厚生労働科学研究費補助金
こころの健康科学研究事業

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

平成21年度　総括・分担研究報告書

研究代表者　石浦　章一

平成22(2010)年　4月

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

平成２１年度　総括・分担研究報告書

研究代表者　石浦　章一

平成２２（２０１０）年　４月

目次

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

総括研究者　　　石浦章一　東京大学大学院 総合文化研究科　教授

研究要旨
　　筋強直性ジストロフィー（DM）は全身性の疾患で、CTG または CCTG というリピートが伸長することが原因で発症する。伸長したリピート RNA に、スプライシング因子 MBNL1 が結合し、正常のスプライシング機能を果たせないことが症状につながると考えられている。本年度、塩素チャネルのスプライシングを正常化することを目的に、アンチセンス配列を検討した。その結果、MBNL1 結合部位付近に作ったアンチセンスが、最も効率よく正常化スプライシングを誘導した。

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

A．研究目的

　　筋強直性ジストロフィー（DM）は常染色体優性遺伝疾患で、遺伝的に DM1 と DM2 の２種類が報告されている。前者は長く伸びた RNA の CUG3 塩基リピート、後者は CCUG4 塩基リピートの伸長が直接の病気の原因で、これらに MBNL1 や CUG-binding protein (CUG-BP) などの RNA 結合タンパク質がトラップされ、正常の機能が果たせなくなる「RNA 病」であることが明らかになっている。リピートが伸長することによって、塩素チャネルのスプライシング異常が起こり、筋強直症状があらわれる。これらは多くの動物実験で明らかになった。私たちは、塩素チャネルミニ遺伝子を用いてスプライシング・アッセイ系を構築し、スプライシング調節活性を持つ MBNL1 の標的配列を明らかにすることを目的とした。次に、この配列を標的としたエキソンスキッピングを行い、スプライシング機能を正常化する新規 DM 治療法の開発を目指した。

B．研究方法（倫理面の配慮含む）

　　塩素チャネルミニ遺伝子（エキソン 6、7a、7 でできている短い遺伝子）を用いて、エキソン 7a をスキップするか、しないか、というスプライシングアッセイが可能である。エキソン 7a がない成人（正常）型と、エキソン 7a を含む幼若

（異常）型の比率は、正常では圧倒的に前者が多く、DM 筋では後者が増えている。そこで、私たちが同定した MBNL1 結合部位近辺の配列 (1) で作成した 2-0-メチルアンチセンスオリゴ投与によって、どの程度スプライシングを正常化させることができるかを、まず COS-7 細胞にミニ遺伝子をトランスフェクトし、RNA 抽出後、スプライシングを RT-PCR で定量した。

（倫理面への配慮）

　　DM 患者生検筋は、患者からインフォームドコンセントを取得し、国立精神・神経センター倫理委員会で承認を受けたものを用いた。

C．研究結果

　　エキソン 7a の最初の塩基を 1 として、-15〜10、0〜25、26〜50、51〜75、76〜+21 をコードする各アンチセンスを、塩素チャネル・ミニ遺伝子をトランスフェクトした COS-7 細胞に添加して効果を見たところ、エキソン 7a の 0〜25 に対するアンチセンスを投与したときに、7a 含有型の割合が約 50％から 10％に低下した。この抑制結果は、以前報告のあったアンチセンスより高く、筋強直の治療に使えるものと考えられた。

　　次に、2-0-メチルアンチセンスオリゴの代わりに生体内への保持能力の高いモルフォリノアンチセンスを使って同じ実験を行った結果、同じ配列で効率のよいエキソン 7a のスキッピングが検

出された。

D．考察

本実験は、Thornton らが 2007 年に発表したアンチセンス法の改良版である。私たちは、まずミニ遺伝子上の MBNL1 の結合部位を同定し、その付近に的を絞ってアンチセンスを設計した。その結果、Kino らが MBNL1 結合配列と同定したエキソン 7a の 0－6 と言う配列を含む 0－25 の部分が最も効率よくエキソンスキップを促すことが判明した。これは Thornton らの配列よりも効率がよいことが証明された。

E．結論

現在、CTG リピートを 300 含むトランスジェニックマウスの成長を待っており、アンチセンスモルフォリノを用いて、実際に筋強直を防ぐ動物実験に入る準備は整った。

F．健康危険情報
　なし

G．研究発表
1．論文発表

(1) Kino. Y., Washizu, C., Oma, Y., Onishi, H., Nezu, Y., Sasagawa, N., Nukina, N. & Ishiura, S. (2009) MBNL and CELF proteins regulate alternative splicing of the skeletal muscle chloride channel CLCN1. Nucleic Acid Res. 37, 6477-6490

(2) Toriumi, K., Oma, Y., Mimoto, A., Futai, E., Sasagawa, N., Turk, B. & Ishiura, S. (2009) Polyalanine tracts directly induce the release of cytochrome c, independently of the mitochondrial permeability transition pore, leading to apoptosis. Genes to Cells 14, 751-757

(3) Nojima, J., Oma, Y., Futai, E., Sasagawa, N., Kuroda, R., Turk, B. & Ishiura, S. (2009)Biochemical analysis of oligomerization of expanded polyalanine repeat proteins. J.Neurosci.Res. 87, 2290-2296

(4) 笹川昇、石浦章一(2009)　筋強直性ジストロフィー。小児内科　41, 909-913

H．知的財産権の出願・登録状況
　なし

2

先天性筋強直性筋ジストロフィーと先天性筋線維タイプ不均等症の

病理学的鑑別に関する研究

研究分担者　西野　一三　　国立精神・神経センター神経研究所部長

　　筋強直性ジストロフィーは、筋病理学的に多彩な所見を呈することが知られている。特に、先天性筋強直性ジストロフィー（CDM）では、先天性筋線維タイプ不均等症（CFTD）との鑑別が困難なことがある。

　　1歳以下で筋生検を受け、CFTD と病理学的に診断された 28 例を対象に *DMPK* 遺伝子の CTG 反復配列延長の有無を検討したところ、4 例（14%）が CDM（CFTD_CDM）であった。CFTD_CDM の病理学的特徴を明らかにするために、臨床遺伝学的に診断された CDM 20 例（CDM）、*ACTA1* 変異を伴う CFTD（CFTD_*ACTA1*）4 例、*TPM3* 変異を伴う CFTD（CFTD_*TPM3*）2 例を対象に研究を行った。筋線維タイプ不均等度（%FSD）は、CFTD_CDM と比較し CFTD_*ACTA1*、CFTD_*TPM3* において優位に高かった。

　　1歳以下の CFTD 患者において、%FSD が 40% 以下の場合、CDM の可能性を検討する必要がある。

A. 研究目的

先天性筋強直性ジストロフィーは、病理学的に乳児重症型のミオチュブラーミオパチーや先天性筋線維タイプ不均等症（CFTD）との鑑別が困難なことがある。そこで、CFTD と診断された 1 歳以下の例の中に CDM 例がないかを検討するとともに、遺伝学的に CDM と確認された例（CFTD_CDM）の病理学的特徴を明らかにすることを目的とした。

B. 研究方法

対象は、1978 年～2007 年までに国立精神・神経センター生検筋レポジトリーに登録された凍結筋検体の内、1 歳以下の患者で CFTD と病理診断された 28 例（男 12 例、女 16 例、平均年齢 9 カ月）を対象とした。DNA を抽出し、triplet repeat PCR 法により *DMPK* 遺伝子内の CTG 反復配列延長の有無を確認した。また、CTG 反復配列延長のなかった例を対象に *ACTA1*、*TPM3* 遺伝子のシークエンス解析を行った。先天性筋強直性ジストロフィーと確認された 4 例（CTFD_CDM）を対象に、臨床遺伝学的に診断された CDM20 例、*ACTA1* 変異を伴う CFTD（CFTD_*ACTA1*）4 例、*TPM3* 変異による CFTD（CTFD_*TPM3*）2 例の病理所見と比較検討した。

（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

CTG 反復配列延長は 4 例（14%）に認められた。この4例における筋線維タイプ不均等度（%FSD）は、平均 23.0±5.0%であった。一方、CDM では 7.2±6.8%、CFTD_*ACTA1* では 47.5±4.0%、CFTD_*TPM3* では 52.0±9.9%であり、CFTD_CDM では CFTD_*ACTA1*、*TPM3* と比較し優位に低かった。また、タイプ 1 線維の頻度は CFTD_CDM では 58.2±6.2%、CDM では 19.6±16.3%、CFTD_*ACTA1* では 57.8±2.0%、CFTD_*TPM3* では 65.5±12.0%であり、CFTD_CDM では CFTD_*ACTA1*、*TPM3* と同様にタイプ 1 線維優位を認めた。また、タイプ 2C 線維は、CFTD_CDM では、CDM と比較し、著明な２Ｃ線維の増加は認めなかった。また、臨床遺伝学的に CDM と診断された 20 例のうち、タイプ２Ｃ線維が少なく、FSD が 15 から 21%と筋病理学的に CFTD に合致する所見を呈する例を 3 例認めた。

D. 考察
CFTD は%FSD が 12%以上であり、他に構造的異常が認められない筋疾患と定義されている。今回の結果から、1 歳以下で病理学的に CFTD と診断された例のうち14%が CFTD_CDM であることが明らかとなった。CFTD_CDM は、CFTD_*ACTA1*、CFTD_TPM3 と比較して明らかに%FSD が低く、CFTD の定義をより高い%FSD に設定することで、CFTD_CDM を除外することが技術的に可能であろうと考えられる。診断的には、%FSD が 40%以下の 1 歳以下の例では、CDM の可能性を検討する必要があることが示唆された。

E. 結論
%FSD が 40%以下の 1 歳以下の例では CDM の可能性を検討する必要がある。

F. 健康危険情報
特になし

G. 研究発表
1. 論文発表

1. Murakami T, Hayashi YK, Ogawa M, Noguchi S, Campbell KP, Togawa M, Inoue T, Oka A, Ohno K, Nonaka I, Nishino I: A novel POMT2 mutation causes mild congenital muscular dystrophy with normal brain MRI. *Brain Dev.* 31: 465-468, 2009

2. Shalaby S, Mitsuhashi H, Matsuda C, Minami N, Noguchi S, Nonaka I, Nishino I, Hayashi YK: Defective Myotilin Homodimerization Caused by a Novel Mutation in MYOT Exon 9 in the First Japanese Limb Girdle Muscular Dystrophy 1A Patient. *J Neuropathol Exp Neurol.* 68: 701-707, 2009

3. Park YE, Hayashi YK, Bonne G, Arimura T, Noguchi S, Nonaka I, Nishino I: Autophagic degradation of nuclear components in mammalian cells. *Autophagy.* 5: 795-804, 2009

4. Hayashi YK, Matsuda C, Ogawa M, Goto K, Tominaga K, Mitsuhashi S, Park YE, Nonaka I, Hino-Fukuyo N, Haginoya K, Sugano H, Nishino I: Human PTRF mutations cause secondary deficiency of caveolins resulting in muscular dystrophy with generalized lipodystrophy. *J Clin Invest.* 119: 2623-2633, 2009

2. 学会発表

1. Tominaga K, Hayashi YK, Goto K, Minami N, Noguchi S, Nonaka I, Nishino I: Congenital myotonic dystrophy in patients diagnosed as congenital fiber type disproportion. 14th International Congress of the World Muscle Society (WMS), Geneva, Switzerland,

9. 11, 2009

2. 冨永佳代, 林由起子, 後藤加奈子, 南　成祐,
   野口　悟, 埜中征哉, <u>西野一三</u>：先天性金線
   維タイプ不均等症(CFTD)様先天性筋強直性
   ジストロフィー(CDM)．第 50 回日本神経学会
   総会, 仙台, 5. 20, 2009

3. 清野智恵子, 南　成祐, 野口　悟, 林由起子,
   埜中征哉, <u>西野一三</u>：先天性筋強直性筋ジス
   トロフィーと X 連鎖性ミオチュブラーミオパ
   チーの筋病理学的鑑別．第 50 回日本神経学
   会総会, 仙台, 5. 21, 2009

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

研究成果の刊行に関する一覧表

書籍

著者氏名	論文タイトル名	書籍全体の編集者名	書　籍　名	出版社名	出版地	出版年	ページ
笹川昇、石浦章一	筋強直性ジストロフィー		小児内科	東京医学社	日本	2009	41, 909-913

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
Kino. Y., Washizu, C., Oma, Y., Onishi, H., Nezu, Y., Sasagawa, N., Nukina, N. & Ishiura, S.	MBNL and CELF proteins regulate alternative splicing of the skeletal muscle chloride channel CLCN1.	Nucleic Acid Res.	37	6477-6490	2009
Toriumi, K., Oma, Y., Mimoto, A., Futai, E., Sasagawa, N., Turk, B. & Ishiura, S.	Polyalanine tracts directly induce the release of cytochrome c, independently of the mitochondrial permeability transition pore, leading to apoptosis.	Genes to Cells	14	751-757	2009
Nojima, J., Oma, Y., Futai, E., Sasagawa, N., Kuroda, R., Turk, B. & Ishiura, S.	Biochemical analysis of oligomerization of expanded polyalanine repeat proteins.	J. Neurosci. Res.	87	2290-2296	2009
Goto, A., Wang, Y-L., Kabuta, T., Setsuie, R., Osaka, H., Sawa, A., Ishiura, S. & Wada, K.	Proteomic and histochemical analysis of proteins involved in the dying-back-type of axonal degeneration in the gracile axonal dystrophy (gad) mouse.	Neurochem. Int.	54	330-338	2009

研究成果の刊行に関する一覧表

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
Murakami T, Hayashi YK, Ogawa M, Noguchi S, Campbell KP, Togawa M, Inoue T, Oka A, Ohno K, Nonaka I, Nishino I	A novel POMT2 mutation causes mild congenital muscular dystrophy with normal brain MRI.	Brain Dev.	31	465-468	2009
Shalaby S, Mitsuhashi H, Matsuda C, Minami N, Noguchi S, Nonaka I, Nishino I, Hayashi YK	Defective Myotilin Homodimerization Caused by a Novel Mutation in MYOT Exon 9 in the First Japanese Limb Girdle Muscular Dystrophy 1A Patient.	J Neuropathol Exp Neurol.	68	701-707	2009
Park YE, Hayashi YK, Bonne G, Arimura T, Noguchi S, Nonaka I, Nishino I	Autophagic degradation of nuclear components in mammalian cells.	Autophagy.	5	795-804	2009
Hayashi YK, Matsuda C, Ogawa M, Goto K, Tominaga K, Mitsuhashi S, Park YE, Nonaka I, Hino-Fukuyo N, Haginoya K, Sugano H, Nishino I	Human PTRF mutations cause secondary deficiency of caveolins resulting in muscular dystrophy with generalized lipodystrophy.	J Clin Invest.	119	2623-2633	2009

筋強直性ジストロフィー
Myotonic dystrophy

笹川　昇＊　　石浦章一＊＊
SASAGAWA Noboru　　ISHIURA Shoichi

① 基本病因，発症機序

筋強直性ジストロフィー（dystrophia myotonica：DM）は，常染色体優性の形式で発症する遺伝病である[1]。多くの場合，DM は成人してから発症するが，それ以外に出産直後から DM の症状を示す場合（先天性筋強直性ジストロフィー）や，子どものときに発症する場合などがある。出現頻度は8,000 人に 1 人といわれている。これは成人発症型の筋ジストロフィーのなかではもっとも高い出現頻度であり，若年性の筋ジストロフィーのなかで

は Duchenne 型についで 2 番目に多い。

1992 年に責任遺伝子およびその遺伝子変異が同定された。この遺伝子は第 19 番染色体長腕 13.3 の部位に位置しており，新規の蛋白質リン酸化酵素（DM protein kinase：DMPK）をコードしていた。しかし驚くべきことに，その変異は蛋白質の翻訳領域ではなく，3′側非翻訳領域に CTG 三塩基リピートがあり，正常対照では繰り返し数が多くても 37 回，たいていは 5 回なのに対し，患者では最低でも 50 回以上，多いものでは数千回にまで達していることが判明したのである[2]（図1a）。ま
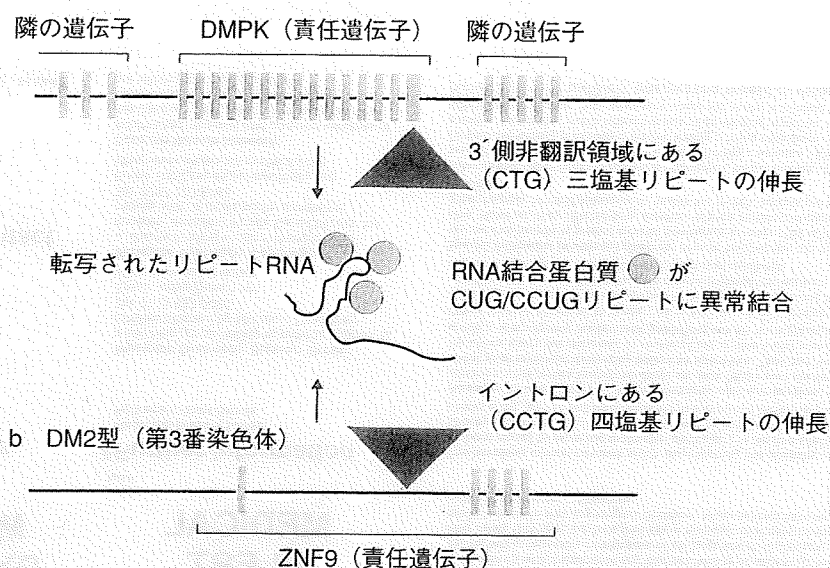
図1　筋強直性ジストロフィー（DM）の分子機構
筋強直性ジストロフィー（DM）は，常染色体優性の形式で発症する遺伝病である。現在までに，DM1 型，DM2 型の遺伝子座が同定されている。
a：DM1 型の責任遺伝子は第 19 番染色体に位置する。遺伝子変異は 3′側非翻訳領域にある CTG 三塩基リピートの伸長である。
b：DM2 型の責任遺伝子は第 3 番染色体に位置する。遺伝子変異はイントロンにある CCTG 四塩基リピートの伸長である。DM1 型，DM2 型ともに，責任遺伝子の翻訳産物は変異を伴わないことに注意する必要がある。

＊ 東京大学大学院総合文化研究科生命科学構造化センター　　＊＊ 同　生命環境科学系
［〒 153-8902　東京都目黒区駒場 3-8-1］　TEL/FAX 03-5454-6739
E-mail：cishiura@mail.ecc.u-tokyo.ac.jp

してしまうことが，この病気の症状につながっているという見方が確立されている。

さらに，近位性筋強直性ミオパチー(proximal myotonic myopathy：PROMM)ともよばれていたDM2型の遺伝子座も同定されており，この場合は第3番染色体にあるZNF9とよばれる転写因子をコードする遺伝子の変異によって起こる。この場合も驚くべきことに，遺伝子変異は蛋白質の翻訳領域でなく，イントロン部分にあるCCTG四塩基リピートの伸長が発症の原因であることが報告されている[3](図1b)。なお，CTG三塩基リピートの伸長が原因で発症する本来のDMをDM1型とよぶが，DM2型の出現頻度は1型に比べて圧倒的に少なく，わが国では1例が報告されたのみである。

② 基本病態

ここに，DMでみられる基本的な病態を示した(図2)。DMの症状は筋肉だけに現れるだけでなく，全身的な症状を併発することを特徴とする。また図3は，欧米で患者が保持することを勧められているカードである。周囲の理解や，応急処置の際に役立つようにとの配慮がされている。基本的な症状についても記載されているので，参考にされたい。

③ 病態生理からみた臨床症候

一番の特徴に筋強直(ミオトニア)があり，握手のあとに手が開きにくい，などの症状がみられる。

筋力低下はとくに腕，顔，首で多くみられる。顔面の筋力が低下した結果，眼瞼下垂，無表情，下顎が下がるなどの特徴的な顔貌を呈する。

筋力低下は主に遠位性のものである。胸鎖乳突筋が衰えた結果，頭をもち上げるのが困難になる。そのほか，腕や手の筋力が低下することにより，ものをもち上げたり，細かい仕事が難しくなる。

また，進行性の筋萎縮がみられる。年を経るごとに萎縮は進んでいくが，急激な変化をするわけではない。

そのほか，不整脈，呼吸障害，嚥下障害，胃腸障害，白内障，日中過眠，ホルモン障害，糖尿病などの全身的な症状を併発する。ただし，一人の患者がこれらすべての症状を呈することはまれで

あり，患者個人によって程度の差が非常に大きいことが知られている[4,5]。

④ 病態生理からみた診断のための臨床検査

DMは常染色体優性の形式で起こる遺伝病であるため，遺伝子診断を行うのが確実である。国内にも検査業者は存在する。血液からDNAを回収し，サザン解析を行うのが現実的である。マーカーと交差するDNA断片の長さを解析することにより，CTGリピートの長さを同定できる。PCR反応は，より少量のDNAで検査できることが利点だが，CTGリピートはGC含量に富むため，DMにおいては，通常のPCR反応ではDNAが増幅しにくく，増幅してもスメアとなって検出が難しい場合がある。

問題は，明らかなDM症状が認められない場合の診断である。病院でほかの症状を訴える患者を検査したところ，実はDMだった，という例もある。具体的には，以下の症状が認められるとき，DMの可能性も疑われる(http://www.myotonic.com/go/mdf/disease-information/about-the-disease/diagnosis/complaints-and-specialists/を和訳，改変)。

- かかりつけの医師：疲労，熟睡できない，過度の日中の眠気，感情の低下
- 小児科：いわゆる，ぐにゃぐにゃしている幼児や，学習や行動に問題を抱えている場合
- 眼科：白内障，眼筋の筋力低下，眼瞼下垂
- 循環器科：不整脈，心筋障害
- 呼吸器科：慢性の呼吸異常，睡眠時無呼吸，慢性的な胸の風邪，嚥下障害による誤嚥性肺炎
- 内分泌科：インスリン抵抗性，甲状腺障害，低テストステロン
- 皮膚科：毛質性上皮腫
- 胃腸科：慢性的な下痢，便秘，原因不明の胃痛，胆石，嚥下障害
- 産婦人科：子宮外妊娠，不妊，流産，死産
- 精神科：うつ，意欲低下，社会的な問題行動，注意欠陥
- 神経科：苦痛を伴う神経や筋肉の脱力や硬直，慢性的な筋肉痛，認知発達の遅れ，決断力低下
- 麻酔科：全身麻酔の前後で呼吸不全
- 整形外科：足の形成不全，背骨の彎曲
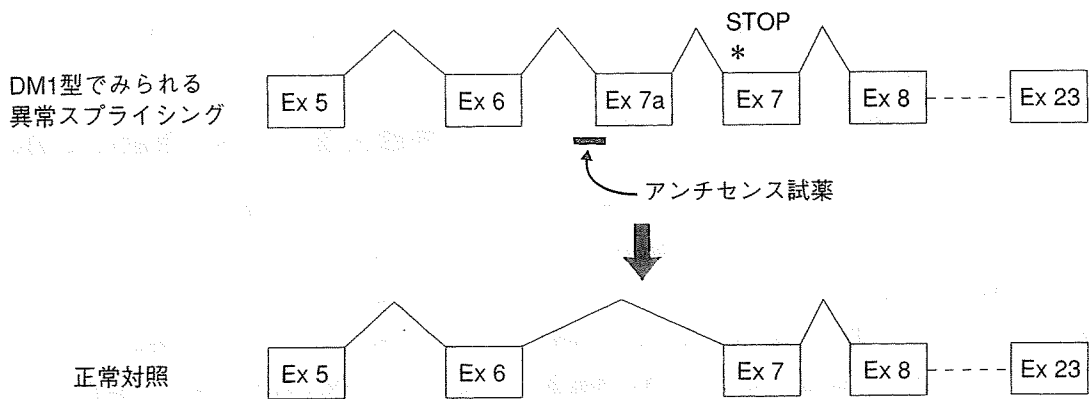
図4　モデルマウスを用いた，DM の根本治療に向けて行われている最新の研究
CTG/CCTG リピートの伸長により，DM 患者では，本来発現するべきではないスプライシング型の遺伝子が発現している。このことが，DM における多岐にわたる全身症状の原因となっている。この図で紹介する方法は，DM でみられる異常型のスプライシングパターンを示す遺伝子（ここでは，塩素チャネル遺伝子）を，相補的な配列をもつ短いアンチセンス試薬を投ずることによって正常型に戻そうとする試みである。まだマウスの段階だが，この方法での良好な効果が報告されている。

(Wheeler ら[6]，2007 より引用改変)

・口腔外科：正常な発音や咀嚼を妨げる骨形成不全
・耳鼻科：聴力損失
・音声病理科：発音障害，嚥下障害
・理学療法科：歩行困難と筋の脱力

5 治療目標とその手順および症状検査所見からみた効果判定指標

　この病気は進行性の神経筋疾患であり，根本的な治療法は確立されていない。筋強直を和らげる場合には，イギリスではメキシレチンがよく使われる。またフェニトイン，キニーネ，プロカインアミドが使用されることもある。

　筋萎縮を抑える薬は，今のところ開発されていない。筋力の低下を補う方法として，その部位をプラスチック装具で補助する，クラッチグラスを使用する，などの対応がとられている。運動の効果には個人差があり，指導者の計画のもとで行う必要がある。

　根本的な治療としては，変異遺伝子を標的とし，その影響を抑えるような薬剤の開発が待たれるが，先に述べたように DM の遺伝子変異は非常に特殊なものであり，間接的に影響を受ける遺伝子は多岐にわたるため，その治療法確立は容易ではない。

　一方でモデルマウスを用いた最新の研究では，病態に関連してスプライシング異常を受けている遺伝子（ここでは，塩素チャネル）のスプライシングパターンを正常型に戻すようなアンチセンス試薬を打ち込むことで，スプライシング異常を受けた遺伝子を正常型の発現パターンに戻す試みが行われ，一定の成果をあげたことが報告されている[6]（図4）。

6 よくある合併症の病態生理とその診断・治療・予防

　すでに記したように，DM では筋肉のみならず，全身にわたる症状を併発する。これは，この遺伝病の特殊な遺伝子変異によって説明がつく。表現型は責任遺伝子の翻訳産物の機能いかんにかかわらず，間接的にスプライシング異常を受けるほかの多くの遺伝子によるものと考えられているからである。

　一般的にみて，麻酔は，DM 患者では重大な危険性がある。とくに，DM であるにもかかわらず，その診断がされていない場合，麻酔のリスクは高い（http://www.gla.ac.uk/centres/muscle/damanaesthesia.htm）。

7 症状経過，検査所見からみた予後判定

　症状は漸次進行する。根本的な治療法は確立されておらず，今後の研究が待たれる。

＜関連 Web site＞
・Myotonic Dystrophy Foundation
　http://www.myotonic.com/go/mdf/
・International Myotonic Dystrophy Organization
　http://www.myotonicdystrophy.org/index.htm

文献
とくに，文献 4)が日本語で書かれていることもあり，入門
として最適である．本稿でも大いに参考にさせていただい
た．分子機構に関する総説は多く出ているが，文献 7)がよ
くまとまっている．総説のうち最新のものに 8)がある．
1) Harper PS：Myotonic dystrophy, W B Saunders,
   London, 2001
2) Brook JD, McCurrach ME, Harley HG, et al：
   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, 1992
3) Liquori CL, Ricker K, Moseley ML, et al：Myotonic
   dystrophy type 2 caused by a CCTG expansion in
   intron 1 of ZNF9. Science **293**：864-867, 2001
4) 川井　充，大矢　寧(訳)：筋強直性ジストロフィー：
   患者と家族のためのガイドブック，診断と治療社，東
   京，2005
5) Myotonic Dystrophy：The Facts：A Book for
   Patients and Families, 3 Revised edition, Oxford
   University Press, ISBN 0-19-852586-9(文献 4)の
   原著)
6) Wheeler TM, Lueck JD, Swanson MS, et al：Correc-
   tion of ClC-1 splicing eliminates chloride channelo-
   pathy and myotonia in mouse models of myotonic
   dystrophy. J Clin Invest **117**：3952-3957, 2007
7) Ranum LP, Cooper TA：RNA-Mediated Neuromus-
   cular Disorders. Annu Rev Neurosci **29**：259-277,
   2006
8) Kaliman P, Llagostera E：Myotonic dystrophy pro-
   tein kinase(DMPK)and its role in the pathogenesis
   of myotonic dystrophy 1. Cell Signal **20**：19, 2008

＊　　　＊　　　＊

MBNL and CELF proteins regulate alternative splicing of the skeletal muscle chloride channel CLCN1

Yoshihiro Kino[1,2], Chika Washizu[1], Yoko Oma[2], Hayato Onishi[2], Yuriko Nezu[2], Noboru Sasagawa[2], Nobuyuki Nukina[1] and Shoichi Ishiura[2,*]

[1]Laboratory for Structural Neuropathology, RIKEN Brain Science Institute, 2-1, Hirosawa, Wako-shi, Saitama, 351-0198 and [2]Department of Life Sciences, Graduate School of Arts and Sciences, the University of Tokyo, 3-8-1, Komaba, Meguro-ku, Tokyo, 153-8902, Japan

ABSTRACT

The expression and function of the skeletal muscle chloride channel CLCN1/ClC-1 is regulated by alternative splicing. Inclusion of the CLCN1 exon 7A is aberrantly elevated in myotonic dystrophy (DM), a genetic disorder caused by the expansion of a CTG or CCTG repeat. Increased exon 7A inclusion leads to a reduction in CLCN1 function, which can be causative of myotonia. Two RNA-binding protein families—muscleblind-like (MBNL) and CUG-BP and ETR-3-like factor (CELF) proteins—are thought to mediate the splicing misregulation in DM. Here, we have identified multiple factors that regulate the alternative splicing of a mouse Clcn1 minigene. The inclusion of exon 7A was repressed by MBNL proteins while promoted by an expanded CUG repeat or CELF4, but not by CUG-BP. Mutation analyses suggested that exon 7A and its flanking region mediate the effect of MBNL1, whereas another distinct region in intron 6 mediates that of CELF4. An exonic splicing enhancer essential for the inclusion of exon 7A was identified at the 5' end of this exon, which might be inhibited by MBNL1. Collectively, these results provide a mechanistic model for the regulation of Clcn1 splicing, and reveal novel regulatory properties of MBNL and CELF proteins.

INTRODUCTION

Myotonic dystrophy (dystrophia myotonica, DM) type 1 or DM1, is a genetic disorder with multi-systemic symptoms, such as myotonia, progressive muscle loss, cataracts, cardiac conduction defects, insulin resistance and cognitive impairments (1). DM1 is caused by the expansion of a CTG trinucleotide repeat in the 3'-untranslated region (UTR) of the DM protein kinase (*DMPK*) gene (2–4). Evidence suggests that the expanded CUG repeats transcribed from a mutated allele cause RNA gain-of-function effects that affect the function of other cellular factors. This concept is supported by transgenic mice (HSA^{LR}) expressing an expanded CUG repeat inserted in an unrelated gene (human skeletal actin, *HSA*) that manifest myotonia and abnormal muscle histology (5). Recently, a second locus of DM has been identified, and CCTG repeat expansion in intron 1 of the *ZNF9* gene was found to be causative of DM type 2 (DM2; 6). Remarkably, in the nuclei of cells of patients with both DM1 and DM2, RNA inclusions containing CUG and CCUG repeats, respectively, have been observed (6–8). In addition, abnormalities in RNA metabolism have been found in the cells of DM patients. Splicing of certain genes is misregulated in DM1. These genes include cardiac troponin T (*cTNT TNNT2*), insulin receptor (*IR*), chloride channel 1 (*CLCN1*), fast skeletal troponin T (*TNNT3*), sarcoplasmic/endoplasmic reticulum Ca^2-ATPase (*SERCA*) 1 and others (9–14). The splicing patterns of some of these genes are also misregulated in DM2 patients and the HSA^{LR} mouse (12,15,16). These results suggest that certain RNA-binding proteins that regulate pre-mRNA splicing of these genes are abnormally influenced by the mutant transcripts containing expanded CUG/CCUG repeats (17).

Two protein families—muscleblind-like (MBNL) and CUG-BP and ETR-3-like factor (CELF) proteins—may play major roles in the pathogenesis of DM. MBNL proteins MBNL1 EXP, MBNL2/MBLL/MLP1 and MBNL3/MBXL/CHCR are orthologs of the *Drosophila* muscleblind protein, which is involved in the terminal differentiation of photoreceptor and muscle cells in the fly (18,19). All three MBNL proteins can colocalize with RNA inclusions of expanded CUG/CCUG repeats in

*To whom correspondence should be addressed. Tel: +81 3 5454 6739; Fax: +81 3 5454 6739; Email: cishiura@mail.ecc.u-tokyo.ac.jp

both DM1 and DM2 cells (20). MBNL1 binds directly to both CUG and CCUG repeat RNA in a length-dependent manner *in vitro* (21,22). Therefore, these proteins are considered to be sequestered by the expanded RNA through direct interactions, and their cellular functions can be disrupted in both types of DM. Remarkably, knockout mice of *Mbnl1* manifest some DM-like symptoms, including myotonia, abnormal muscle histology and cataracts (13). More recently, *Mbnl2* knockout mice were reported to manifest myotonia (23). Importantly, cellular studies have demonstrated that MBNL proteins can directly regulate the alternative splicing of the *cTNT* and *IR* genes, which are misregulated in DM1 patients (24,25). These results strongly support the hypothesis that loss of function of MBNL proteins leads to the misregulation of splicing in DM

CELF proteins are another protein family involved in the pathogenesis of DM1 CELF proteins CUG-BP, CUGBP1 BRUNOL2, ETR-3/CUGBP2/NAPOR/ BRUNOL3, CELF3/TNRC4/BRUNOL1, CELF4/ BRUNOL4, CELF5/BRUNOL5 and CELF6/ BRUNOL6 are multi-functional proteins that play regulatory roles in translation, RNA editing, mRNA stability, as well as splicing (26–29). CUG-BP regulates the alternative splicing of *cTNT* exon 5, *IR* exon 11 and *CLCN1* intron 2 (9–11). In DM1 patients, the expression of CUG-BP protein is elevated because of protein stabilization induced by PKC-mediated phosphorylation (10,30,31). Moreover CUG-BP transgenic mice can reproduce some of the muscular abnormalities observed in DM1 or its congenital form, including aberrant splicing and muscle histology (32,33). CUG-BP acts antagonistically against MBNL proteins in the splicing regulation of *cTNT* and *IR* (24,25), suggesting that altered CELF activities, in addition to the loss of MBNL function, can induce aberrant splicing in DM1 However, the extent to which these proteins can account for splicing abnormalities and the pathogenesis of DM remains unclear

Myotonia is a characteristic symptom of both DM1 and DM2 and has been linked with a loss of function of *CLCN1* chloride channel caused by aberrant splicing of its pre-mRNA in DM patients (11,12). The CLCN1 protein is a muscle-enriched voltage-gated chloride channel and is important for stabilizing the resting potential of muscle membrane (34). More than 50 mutations of *CLCN1* have been found in myotonia congenita, another genetic disorder with myotonia, directly linking defects of *CLCN1* with the pathogenesis of myotonia (35). In DM1 patients, the abnormal inclusion of alternative exons 6B and/or 7A and retention of intron 2 of *CLCN1* have been observed (11 12). These aberrant-splicing patterns can lead to *CLCN1* transcripts containing premature termination codons, resulting in an enhanced degradation of transcripts through the mechanism of nonsense-mediated mRNA decay (NMD), or the production of truncated proteins having a dominant-negative effect (12,36). Consistently, the levels of *CLCN1* mRNA and protein are considerably lower in the muscle of DM patients (11,12). Thus, the misregulated splicing of *CLCN1* in

DM1 leads to a reduction in CLCN1 activity, which can be causative of myotonia.

In mouse models expressing an expanded CUG repeat (HSA^{LR}) or lacking *Mbnl1*, the inclusion of exon 7A in mouse *Clcn1* increased, as in human *CLCN1* of DM patients (12,13). It is important to note that the introduction of exogenous MBNL1 into HSA^{LR} mice by viral administration reversed the misregulation of *Clcn1* splicing as well as the myotonic phenotype (37). Furthermore, antisense oligonucleotide (AON)-induced exon 7A skipping resulted in the upregulation of *Clcn1* mRNA and protein levels and eliminated myotonia in both HSA^{LR} and *Mbnl1* knockout mice (38). This suggests that the misregulation of *Clcn1* splicing alone can explain the pathogenesis of myotonia in these mouse models. Therefore, MBNL proteins play an essential role in the splicing regulation of *Clcn1* and are probably involved in the pathogenesis of myotonia in DM Although the loss of function of MBNL was reproduced in these two mouse models, another pathogenic pathway involving CELF proteins might have been underrepresented in these models, which did not show elevated CUG-BP protein levels (13,16,39). Therefore, it is important to ask whether CELF proteins are involved in the regulation of *CLCN1/Clcn1* splicing. Indeed, CUG-BP binds directly to an element in intron 2 and promotes the retention of this intron (11). Furthermore, CUG-BP transgenic mice exhibit increased inclusion of *Clcn1* exon 7A, even though the manifestation of myotonia is not clear (33). Thus, it is important to characterize the roles of MBNL and CELF proteins in the regulation of *Clcn1* splicing to understand the mechanism of myotonia in DM Although increased exon 7A inclusion is the most frequent abnormality of *CLCN1/Clcn1* splicing in DM (12), the mechanism of its regulation is still unclear

We established a *Clcn1* minigene assay system and identified multiple *cis*- and *trans*-acting factors that regulate the alternative splicing of *Clcn1* exon 7A. The essential role of MBNL proteins in the normal splicing pattern of *Clcn1* was verified. Our results also highlight some CELF proteins as antagonistic regulators against MBNL proteins.

MATERIALS AND METHODS

cDNA clones and constructs

MBNL1 and MBNL2 were amplified by polymerase chain reaction (PCR) from a human skeletal muscle cDNA library (BD Marathon-Ready human cDNA, Clontech). MBNL3 was amplified from a human liver cDNA library Because the amplified MBNL3 cDNA clones contained an extra exon compared to a previous MBNL3 sequence, this exon was deleted by PCR-mediated mutagenesis. CELF proteins ETR-3, CELF3, CELF4, CELF5 and CELF6 were amplified from cDNA libraries of either brain or skeletal muscle of human origin. CUG-BP was amplified from pSRD/CUG-BP (40). Forward primers for the amplification of these cDNAs contained BamHI, BglII, or EcoRI sites, whereas the reverse primers contained either SalI or XhoI sites to add these restriction sites to

the PCR products. Fragments of these cDNAs were inserted into the BamHI-XhoI or EcoRI-XhoI site of pSecDK, a mammalian expression vector with a myc-tag that was modified from pSecTagA (Invitrogen) to delete the Igκ chain leader sequence. Constructs encoding GST-MBNL1$_{40}$ has been described previously (22). The *Clcn1* minigene fragment covering exons 6 to 7 was amplified from mouse genomic DNA by PCR using the primer pair Clcn1-Fw and Clcn1-Rv, into which a restriction site for BamHI or SalI was added. Similarly, the corresponding fragment of human *CLCN1* was amplified using primers CLCN1-Fw and CLCN1-Rv. The minigene fragments were ligated into pGEM-T Easy vector (Promega). The minigene fragments in pGEM-T Easy were cleaved by BamHI and SalI and then subcloned into the BglII-SalI site of pEGFP-C1 (Clontech). A series of deletion mutants of *Clcn1* was generated by PCR-mediated mutagenesis. To construct heterologous minigenes, we inserted alternative exons with flanking regions such as *Clcn1* 451–720 into the BglII-SalI sites of pEGFP-Tpm2-ex1-2 vector (see Supplementary 'Materials and Methods' section). Primer sequences are listed in Supplementary Table S1. Detailed information on the sequences and construction of mutant minigenes is available upon request. DM18 and DM480 contain a fragment of the 3′ region of DMPK with a CTG18 and interrupted CTG480 repeats, respectively (Supplementary Figure S4).

R-miR, a vector modified from pcDNATM6.2-GW EmGFP-miR (Invitrogen), was utilized for RNA interference (RNAi) experiments. R-miR contains a cDNA fragment of monomeric RFP (mRFP) in place of EmGFP and an Esp3I recognition site introduced downstream of mRFP. DNA fragments corresponding to a portion of an artificial microRNA (Supplementary Table S2) were designed using BLOCK-iT RNA Designer (Invitrogen website) and inserted into the Esp3I site of R-miR.

The FANTOM3 clone plasmids encoding murine Mbnl3 (E430034C16), Cugbp1 (4432412L08), Cugbp2/Etr-3 (9530098D08) and Celf4 (C130060B05) used for testing RNAi efficiency in Neuro2a cells were provided by Dr Hayashizaki (41). Murine Mbnl1 and Mbnl2 were amplified from a mouse brain cDNA library. The N-terminal regions of Mbnl1, Mbnl2 and Mbnl3 and the full-length open reading frames of Cugbp1, Cugbp2 and Celf4 were amplified with primers containing restriction sites, digested by the restriction enzymes, and inserted into the BglII-SalI site of the pEGFP-C1 vector. All constructs were confirmed by sequencing.

Cellular splicing assay

Cells transfected with plasmids for the expression of a protein and a minigene were harvested 48 h post-transfection. Typically, cells were cultured in 12-well plates and transfected with 0.5 μg plasmids for protein expression (or cognate empty vector) and 0.01 μg plasmids for the expression of a minigene. Total RNA was extracted and purified using either the acidic guanidine phenol chloroform method or RNeasy Mini

kit (Qiagen) including DNase treatment. Typically, 1.0 μg total RNA was reverse-transcribed using the ThermoScript RT-PCR System (Invitrogen) or Revertra Ace -α- (TOYOBO) with a 1:1 mixture of oligo dT and random hexamer as primers. Minigene fragments were amplified by PCR using a fluorescein isothiocyanate (FITC)-labeled forward primer for the 3′ region of the EGFP sequence (FITC-GFP-Fw) and a gene-specific reverse primer (Clcn1-Rv for *Clcn1* or CLCN1-Rv for *CLCN1* Supplementary Table S1). For *Tpm2*-based minigenes, primers FITC-GFP-Fw and Tpm2-ex2-splicing-Rv2 were used for amplification. PCR products were resolved by 2.0–2.5% agarose gel electrophoresis. By sampling at multiple cycles, the cycle numbers of PCR were adjusted such that the amplification was within the logarithmic phase. The fluorescence of PCR products was captured and visualized by LAS1000 or LAS3000 (FUJIFILM). The intensity of band signals was quantified using Multigauge software (FUJIFILM). The ratio of exon 7A inclusion in *Clcn1* and *CLCN1* was calculated as (7A inclusion)/(7A inclusion + 7A skipping) × 100.

Quantitative PCR

Gene-specific primers were designed using Primer Express software (Applied BioSystems) and are listed in Supplementary Table S3. These primer sets were mixed with cDNA samples and Power SYBR Green PCR Master Mix (Applied BioSystems). Real-time amplification and quantification were performed using an ABI7700 (Applied BioSystems) following the manufacturer's protocol.

Gel shift analysis

GST and GST-MBNL1 were purified as described previously (22). Oligo DNA templates corresponding to Clcn1(473–518) (CTGCCCAGGCACGGTCTGCAACA GAGAAGCACGACGGGCGAGGCAGCCCTATAGT GAGTCGTATTACCCC), Clcn1(GAA) (CTGTTCTTC TTCTTCCTGCAACAGAGAAGCACGACGGGCGA GGCAGCCCTATAGTGAGTCGTATTACCCC), and Clcn1(a504c) (CTGCCCAGGCACGGGCTGCAACAG AGAAGCACGACGGGCGAGGCAGCCCTATAGTG AGTCGTATTACCCC) were purchased from Invitrogen and annealed with another DNA fragment for the T7 promoter (GGGGTAATACGACTCACTATAGGG). Using this partial duplex as a template, we transcribed RNA using T7 RNA polymerase (MEGAscript T7 kit; Ambion). The RNA was purified by phenol-chloroform extraction followed by ethanol precipitation. The purified RNA was treated with alkaline phosphatase, then labeled by T4 polynucleotide kinase in the presence of γ-^{32}P-ATP. The labeled RNA was purified using a Nucaway spin column (Ambion). The procedures and reaction mixture used in the gel shift analysis are described in our previous report (22).

Ribonucleoprotein immunoprecipitation

Ribonucleoprotein immunoprecipitation (RIP) was performed as described previously (42), with minor modifications. The amount of co-precipitated minigene

RNA was quantified by SYBR green-based Quantitative PCR (qPCR) using the primers listed in Supplementary Table S3. The procedure is described in the Supplementary 'Materials and Methods' section.

RESULTS

MBNL and CELF proteins regulate the inclusion of *Clcn1* exon 7A

To examine whether the MBNL and CELF family proteins can regulate the splicing of *Clcn1*, we created a minigene covering exons 6 to 7 of the mouse *Clcn1* gene (Figure 1A). It is important to note that because the inclusion of exon 7A does not produce a premature termination codon in the context of our *Clcn1* minigene, the spliced products containing exon 7A are not substrates of NMD. Thus, the minigene would provide more faithful splicing patterns compared to the endogenous

Figure 1. Splicing regulation of MBNL and CELF proteins. (A) Structure of chloride channel minigenes. Both human *CLCN1/ClC-1* and mouse *Clcn1* minigenes were subcloned between the BglII and SalI sites of pEGFP-C1. Black boxes represent exons of the minigenes. Arrows indicate the position of primers used in the splicing assays. Exon 6B is a human-specific exon and is absent in *Clcn1*. (B) Splicing regulation of *Clcn1* by MBNL and CELF proteins. Representative results of cellular splicing assays using the *Clcn1* minigene in COS-7 cells. The upper bands correspond to a splice product containing exon 7A, whereas lower bands correspond to a splice product lacking exon 7A. Bar chart shows quantified results of exon 7A inclusion (mean ± SD, $n = 3$). Statistical significance was analyzed by analysis of variance (ANOVA) and Dunnett's multiple comparisons. All MBNL proteins and CELF proteins except for CUG-BP and ETR-3 showed significant differences ($^*P < 0.0001$) compared to the empty vector. (C) CUG-BP and ETR-3 increased an unspliced product of the *Clcn1* minigene. Structures of PCR products are indicated.

Clcn1 We utilized non-muscle cell lines to minimize the effect of muscle-dependent backgrounds and focus on the direct effects of transgenes. When the *Clcn1* minigene was transfected into COS-7 cells, 45% of the spliced products contained exon 7A (Figure 1B). Next we expressed myc-tagged MBNL or CELF proteins with the *Clcn1* minigene and examined the patterns of *Clcn1* splicing. The expressions of MBNL and CELF proteins were confirmed by Western blot analysis using an anti-myc antibody (Supplementary Figure S6A). All three MBNL proteins strongly repressed exon 7A inclusion (Figure 1B). In contrast, CELF3, CELF4, CELF5 and CELF6 proteins significantly promoted the inclusion of 7A (Figure 1B). Remarkably, CUG-BP and ETR-3 did not alter the ratio of exon 7A inclusion (Figure 1B). These two proteins increased the unspliced product and reduced the spliced products with or without exon 7A (Figure 1C).

CELF4 and expanded CUG repeats act antagonistically against MBNL1 in the splicing regulation of *Clcn1*

We investigated whether CELF proteins can antagonize the effect of MBNL1. Among CELF proteins that promoted exon 7A inclusion in *Clcn1*, CELF4 was used for the following analyses because this protein is expressed in muscle (26,43). CELF4 and two other muscle-expressed CELF proteins, CUG-BP and ETR-3, were co-transfected with MBNL1, as well as the *Clcn1* minigene. As shown in Figure 2A, CELF4 increased the ratio of exon 7A in a dose-dependent manner (lanes 7 and 8), whereas CUG-BP or ETR-3 did not (lanes 3-6). When MBNL1 was titrated in the presence of CELF4, a decrease in exon 7A inclusion was observed, depending on the dosage of MBNL1 (Figure 2A, lanes 9-11). These results demonstrate that MBNL1 and CELF4, but not CUG-BP or ETR-3, can regulate *Clcn1* exon 7A splicing in an antagonistic manner.

We also examined DMPK constructs harboring either CTG18 (DM18) or interrupted CTG480 (DM480) in the 3'-UTR. When these constructs were expressed with the *Clcn1* minigene, DM480 increased exon 7A inclusion, whereas DM18 showed little effect (Figure 2B, left). These constructs were next expressed in the presence of MBNL1. As shown previously, MBNL1 alone strongly repressed the inclusion of exon 7A. DM480 reversed the repression of exon 7A inclusion by MBNL1, whereas DM18 did not (Figure 2B, right). Thus, expanded CUG repeats can antagonize the effect of MBNL1 on *Clcn1* splicing.

Finally, we performed knockdown experiments using vector-based RNAi to examine whether the regulation of *Clcn1* splicing is dependent on the dose of endogenous MBNL1 or CUG-BP. The RNAi vector used here expresses an artificial microRNA that is exactly complementary to a region of its target gene, leading to degradation of the target mRNA. For RNAi experiments, we utilized Neuro2a and HeLa cells rather than COS-7 because of the availability of cDNA sequence information essential for the design of microRNA. First, the overexpression of MBNL1 in Neuro2a cells strongly repressed the inclusion of exon 7A as in COS-7 cells (M, Figure 2C).
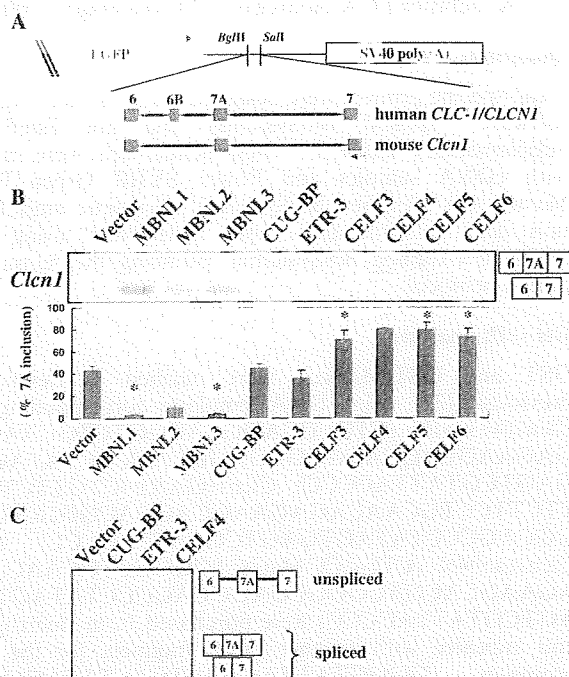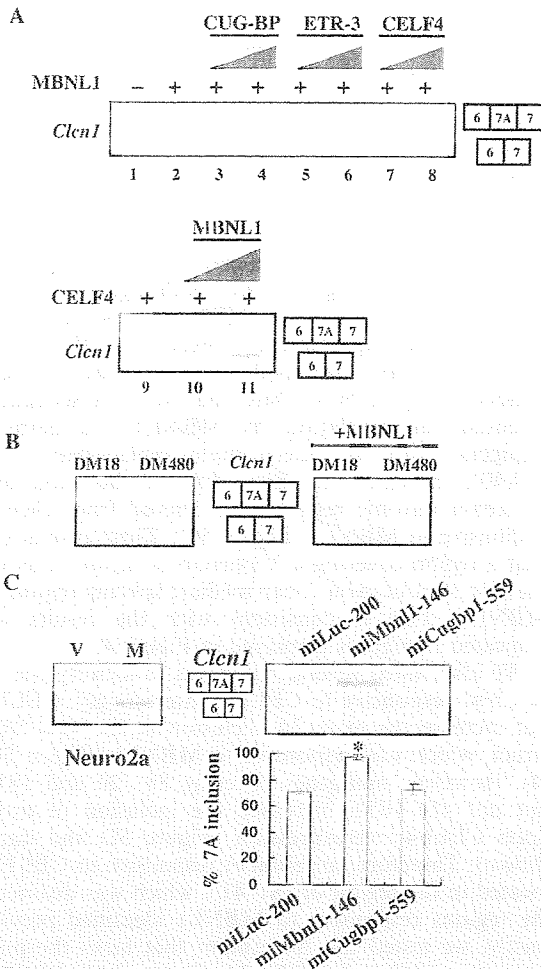
Figure 2. MBNL1 is antagonized by CELF4 and expanded CUG repeats. (A) Antagonistic effects of CELF4 against MBNL1 in the splicing regulation of *Clcn1*. *Clcn1* minigene was co-transfected with MBNL1 or MBNL1 plus CELF protein into COS-7 cells. Upper panel: lane 1 the pattern of empty vector-transfected cells; lanes 2–8, a constant amount of MBNL1-encoding vector and increasing amounts of one of the CELF-encoding vectors were co-transfected at ratios of 1:0 (lane 2), 1:1 (lanes 3, 5 and 7) and 1:3 (lanes 4, 6 and 8). Lower panel: similarly a CELF4-encoding vector and MBNL1-encoding vector were transfected at ratios of 1:0 (lane 9), 1:1 (lane 10) and 1:3 (lane 11). The total amount of transfected plasmids was held constant by adjusting the amounts of empty vector. (B) Effects of an expanded CUG repeat on the chloride channel splicing. *Clcn1* minigene was transfected with an expression vector of DMPK harboring a normal (DM18) or expanded (DM480) CTG repeat (left panel). Either normal or expanded DMPK vector was co-transfected with MBNL1 and the *Clcn1* minigene, and the splicing patterns were analyzed (right panel). (C) Results of *Clcn1*-splicing assays in Neuro2a cells. MBNL1-mediated repression of exon 7A inclusion in Neuro2a cells (left). 'V' and 'M' indicate empty vector and MBNL1, respectively. Note that the basal inclusion of exon 7A in Neuro2a cells was higher than that in COS-7 cells. *Clcn1*-splicing regulation was affected by RNAi of Mbnl1 but not Cugbp1 in Neuro2a cells (right). Bar chart shows the quantified results of exon 7A inclusion (mean ±SD, *n* 4). According to ANOVA and Dunnett's test, miMbnl1-146 induced a statistically significant increase of exon 7A compared to miLuc-200 (*P* < 0.0001), whereas miCugbp1-559 did not (*P* 0.36).

An RNAi vector miMbnl1-146 was effective in reducing both Mbnl1 and Mbnl2 and increased the inclusion of *Clcn1* exon 7A compared to a control vector miLuc-200 (Figure 2C and Supplementary Figure S1). Another RNAi vector, miMbnl1-236, also increased exon 7A inclusion (data not shown). We also used HeLa cells for RNAi experiments and found that the knockdown of MBNL1 resulted in an increase in exon 7A inclusion (Supplementary Figure S2). Therefore, the splicing of *Clcn1* exon 7A is regulated by MBNL in a dose-dependent manner In contrast, an effective RNAi vector targeting endogenous Cugbp1, miCugbp1-559, did not alter exon 7A splicing (Figure 2C and Supplementary Figure S1). We were not able to confirm the knockdown of endogenous Etr-3/Cugbp2 and Celf4 because of very low or undetectable endogenous expression in the cell lines used in this study (data not shown); thus, the RNAi of Etr-3 and Celf4 was not tested in the splicing analysis.

Involvement of the exon 7A sequence in the splicing regulation by MBNL1

To understand the mechanism by which MBNL1 represses the inclusion of *Clcn1* exon 7A, we tried to define the regions of the *Clcn1* minigene that are responsive to MBNL1 For this purpose, we examined a series of *Clcn1*deletion mutants lacking a region in either introns 6 or 7A (Δ1–Δ9, Figure 3A). As shown in Figure 3B, deletions in intron 6 altered the basal splicing pattern. For example, the Δ1 mutant exhibited increased inclusion of exon 7A, suggesting the presence of an element in the deleted region that represses exon 7A inclusion. However, this mutant and the other intron 6 mutants (Δ2–Δ5) were strongly repressed by MBNL1 (Figure 3B, upper panel). Similarly, the series of intron 7A mutants did not lose responsiveness to MBNL1 (Δ6–Δ9, Figure 3B). Thus, large portions of these intronic regions could be excluded from the region critical for responsiveness to MBNL1

Next we examined another series of deletion mutants (Figure 4A, left). When minigene 6-7A was expressed with the empty vector, both spliced and unspliced products were observed (Figure 4A). Co-expression with MBNL1 resulted in the repression of splicing (Figure 4A). In the case of 7A-7, the expression of MBNL1 did not cause a significant change compared to that of the empty vector (Figure 4A). To examine whether the responsiveness of 6-7A was dependent on the sequence of exon 7A, we analyzed the 6/7 mutant, in which the sequence of exon 7A was virtually replaced with that of exon 7 Interestingly, this replacement completely abolished the responsiveness to MBNL1 (Figure 4A, right panels). The observed loss of response in the 6/7 mutant was not due to inefficient basal splicing of exon 7, because replacement of the first 12 nt of exon 7 in the 6/7 mutant with an exonic-splicing enhancer (ESE) markedly increased the spliced products but did not improve the responsiveness to MBNL1 (Supplementary Figure S3). Thus, exon 7A should contain at least part of the MBNL1-responsive region. In addition, intron 6 alone was insufficient for response to MBNL1 To further