, Y., Morita, T., Sasagawa, N. & Ishiura, S. (2008) MBNL1 associates with YB-1 in cytoplasmic stress granules. J. Neurosci. Res. in press

Dhaenens, M-C., Schraen-Maschke, S., Tran, H., Vingtdoux, V., Ghanem-Le-Dizes, D., Leroy, O., Delplanque, J., Vanbrussel, E., Delacourte, A., Vermersch, P., Maurage, C-A., Gruffat, H., Sergeant, A., Mahadevan, M., Ishiura, S., Buee, L., Cooper, T., Caillet-Boudin, M-L., Charlet-Berguerand, N., Sablonniere B. & Sergeant, N. (2008) Overexpression of MBNL1 fetal isoforms and modified splicing of tau in the DM1 brain: two individual consequences of CUG trinucleotide repeats. Exp. Neurol. in press

Mori, D., Sasagawa, N., Kino, Y. & Ishiura, S. (2008) Quantitative analysis of CUG-BP1 binding to RNA repeats. J. Biochem. in press

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 17,
306-312

石浦章一. 筋強直性ジストロフィー.
Clin. Neurosci. 26, 178-180, 2008.

G. 知的財産権の出願・登録状況
なし

先天性筋強直性筋ジストロフィーとミオチューブラーミオパチーの

病理学的鑑別に関する研究

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

先天性筋強直性筋ジストロフィーは、臨床病理学的に乳児重症型ミオチューブラー・ミオパチーとの鑑別が困難であるとされている。3歳以下の先天性筋強直性筋ジストロフィーの24%に peripheral halo を認めたが全例タイプ 2C 線維を 50%以上（平均 $70 \pm 14\%$ ）有していた。一方、ミオチューブラー・ミオパチーでは、タイプ 2C 線維の頻度は、0-11%（平均 $2.9 \pm 2.7\%$ ）であったことから、peripheral halo を呈する例であっても、タイプ 2C 線維の頻度により鑑別が可能であると考えられる。

A. 研究目的

先天性筋強直性筋ジストロフィーは、臨床的には floppy infant を、病理学的にはミオチューブラー・ミオパチー様の変化を呈し、乳児重症型のミオチューブラー・ミオパチーとの鑑別が困難であるとされている。そこで、遺伝学的に MTM1 変異を確認した乳児重症型ミオチューブラー・ミオパチー例と同様に遺伝学的に診断を確定した先天性筋強直性筋ジストロフィー例の筋生検組織を比較検討し、病理学的な鑑別が可能かどうかを詳細に検討した。

B. 研究方法

対象は、1978 年～2006 年までに国立精神・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、3歳以下の例で、DMPK 遺伝子内の CTG リピート及び ZNF9 遺伝子内の CCTG リピート伸張を確認した先天性筋強直性筋ジストロフィー例 17 例および、同様に 3歳以下で MTM1 遺伝子変異を確認したミオチューブラー・ミオパチー例 33 例。全検体に対して、3列からなる連続切片を作製し、ヘマトキシリン・エオジン、ゴモリ・トリクロム変法、NADH-TR、ミオシン ATPase を含む各種組

織化学染色を行い、病理学的変化を比較検討した。

（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

ミオチューブラー・ミオパチー例では、全例に peripheral halo 並びに中心核線維（ $15 \pm 14\%$ ）を認めた。タイプ 2C 線維の頻度は、0-11%（平均 $2.9 \pm 2.7\%$ ）であった。

一方、先天性筋強直性筋ジストロフィー例では、中心核線維の頻度は、平均 $2.6 \pm 4.9\%$ であった。peripheral halo を認めた例は、4例のみであった。この4例におけるタイプ 2C 線維の頻度は、50-80%（平均 $70 \pm 14\%$ ）であった。

D. 考察

確かに peripheral halo を呈して一見ミオチューブラー・ミオパチーとよく似た病理所見を示す例が

24% (4/17 例) に認められた。しかし、ミオチューブラー・ミオパチーでは、タイプ 2C 線維の頻度が多くても 10%程度であるのに対して、先天性筋強直性ジストロフィーでは、全例で 50%を越えていた。このことは、peripheral halo を呈する例では、タイプ 2C 線維の頻度を見ることにより、ミオチューブラー・ミオパチーと先天性筋強直性ジストロフィーを病理学的に鑑別することが出来る可能性を示している。さらに、先天性筋強直性ジストロフィーにおいて、タイプ 2C 線維が多数認められることは、peripheral halo を伴うような病理学的変化が恐らく筋線維の幼弱性を反映している可能性を示している。一方、ミオチューブラー・ミオパチーでは、タイプ 2C 線維が少なく、peripheral halo を伴う myofibril の配列の変化が幼弱性ではなく、myotubularin の機能喪失による細胞内膜輸送の異常を反映したものであることを強く示唆している。従って、一見同様に見える病理学的変化ではあるが、恐らく全く異なった病態を背景としている可能性が高い。

E. 結論

先天性筋強直性ジストロフィーでは 24%に peripheral halo を認めて、乳児重症型ミオチューブラー・ミオパチーと一見病理学的に極似しているが、タイプ 2C 線維が高頻度に認められる点でミオチューブラー・ミオパチーとの鑑別が可能であると考えられる。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

Okada M, Kawahara G, Noguchi S, Sugie K, Murayama K, Nonaka I, Hayashi YK, Nishino I: Primary collagen VI deficiency is the second most common congenital muscular dystrophy in

Japan. *Neurology* 69: 1035-1042, 2007

Kawahara G, Okada M, Morone N, Ibarra C, Nonaka I, Noguchi S, Hayashi YK, Nishino I: Reduced cell anchorage may cause sarcolemma-specific collagen VI deficiency in Ullrich disease. *Neurology* 69: 1043-1049, 2007

Sato I, Wu S, Ibarra MCA, Hayashi YK, Fujita H, Tojo M, Oh SJ, Nonaka I, Noguchi S, Nishino I: Congenital neuromuscular disease with uniform type 1 fiber and RYR1 mutation. *Neurology* 70: 114-122, 2008

2. 学会発表

Nishino I: Ullrich Disease. 6th Asian and Oceanian Myology Centre (AOMC) and Neuroscience 2007, Penang, Malaysia, 6.21, 2007

Nishino I: Muscle disorders of lipid dysmetabolism. 12th International Congress of the World Muscle Society (WMS), Taormina, Italy, 10.18, 2007

Ohkuma A, Hayashi YK, Noguchi S, Nonaka I, Nishino I: Clinicopathological features of Japanese patients with PNPLA 2 gene mutation. 12th International Congress of the World Muscle Society (WMS), Taormina, Italy, 10.19, 2007

Okada M, Noguchi S, Nonaka I, Malicdan M, Fujita M, Ogawa M, Hayashi YK, Nishino I: Rimmed vacuoles in children: Highly specific indication for SIL1 mutation in Marinesco-Sjögren syndrome. 12th International Congress of the World Muscle Society (WMS), Taormina, Italy, 10.19, 2007

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

筋ジストロフィーにおける dystroglycan のプロセッシングの解析

分担研究者 清水 輝 夫 帝京大学医学部神経内科

A. 緒言

重症型の先天性筋ジストロフィーにおいてその原因遺伝子が相次いで明らかにされている。これらの疾患は α -dystroglycan (α -DG) の糖鎖修飾の異常がその分子発病機序において重要であり、 α -dystroglycanopathy と総称される。 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が、その生理学的、病態学的意味は不明である。本研究は筋強直性ジストロフィーを含む各種の筋ジストロフィーで α -DG のプロセッシングとその異常がその発病機序に関与する可能性を考え、検討を行った。

B. 方法

ウサギに合成ペプチドをウサギに免疫することにより、 α -DG コア蛋白質の N 末端ドメイン (α -DG-N) に対する精製抗体 (AP1528) を作製した。また同様にマウスに免疫し、モノクローナル抗体 1D9 を作製した。これらの抗体を用いて、筋細胞系を中心に各種の培養細胞における α -DG-N のプロセッシングを検討した。またイムノブロット法でヒト血清、脳脊髄液中の α -DG-N の発現を解析した。また新たに ELISA 法を開発し、ヒト脳脊髄液中の α -DG-N の濃度を定量化した。

C. 結果

抗 α -DG-N 抗体によりマウスの筋芽細胞 C2C12 の培養上清中に分子量約 35KD の蛋白質を認めた。培養時間が増えるごとに経時的に 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。同じ蛋白質は筋芽細胞以外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蛋白質は認められなくなっ

た。一方で α -DG の糖鎖に対する抗体である 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 の蛋白質は抗 α -DG-N 抗体によっても認識されたが、130kD の蛋白質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 (α -DG-N) が培養上清中に分泌されていることが明らかとなった。さらに抗 α -DG-N 抗体を用いたウエスタンブロットにより α -DG-N はヒト血清と脳脊髄液にも認められた。抗 α -DG-N 抗体を用いた ELISA 法を新たに開発し、正常圧水頭症患者 11 例の脳脊髄液 α -DG-N 濃度を測定したが、その平均値は $2.44 \mu\text{g/ml}$ ($\text{SD}=1.07$) であり、総脳脊髄液蛋白の約 1/100~1/200 に相当した。

D. 考察

培養上清中の α -DG-N は筋芽細胞の他に多種類の培養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。そしてヒトにおいて α -DG-N は脳脊髄液や血清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。脳脊髄液に高濃度に存在することは α -DG-N が中枢神経において重要な機能を果たしている可能性が考えられる。

E. 結論

筋芽細胞など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明らかにした。生体においては α -DG-N は血清、脳脊髄液に分泌されていることを明らかにした。今後、筋強直性ジストロフィー、先天性筋ジストロフィーを含む各種の筋ジストロフィーで血清、脳脊髄液でのレベルに変動がないかを検討したい。

F. 参考文献

- 1) Kanagawa, M., et al. Cell
2004;117:953-964.
- 2) Zhong, D., et al. Biochem. Biophys. Res.
Commun. 2006;345:867-871.
- 3) Saito, F., et al. J. Neurochem.
2007;101:1712-1722.
- 4) Saito, F., et al. F.E.B.S. Lett.
2008;582:439-444.

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
石浦章一	筋強直性ジストロフィー	丸山敬	Clinical Neuroscience	中外医学社	東京	2008	178-180

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
Onishi H, Kino Y, Morita T, Sasagawa N, Ishiura S	MBNL1 associates with YB-1 in cytoplasmic stress granules.	J. Neurosci. Res.		in press	2008
Dhaenens M-C, Schraen-Maschke S, Tran H, Vingtdeux V, Ghanem-Le-Dizes D, Leroy O, Delplanque J, Vanbrussel E, Delacourte A, Vermersch P, Maurage C-A, Gruffat H, Sergeant A, Mahadevan M, Ishiura S, Buee L, Cooper T, Caillet-Boudin M-L, Charlet-Berguera nd N, Sablonniere B, Sergeant N	Overexpression of MBNL1 fetal isoforms and modified splicing of tau in the DMI brain: two individual consequences of CUG trinucleotide repeats.	Exp. Neurol.		in press	2008
Mori D, Sasagawa N, Kino Y, Ishiura S	Quantitative analysis of CUG-BP1 binding to RNA repeats.	J. Biochem.		in press	2008
Nezu Y, Kino Y, Sasagawa N, Nishino I, Ishiura S	Expression of MBNL and CELF mRNA transcripts in muscles with myotonic dystrophy.	Neuromuscular Disorders	17	306-312	2007

Sato I, Wu S, Ibarra MCA, Hayashi YK, Fujita H, Tojo M, Oh SJ, Nonaka I, Noguchi S, Nishino I	Congenital neuromuscular disease with uniform type 1 fiber and RYR1 mutation.	Neurology	70	114-122	2008
Okada M, Kawahara G, Noguchi S, Sugie K, Murayama K, Nonaka I, Hayashi YK, Nishino I	Primary collagen VI deficiency is the second most common congenital muscular dystrophy in Japan.	Neurology	69	1035-1042	2007
Kawahara G, Okada M, Morone N, Ibarra C, Nonaka I, Noguchi S, Hayashi YK, Nishino I	Reduced cell anchorage may cause sarcolemma-specific collagen VI deficiency in Ullrich disease.	Neurology	69	1043-1049	2007
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.	101	1712-1722	2007

研究成果の刊行物・別冊

筋強直性ジストロフィー

石 浦 章 一

はじめに

筋強直性ジストロフィー1型(DM1)の原因がDMPK遺伝子の3'非翻訳領域にあるCTG3塩基リピートの伸長であることがわかって15年がたった¹⁾。また同2型(DM2)も、ZNF9遺伝子の第1イントロンにあるCCTG4塩基リピートの伸長が原因で、塩基リピートの伸長が病態と深く関わることがわかり、リピートの伸びたRNAに何か特別の機能があるのではないかと、というRNA機能獲得説が生まれた^{2,3)}。これは、CTGリピートだけを発現させたトランスジェニックマウスで症状が再現されたことから、正しい説ではないかと考えられた。

この他にも、CTGリピートが伸びたDMPK遺伝子の下流にあるSIX5遺伝子の発現が低下したり、リピートが伸長したDMPK mRNAが核から出られず、DMPK自体の発現が低下することも報告されている³⁾。本論では、主にDM1について前者のRNA機能獲得説の現状と、それに応じた治療の試みについてまとめてみたい。

CTG/CCTG リピート伸長と RNA 結合タンパク質 MBNL1

現在までの研究結果から、伸長したリピートRNAに特異的に結合するタンパク質があって、正常ではスプライシング調節をしているこのタンパク質が伸長リピートに捕捉され、正常機能が果たせなくなって全身症状が出るのではないかと考えられている。そのタンパク質の名前はMBNL (muscleblind-like)である⁴⁾。このタンパク質は、目と筋肉に異常のあるハエの責任タンパク質として発見された muscleblind のオーソログであり、ヒトでは3種類のホモログが存在する。MBNL1, MBNL2, MBNL3である。その中でもMBNL1は筋肉をはじめとする全身に発現していて、強いスプライシング制御活性を持つタンパク質で、筋肉では塩素チャンネル(CLCN1)、インスリン受容体(IR)、リアノ

ジン受容体(RYR1)、マイオチューブラリン関連タンパク質(MTMR1)、トロポニンT(TNNT3)、小胞体Ca-ATPアーゼ(SERCA)などのスプライシングを調節している。また心筋ではトロポニンT(TNNT2)、脳ではタウやアミロイド前駆体、NMDA受容体のスプライシングにも関わっていて、大変重要な分子である。このMBNL1がCUGリピートやCCUGリピートと特異的に結合することが私たちの研究で明らかになった⁵⁾。

DMの特徴的症状の一つは、ミオトニア、インスリン耐性、筋力低下などである。特にミオトニアは、活動電位の頻発と弛緩障害という興奮異常であり、塩素チャンネルの機能低下によっておこることがわかっている。DM患者の筋では、塩素チャンネルCLCN1遺伝子に異常スプライシングがおこり、途中で停止コドンが入った胎児型CLCN1ができることがわかっている。実は正常型のスプライシングにはMBNL1が欠かせないのだが、何らかの異常でMBNL1が働かないために異常スプライシングがおこると推定されている。一般の筋肉の分化においては、機能のない胎児型から機能を持つ成人型にスプライシングが変わってゆく

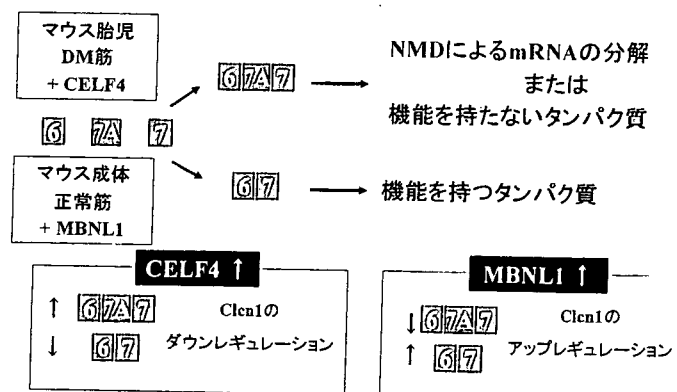


図1 ヒトとマウス塩素チャンネルの活性制御

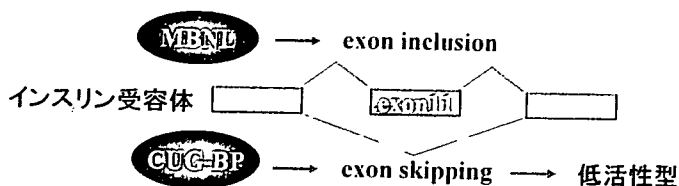
いしうら しょういち 東京大学大学院教授/総合文化研究科

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タンパク質群
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4 DMにかかわるRNA結合タンパク質2種類

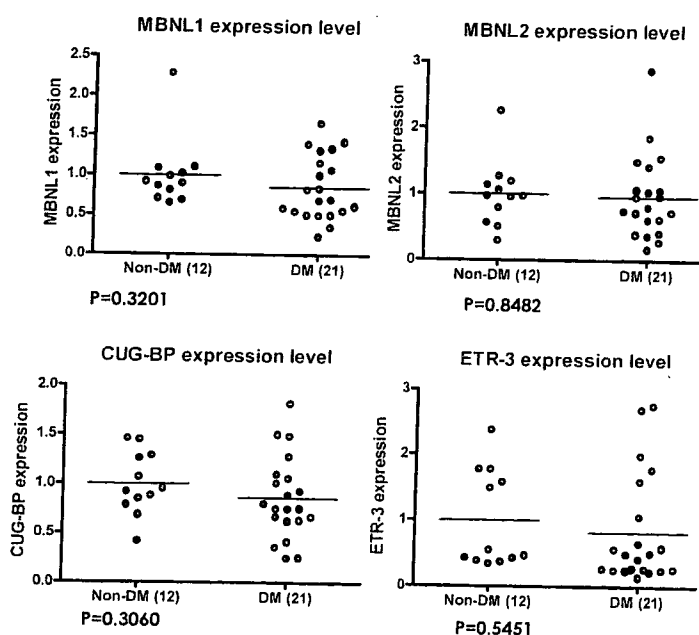


図5 DM患者筋のMBNL1、MBNL2、CUG-BP (CELF1)、CUG-BP2(CELF2)の量

いて定量し、ほとんど差がないことを確認した(図5)⁶⁾。

DMについての全く新しい発症説

リピート領域が逆方向に読まれると、CAGリピートを
含むmRNAが作られる。例えばSCA8の非コード領域に
あるCTGリピートがmRNAではCUGリピートになるの
だが、なんと逆方向にCAGリピートとしても読まれ、リー
ディングフレームがないにもかかわらずポリグルタミンが

作られてしまう、という報告がある⁷⁾。SCA8では、このポ
リグルタミンの沈着によって神経が死ぬというのである。

一方、図5で示すように長いCUGリピートがミスマッ
チ二重鎖をつくり、それがdicerと呼ばれるRNA切断酵
素によって21-23ヌクレオチドの長さの二本鎖RNAを作
り、RNAiと同じ手法によってサイレンシングがおこるの
ではないか、という説も提唱されている。

治療法の提唱

DMの原因は明らかになったが、発症メカニズムは依然
として不明な点も多い。しかし、治療の試みは続けられて
いる。まず、ミオトニアの治療としては塩素チャネルのス
プライシング正常化が第一の標的になる。図3で明らかな
ように、リピートにMBNL1がトラップされて正常スプラ
イシングが果たせないなら、MBNL1の発現を上げることが
考えられる。また、逆方向に働くCELFファミリーの遺
伝子発現を低下させることも必要かもしれない。このよう
な薬剤をスクリーニングすることは、今後の治療に大変有
用であると考えられる。

また直接的には、Duchenne型筋ジストロフィーで提唱
されているエキソンスキップを塩素チャネル遺伝子に応用
することも可能だろう。アンチセンスオリゴヌクレオチド
を用いて図3のエキソン6Bと7Aをスキップさせること
ができれば、成人型塩素チャネルが優先的に作られ、ミオ
トニアの症状がよくなることが期待される。標的が決まっ
ているため、すべてのDM患者に応用できるのが強みで、
近未来の治療法としてはこのあたりが到達点になろう。

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月号: 58-65.
- 2) Ranum LPW, Day JW. Myotonic dystrophy: RNA pathogenesis
comes into focus. Am J Hum Genet. 2004; 74: 793-804.
- 3) Osborne RJ, Thornton CA. RNA-dominant diseases. Human Mol
Genet. 2006; 15: R162-9.
- 4) 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.
2006; 219: 249-52.
- 5) Kino Y, Oma Y, Sasagawa N, et al. Muscleblind protein, MBNL1/
EXP, binds specifically to CHHG repeats. Human Mol Genet. 2004;
13: 495-507.
- 6) Nezu Y, Kino Y, Sasagawa N, et al. Expression of MBNL and CELF
mRNA transcripts in muscles with myotonic dystrophy. Neuro-
muscul Disord. 2007; 17: 306-12.
- 7) Moseley ML, Zu T, Ikeda Y, et al. Bidirectional expression of CUG and
CAG expansion transcripts and intranuclear polyglutamine inclusion
in spinocerebellar ataxia type 8. Nature Genet. 2006; 38: 758-69.

MBNL1 Associates With YB-1 in Cytoplasmic Stress Granules

Hayato Onishi,¹ Yoshihiro Kino,^{1,2} Tomoko Morita,¹ Eugene Futai,¹ Noboru Sasagawa,¹ and Shoichi Ishiura^{1*}

¹Department of Life Sciences, Graduate School of Arts and Sciences, University of Tokyo, Tokyo, Japan

²Laboratory for Structural Neuropathology, Brain Science Institute, RIKEN, Tokyo, Japan

The muscleblind-like (MBNL) protein family is thought to be involved in the molecular mechanism of myotonic dystrophy (DM). Although it has been shown to have splicing activity, a broader function in cellular RNA metabolism has been implicated. In this study, we attempted to find the binding proteins of MBNL1 in order to elucidate its physiological function. First, we performed a GST pull-down assay using GST-MBNL1-6xHis as bait. Several proteins were identified, including YB-1, a multifunctional DNA/RNA-binding protein, and DDX1, a DEAD box RNA helicase. MBNL1 formed an RNP complex with YB-1 and DDX1 in binding assays. YB-1 also showed a weak but significant effect on α -actinin splice site selection. Interestingly, in response to stress, MBNL1 moved to cytoplasmic stress granules, where it colocalized with YB-1, which was previously reported to be a component of stress granules. We found that DDX1 also colocalized with MBNL1 at stress granules. These results provide new insight into the dynamics of MBNL1 in response to stress, and they suggest a role for MBNL1 in mRNA metabolism in the cytoplasm. © 2008 Wiley-Liss, Inc.

Key words: myotonic dystrophy; MBNL1; YB-1; stress granules; splicing

Myotonic dystrophy (dystrophia myotonica; DM) is one of the most common human muscular dystrophies, occurring at a frequency of 1 in 8,000 (Harper, 2001). The clinical features of DM include myotonia, cataracts, insulin resistance, and cognitive dysfunction (Meola et al., 2003). DM is an autosomally inherited disorder that is classified into two types, DM1 and DM2, based on the expansion of tri (CTG)- and tetra (CCTG)-nucleotide repeats in the 3'-UTR of *DMPK* (Brook et al., 1992; Mahadevan et al., 1992; Fu et al., 1993) and intron 1 of *ZNF9* (Liquori et al., 2001), respectively. DM1 and DM2 have similar phenotypes even though they are caused by unrelated mutations (Day et al., 2003). Various hypotheses have been proposed to explain how untranslated mutations can lead to a dominant pathogenic phenotype; however, several lines of evidence support a "gain-of-function" model for expanded RNA repeats. No *DMPK* mutation except for the repeat expansion has ever been reported, indicating

that loss of function of *DMPK* is not the major cause of DM1. Although mice deficient in *DMPK* show mild myopathy and abnormalities in cardiac conductance, they do not reproduce other symptoms of DM1 (Jansen et al., 1996; Reddy et al., 1996; Berul et al., 1999). On the other hand, mice expressing expanded CUG repeats inserted in the 3'-UTR of the muscle-specific actin gene developed myotonia and DM-like myopathy (Mankodi et al., 2000). There are several reports that CUG or CCUG repeat RNAs form nuclear foci in cells or tissues of DM1 or DM2 patients and mice expressing expanded CUG repeats by using fluorescent in situ hybridization (FISH; Taneja et al., 1995; Davis et al., 1997; Amack et al., 1999; Mankodi et al., 2000, 2001; Liquori et al., 2001). This evidence suggests that the expressions of expanded CUG or CCUG repeats are likely to be central features and sufficient for causing these symptoms.

The RNA repeat foci seem to sequester several RNA binding proteins, such as those of the well-known MBNL family (Fardaei et al., 2001, 2002; Mankodi et al., 2001). MBNL1, which has four Cys₃His zinc-finger domains, is a human homologue of *Drosophila* muscleblind (Begemann et al., 1997), which has been reported to play some role in the differentiation of eye and muscle (Begemann et al., 1997; Artero et al., 1998). MBNL1 was first isolated as a CUG repeat binding protein in relation to DM (Miller et al., 2000). Previously, the binding specificity of MBNL1 was characterized, and target RNA sequence was determined (Kino et al., 2004). The MBNLs have been established as regulators of alternative splicing (Ho et al., 2004). Recently, it was

Supplementary Material for this article is available online at <http://www.interscience.wiley.com/suppmat/0360-4012/suppmat/> (www.interscience.wiley.com).

Contract grant sponsor: Ministry of Health, Labor and Welfare, Japan; Contract grant sponsor: HFSP.

*Correspondence to: Shoichi Ishiura, Department of Life Sciences, Graduate School of Arts and Sciences, University of Tokyo, Tokyo, Japan. E-mail: cishiura@mail.ecc.u-tokyo.ac.jp

Received 2 October 2007; Revised 30 November 2007; Accepted 17 December 2007

Published online 00 Month 2008 in Wiley InterScience (www.interscience.wiley.com). DOI: 10.1002/jnr.21655

AQ1

suggested that *Muscleblind* has a role in translational control through a modulation of RNA stability in the cytoplasm (Houseley et al., 2005). In addition, it was shown that localized expression of the integrin $\alpha 3$ is regulated at the level of RNA localization by MBNL2 (MLP1), a human paralogue of MBNL1 (Adereth et al., 2005). These findings imply that MBNL1 might also have a similar role in mRNA metabolism in the cytoplasm. The physiological functions of MBNL1 are largely unknown except that it has splicing activity and its function is down-regulated in DM. Although therapeutic strategies that restore MBNL1 function to normal would likely benefit those with DM, a broader understanding of MBNL1 function is important for elucidating DM pathogenesis.

MATERIALS AND METHODS

Plasmid Construction

AQ1

The open reading frames for *YB-1*, *DDX1*, *TIA-1*, and *DCP2* were amplified by PCR from a human skeletal muscle cDNA library (Clontech, Logan, UT) and cloned into pcDNA3.1-V5 (Invitrogen, Carlsbad, CA), pECFP-C1 (Clontech), or pcDNA3-HA (Invitrogen) using conventional molecular biological techniques. MBNL1₄₀ was cloned into pEGFP-N1 (Clontech) or pSecDk. The pSecDk vector was generated by deleting the IgG sequence from pSecTagA (Invitrogen). The EF1-EF2 region of α -actinin was amplified by PCR from rat genome DNA and cloned into the BglII-Sall site of pEGFP-C1 (Clontech). The nucleotide sequences of the DNA inserts were confirmed by sequencing.

Antibodies

Anti-MBNL1 rabbit polyclonal antibodies were raised using bacterially expressed MBNL1₄₀-6xHis as the antigen. The serum was purified with MBNL1₄₀-coupled Affigel 10 (Bio-Rad, Hercules, CA) and cleared by GST-6xHis-bound glutathione Sepharose (Amersham, Arlington Heights, IL). Goat anti-TIA-1 was purchased from Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA). Rat anti-HA 3F10 was purchased from Roche (Indianapolis, IN). Mouse anti-V5 and anti-myc antibodies were purchased from Invitrogen. Alexa Fluor 568-labeled goat anti-mouse IgG, Alexa Fluor 488-labeled donkey anti-rabbit IgG, Alexa Fluor 546-labeled donkey anti-goat IgG, and Alexa Fluor 488-labeled donkey anti-rat IgG were purchased from Molecular Probes (Eugene, OR).

Protein Purification

Recombinant GST-MBNL1₄₀-6xHis was expressed in bacteria and purified as described elsewhere (Kino et al., 2004). Briefly, pET-GX containing MBNL1₄₀ was transformed into BL21 (DE3) cells and cultured overnight in LB medium. The culture was then diluted and shaken at 37°C for 1.5 hr, or until the OD₆₀₀ reached 0.3–0.4, and then 0.2 mM IPTG was added. During induction, the culture was shaken at 25°C for 4 hr. The bacterial cells were then collected and lysed twice in a French pressure cell press (Ohtake Works, Co.) before being centrifuged at 5,000g for 20 min. The supernatant was subjected to affinity purification using

glutathione Sepharose 4B (Amersham Biosciences). The beads were washed with ATP MgSO₄ buffer to exclude DnaK, and GST-MBNL1₄₀-6xHis was eluted with 50 mM Tris-HCl, pH 8.8, and 10 mM glutathione (reduced type). The eluate was then mixed with NaCl and imidazole before the addition of Talon Metal Affinity Resin (Clontech) according to the manufacturer's protocol. Finally, the purified proteins were dialyzed against a stock buffer (50 mM Tris-HCl, pH 8.0, 100 mM NaCl, and 2 mM 2-mercaptoethanol). The quantity and purity of the samples were checked by SDS-PAGE with Coomassie brilliant blue (CBB) staining. The identity of GST-MBNL1₄₀-6xHis was confirmed by peptide mass fingerprinting with mass spectrometry (AXIMA-CFR; Shimadzu) following digestion with trypsin.

GST Pull-Down Assay

Mouse muscle and heart (2 g each) were homogenized in lysis buffer (50 mM Tris-HCl, pH 8.0, 100 mM NaCl, 2 mM 2-mercaptoethanol, 0.5% NP-40, 0.5% Triton X-100, and 1/1,000 vol protease inhibitors) using a Hitachi homogenizer and centrifuged at 15,000g for 20 min. Next, the supernatant was precleared with 500 μ l of glutathione Sepharose for 2 hr and with GST-6xHis-bound glutathione Sepharose for 2 hr at 4°C. Finally, the supernatant was mixed with 20 μ g of GST-MBNL1₄₀-6xHis and rotated overnight at 4°C. The beads were washed five times with lysis buffer, and the complex was eluted by cleavage with 3 U thrombin for 1 hr at 20°C, then subjected to SDS-PAGE.

In-Gel Trypsin Digestion and Analysis by Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Tandem Time-of-Flight (MALDI-TOF/TOF) Mass Spectrometry

Pull-down assays were performed as described above. The bound proteins were separated by 12.5% SDS-PAGE and stained with Silver Quest (Invitrogen). The bands were excised from the gel and destained, dehydrated with acetonitrile for 10 min, and dried completely under a vacuum pump for 10 min. Each band was placed in 20 μ l of 5 mM NH₄HCO₃ containing 1 pmol sequencing-grade trypsin (Promega, Madison, WI) at 37°C overnight. Aliquots of the trypsinized samples were analyzed by nanoliquid chromatography and automatically spotted with α -cyano-4-hydroxycinnamic acid solution on a stainless-steel target and air dried. MALDI-TOF analysis was conducted with a Proteomics analyzer 4700 (Applied Biosystem, Foster City, CA). The proteins were identified by database searches on the web with Mascot (Matrix Science, Ltd., London, United Kingdom).

Western Blotting

The samples were subjected to 10% SDS-PAGE and transferred to PVDF membranes (Immobilon-P; Millipore, Bedford, MA). The membranes were then blocked with 5% skim milk in TPBS (0.05% Tween 20 in PBS) for 1 hr at room temperature and incubated with primary antibodies in TPBS. After washing, the membranes were incubated for 1 hr with horseradish peroxidase (HRP)-conjugated secondary antibodies. The immunoreactive bands were visualized with the LAS-3000 imaging system (Fujifilm, Tokyo, Japan).

Immunoprecipitation

COS-7 cells were transfected with myc-tagged constructs of MBNL1 and V5-tagged constructs of YB-1 or DDX1 using FuGENE6 (Roche, Basel, Switzerland). Cells from two 10-cm plates were homogenized in 500 μ l lysis buffer [50 mM Tris-HCl, pH 8.0, 150 mM NaCl, 5 mM dithiothreitol (DTT), 1 mM EDTA, 1% (w/v) Triton X-100, and protease inhibitor cocktail]. The lysates were then centrifuged at 100,000g for 15 min at 4°C. The supernatant was precleared with protein G Sepharose 4 fast flow beads (Amersham Biosciences, Piscataway, NJ) for 1 hr and then incubated with anti-V5 antibodies fixed on beads. After the beads were washed five times with lysis buffer, the precipitates were analyzed by SDS-PAGE and immunoblotted with either anti-myc or anti-V5 antibodies.

Immunocytochemistry and Image Analysis

HeLa and COS-7 cells were fixed with PBS containing 4% (w/v) paraformaldehyde for 15 min and permeabilized with 0.1% (w/v) Triton X-100 in PBS for 15 min. After the buffer was exchanged for 3% (w/v) BSA in PBS, the cells were incubated with the first antibody in 3% BSA in PBS for 1 hr, washed with PBS, and then incubated with the second antibody in 3% BSA in PBS for 1 hr. After washing with PBS, the samples were embedded in Mowiol (Calbiochem, La Jolla, CA). Cell images were acquired on a Zeiss LSM510 Meta laser scanning confocal microscope (Carl Zeiss, Jena, Germany) or IX70 microscope (Olympus, Tokyo, Japan).

Polysome Analysis

HeLa (10-cm dish) cells were exposed to 50 μ g/ml cycloheximide at 37°C for 10 min, washed twice with cold PBS, and resuspended in 300 μ l TKM buffer (10 mM Tris-HCl, pH 7.5, 100 mM KCl, 5 mM MgCl₂, and 50 μ g/ml cycloheximide). The cells were then homogenized by passing them through a 27-gauge needle 10 times. Both the PBS and the TKM contained 50 μ g/ml cycloheximide. The homogenate was centrifuged at 2,000g for 10 min at 4°C, and the supernatant was then loaded onto a gradient of 15–40% (w/v) sucrose in TKM and sedimented for 60 min at 4°C at 40,000 rpm (18 kG) in a swinging bucket rotor. The gradient was collected in 15 fractions, with concomitant measurement of the absorbance at 254 nm. The proteins were precipitated with trichloroacetic acid and subjected to SDS-PAGE and Western blot analysis, as described above.

Splicing Assays

For the *in vivo* splicing assays, HEK293 cells were plated in 3.5-cm or 6-cm dishes and cultured for 24 hr in DMEM plus 10% FBS before plasmid transfection. Cells were grown to 60–80% confluence and then transiently cotransfected using FuGENE 6 (Roche) according to the manufacturer's instructions with 300 ng splicing reporter and 4 μ g YB-1-V5, MBNL1-myc, or DDX1-V5. The cells were collected after 48 hr, total RNA was extracted using an RNeasy Kit (Qiagen, Valencia, CA), and the samples were analyzed by RT-PCR. Reverse-transcription was done by using Prime-

Script Reverse Transcriptase (TaKaRa). Spliced products were amplified using EGFP primer (Fw: CATGGTCCTGCTGGA GTTCGTG, Rv: GTTTCAGGTTTCAGGGGAGGTGTG) and separated by 6% polyacrylamide gel.

RESULTS

Pull-Down Screening of MBNL1

MBNL1 has nine splicing isoforms (Kino et al., 2004; Pascual et al., 2006). The ratio of each isoform is likely to change during development and differentiation of muscle (Kanadia et al., 2006). Recently, it was shown that MBNL2 (MLP1) is involved in the local translation of the integrin α 3 by transporting the transcript to specific points in the cytoplasm (Adereth et al., 2005). Therefore, we focused on both the nuclear and the cytosolic compartment of MBNL1, and we selected MBNL1₄₀, which localizes to both compartments, for use as bait in a GST pull-down assay. Double-tagged GST-MBNL1-6xHis was purified in a two-step procedure. Purified GST-MBNL1-6xHis was bound to glutathione beads and mixed with a mouse muscle or heart lysate. After incubation overnight, the beads were washed extensively, and the proteins were eluted by thrombin cleavage. After elution, the complexes in the experimental and control samples were compared by SDS-PAGE (Fig. 1). About 20 bands were detected in the sample containing muscle lysate as prey. Each band was excised from the gel and digested with trypsin. The trypsinized peptides were then subjected to MADLI-TOF/TOF analysis, and each protein was identified in MASCOT software (Suppl. Table I). Seven proteins among 20 bands were identified, and these were YB-1, DDX1, phenylalaninyl-tRNA synthetase α and β subunits, amylo-1,6-glucosidase, and several small and large ribosomal subunits. YB-1 is a multifunctional RNA/DNA binding protein and has a role in transcriptional and posttranscriptional RNA metabolism, including splicing (Stickeler et al., 2001; Rapp et al., 2002; Kohno et al., 2003; Raffetseder et al., 2003; Allemand et al., 2007). DDX1 is part of the DEAD box RNA helicase family (Cordin et al., 2006). From all of the proteins identified, we focused our attention on the two proteins known to be involved in mRNA metabolism.

Interactions Between MBNL1 and YB1 or DDX1

To confirm the interaction between MBNL1 and YB-1 or DDX1, we performed a pull-down assay. Forty-eight hours after transfection with YB-1-V5 or DDX1-V5, each COS-7 lysate was mixed with GST-MBNL1₄₀-6xHis bound to glutathione Sepharose. After 4 hr, the beads were washed thoroughly and boiled in SDS sample buffer. The binding of these proteins was confirmed (Fig. 2A). As negative controls, RNA binding proteins HuR and calreticulin were shown not to bind MBNL1 (data not shown). Next, immunoprecipitation (IP) assays were performed against MBNL1-myc and YB-1-V5 expressed in COS-7 (Fig. 2B). MBNL1-myc

4 Onishi et al.

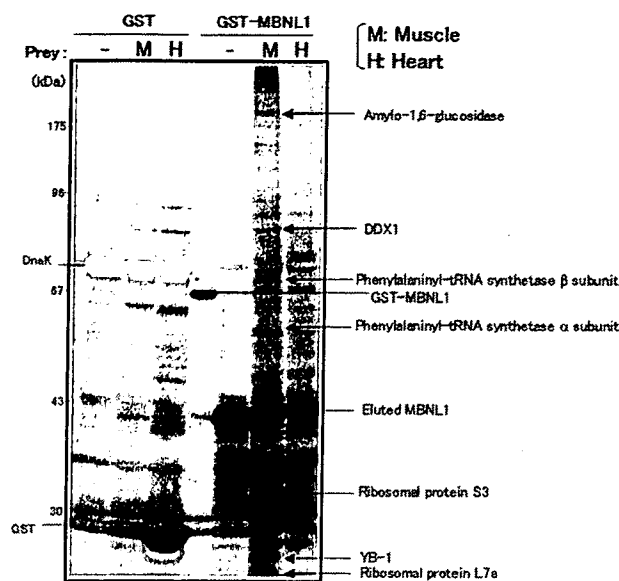


Fig. 1. GST pull-down assay with MBNL1₄₀. Identification of MBNL1₄₀-interacting proteins by pull-down assay and mass spectrometry. GST-MBNL1₄₀-6xHis (20 μg) or GST-6xHis (20 μg) was incubated for 16 hr with 2 g mouse muscle (M) or heart (H) lysate. The MBNL1 complex was eluted by thrombin cleavage. Twenty bands that were reproducibly observed in the GST-MBNL1₄₀-6xHis pull-down with muscle were subjected to MALDI-TOF/TOF analysis and identified as indicated. Accession Nos. are as follows: amylo-1,6-glucosidase, XM_131166.8; DEAD (Asp-Glu-Ala-Asp) Box polypeptide 1, NM_134040.1; phenylalanyl-tRNA synthetase α subunit, NM_011811.3; phenylalanyl-tRNA synthetase β subunit, NM_025648.2; ribosomal protein S3, NM_012052.2; Y-box transcription factor, NM_011732; and ribosomal protein L7a, NM_013721.3.

was specifically coimmunoprecipitated with YB-1-V5 by anti-V5 antibody. Because these associations diminished when the lysates were pretreated with RNase A (Fig. 2B), it was suggested that these proteins are assembled into RNP on an RNA scaffold.

AQ1 AQ1 α-Actinin Minigene Splicing Assay

Previously, YB-1 was shown to interact with MeCP2 through RNA and to mediate the alternative splicing of CD44 (Young et al., 2005). To investigate the functional interaction between MBNL1 and YB-1, we tested the splicing activity of YB-1 on one of the targets of MBNL1, the α-actinin minigene (Vicente et al., 2007). HEK293 cells were transfected with the minigene and each effector protein plasmid. RT-PCR analysis showed that YB-1 promoted exon skipping, as did MBNL1, although the response was weaker (Fig. 3). It suggests that MBNL1 and YB-1 may cooperate in the alternative splicing of α-actinin. The effect of DDX1 was not significant. We also determined the splicing activity of YB-1 and DDX1 on Clcn1 minigene, but no significant change was observed (data not shown).

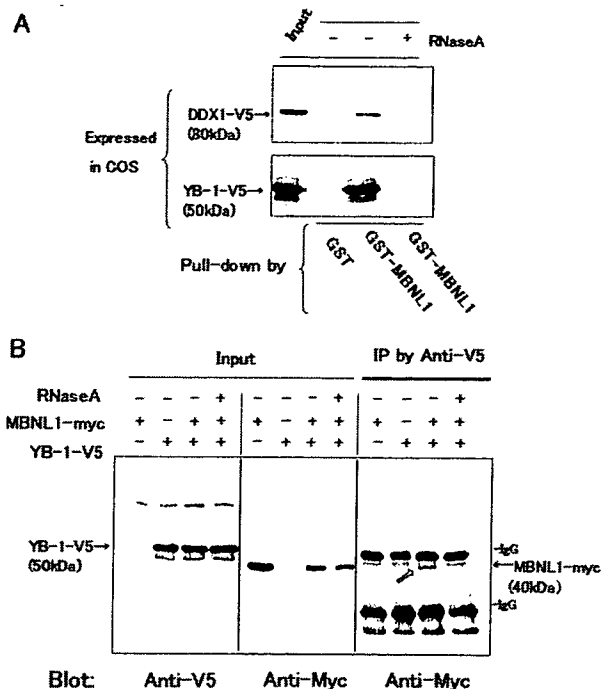


Fig. 2. Interactions of MBNL1 with YB1 or DDX1. A: Pull-down assays were performed with GST-MBNL1₄₀-6xHis as bait. In the upper panel, transiently expressed DDX1- or YB-1-V5 was pulled-down by GST-MBNL1₄₀-6xHis. Binding was diminished by the addition of RNase A. B: Immunoprecipitation (IP) was performed using COS-7 cells transiently transfected with MBNL1₄₀-myc and YB-1-V5. As indicated by an arrow, MBNL1-myc was present in the YB-1-V5 complex precipitated by anti-V5 antibody. When an RNase A-containing lysis buffer was used, the MBNL1 band was diminished.

Colocalization of MBNL1, YB-1, DDX1, and TIA-1 in HeLa Cells

Although YB-1 affected the splicing of α-actinin, the effect was weak. Combining this with the fact that some ribosomal proteins were identified as MBNL1-binding proteins (Fig. 1), we speculate that the interaction between MBNL1 and YB-1 occurs in the cytoplasm rather than in the nucleus. YB-1 is one of the components of mRNA processing bodies (P-bodies) and stress granules (SGs; Goodier et al., 2007; Yang and Bloch, 2007). Considering that MBNL1 also functions in mRNA metabolism in the cytoplasm, we investigated the localization of GFP-MBNL1 or MBNL1-myc, YB-1-V5, and DDX1-V5 in HeLa cells (Fig. 4). Under normal conditions, MBNL1 and DDX1 localized mainly to the nucleus. On the other hand, nuclear localization of YB-1 was weak. When HeLa cells were subjected to arsenite stress, MBNL1 and YB-1 or DDX1 strongly colocalized to SGs (Fig. 4A,B). CFP-tagged TIA-1, a SGs marker, also colocalized with MBNL1 in SGs (Fig. 4C).