

## Identification of *Caenorhabditis elegans* K02H8.1 (CeMBL), a Functional Ortholog of Mammalian MBNL Proteins

Noboru Sasagawa,<sup>1,2\*</sup> Eriko Ohno,<sup>1</sup> Yoshihiro Kino,<sup>1,3</sup> Yuichiro Watanabe,<sup>1</sup> and Shoichi Ishiura<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Department of Life Sciences, Graduate School of Arts and Sciences, University of Tokyo, Tokyo, Japan

<sup>2</sup>Center for Structuring Life Sciences, Graduate School of Arts and Sciences, University of Tokyo, Tokyo, Japan

<sup>3</sup>Laboratory of Structural Neuropathology, Brain Science Institute, RIKEN, Saitama, Japan

The genome of the nematode *Caenorhabditis elegans* possesses an orthologous sequence to the *Drosophila muscleblind* (*mbf*) and mammalian *muscleblind-like* genes (*MBNLs*). This ortholog, K02H8.1, which has a high degree of homology (about 50%) to human *MBNLs*, encodes two zinc finger domains, as does the sequence of the *Drosophila mbl* gene. This distinguishes it from human *MBNLs*, which encode four zinc finger domains. In this study, we cloned six major isoforms of K02H8.1 using cDNA generated from *C. elegans* total RNA. All six of the cloned isoforms had an SL1 leader sequence at the 5'-position. Interestingly, one of the isoforms lacked a zinc finger domain-encoding sequence. To understand better the function of K02H8.1, we performed yeast three-hybrid experiments to characterize the binding of K02H8.1 to bait RNAs. K02H8.1 exhibited strong binding affinity for CUG and CCUG repeats, and the binding affinity was very similar to that of *MBNLs*. In addition, promoter analysis was performed using promoter-green fluorescent protein (GFP) fusion constructs. The expression of GFP driven by the K02H8.1 promoter was absent in muscle; however, significant GFP expression was detected in the neurons around the pharynx. © 2008 Wiley-Liss, Inc.

**Key words:** myotonic dystrophy; MBNL; *Caenorhabditis elegans*; CeMBL; K02H8.1

Myotonic dystrophy (dystrophia myotonica, DM) is an autosomal dominant disorder with an incidence of about five individuals per 100,000. DM is one of the most common muscular dystrophies with multisystemic and variable symptoms. The main symptoms are muscle hypertension, myotonia, muscle weakness, cataracts, mental retardation, insulin resistance, heart disorders, gonadal failure, baldness, immunodeficiency, and insulin abnormalities (Harper, 2001).

Two types of DM (type 1 [DM1] and type 2 [DM2]) have been observed, each of which is associated with a different set of mutations. The mutation responsible for DM1 lies within the DM protein kinase (*DMPK*)

gene, which is located at chromosomal position 19q13.3 (Brook et al., 1992; Mahadevan et al., 1992). *DMPK* contains a CTG triplet repeat in its 3'-noncoding region; an expansion in the number of repeats has been observed in DM1 patients (Mahadevan et al., 1992). The normal number of CTG repeats is between 5 and 50, whereas hundreds to thousands of repeats have been observed in patients with DM1. Increased numbers of repeats are associated with more severe symptoms and an earlier onset of disease (Tsiflidis et al., 1992).

The mutation responsible for DM2 is located in the *ZNF9* gene, which is found at chromosome position 3q21. This mutation consists of an expansion of CCG repeats in intron 1 of *ZNF9*. Patients with DM2 have 75–1,000 (or more) of these repeats, whereas 10–27 repeats are considered normal (Liquori et al., 2001).

An interesting feature of DM is that neither DM1 nor DM2 is the result of mutations in the coding regions of *DMPK* or *ZNF9*. Instead, the mutations that give rise to DM are in noncoding regions (i.e., 3'-untranslated region and intron). This indicates that the phenotypes associated with DM are not due to the abnormal function of the translated gene product but are due to the presence of expanded CUG or CCUG repeats within the transcript. There is evidence that the production of a transcript containing an expanded CUG or CCUG repeat is the molecular basis of DM1 and DM2, and this evidence is based on the interaction of repeat sequences with the protein CUG-BP1 and *MBNLs*. CUG-BP1 (originally named *CUG triplet-binding protein*) was first

The first two authors contributed equally to this work.

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

\*Correspondence to: Noboru Sasagawa, Department of Life Sciences, Graduate School of Arts and Sciences, University of Tokyo, Tokyo 153-8902, Japan. E-mail: sasagawa@esls.c.u-tokyo.ac.jp

Received 27 June 2008; Revised 17 August 2008; Accepted 24 September 2008

Published online 19 November 2008 in Wiley InterScience (www.interscience.wiley.com). DOI: 10.1002/jnr.21942

reported to bind the CUG repeat sequence in RNA (Timchenko et al., 1996; Begemann et al., 1997). However, recent evidence suggests that CUG-BP1 does not in fact bind to CUG repeats but instead to a UG dinucleotide repeat (Takahashi et al., 2000; Kino et al., 2004; Mori et al., 2008). Muscleblind-like 1 (MBNL1) was first identified as a CUG repeat-binding protein in UV cross-linking experiments. Muscleblind-like proteins (MBNLs) colocalize with CUG or CCUG repeat foci in the cells of DM1 and DM2 patients (Miller et al., 2000). MBNL1 plays an important role in the splicing of cardiac troponin T (*cTNT*; Ho et al., 2004) and insulin receptor (*IR*; Savkur et al., 2001). The aberrant splicing of genes such as those encoding muscle-specific chloride channel (*Clcn1*; Charlet-B et al., 2002) and *IR* has been observed in DM patients, as has the increased expression of CUG-BP1 (Savkur et al., 2001). *Mbnl1* overexpression rescues the disease-associated phenotypes in CUG repeat-overexpressing mice (Kanadia et al., 2006). We previously showed that the level of transcription of CUG-BP1 in DM patients was equal to that in non-DM controls by using real-time PCR (Nezu et al., 2007). This indicates that the increased expression of CUG-BP1 is a posttranscriptional event.

Studies on the localization of MBNLs have found that they colocalize with repeat RNA foci in fibroblasts from DM1 and DM2 patients (Fardaei et al., 2002). Such foci have also been observed at neuromuscular junctions in DM1 patients (Wheeler et al., 2007). MBNL1, MBNL2, and MBNL3 have all been observed in nuclear foci. Although these foci and splicing abnormalities are thought to be independent (Ho et al., 2005a), MBNL could play an important role in DM pathogenesis. In addition, MBNL1 actually binds to the intron of *cTNT* (Yuan et al., 2007).

The overexpression of an expanded CUG repeat in *Drosophila* results in developmental abnormalities of the eye; however, the expression levels of CUG-BP1 and MBNLs affect the phenotype induced by CUG expansion (de Haro et al., 2006). A possible explanation for this is that MBNL1 and CUG-BP function together in splicing and RNA processing. CUG-BP1 transgenic mice show splicing abnormalities in genes such as those encoding *cTNT*, myotubularin-related 1, and *Clcn1* (Ho et al., 2005b). MBNL1 knockout mice exhibit cataracts and muscular abnormalities (Kanadia et al., 2003a), similar to DM patients. Moreover, the mice show abnormal splicing of *cTNT*, *Clcn1*, and *TNNT3*. Taken together, these results indicate that the abnormal splicing of these genes is due to a loss of function of MBNL1 or the overexpression of CUG-BP1. Recently, the involvement of MBNL1 in stress granules was reported (Onishi et al., 2008).

As a model organism, *Caenorhabditis elegans* has many advantages. One major challenge we faced in this work was to establish *C. elegans* as a model for studying the molecular basis of DM. In *C. elegans*, the K02H8.1 gene (a predicted ortholog of human MBNLs) is located on the X chromosome. We cloned *C. elegans* K02H8.1

and functionally identified it as *C. elegans* muscleblind (*CeMBL*).

## MATERIALS AND METHODS

### Breeding of *C. elegans*

*C. elegans* strain N2 was used in this study. The deletion mutant Tm1563 was kindly provided by Dr. S. Mitani (Tokyo Women's Medical University, Tokyo, Japan). Nematode growth medium (NGM)-containing plates and *E. coli* strain OP50 were used to breed the nematodes as previously described (Brenner, 1974).

### cDNA Cloning

Nematodes contained in a 6-cm dish were washed with M9 buffer and collected into microfuge tubes. They were then centrifuged, and the supernatant was removed. RNA was extracted using Trizol (Gibco BRL, Grand Island, NY) or Isogen (Nippongene) according to the manufacturers' instructions. Reverse transcription reactions to generate cDNA were carried out with Superscript II (Invitrogen, La Jolla, CA) with 250 ng of total RNA and 250 ng of oligo(dT).

The synthesized cDNA was used as the template for PCR. mRNA molecules in *C. elegans* have an SL1 or SL2 leader sequence at their 5'-end, so SL1 (5'-GGTTTAAT TACCCAAGTTTGGAG-3') or SL2 (5'-GGTTTAAACC CAGTTACTCAAG-3') was used as the forward primer. For the reverse primer, we designed two sequences for nested PCR. 5'-ATTATGAGAGAGAGAGAGGAATGTGTGT-3' (nest1) and 5'-CTAGAATGGTGGTGGCTGCATGTAC TCAC-3' (nest2). The products were ligated into pGEM-T Easy. The Beckman CEQ-8000 system was used to sequence the cloned inserts. To study the expression pattern of each K02H8.1 isoform during development, we first amplified the DNA using primers SL1 and nest1 and then performed a second round of PCR using an exon 3-specific primer (5'-ATGTTTCGACGAAAACAGTAATGCCGCTGG-3') and nest2. Each product was confirmed by sequencing.

### Yeast Three-Hybrid System

The budding yeast *Saccharomyces cerevisiae* L40-coat strain and the vector pIII/MS2-2 were kind gifts from Dr. M. Wickens (University of Wisconsin). The prey vector used was pACT2 AD (Clontech, Logan, UT). Standard two-hybrid protocols were used for the transformation and maintenance of the yeast. Constructs with repeat regions of various lengths were cloned into pIII/MS2-2. K02H8.1s (*CeMBL*s) was cloned into pACT2 AD. The constructs were then transformed into *S. cerevisiae* L40-coat strain and grown on synthetic dextrose (SD) plates without leucine and uracil. For the histidine plate assay, SD plates without leucine, uracil, and histidine were used. For the histidine assay, 0, 0.1, 0.5, or 1.0 mM 3-amino-1,2,4-triazole (3-AT), which is a competitive inhibitor of histidine synthesis, was added to the plates. For the quantitative  $\beta$ -galactosidase assay, chlorophenol red  $\beta$ -D-galactopyranoside (CPRG) was used as the substrate. To construct a deletion mutant of *CeMBL*, we used the following primers: 5'-ATGTTTCGACGAAAACAGTAATGCCGCTG

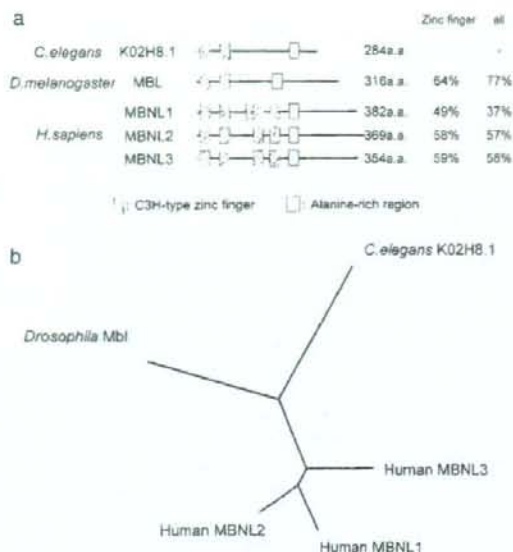


Fig. 1. Sequence similarity among the *C. elegans* K02H8.1, *Drosophila* muscleblind, and human muscleblind-like protein families. **a**: Hatched boxes denote C3H-type zinc finger domains; open boxes denote alanine-rich elements. The sequence homology scores of the C3H-type zinc finger domains and full-length proteins are shown. **b**: Phylogenetic tree for the human MBNL1-3, *Drosophila* muscleblind, and *C. elegans* K02H8.1 proteins created with ClustalX software.

G-3' (forward) and 5'-CTCGAGCATTGGAGTTCAGTC TGATTAAG-3' (reverse).

#### Life Span Analysis

N2 and Tm1563 nematodes were cultured in 6-cm NGM plates with *Escherichia coli* OP50. We used an adult nematode that laid eggs overnight and then removed the adult from the plate in the morning. We defined time zero as the point at which the eggs hatched. Eggs and L1-3 larvae were grown at 15°C and then transferred to 25°C at the L4 and adult stages.

#### Promoter Analysis Based on GFP Expression

The promoter region of the gene was cloned from the wild-type *C. elegans* genome by PCR using the following primers: forward, 5'-AACTGCAGGTGCAATGGGCTACT GATCTCC-3' and reverse, 5'-CGGGATCCCATTCCGT CACTTGCAAAGAAC-3'. Each primer contained an additional PstI and BamHI site, respectively. The resulting fragment was ligated into pPD95.75 (kindly provided by Dr. A. Fire, Stanford School of Medicine) using the PstI and BamHI sites. The resulting plasmid, K02H8.1::GFP, was mixed with pRF4, which contains the marker *rol-6* (su1006). The ratio of K02H8.1::GFP to pRF4 in the mixed solution was between 1:1 and 1:4. All twisted F1 transformants were

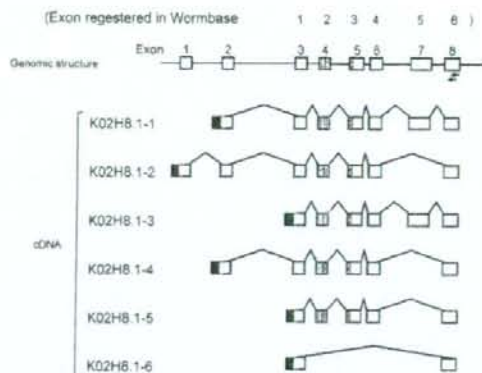


Fig. 2. Cloning of K02H8.1 from cDNA. Open boxes indicate exons; hatched boxes indicate C3H-type zinc finger domains; solid boxes indicate the SL1 leader sequences. Arrowheads in the genomic structure represent the reverse primers used for nested PCR. Six major isoforms of K02H8.1 were identified, including new exons that were not registered in Wormbase. These exons were named *exon 1* and *exon 2*, and the remaining exons were renumbered to reflect this.

collected, and the F3 or later transformants were analyzed by fluorescence microscopy (IX70; Olympus).

## RESULTS

### Cloning of K02H8.1

K02H8.1 (NCBI accession No. NM078345; Wormbase WBGene00019347) was identified through an in silico search of databases to find a gene with a high degree of homology to human MBNLs. K02H8.1, which is located on chromosome X of the *C. elegans* genome, has a high level of homology to the *Drosophila mbl* gene (77%) and human MBNLs (37-58%) on the amino acid level (Fig. 1a). There are three MBNL loci in the human genome, but only one locus with significant sequence similarity was found in the *C. elegans* genome. Figure 1b shows a phylogenetic tree for human MBNL1-3, *Drosophila* Mbl, and *C. elegans* K02H8.1 proteins. As shown, MBNL3 has the highest similarity to K02H8.1 among the human MBNL1-3 proteins. MBNL3 may be the ancestral gene for all human MBNLs. It is interesting that both MBNL3 and K02H8.1 are located on the X chromosome, whereas *Drosophila mbl* is located on chromosome 2, human MBNL1 is located on chromosome 3, and MBNL2 is located on chromosome 13. After the identification of sequences with a high level of similarity to *Drosophila mbl* and human MBNLs, we cloned K02H8.1 from *C. elegans* cDNA by PCR using the primers SL1 or SL2 (forward) and a K02H8.1-specific primer (reverse). Using SL1 as the forward primer, six major isoforms of K02H8.1 (Fig. 2) were amplified, whereas using SL2 as the forward primer resulted in no PCR products. This

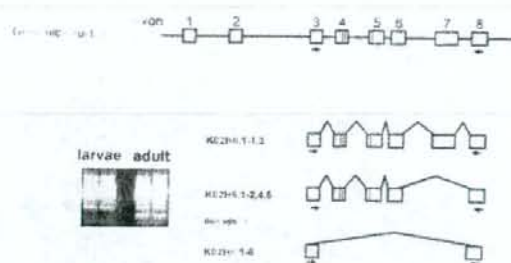


Fig. 3. Expression pattern of K02H8.1 at different developmental stages, showing our nested PCR results (see Materials and Methods). The primers used in the second round of PCR are indicated by arrowheads. K02H8.1-3 and -5 appear in the same band, and K02H8.1-2, -4, and -5 appear in the same band. The K02H8.1-6 product can be seen in the adult sample but not in the larval sample.

indicates that the SL1 leader sequence is added to all K02H8.1 transcripts. In *C. elegans*, many genes are transcribed as a single polycistronic RNA that is subsequently processed, giving rise to multiple mRNAs. The SL1 leader sequence is added to the first of these mRNAs, whereas the SL2 sequence is added to the second and all subsequent mRNAs. Therefore, our result indicates that the expression of each K02H8.1 isoform is regulated by its own upstream promoter.

The six isoforms of K02H8.1 were named K02H8.1-1 to K02H8.1-6. The expression of each isoform of K02H8.1 was analyzed by RT-PCR, and the results show a significant change in the expression of these splicing isoforms during development. No fragment for K02H8.1-6 was observed on a plate containing L1-4 larvae; however, a significant band was obtained from a sample prepared at the adult stage (Fig. 3).

#### Binding Affinity of K02H8.1 for RNA Containing Repeated Sequences

To examine the RNA binding function of K02H8.1, we performed a yeast three-hybrid analysis. An outline of the assay is shown in Figure 4a. We used K02H8.1-3 and K02H8.1-5 as prey and various repeat RNAs as bait. Reporter genes allowing the yeast to survive on plates without histidine are activated only when the bait RNA and prey protein bind. 3-AT, a competitive inhibitor of histidine synthesis, was used to eliminate false positives.

The results of the histidine assay in Figure 4 are summarized in Table I. As shown, the K02H8.1 isoforms containing zinc fingers had a pattern of RNA binding similar to that of human MBNL1, the sequences (CUG)<sub>21</sub> and (CCUG)<sub>22</sub> in particular had higher binding affinities, whereas (CUUG)<sub>38</sub> and (CCCG)<sub>21</sub> also exhibited significant binding. Interestingly, the binding affinity of the longer repeats, which correlate to DM, was similar to that of human MBNL1. In contrast, K02H8.1 (-3 and -5) and MBNL1 had different binding

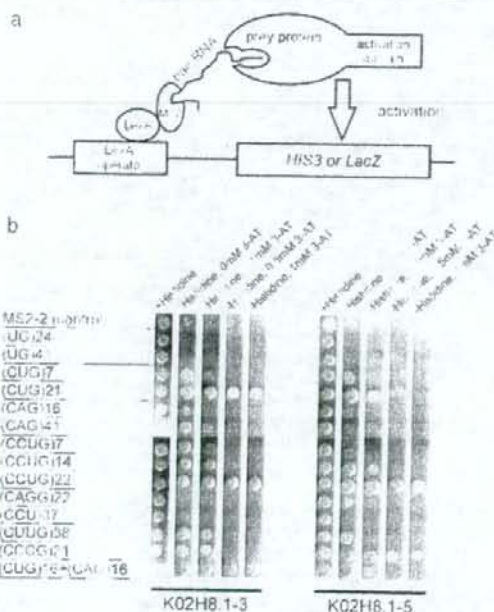


Fig. 4. a: Outline of the yeast three-hybrid approach. K02H8.1 was used as prey, and several RNA repeats were used as bait. The diagram is a modified version of that in SenGupta et al. (1996). b: Results of the yeast three-hybrid histidine assay. Transformants were seeded to test their viability on the selection plates lacking histidine but containing 0, 0.1, 0.5, or 1 mM 3-amino triazole (3-AT).

TABLE I. Summary of the Binding Affinities Between K02H8.1s and Various Repeat RNAs in Our Yeast Three-Hybrid System (Histidine Assay)

	K02H8.1-3	K02H8.1-5	MBNL1
MS2-2 (control)	-	-	-
(UG) <sub>24</sub>	-	-	n.t.
(UG) <sub>41</sub>	-	-	-
(CUG) <sub>7</sub>	-	-	-
(CUG) <sub>21</sub>	++++	+++	+++
(CAG) <sub>16</sub>	++	-	++
(CAG) <sub>41</sub>	++	-	++
(CCUG) <sub>7</sub>	++	-	-
(CCUG) <sub>14</sub>	+++	+++	n.t.
(CCUG) <sub>22</sub>	+++++	+++++	+++++
(CAG) <sub>22</sub>	-	-	-
(CCU) <sub>37</sub>	-	-	-
(CUUG) <sub>38</sub>	+++	+	+++
(CCCG) <sub>21</sub>	+++	++++	++++
(CUG) <sub>16</sub> + (CAG) <sub>16</sub>	++++	++	-

\*The viability of the transformants was classified as follows: +++++, +++++, +++, and ++ were viable in the presence of 1.0, 0.5, 0.1 and 0 mM 3-AT, respectively; + indicates growth in the absence of 3-AT (0 mM) after more than 1 week; - indicates no viability in the presence of 0 mM 3-AT. False positives in MS2-2 (control) were taken into account to estimate the relative viabilities. The survival rates for MBNL1 are taken from Kino et al. (2003). n.t.: Not tested.

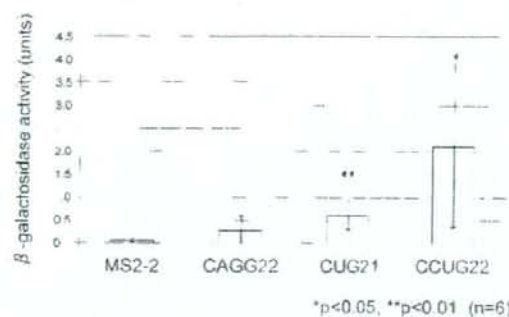


Fig. 5. Yeast three-hybrid system and  $\beta$ -galactosidase assay (K02H8.1-5). Yeast transformants were incubated in synthetic liquid medium, and the cells were harvested by centrifugation. The formation of a colored product was assessed based on the absorbance.  $\beta$ -Galactosidase activity [in units (U)] was calculated as follows:  $U = 1,000 \times OD_{578} / (t \times V \times OD_{600})$ , where  $t$  = incubation time and  $V$  = reaction volume.

affinities for the sequences (CAG)<sub>10</sub> and (CUG)<sub>10</sub> + (CAG)<sub>16</sub> (double-stranded), indicating that K02H8.1 does not exactly match the binding specificity of human MBNL1. Moreover, K02H8.1-3 and K02H8.1-5 showed slightly different binding preferences for (CAG)<sub>41</sub>, (CUUG)<sub>58</sub>, and (CCUG)<sub>7</sub>. In particular, K02H8.1-3 had an affinity for (CAG)<sub>41</sub>, whereas K02H8.1-5 did not.

To quantitate the binding affinities of the K02H8.1 proteins for the bait RNAs,  $\beta$ -galactosidase assays were performed (K02H8.1-5). As shown by our results, the repeat sequences (CUG)<sub>21</sub> and (CCUG)<sub>22</sub> had significant binding affinities compared with the negative controls ( $P < 0.05$ ; Fig. 5). These data clearly show that K02H8.1 has both functional and structural similarity to human MBNLs. Therefore, we determined that K02H8.1 is an ortholog of human MBNLs and renamed it *C. elegans muscleblind* (*CeMBL*). The isoforms of K02H8.1 (-1 to -6) were renamed *CeMBL*-1 to -6.

The next question was whether the RNA-binding motif of *CeMBL* is required for RNA binding. An analysis of the *CeMBL*-6 isoform, a splicing variant lacking the zinc finger RNA-binding motif, suggested that the motif is required. *CeMBL*-6 did not bind RNAs containing a CCUG repeat in our yeast three-hybrid system. In addition, a deletion mutant lacking the C-terminus (i.e., possessing only the N-terminal domain and RNA-binding motif) showed significant binding affinity for CCUG repeats. However, this affinity was weaker than that of *CeMBL*-3 and -5, especially for shorter CCUG repeats, such as (CCUG)<sub>14</sub>. These results indicate that C3H-type zinc finger domains are necessary for *CeMBL* RNA binding activity (Fig. 6, Table II).

#### Analysis of a *CeMBL* Mutant

The *CeMBL* mutant Tm1563 has a deletion in exon 3 and in the introns around exon 3. The deletion



Fig. 6. Yeast three-hybrid assay of *CeMBL*-3, -5, and -6 and the *CeMBL* deletion mutant (del). Transformants were seeded to test their viability on the selection plates as described for Figure 4b.

TABLE II. Binding Affinities of *CeMBL*s and a *CeMBL* Deletion Mutant for RNAs Containing CCUG Repeats in Our Yeast Three-Hybrid System (Histidine Assay)

	<i>CeMBL</i> -3 (K02H8.1-3)	<i>CeMBL</i> -5 (K02H8.1-5)	<i>CeMBL</i> -6 (K02H8.1-6)	del
MS2-2 (control)	-	-	-	-
(CCUG) <sub>7</sub>	++	++	-	-
(CCUG) <sub>14</sub>	+++	+++	-	-
(CCUG) <sub>22</sub>	+++++	+++++	-	+++++

The viability of the transformants was assessed as in Table I.

of these regions was confirmed by sequencing of the PCR-amplified *CeMBL* region from the Tm1563 genome. Our sequence data showed a 513-bp deletion and a 2-bp insertion around exon 1 in *CeMBL*. These mutations cause a frameshift at exon 2, resulting in a lack of RNA-binding motifs within the *CeMBL* protein.

The Tm1563 mutant did not appear to have abnormal development or behavior; however, it did have a shorter life span (Fig. 7):  $14.2 \pm 0.77$  days ( $n = 20$ ) compared with  $18.5 \pm 1.40$  days ( $n = 16$ ) for the wild type.

#### Promoter Analysis of *CeMBL*

To determine the expression pattern of *CeMBL*, a genomic clone containing the 2.4-kb region upstream of *CeMBL* exon 1, an intermediate intron, and part of exon 2 was used. A fusion construct was made using the *CeMBL* fragment from this clone and pTD95.77; the resulting plasmid had an in-frame fusion of *CeMBL* exon 2 and GFP. This fusion construct was then injected into nematodes harboring the *rol-6* marker.

Analysis of GFP expression in the nematodes showed fluorescence in the excretory cell, seminal vesicle, and nerve cells that run parallel to the pharynx and body axis (Fig. 8). GFP expression was observed at all developmental stages, including egg, L1-L4, and adult,

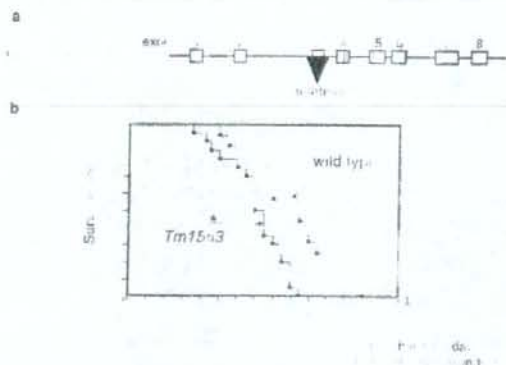


Fig. 7 Life span analysis of a *CeMBL* mutant. **a**: Diagram of the structure of *CeMBL* in Tm1563. **b**: The survival rates for Tm1563 and wild-type strain N2 are plotted.

suggesting that *CeMBL* expression occurs during the early stages of development.

### DISCUSSION

Our results clearly show that K02H8.1 (*CeMBL*) is a functional ortholog of *Drosophila mbl* and human MBNLs. The *Drosophila mbl* mutant was first identified from its dysfunctional eye development. A recent report showed that *mbl* has several splicing isoforms that are involved in the alternative splicing of  $\alpha$ -actinin (Vicente et al., 2007). Several splicing isoforms of MBNLs have been reported in humans (Miller et al., 2000). In our experiments, we found several splicing isoforms of *CeMBL* in *C. elegans*. One of these isoforms, K02H8.1-6 (*CeMBL*-6), was of particular interest, because as we saw no expression in larvae but significant expression in adults (Fig. 3). K02H8.1-6 (*CeMBL*-6) does not have a zinc finger domain, suggesting that it does not bind RNA. Human MBNLs also have an isoform that lacks a zinc finger, but the physiological function of this isoform is unknown.

A major challenge in this work was the identification of K02H8.1 as a functional ortholog of human MBNLs. The results of our yeast three-hybrid experiments suggested that the binding affinity of K02H8.1 for RNA containing repeat sequences is comparable to that of human MBNLs, indicating that K02H8.1 is orthologous to human MBNLs. In these experiments, we observed that K02H8.1 (*CeMBL*) bound CUG, CUUG, CCCG, and (especially) CCUG repeats (Fig. 4, Table I), which are also known to be target sequences for human MBNLs. Interestingly, the *CeMBL* protein possesses only two zinc fingers compared with the four zinc fingers found in human MBNLs, yet these proteins have similar binding specificities for sequences containing repeats. This suggests that the binding preference of *CeMBL*-family proteins for RNA molecules containing repeat sequences is not determined by the number of

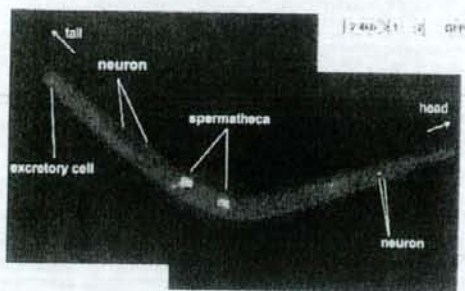


Fig. 8. Promoter analysis of *CeMBL*. GFP expression was observed in the excretory cell, seminal vesicle, and nerve cells that run parallel to the pharynx and body axis.

zinc fingers within the protein; however, variation in the number of zinc fingers may explain the small differences in affinity of human MBNLs and *CeMBL* for certain sequences, such as (CUG)<sub>16</sub> + (CAG)<sub>16</sub>. Actually, MBNLs bind the intron of *tTNT*, and the binding sequence has been determined (Warf and Berglund, 2007). One interesting finding is that splicing abnormalities can be overcome by the overexpression of MBNLs, and increases in MBNL expression have been shown to restore a normal splicing pattern (Kanadia et al., 2006).

Significant binding was observed between *CeMBL*-3 and the (CAG)<sub>41</sub> repeat, similarly to human MBNL1. Human MBNL1 forms nuclear foci with both CTG and CAG repeats (Ho et al., 2005a). Although the coexpression of MBNL1 with a long CAG repeat does not affect the splicing of *tTNT* or *IR* (Ho et al., 2005a), the binding affinities of *CeMBL* and MBNL1 for CAG repeats may have important physiological consequences.

Moreover, binding to the (CAG)<sub>41</sub> repeat occurred only with *CeMBL*-3, and not *CeMBL*-5. The only difference between *CeMBL*-3 and -5 is an insertion of exon 7. Thus, exon 7, which is located at the C-terminus, may regulate the binding preference of *CeMBL*. The altered binding affinity of the deletion mutant for molecules containing a CCUG repeat (Fig. 6, Table II) supports the idea that the C-terminal domain (exons 6–8) regulates the RNA binding preferences of *CeMBL*.

As part of this work, we investigated the *CeMBL* mutant Tm1563. Tm1563 has a mutation in exon 3 of *CeMBL*, upstream of the RNA-binding motif. The result of this mutation is a *CeMBL* protein that lacks the ability to bind RNA. An analysis of the phenotype of this mutant showed that it had a reduced life span compared with wild-type *C. elegans* (Fig. 7), a finding that is supported by RNAi experiments (Wang et al., 2008) showing that the inhibition of *CeMBL* expression also resulted in a shorter life span in *C. elegans*.

The mechanism by which the inactivation of *CeMBL* leads to a reduced life span is currently unknown. One possible explanation is the effect on the level of oxidative stress, which is an important factor in

aging. Oxidative stress results in damage to DNA, proteins, and fatty acids. We previously reported that the expression of a longer CTG repeat sequence in cultured C2C12 mouse cells increased cellular sensitivity to oxidative stress (Takeshita et al., 2003). Therefore, the shorter life span of *C. elegans* with inactivated *CeMBL* may be due to splicing abnormalities in certain genes involved in oxidative stress.

Previous experiments indicated that the mRNA expression of MBNLs and CELF was similar in DM patients and non-DM controls (Nezu et al., 2007). This indicates that MBNL function might be controlled at the protein level. The shorter life span associated with the inactivation of *CeMBL* is significant, especially in comparison with the phenotype of MBNL knockout mice, which exhibit DM symptoms and splicing abnormalities. Nevertheless, additional biochemical studies are needed to investigate the role of *CeMBL* in determining life span.

We also analyzed the location of *CeMBL* expression by comparing tissues in which MBNLs and Mbl are expressed. Human MBNL1 was expressed mainly in skeletal muscle, heart, brain, intestine, kidney, liver, lung, and placenta. The tissues in which MBNL2 was expressed were largely the same, although the level of expression in skeletal muscle was not as high. MBNL3 expression occurs mainly in the placenta, but is also seen at very low levels in the heart, liver, kidney, and intestine (Kanadia et al., 2003b). MBNL3 (also known as CHCR) inhibits myogenic differentiation (Squillace et al., 2002; Lee et al., 2008). Moreover, the expression of MBNL decreases over the course of differentiation (Lee et al., 2007). In *Drosophila*, Mbl expression has been reported in the eye, central nervous system, and most muscle types, in accordance with the fact that the disruption of *Drosophila mbl* leads to changes in photoreceptor differentiation (Begemann et al., 1997). To analyze the location of *CeMBL* expression in *C. elegans*, we used the DNA sequence upstream of *CeMBL* fused to GFP. In these experiments, GFP fluorescence was seen in the excretory cell, in the seminal vesicle, and in the nerve cells that run parallel to the pharynx and body axis. No GFP fluorescence was seen in muscle tissue (Fig. 8).

Analysis of the expression of *CeMBL* in neurons showed comparable levels in *C. elegans*, *Drosophila*, and human, whereas expression was absent in muscle, unlike the case in *Drosophila* and human. There are several explanations for the lack of expression in muscle in *C. elegans*. One is that *CeMBL* has six splicing variants, and it is possible that each of these isoforms has a unique expression pattern. There is a large intron between exons 2 and 3 (~12 kb) in the *CeMBL* genomic structure, which may contain a *cis* element that affects the expression of the gene. Another is that in silico analysis indicated putative promoter elements in the 3-kb region upstream of exon 3 (i.e., in the 12-kb intron; data not shown). Therefore, it is possible that the expression of *CeMBL* is regulated by multiple promoter sequences.

In conclusion, our study clearly indicates that *CeMBL* has remarkable similarities to MBNL, not only in terms of its structure but also in terms of its RNA-binding capacity. The physiological functions of *CeMBL* and MBNL, including RNA splicing, may be highly conserved between species.

#### ACKNOWLEDGMENTS

We thank Prof. Marvin Wickens for providing the yeast three-hybrid samples, Prof. Shohei Mitani for providing Tm1563, Prof. Andrew Fire for providing vectors, and Prof. Yuichi Iino for helpful advice concerning *C. elegans*.

#### REFERENCES

- Begemann G, Paricio N, Artero R, Kiss I, Prez-Alonso M, Mlodzik M. 1997. *muscleblind*, a gene required for photoreceptor differentiation in *Drosophila*, encodes novel nuclear Cys3His-type zinc-finger-containing proteins. *Development* 124:4321-4331.
- Brenner S. 1974. The genetics of *Caenorhabditis elegans*. *Genetics* 77: 71-94.
- Brook JD, McCumach ME, Harley HG, Buckler AJ, Church D, Aburatani H, Hunter K, Stanton VP, Thirion JP, Hudson T, Sohn R, Zemelman B, Snell R.G, Flundie SA, Crow S, Davies J, Shelbourne P, Buxton J, Jones C, Juvenon V, Johnson K, Harper PS, Shaw DJ, Housman DE. 1992. Molecular basis of myotonic dystrophy expansion of a trinucleotide (CTG) repeat at the 3' end of a transcript encoding a protein kinase family member. *Cell* 68:799-808.
- Charlet-B N, Savkur RS, Singh G, Philips AV, Grice EA, Cooper TA. 2002. Loss of the muscle-specific chloride channel in type 1 myotonic dystrophy due to misregulated alternative splicing. *Cell* 10:45-53.
- de Haro M, Al-Ramahi I, De Gouyon B, Ukanli I, Rosa A, Faustino NA, Ashizawa T, Cooper TA, Botas J. 2006. MBNL1 and CUGBP1 modify expanded CUG-induced toxicity in a *Drosophila* model of myotonic dystrophy type 1. *Hum Mol Genet* 15:2138-2145.
- Fardaei M, Rogers MT, Thorpe HM, Larkin K, Hamshere MG, Harper PS, Brook JD. 2002. Three proteins, MBNL, MBLL and MBXL, colocalize in vivo with nuclear foci of expanded-repeat transcripts in DM1 and DM2 cells. *Hum Mol Genet* 11:805-814.
- Harper PS. 2001. *Myotonic dystrophy*, 3rd ed. Philadelphia: W.B. Saunders.
- Ho TH, Charlet-B N, Poulos MG, Singh G, Swanson MS, Cooper TA. 2004. Muscleblind proteins regulate alternative splicing. *EMBO J* 23:3103-3112.
- Ho TH, Savkur RS, Poulos MG, Mancini MA, Swanson MS, Cooper TA. 2005a. Colocalization of *muscleblind* with RNA foci is separable from mis-regulation of alternative splicing in myotonic dystrophy. *J Cell Sci* 118:2923-2933.
- Ho TH, Bundman D, Armstrong DL, Cooper TA. 2005b. Transgenic mice expressing CUG-BP1 reproduce splicing mis-regulation observed in myotonic dystrophy. *Hum Mol Genet* 14:1539-1547.
- Kanadia RN, Johnstone KA, Mankodi A, Lungu C, Thornton CA, Esson D, Timmers AM, Hauswirth WW, Swanson MS. 2003a. A *muscleblind* knockout model for myotonic dystrophy. *Science* 302:1978-1980.
- Kanadia RN, Urbinati CR, Crusselle VJ, Luo D, Lee YJ, Harrison JK, Oh SP, Swanson MS. 2003b. Developmental expression of mouse *muscleblind* genes *Mbnl1*, *Mbnl2* and *Mbnl3*. *Gene Express Patterns* 3:459-462.
- Kanadia RN, Shin J, Yuan Y, Beattie SG, Wheeler TM, Thornton CA, Swanson MS. 2006. Reversal of RNA mis-splicing and myotonia after *muscleblind* overexpression in a mouse poly (CUG) model for myotonic dystrophy. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103:11748-11753.

- Kino Y, Mori D, Omi Y, Takeshita Y, Sasagawa N, Ishiura S. 2004. Muscleblind protein, MBNL1/EXP, binds specifically to CHHG repeats. *Hum Mol Genet* 13:495-507.
- Lee KS, Squillace RM, Wang EH. 2007. Expression pattern of muscleblind-like proteins differs in differentiating myoblasts. *Biochem Biophys Res Commun* 361:151-155.
- Lee KS, Smith K, Amieux PS, Wang EH. 2008. MBNL3/CHCR prevents myogenic differentiation by inhibiting MyoD-dependent gene. *Differentiation* 76:299-309.
- Liquori CL, Rieker K, Moseley ML, Jacobsen JF, Kress W, Naylor SL, Day JW, Ranum LP. 2001. Myotonic dystrophy type 2 caused by a CCTG expansion in intron 1 of ZNF9. *Science* 293:864-867.
- Mahadevan M, Tsiflidis C, Sabourin L, Shutler G, Amemiya C, Jansen G, Neville C, Narang M, Barcel J, O'Hoy K, Lebond S, Earle-Macdonald J, de Jong PJ, Wieringa B, Korneluk RG. 1992. Myotonic dystrophy mutation: an unstable CTG repeat in the 3' untranslated region of the gene. *Science* 255:1253-1255.
- Miller JW, Urbanini CR, Teng-Ummuay P, Stenberg MG, Byrne BJ, Thornton CA, Swanson MS. 2000. Recruitment of human muscleblind proteins to (CUG)<sub>n</sub> expansions associated with myotonic dystrophy. *EMBO J* 19:4439-4448.
- Mori D, Sasagawa N, Kino Y, Ishiura S. 2008. Quantitative analysis of CUG-BP1 binding to RNA repeats. *J Biochem* 143:377-383.
- Nezu Y, Kino Y, Sasagawa N, Nishino I, Ishiura S. 2007. Expression of MBNL and CELF mRNAs transcripts in muscles with myotonic dystrophy. *Neuromuscul Disord* 17:306-312.
- Onishi H, Kino Y, Morita T, Futai E, Sasagawa N, Ishiura S. 2008. MBNL1 associates with YB-1 in cytoplasmic stress granules. *J Neurosci Res* 86:1994-2002.
- Savkur RS, Philips AV, Cooper TA. 2001. Aberrant regulation of insulin receptor alternative splicing is associated with insulin resistance in myotonic dystrophy. *Nat Genet* 29:40-47.
- SenGupta DJ, Zhang B, Kraemer B, Pochan P, Fields S, Wickens M. 1996. A three-hybrid system to detect RNA-protein interactions in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93:8496-8501.
- Squillace RM, Chenault DM, Wang EH. 2002. Inhibition of muscle differentiation by the novel muscleblind-related protein CHCR. *Dev Biol* 250:218-230.
- Takahashi N, Sasagawa N, Suzuki K, Ishiura S. 2000. The CUG-binding protein binds specifically to UG dinucleotide repeats in a yeast three-hybrid system. *Biochem Biophys Res Commun* 277:518-523.
- Takeshita Y, Sasagawa N, Usuki F, Ishiura S. 2003. Decreased expression of alpha-B-crystallin in C2C12 cells that express human DMPK/160CTG repeats. *Basic Appl Myol* 13:305-308.
- Timchenko LT, Miller JW, Timchenko NA, DeVore DR, Datar KV, Liu L, Roberts R, Caskey CT, Swanson MS. 1996. Identification of a (CUG)<sub>n</sub> triplet repeat RNA-binding protein and its expression in myotonic dystrophy. *Nucleic Acids Res* 24:4407-4414.
- Tsilfidis C, MacKenzie AE, Mentler G, Barcel J, Korneluk RG. 1992. Correlation between CTG trinucleotide repeat length and frequency of severe congenital myotonic dystrophy. *Nat Genet* 1:192-195.
- Vicente M, Moulferrer L, Poulos MG, Houseley J, Monckton DG, O'Dell KM, Swanson MS, Artero RD. 2007. Muscleblind isoforms are functionally distinct and regulate alpha-actinin splicing. *Differentiation* 75:427-440.
- Wang LC, Hung WT, Pan H, Chen KY, Wu YC, Liu YF, Hsiao KM. 2008. Growth-dependent effect of muscleblind knockdown on *Caenorhabditis elegans*. *Biochem Biophys Res Commun* 366:705-709.
- Warf MB, Berglund JA. 2007. MBNL1 binds similar RNA structures in the CUG repeats of myotonic dystrophy and its pre-mRNA substrate cardiac troponin T RNA. *RNA* 13:2238-2251.
- Wheeler TM, Krym MC, Thornton CA. 2007. Ribonuclear foci at the neuromuscular junction in myotonic dystrophy type 1. *Neuromuscul Disord* 17:242-247.
- Yuan Y, Compton SA, Sobczak K, Stenberg MG, Thornton CA, Griffith JD, Swanson MS. 2007. Muscleblind-like 1 interacts with RNA hairpins in splicing target and pathogenic RNAs. *Nucleic Acids Res* 35:5474-5486.



## 筋強直性ジストロフィー

本症は成人の筋疾患ではもっとも頻度が高く、人口10万人あたり約5人といわれています。筋強直（ミオトニア）とは、収縮した筋肉が、弛緩するときに時間がかかることをいいます。たとえば、手をぐっと握ってパッと開くときに、指が曲がったまままでなかなか伸びません。この筋強直以外に、筋肉の力が弱くなる、白内障になりやすい、ホルモンの異常がくるなど、全身のいろいろな場所が冒されます。症状には幅があって、自分では異常に気づかない人から、車椅子生活になる人まであります。この病気の遺伝子の異常についての研究が進んでいます。治療法の開発が期待されています。



## 筋強直性ジストロフィーの原因と治療戦略

【研究課題】 スプライシングを利用した筋強直性ジストロフィーの治療

石浦章一

東京大学 大学院総合文化研究科 教授

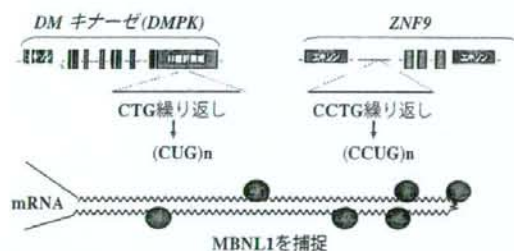


図1 筋強直性ジストロフィー (DM) の原因

■筋強直性ジストロフィー原因は遺伝子が伸びることだった

### 1. 筋強直性ジストロフィー (Dystrophia Myotonica, DM)

筋強直性ジストロフィーは、我が国で一番多い成人型の筋疾患です。症状は、人によってさまざまで、ミオトニアが特徴なのですが、その他に耐糖能の異常、禿頭、精神遅滞、性腺萎縮などが見られます。この病気は遺伝性なのですが、家系の中で発症がだんだん早まる「表現促進現象」が見られます。残念ながら、本症を抜本的に治療する薬はできていませんが、原因がわかったので世界中で標的を絞った治療法の開発が行われています。

### 2. 遺伝子の伸長

本症には遺伝的に異なる2つの型があることが報告されています。DM1型は、第19染色体にあるDMキナーゼ (DMPK) 遺伝子のちょっと後ろにあるCTGの繰り返しの伸長が原因であり、DM2型は第3染色体にあるZNF9遺伝子のイントロン1にあるCCTGという4塩基の伸長が病気を引き起こします(図1)。この2つは、遺伝子とその変異の型がまったく異なるにもかかわらず、臨床症状が似ていることがわかっており、

### 一口メモ MBNL (muscleblind protein)

MBNLはショウジョウバエの筋と眼球の発育分化に関する遺伝子産物です。それによく似た構造を持つものがヒトで見つかりMBNL1,2,3と分類されています。MBNL1ノックアウトマウス(ある一部の遺伝子を破壊した実験用のマウス)はヒト筋強直性ジストロフィー類似の症状を呈することが知られています。私はMBNL1の働きをより明らかにし、本症の原因にMBNL1が大きく関わっていることを明らかにしました。

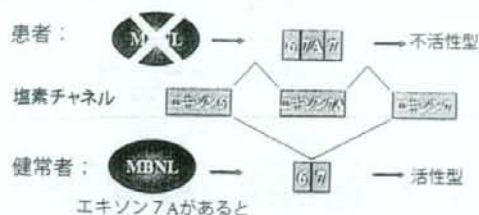
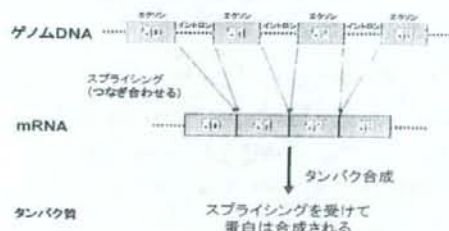


図2 MBNL1の有無とスプライシングの違い

一口メモ

スプライシングとは？



染色体にあるゲノム DNA は遺伝情報に欠かせない部分エクソンと、ほとんど必要とされない部分イントロンからできており、エクソン-イントロン-エクソン-イントロンと交互に配列しています。エクソンの数は遺伝子によって異なり、数個から数百以上までと幅があります。ゲノム DNA を鋳型としてメッセンジャー RNA (mRNA) ができる(転写と呼ばれる)過程で、イントロンは取り除かれエクソンだけになります。このイントロンが取り除かれエクソンがつなぎあわせる過程をスプライシング (splice = つなぎ合わせる) といいます。mRNA からアミノ酸が読み取られる(翻訳と呼ばれる)過程を経て、蛋白質が合成されるのです。

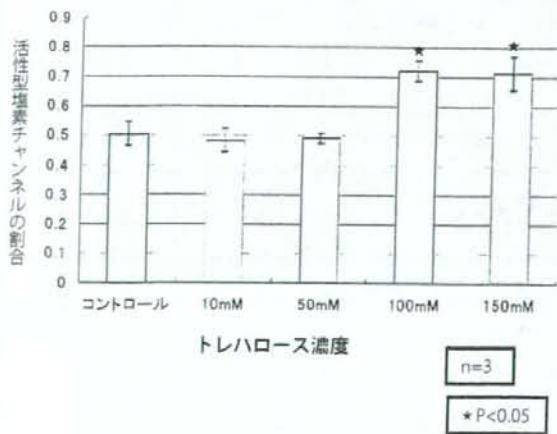


図3 正常型塩素チャネルを増やす薬剤

表現促進現象が起こる原因は、繰り返しの数が次第に大きくなるためであることがわかってきました。我が国では、ほとんどの患者さんが DM1 です。1 人の患者さんでは、身体中のどの遺伝子でも、同じ長さの繰り返し数をもつことが分かっています。

3. なぜいろいろな症状が出るのか

実は、遺伝子は私たちの身体のタンパク質を作る指令なのですが、そのためには一旦、遺伝子をコピーした mRNA という分子が作られ、この mRNA の配列を読み取ってタンパク質が作られます。DM では、遺伝子中の...CTGCTGCTG...と並んでいるところが伸びているわけですから、必然的に mRNA のその部分も伸びています。DNA での...CTGCTGCTG...は、mRNA では...CUGCUGCUG...と読み替えられています。

実は、その CUG の伸長部分に MBNL1 というタンパク質が結合していることが、私たちや他の研究者の実験でわかりました。患者さんで伸長している CUG の部分に MBNL1 が捕捉されるためにスプライシングに必要な MBNL がなくなり、スプライシングができなくなります。そのために色々な蛋白の合成に障害が起こり、全身症状が出るということがわかったのです。(図1)。

■筋強直性ジストロフィーの治療戦略

この DM の特徴的症状の 1 つは、ミオトニア (筋強直) です。ミオトニアは筋肉の興奮異常で、塩素チャネルという遺伝子の機能低下によって起こるのです。DM の患者さんの筋肉では、塩素チャネル遺伝子のスプライシングが図 2 のようになり、エキソン 7A が入るようなスプライシングが起こって機能のない幼若型遺伝子ができるために発症するのです。成人では、エキソン 7A を飛ばしてしまうために MBNL1 が欠かせないのです。

そこで、ミオトニアの治療戦略としては、塩素チャネルのスプライシングの正常化が第一の目標になります。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と考えられます。筋強直性ジストロフィーの示す全身症状のほとんどが、塩素チャネル (ミオトニア)、インスリン受容体 (耐糖能の異常)、トロポニン T (心筋異常) など、いろいろな遺伝子のスプライシングがおかしくなるために起こります。そのため、これらを正常なスプライシングに変える薬剤があればいいわけです。

私たちは、このスプライシングを正常化させることを目的に、培養細胞に薬剤を添加する実験から、効果のある薬剤がないかを網羅的に調べています (図3)。現在、トレハロースという候補が見つっていますが、今後はこれを突破口としてスプライシングを変化させる薬剤を探していくつもりです。

# 筋強直性ジストロフィー発症に関わる RNA 結合タンパク質ファミリーの 新しい機能

大西 隼, 石浦章一

筋強直性ジストロフィーは、遺伝子中の3塩基CTGまたは4塩基CCTGリピートが伸長する疾患で、筋強直をはじめ全身に種々の症状を呈することが特徴である。その発症機構として、スプライシングを調節するRNA結合タンパク質が伸長したリピートRNAに捕捉され、本来の機能を果たせないことが明らかになってきた。本稿では、そのRNA結合タンパク質ファミリーの働きについてまとめてみたい。

## はじめに

1つの遺伝子から活性をもつタンパク質が生み出される過程は非常に多くのステップからなり、それぞれのステップは絶妙な制御下にある。その中でも注目すべきはRNA代謝の複雑性・多様性であろう。RNA代謝には、RNA編集、スプライシング、輸送、翻訳、分解などが含まれる。近年では、分子生物学的手法・技術の著しい発展を背景に、non-coding RNAの発見が相次いでおり<sup>1)</sup>、生体内における多様なRNAの機

能的な意義の理解は急速に進んでいる。このことからRNA代謝機能が阻害されたときの影響が甚大であることも想像に難くない。本稿では、主にスプライシング異常を特徴とする筋強直性ジストロフィーと、それに深く関与するRNA結合タンパク質について解説する。

## 1 DMにおけるスプライシング異常

ヒトの疾患の中では、ある遺伝子変異がタンパク質の機能を変化させることで発症する例に比して、遺伝子変異が直接的にRNA代謝に影響して引き起こされるものの例は、圧倒的に少ない。しかしながら、ヒト遺伝性疾患における点突然変異のうち、約15%においてスプライシング異常が起きていると推定されている<sup>2)</sup>。スプライシングは1つの遺伝子から各組織や発生段階の違いによってさまざまな機能をもつタンパク質を作り出すうえできわめて重要であり、多細胞生物の複雑化に貢献していると考えられる。スプライシング異常によって発症する疾患の代表例として、筋強直

### [キーワード&略語]

筋強直性ジストロフィー (DM)、スプライシング異常、MBNL1, stress granules (SGs)  
DM: myotonic dystrophy (Dystrophia Myotonica)  
(筋強直性ジストロフィー)  
DMPK: Dystrophia Myotonica-protein kinase  
MBNL: muscleblind-like  
CELF: CUGBP-1 and ETR-3 like factor  
ETR: ELAV type RNA-binding protein

New function of RNA-binding protein family in myotonic dystrophy  
Hayato Onishi/Shoichi Ishiura · Department of Life Sciences, Graduate School of Arts and Sciences, The University of Tokyo (東京大学大学院総合文化研究科生命環境科学系)

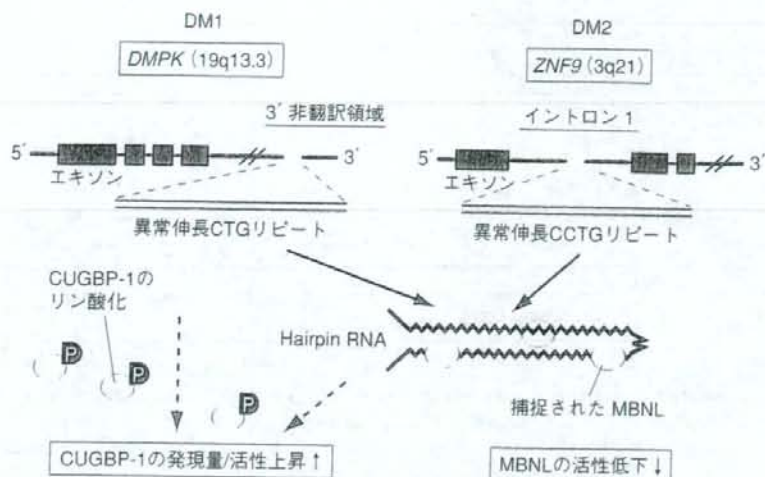


図1 DMにおけるRNA機能獲得仮説 (RNA gain-of-function hypothesis)

DM1とDM2に関して模式的に示した。DM1, DM2ともに非翻訳領域における繰り返し配列の伸長が原因である。核内にリピートRNAが凝集し、MBNL1が捕捉されることがMBNL1の機能低下をもたらすと考えられている。CUGBP-1の発現量/活性上昇のしくみに関しては謎が多い

性ジストロフィー (Dystrophia Myotonica : DM) が挙げられる。DMは、成人男性中で最も発症率が高い常染色体優性遺伝疾患で、筋強直 (緊張した筋肉の弛緩障害)、進行性の骨格筋衰弱、心伝導異常、内分泌異常、認知障害など、全身にわたる特徴的な症状を呈する。また、それぞれの症状に対応する塩素チャネル、インスリン受容体、心筋トロポニンT、タウ、アミロイド前駆体などの原因となり得るタンパク質のスパライジング異常が報告されている。

## DM 発症メカニズムの謎

DMには、DM1とDM2という2つの型が存在する (図1) が、両方とも繰り返し配列の異常伸長が原因となっている (特に、3塩基繰り返しのものをトリプレットリピート病<sup>※1</sup>という)。DM1の原因遺伝子は第19番染色体上のDMPK遺伝子であり、その3'非翻訳領域中のCTGリピート数は正常者で5~30、軽症者 (成人発症型) で50~80、重症者 (先天型) で

2,000以上にもなり、リピートが長いほど重症化する傾向がある。一方、DM2はDM1よりも圧倒的に頻度は低く、その原因は第3染色体上ZNF9遺伝子のイントロン1中のCCTGリピート異常伸長であり、そのリピート数は80から10,000に及ぶ例もある。

DM1とDM2の原因遺伝子は全く別の染色体上のものであるが、非常によく似た症状を呈する。CTGとCCTGという配列上の類似性からも、ある共通した発症メカニズムの存在が示唆されていた。近年の精力的な研究の結果、このnon-coding RNAリピートによる発症メカニズムが明らかになりつつある。DMPKあるいはZNF9のタンパク質の発現量には無関係に、この転写されるRNA自体が負の機能を獲得しているという説がRNA gain-of-function hypothesisで、異常伸長CUG/CCUGリピートによってRNA結合タンパク質の機能が阻害され発症に至る、という仮説である。この中で、注目を浴びているのがMBNL (muscleblind-like) ファミリーである。

### ※1 トリプレットリピート病

3塩基の繰り返し配列の異常伸長が原因である疾患の総称。原因リピート配列の存在する位置によって、翻訳領域 (ポリグルタミン病やハンチントン病など) か、あるいは非翻訳領域 (筋強直性ジストロフィー1型や脆弱X症候群) に分類されることもある。

## MBNL ファミリー

ヒトMBNL1は、(CUG)<sub>n</sub> RNAに結合するタンパク質として同定された<sup>3)</sup>。muscleblindは、*Drosophila*において光受容体や筋肉の分化に必須の遺伝子として同定された遺伝子であり、ヒトではMBNL1, MBNL2

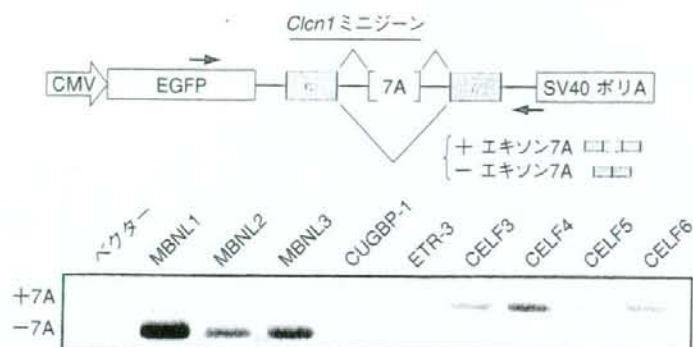


図2 MBNLファミリーとCELFファミリーによる塩素チャネルのスプライシング調節  
 マウス塩素チャネル(Clcn1)のミニジーン構造と、スプライシングアッセイの結果を示した。MBNLは-7A(成人型)スプライシングを、CELF(特に3~6)は+7A(胎児型)スプライシングを促進した

(MBLL), MBNL3 (MBXL) という3つのホモログが存在する。中でもMBNL1は、筋肉や脳など全身に発現しているスプライシング調節因子である。もともと250 CUGリピートを単に骨格筋アクチン遺伝子の3'非翻訳領域に挿入させたトランスジェニックマウスがDM様の筋組織の病理変化や筋強直を呈したことが、RNA gain-of-function hypothesisの最大の根拠となっていた<sup>4)</sup>。さらにDM患者の細胞内では、核内の異常伸長リピートRNAの凝集体とMBNLが共局在することから、MBNLがRNAの凝集体によって捕捉され機能阻害を受けることが発症の原因ではないかという説が浮上した<sup>3)</sup>。MBNL1のノックアウトマウスが筋強直やスプライシング異常を示したことも、この説の強い傍証となっている<sup>5)</sup>。

## CELFファミリー

もう1つ、DMにおいてはCELFファミリーというRNA結合タンパク質ファミリーも発症メカニズムにおいて重要な役割を担っていると考えられている。CUGBP-1はその名の通り、実はMBNL1に先んじてCUGリピートに結合するとして報告されたタンパク質である<sup>6)</sup>。CELFファミリーは、CUGBP-1 (CELF1), ETR-3 (CELF2)に加えて、CELF3~6まで、ヒトでは計6つのホモログが知られている。MBNL1のKOマウスと逆相関的に、CUGBP-1のトランスジェニックマウスは、塩素チャネルなどにおいて胎児型のスプライシングを促し、DM様の症状を示した<sup>7)</sup>。MBNLの機能低下と並行して、CELFにおいてはその活性化

昇がDMの症状に結びつくものとみなされている<sup>8)</sup>。

## MBNLとCELFの拮抗関係

MBNLとCELFの両RNA結合タンパク質ファミリーは、DMで異常となっているスプライシング調節において、多くの場合拮抗的に働いていることが、先行研究から明らかとなっている<sup>9)~12)</sup>。またそれらの遺伝子における選択的エクソンの周辺のイントロン内には、CUGやUGなどの繰り返し配列が存在している。

私たちは、両タンパク質のRNAに対する結合特異性を酵母two-hybrid法によって明らかにした<sup>13)</sup>。これによると、MBNL1はやはりCUG、CCUGリピートに高い結合性を示したのに反し、CELFはほとんど結合せず、むしろUGリピートに顕著に結合した。これは他の研究結果とも一致するものであるが<sup>14)15)</sup>、これがDMのメカニズムにおいてどういった意義をもち得るのかについては、目下議論されているところである。CUGリピートRNAは、ミスマッチを含んだステムループ構造を形成することが想定されているが、このステム部分にはMBNLが、ステムループの根元にCUGBP-1が結合するのではないかという説もある。

また、塩素チャネルのミニジーンを用いた選択的スプライシングアッセイにおけるMBNLとCELFの特異性を示したのが図2である。これで明らかのようにMBNLは成人型へのスプライシングを、CELFは胎児型へのスプライシングを促進する。インスリン受容体のスプライシングにおいても、MBNLは成人型アイソフォームを、CELFは胎児型アイソフォームの産生を促

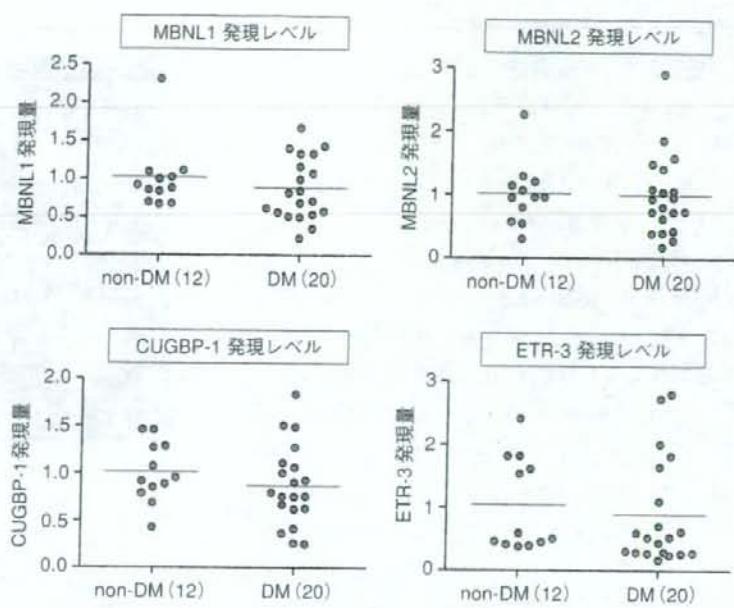


図3 DM患者筋におけるMBNL1, MBNL2, CUGBP-1 (CELF1), ETR-3 (CELF2) のmRNA量 DM患者筋と非DM患者筋からtotal RNAを抽出し、逆転写反応でcDNAを合成後、各特異的プライマーを用いてリアルタイムPCR法を行い、各mRNA量を定量した。同サンプルは、インスリン受容体と心筋トロポニンTに関してスプライシング異常が確認済みである

進することがわかっており<sup>12)</sup>、DMにおける筋細胞の分化不全の本質が分子レベルで明らかになりつつある。

### DMにおけるMBNLとCELFの発現量

今までDM患者の組織において、MBNLとCELFの発現量の詳細な解析はされていなかった。最近、私たちは、患者の筋組織をサンプルとし、リアルタイムPCR法を用いてmRNAの発現量を解析した<sup>16)</sup>(図3)。その結果、DM筋ではnon-DM筋における発現量との有意な差がないことが確認された。これにより、DMにおいて、MBNL1とCELFの転写量自体が変化している可能性は否定され、転写後の翻訳量やタンパク質の修飾に焦点が絞られた。

MBNL1に関しては、異常伸長CUGリピート発現マウスにおいてタンパク質量自体は影響を受けておらず<sup>17)</sup>、やはりリピートRNAに捕捉されることによる機能低下こそが重要であるようだ。一方、CUGBP-1がDMにおいて活性化/異常リン酸化を受けていることが報告されている。この上流のカスケードは不明な点が多いが、CUGBP-1に関しては、実際にDM患者の筋芽細胞においてタンパク質の発現が上昇しているという報

告がある<sup>9)</sup>。さらにPKC経路の異常な活性化により過剰にリン酸化され、タンパク質の安定化が上昇していることが報告されている<sup>18)</sup>。最近、hnRNP HというRNA結合タンパク質が、CUGBP-1と同様に発現上昇しており、MBNL1と結合することもわかっている。

以上のことから、治療においては、CELF (CUGBP-1)あるいはhnRNP Hをdown-regulateさせ、MBNLをup-regulateさせることが有効であろうことは、多くの研究者に同意されている。

### MBNL1の相互作用タンパク質と細胞内動態

これまでのところMBNL1の機能としては、スプライシング調節以外にはほとんど報告がなく、相互作用タンパク質の網羅的なスクリーニングの前例もない。私たちはMBNL1の機能に関して新たな知見を得る目的で、GST-pull down assayによる相互作用タンパク質のスクリーニングを行い、候補としてYB-1 (Y-box binding protein 1), DDX1 (DEAD-box RNA helicase) など、計7タンパク質を同定した<sup>19)</sup>。この中で、DNAとRNAに結合し、転写、スプライシング

調節、翻訳調節など幅広い機能を有する YB-1 に着目した。免疫沈降法などの結合実験の結果、MBNL1 と YB-1 の相互作用は RNA 依存的事であることが明らかとなった。続いて、選択的スプライシングアッセイを行ったところ、MBNL1 と YB-1 がともに alpha-actinin の選択的スプライシングを調節することが示唆された。

さらに細胞内局在解析において、興味深いことに細胞質の「顆粒状構造体」において MBNL1 と YB-1 の顕著な共局在がみられた。近年、細胞質における RNA 代謝関連の顆粒状構造体として、processing bodies (P-bodies)<sup>※2</sup> と stress granules (SGs)<sup>※3</sup> が盛んに研究されている。P-bodies は mRNA 分解の場であり、Dcp1 (decapping enzyme 1) などが局在し、一方で SGs は、熱ストレスや酸化ストレス条件下に形成される RNA 顆粒で、局在する主要構成タンパク質として TIA1 などが知られている<sup>20)</sup>。私たちは、高い特異性をもつ MBNL1 のポリクローナル抗体を作製し、免疫染色法によって各種培養細胞における MBNL1 の細胞内局在を解析したところ、MBNL1 はストレスに responding して SGs のマーカーである TIA1 と顕著に共局在することが明らかとなった(図 4)。また YB-1 も同様に SGs に局在することが確認された。また P-bodies のマーカータンパク質の 1 つである DCP2 を過剰発現させ、ストレス条件下で MBNL1 と共染色したところ、MBNL1 が形成する顆粒は P-bodies と区別されることが判明した。

MBNL1 の欠失変異体による局在解析を行ったところ、Zinc finger motifs が細胞質における顆粒形成においては必要十分であることが明らかとなった。各変異体の RNA への結合性と顆粒形成性の間には、相関する傾向がみられた。これは、SGs において MBNL1 が RNA と相互作用することを支持する結果である。

#### ※2 P-bodies

Dcp (decapping enzyme) や Argonate などが局在する mRNA の分解の場と考えられている stress granules と共通に局在するタンパク質 (YB-1 など) も知られており、両者の関係性が興味深い

#### ※3 stress granules

熱ストレスや酸化ストレスに応じて、細胞質に形成される顆粒状構造体 主要構成タンパク質である TIA-1 や eIF4E (翻訳開始因子)、リボソームタンパク質などが局在する mRNA の一時的な翻訳抑制の場であると考えられている

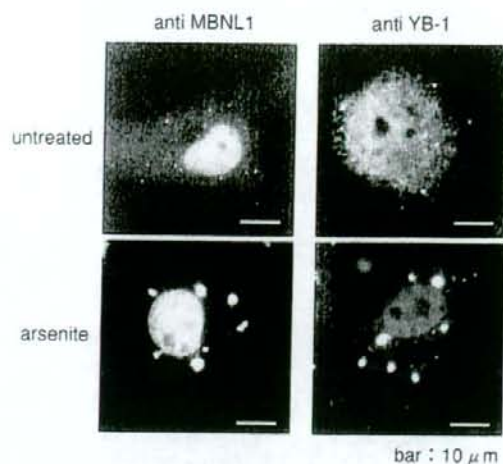


図 4 MBNL1 の COS-7 における局在 (巻頭カラー図 5 参照)

MBNL1 と YB-1 は、arsenite (亜硫酸) ストレスに応じて stress granules に局在するようになった (それぞれの内在性のタンパク質に対する抗体を用いて検出した)

さらに SGs の形成過程と、ストレス解除後に SGs が消失していく過程を、MBNL1 と TIA1 を共染色し経時的に観察した結果、MBNL1 は TIA1 に遅れて SGs に移行し、回復過程では MBNL1 は TIA1 よりも早い段階で SGs から離脱することが示唆された。このことは、SGs はその形成/回復段階によって構成タンパク質に違いがあることを意味し、SGs の機能的意義の理解に役立つ知見であると考えられる。また、DMPK-CTG リピート 140 を安定過剰発現する C2C12 マウス筋芽細胞における MBNL1 のストレス応答性を調べたところ、コントロールの細胞に比べて、SGs 形成過程と SGs から核への回復過程が著しく阻害されていることが観察された(図 5)。SGs の形成能も含めたストレス応答性が、DM で実際に阻害されているのかどうかを明らかにすることも重要であろう。

#### おわりに

2005 年には、MBNL2 が integrin-alpha3 の mRNA の輸送/局在と局所翻訳を担っていると報告された<sup>21)</sup>。MBNL2 は zipcode という cis 配列に結合し、その局在を制御しているようである。MBNL1 と MBNL2 の結合特異性は似ており、MBNL1 も同様の機能を有することが推測される。DM においては、核内での CUG リピートの凝集体による MBNL の捕捉が重要である

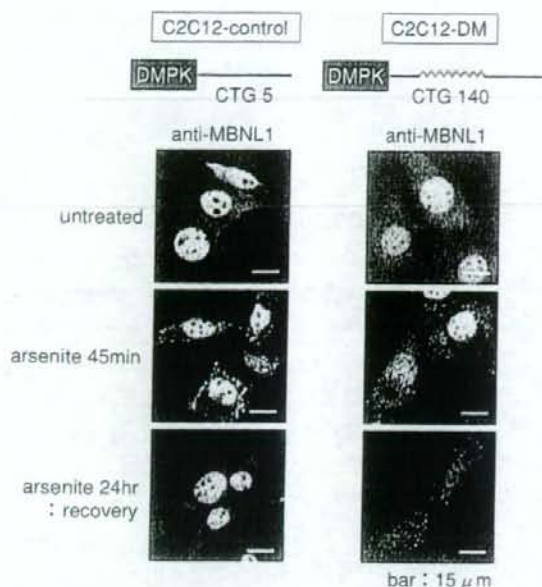


図5 異常伸長CTGリピートによるMBNL1のストレス応答性への影響 (巻頭カラー図6参照)

CTG140リピートを安定発現するC2C12筋芽細胞ではstress granules (SGs)の形成/回復過程が阻害されていた。C2C12-DMでは、controlに比べSGs形成が顕著でなく(中段: 1 mM arsenite 45min処理)、SGsからの回復も阻害されている(下段: 0.1 mM arsenite 24hr処理)ことがわかる。

ことに疑う余地はないだろうが、昨年のIDMC-6 (6th International Myotonic Dystrophy Conference)においては、細胞質においてもリピートRNAの凝集体が存在することが示されていた。これらのことから、MBNL1の細胞質での機能解析、ならびに細胞質でのターゲットRNAの探索が研究の焦点となってくるだろう。DMにおいて、MBNL1の細胞質での機能が変化している可能性も十分に考えられる。また、SGsの主要因子であるTIA-1の結合タンパク質を酵母two-hybrid法によって解析した結果、CUGBP-1が同定され、CUGBP-1もSGsに局在するということが報告されている<sup>22)</sup>。CUGBP-1をはじめCELFファミリーは、RNAの編集、輸送、安定化、分解など細胞質での機能に関して、すでに多数の報告がある<sup>23) 24)</sup>。

DM研究においては、CUGBP-1とMBNL1は、おそらく発症に関与する最も重要な2つのRNA結合タンパク質であり、これらが、核内でのスプライシング制御のみならず、細胞質における機能が阻害されている可能性を視野に入れることは、DMの分子メカニ

ムの全容を明らかにするうえで重要であろう。

また、興味深いことに、CUGリピートRNAが二本鎖RNA切断酵素Dicerに切断されてsiRNAが生じ、相補鎖であるCAGリピートをもつmRNAの発現抑制に効くこともわかってきた<sup>25)</sup>。この機構にMBNLやCELFの関与はあるのか、あるいは、これが果たしてDMの発症メカニズムの一端を担うものなのか、さらなる研究の進展が待たれるところである。

## 文献

- 1) Matera, A. G. et al.: *Nature Rev. Mol. Cell Biol.*, 8: 209-220, 2007
- 2) Krawczak, M. et al.: *Hum. Genet.*, 90: 41-54, 1992
- 3) Miller, J. W. et al.: *EMBO J.*, 19: 4439-4448, 2000
- 4) Mankodi, A. et al.: *Science*, 289: 1769-1773, 2000
- 5) Kanadia, R. N. et al.: *Science*, 302: 1978-1980, 2003
- 6) Timchenko, L. T. et al.: *Nucleic Acids Res.*, 24: 4407-4414, 1996
- 7) Ho, T. H. et al.: *Hum. Mol. Genet.*, 14: 1539-1547, 2005
- 8) Charlet, B. N. et al.: *Mol. Cell*, 10: 45-53, 2002
- 9) Paul, S. et al.: *EMBO J.*, 25: 4271-4283, 2006
- 10) de Haro, M. et al.: *Hum. Mol. Genet.*, 15: 2138-2145, 2006
- 11) Ishiura, S. et al.: *Acta Myol.*, 24: 74-77, 2005
- 12) Dansithong, W. et al.: *J. Biol. Chem.*, 280: 5773-5780, 2005
- 13) Kino, Y. et al.: *Hum. Mol. Genet.*, 13: 495-507, 2004
- 14) Mori, D. et al.: *J. Biochem.*, in press (2008)
- 15) Marquis, J. et al.: *Biochem. J.*, 400: 291-301, 2006
- 16) Nezu, Y. et al.: *Neuromuscul. Disord.*, 17: 306-312, 2007
- 17) Lin, X. et al.: *Hum. Mol. Genet.*, 15: 2087-2097, 2006
- 18) Kuyumcu-Martinez, N. M. et al.: *Mol. Cell*, 28: 68-78, 2007
- 19) Onishi, H. et al.: *J. Neurosci. Res.*, in press (2008)
- 20) Anderson, P. & Kedersha, N.: *J. Cell Biol.*, 172: 803-808, 2006
- 21) Adereth, Y. et al.: *Nature Cell Biol.*, 7: 1240-1247, 2005
- 22) Fujimura, K. et al.: *Exp. Cell Res.*, 314: 543-553, 2008
- 23) Barreau, C. et al.: *Biochimie*, 88: 515-525, 2006
- 24) Vlasova, I. A. et al.: *Mol. Cell*, 29: 263-270, 2008
- 25) Krol, J. et al.: *Mol. Cell*, 25: 575-586, 2007

## <筆頭著者プロフィール>

大西 隼: 東京農工大学農学部卒業後、2008年東京大学大学院理学系研究科博士課程修了。石浦章一教授の指導の下、筋強直性ジストロフィーの非常にユニークな発症機構に興味をもち、スプライシング以外のMBNL1の新規機能を探索する目的で研究を行った。



## 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<sup>1)</sup>。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<sup>2,3)</sup>。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<sup>3)</sup>。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<sup>4)</sup>。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<sup>5)</sup>。

DMの特徴的の症状の一つは、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

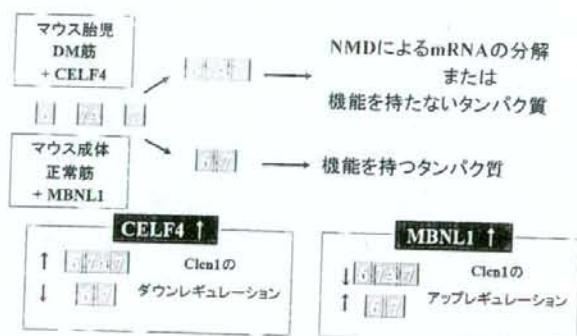
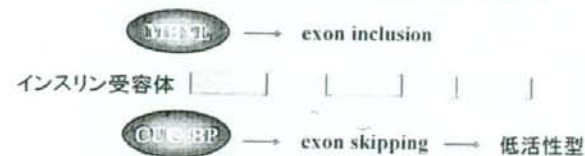


図1 ヒトとマウス塩素チャンネルの活性制御

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

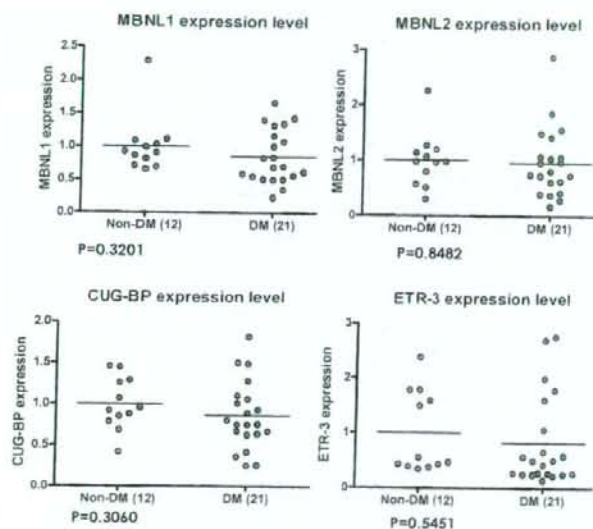


図5 DM患者筋のMBNL1, MBNL2, CUG-BP (CELF1), CUG-BP2 (CELF2)の量

いて定量し、ほとんど差がないことを確認した(図5)<sup>6)</sup>。

### 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<sup>7)</sup>。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で明らかにように、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適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. *Neuromuscul 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.

## 筋強直性ジストロフィーの治療戦略

Therapeutic trial for myotonic dystrophy

— 石浦 章 —

Shoichi Ishiura

東京大学大学院総合文化研究科生命環境科学系

○筋強直性ジストロフィーは筋ジストロフィーのなかでも特異な位置を占めるもので、筋の弛緩障害が特徴であるだけでなく、全身にいろいろな症状が出るために、1つの原因でなかなか発症が説明できなかった。原因が遺伝子中の塩基の繰返しの伸長であることが判明し、伸長した遺伝子それ自体の機能がわるのではなく、RNAの繰返し部位にスプライシング因子が結合して本来のスプライシング機能が果たせずに症状が出ることがわかってきた。そのため、治療の標的がスプライシング異常に絞られてきた。ここでは新しい治療戦略についてまとめる。



筋強直性ジストロフィー、スプライシング、塩基リピート、RNA結合蛋白質

筋強直性ジストロフィー (dystrophia myotonica: DM) は、わが国で一番多い成人型筋ジストロフィーである。症状はミオトニアのみならず、耐糖能の異常、禿頭、精神遅滞、性腺萎縮などさまざまな、効果的な治療法もないのが現状である。特徴として家系内で発病が早まる表現促進現象がみられる。致死ではないものの難治性疾患である。本症の QOL を改善する効果的な薬剤の開発が待たれている。

本症には遺伝的に2つの型が報告されている。1型は第19染色体にあるDMキナーゼ(DMPK)遺伝子の3'非翻訳領域中にあるCTGリピートの伸長であり、2型は第3染色体にあるジンクフィンガー蛋白質ZNF9をコードする遺伝子のイントロン1にあるCCTGリピートの伸長である<sup>1,2)</sup>。両型の臨床症状はほとんど変わらない。世代を経るに従って発症が早くなるのは、塩基リピート数がしだいに伸長することによるものであることが明らかになった。発病は転写されたCUGまたはCCUGリピートにスプライシング関与因子MBNL1-3やCELF1-6が結合し、正常のスプライシングができなくなることが原因であることが示唆されている。

本稿では、このスプライシング異常を標的とした新しいDMの治療の開発について考察する。

### リピーターRNAに結合する スプライシング因子

塩基リピート結合蛋白質として注目されているのはMBNL (muscleblind-like) である。この蛋白質は、目と筋肉に異常のあるショウジョウバエの責任蛋白質として発見された muscleblind のオーツログであり、ヒトでは3種類の遺伝子 *MBNL1*, *MBNL2*, *MBNL3* が報告されている<sup>3,4)</sup>。そのなかでも *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もつ蛋白質で、筋肉において塩素チャネル (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蛋白質 (MTMR1)、トロポニン T (TNNT3)、小胞体 Ca-ATPase (SERCA) など多くの遺伝子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かかわっていることが報告されており、本症において重要な分子と考えられている。この *MBNL1* のリピート結合性を明らかにしたと