

199860375A

平成10年度厚生科学研究費補助金
(脳科学研究事業)

福山型先天性筋ジストロフィーの
病態解明に関する研究

(課題番号 H10-脳-024)

研究報告書

主任研究者

戸田 達史

(東京大学医科学研究所)

福山型先天性筋ジストロフィーの病態解明に関する研究

主任研究者 戸田 達史 東京大学医科学研究所 助教授

研究要旨 福山型先天性筋ジストロフィー(FCMD)原因遺伝子を特定し、ゲノム構造を決定した。FCMDはレトロトランスポゾンの挿入が遠い祖先から伝わった疾患であった。強制発現の結果とアミノ酸構造予測により、フクチンは細胞外に存在する蛋白質であることが示唆された。その後FCMD患者において多数のフクチン遺伝子変異が見い出されたことは、この遺伝子が本疾患の原因遺伝子であるということを強く支持し、レトロトランスポゾン挿入と点変異との複合ヘテロの患者は重症の傾向を示していた。FCMD骨格筋では細胞外マトリックス蛋白と考えられる180kDa蛋白(p180)が欠損していることを見出した。マウスFcmd遺伝子の翻訳開始コドンを含むエクソンを欠損させたノックアウトマウス作製は、F1ヘテロ変異マウス作製過程に至った。さらに、マウスFcmd遺伝子がヒトFCMD遺伝子の9q31のシンテニー領域である第4番染色体上のD4Mit111の近傍に位置することを明らかにした。新たに10例のFCMD生検筋をバンク入りさせた。FCMD骨格筋はnon-FCMD筋に比し結合織の増生が病初期からあり、それが病態を説明する鍵を握っていると考えられた。遺伝子発現をみる限り再生には欠陥はなかった。急速凍結ディープエッチレプリカ法により作成した試料を、電子顕微鏡内で傾斜撮影することにより、溶液中あるいは細胞内の蛋白質の高分解能の3次元像を得ることを可能にした。

分担研究者氏名

松村 喜一郎（帝京大学医学部神経内科・助教授）
片山 榮作（東京大学医科学研究所・助教授）
埜中 征哉（国立精神・神経センター 武蔵病院・院長）
堀江 正人（大塚製薬㈱大塚GEN研究所・室長）

A. 研究目的

福山型先天性筋ジストロフィー（FCMD）は、福山によって報告・確立された先天性筋ジストロフィーの一型であり、重度の筋ジストロフィーに脳奇形を伴う常染色体劣性遺伝性神経筋疾患である。その頻度は我が国の筋ジストロフィーの中ではデュシャンヌ型に次いで多く我々の約80人に1人が保因者である。患児は生涯歩行不能であり、同時に精神発達遅延を伴い、多くは20歳以前に死亡する難病である。また、本症の脳病変は神経細胞遊走障害による脳奇形と考えられ、本症の原因遺伝子産物は脳で働く未知の機能分子である。我々は本症原因遺伝子が第9番染色体長腕31領域に存在することを初めて見出した。さらに我々はポジショナルクローニング法により、遺伝子の同定を行った。本研究では、さらに進めて抗体作成、生化学的解析、形態学的解析、ノックアウトマウス、結合蛋白など遺伝子産物の局在・機能解析を行い、本症の骨格筋の病態や脳細胞の遊

走の機構について解明し、治療法を確立することを目的とする。

B. 研究方法、研究結果

（1）福山型先天性筋ジストロフィー原因遺伝子

我々は病気の創始者は1人でありそれが全国に広がったこと、日本のFCMD変異はそれ以外に数回起きたこと、FCMD患者の95%以上が予想領域にDNA insertionを持つことを報告してきた。このinsertionプローブをもとにcDNAライブラリーから得られた候補cDNAにおいて、患者における変異を発見し、福山型遺伝子を同定し、遺伝子産物をフクチンと命名した。FCMDcDNAは7349bp、フクチンは461アミノ酸からなる。

87%のFCMD染色体が単一の創始者由来と思われる同一のハプロタイプを示し、これらの創始者由来染色体にあるフクチン遺伝子の3'非翻訳領域内には、約3kbのレトロトランスポゾンのinsertionが存在することでmRNA量が著しく低下していることがわかった。また、このinsertionを示す染色体以外においては、exon3でのノンセンス変異(C250T→Arg47Stop)、exon4での2塩基の欠失によるフレームシフト変異(298-299delAT, Met63Val→75Stop)の2種類が見い出されている。

FCMDはレトロトランスポゾンの挿入が遠い祖先から伝わった初めての疾患であった。

(2) 福山型の祖先について

共通ハプロタイプが1世代ごとに組換えにより失われる確率（もし仮にDNA多型マーカーが病気の遺伝子から0.2cM=200kb離れていると、1世代につき0.2%失われる、n世代たった現在患者の80%が共通パターンをもっているとすると、およそ $(1-0.002)^n=0.80$ が成り立つ）から計算すると、この創始者は約100世代前、1世代20~25年として約2000-2500年前に存在していたと推定された。

この時期はちょうど日本では縄文時代から弥生時代に移行するところである。この祖先のレトロトランスポゾン挿入変異が、すでに日本に住んでいる縄文人に起きたか、あるいは弥生時代に大陸から渡ってきた渡来人が運んできたのであろう。今後の東アジア各地域のレトロトランスポゾン挿入変異の検索が興味深い。

(3) 遺伝子産物フクチン

フクチンは、461アミノ酸（分子量53.7kD）から成り、データベース検索では既知の蛋白質とは相同性を示さない、機能未知の新規蛋白質である。また、構造予測では、フクチンはN末端に分泌シグナル配列をもち、膜貫通ドメインをもたず、また他のオルガネラへの移行シグナルももっていなかった。細胞外に存在する蛋白質であることが考えられた。

合成ペプチドとGST融合蛋白質を含む10種類以上の抗原に対し、ポリクローナル抗体およびモノクローナル抗体の作成を試みたが、いまだにフクチン特異的な抗体は得られていない。そこで培養細胞（筋芽細胞C2C12細胞、COS-7細胞）を用い、フクチンのC末端にGFP（green fluorescent protein）を融合させた蛋白質または、HAタグをつけた蛋白質を強制発現させ、フクチンの局在を解析した。いずれの強制発現細胞においてもフクチンはゴルジ系に観察されたが、多くの筋ジストロフィー原因蛋白質が局在する細胞膜には見られなかった。また、免疫沈降法により、細胞培養液中にもフクチンが認められた。以上の結果と構造予測により、フクチンは細胞外に存在する蛋白質であることが示唆された。

つまり、患者脳や筋の基底膜のひ薄化・断裂という最近の研究も併せて、フクチンは細胞外基質にあって筋鞘膜複合体に結合している可能性がある。

(4) 福山型先天性筋ジストロフィー遺伝子のゲ

ノム構造の解析

FCMD遺伝子を含むコスミドコンテイングから5つのコスミドを選び、ショットガンシーケンシング法にて塩基配列を決定した。FCMD遺伝子のエクソン、イントロンを調べた結果、FCMD遺伝子はゲノム上の約100kbの領域にまたがり、そのcDNAは10個のエクソンからなっていた。エクソンは最大で6066bp（エクソン10）であり、最小で60bp（エクソン3）であった。またFCMD遺伝子のエクソン1の約10kbと約40kb上流（セントロメア側）にESTのクラスターを認め、2つの発現遺伝子と考えられた。全体的に比較的L1が豊富な塩基配列をしていた。

(5) 遺伝型-重症度の関連

解析症例数増加に伴い、創始者ハプロタイプは同様に約85%で認められるものの、それ以外のハプロタイプを示す症例も増加してきた。一方、FCMDの臨床像には多様性があり、広い臨床的スペクトラムを持つ疾患であることが提唱されつつある。新たなフクチン遺伝子変異を検索するとともに、その臨床症状との関連についても検討を試みた。

insertionをヘテロに持つ患者を解析したところ、新たに4家系4種類の変異が見い出された。症例1: intron7におけるL1リピートinsertion, 症例2: exon6でのミスセンス変異(T859G → Cys250Gly), 症例3: exon9での1塩基挿入によるフレームシフト変異(1279insA, Phe390Ile → 403Stop), 症例4: exon7でのノンセンス変異(T1017A → Cys302Stop), であった。症例1は定額不完全なFCMD重症例、症例2は坐位保持困難な比較的重症例、症例3は小眼球、瞳孔膜遺残を合併し、Walker-Warburg症候群(WWS)との鑑別が困難だった重症例、症例4は典型例であった。すでに報告したexon3でのノンセンス変異の患者(7例)は全例重症例であり、exon4でのフレームシフト変異の患者も定額未獲得の重症例であった。また、insertionを全く持たない患者でも同様の解析を進めているが、興味深いことに1種類として(つまり片アレルだけでも)点変異を有する症例は未だ見つかっていない。

(6) 福山型先天性筋ジストロフィーにおける欠損蛋白p180の解析

松村、砂田は福山型先天性筋ジストロフィーにおいては何らかの細胞外マトリックス蛋白の欠損が発症に関与していると考え、免疫生化学的手法を用いて欠損蛋白の同定を試みた。まず、強アル

カリ条件で可溶化した骨格筋細胞外マトリックス成分に対する単クローン抗体を作製し、その中からFCMD骨格筋における欠損蛋白を認識する抗体を確立した。この抗体はヒト骨格筋のウエスタンブロット解析で、分子量180 kDsの蛋白(p180)を認識した。またFCMD骨格筋ではp180が欠損していた。p180の欠損はFCMDに特異的にみられ、その病態に関与することが示唆される。

(7) FCMDノックアウトマウスの作製

堀江は福山型先天性筋ジストロフィー原因遺伝子FCMDのノックアウトマウス作製用遺伝子ターゲットベクターをマウスES細胞に導入し、相同組換えにより一方のFcmd遺伝子座が不活性化されたES細胞株を樹立した。このES細胞株を用いてキメラマウス及びF1ヘテロ変異マウスの作製を行った。また、Radiation Hybrid Panelを用いた解析により、マウスFcmd遺伝子が第4番染色体上のDNAマーカーD4Mit111の近傍に位置することが明らかとなった。

(8) 福山型先天性筋ジストロフィーの臨床、病理学的解析

塾中は福山型先天性筋ジストロフィー研究を推進するために本症の生検筋のバンク (research resource bank) を目指し、1998年末までに164検体をバンク入りさせた。

本症の病理発生をみるため非福山型生検筋との病理学的比較検討を行ったところ、福山型では病早期からの結合織の増生がみられるのが特異的であった。この結合織の増生は再生遅延によることが一つの要因と考えられるが、筋発生分化誘導遺伝子 (*myoD*, *myogenin*) の発現は正常であった。

(9) 遺伝子産物の超微形態解析

福山型先天性筋ジストロフィーの原因遺伝子産物は、そのアミノ酸配列から、膜蛋白あるいは細胞外蛋白質である可能性が示唆されている。その構造解析に用いる予定の急速凍結フリーズレプリカ電子顕微鏡法は、高い空間・時間分解能で個々の分子の実像を与える強力な手法であり、溶液中、細胞内のいずれの蛋白質分子にも柔軟に適用できるという極めてユニークな特長を有する。この方法で得られる像に含まれる構造情報を十分に活用するため、片山は、電子顕微鏡内で傾斜撮影された一連の像から、対象分子の3次元像再構成を行うことを目指している。昨年度までに試みた逆投影法に加え、全く別原理に基づく、より精度の高い新手法を開発中である。

C. 考察

FCMDはレトロトランスポゾンの挿入が遠い祖先から伝わった初めての疾患であった。FCMD遺伝子の発見は、筋ジストロフィーの病態解明、治療法の開発だけでなく、脳の発生の理解にも貴重な一歩となることは明らかである。

強制発現の結果とアミノ酸構造予測により、フクチンは細胞外に存在する蛋白質であることが示唆された。つまり、患者脳や筋の基底膜のひ薄化・断裂という最近の研究も併せて、フクチンは細胞外基質にあって筋鞘膜複合体に結合している可能性がある。

またその後FCMD患者において多数のフクチン遺伝子変異が見い出されたことは、この遺伝子が本疾患の原因遺伝子であるということ強く支持する。レトロトランスポゾンinsertionと点変異とのcompound heterozygoteの表現型は重症の傾向を示していたのは、レトロトランスポゾンinsertionではフクチン蛋白はRNAが不安定といっても微量に存在しうるが、点変異によりtruncateされたフクチンは全く機能しないため、点変異が入ったほうが全体の蛋白量はより少なくなるためと考えられる。

小眼球、瞳孔膜遺残を合併するWWS類似症例にもFCMD変異が証明されたことは、本疾患のより広い臨床的スペクトラムを示唆した。insertionを全く持たない患者が別の先天性筋ジストロフィーとすれば、点変異を2つ有する症例は、胎生致死である可能性も推測される。

さらにFCMD骨格筋ではM1抗体で検出される180kDa蛋白(p180)が欠損していることをみいだした。p180は、界面活性剤だけでなくpH12という強アルカリ条件、およびEDTA存在下で可溶化されることから、膜貫通蛋白integral membrane proteinではなくCa²⁺依存性細胞外マトリックス蛋白であると推測される。フクチンの推定分子量(53.6kDa)を考慮すると、p180がフクチン自体である可能性は低いと思われる。われわれはp180がフクチン結合蛋白でありFCMD筋で二次的に欠損しているのではないかと推察している。今後フクチンの生理機能の解明、FCMDの病態の解明の上からもp180の同定が必要であると思われる。

またノックアウトマウス作製の過程において今回行ったRadiation Hybridマッピングの結果、Fcmd遺伝子がD4Mit111より約11 cRの位置にあることが明らかとなったが、現時点において、このDNAマーカーの近傍にマップされている自然発

生変異マウスはおらず、福山型先天性筋ジストロフィーのモデルマウス作製におけるジーンターゲットングの必要性が再確認された。

一方で今後の研究を推進するため、FCMDの生検筋をバンク入りさせている。FCMD、non-FCMD生検筋を比較検討すると、同じ先天性筋ジストロフィーでありながら、FCMD筋には早期から結合織の増生がみられる。このことはFCMD筋には早期から間質の異常を来すので細胞外マトリックスに何らかの一時的変化が存在する可能性、再生の遅延の可能性を示唆する。再生に関しては筋発生分化誘導遺伝子の発現をみたが、FCMD筋でその発現が抑制されている所見はなかった。ただ数量的検討はしていないので、その必要性があり、今後研究を進める予定である。

急速凍結ディープエッチ・レプリカ法は、一瞬に凍結固定された生体試料の表面の凹凸の情報を高いコントラストの電子顕微鏡像として直接観察することのできるユニークな方法である。溶液中の蛋白質でも細胞内の構造でも同様に、これほどの高い空間分解能で観察できる方法は他に例を見ない。われわれはさらに、レプリカ試料が本質的に2次元物体であることを利用して、そのような像から試料蛋白質の3次元構造を再構成することを目指し、その一連の手法の完成に向けて努力を重ねている。初期には、ステレオ像の立体視差から試料の高さの情報を得る手法でアルゴリズムを構築したが、凹凸の激しい試料では死角が生じた。そこで、より正統的に、傾斜撮影像から逆投影法を用いるコンピュータ断層法を採用して分子の立体構造を調べたが、今度は、高さ方向の分解能が不十分であった。現在、死角の影響を受けない純代数的演算による方法を従来の方法と組み合わせることで再構成することが最も実用的な方策と考えている。

D. 結論

福山型先天性筋ジストロフィー(FCMD)原因遺伝子を特定し、ゲノム構造を決定した。FCMDはレトロトランスポゾンの挿入が遠い祖先から伝わった疾患であった。強制発現の結果とアミノ酸構造予測により、フクチンは細胞外に存在する蛋白質であることが示唆された。FCMD患者において多数のフクチン遺伝子変異が見い出されたことは、この遺伝子が本疾患の原因遺伝子であるということ強く支持する。レトロトランスポゾン挿入と点変異との複合ヘテロの患者は重症の傾向を示し

ていた。

FCMD骨格筋では細胞外マトリックス蛋白と考えられる180kDa蛋白(p180)が欠損しており、発症の分子機構に関与すると思われた。

Fcmd遺伝子の翻訳開始コドンを含むエクソンを欠損させたノックアウトマウス作製は、F1ヘテロ変異マウス作製過程に至った。一方、マウスFcmd遺伝子の3'非翻訳領域置換用ターゲットングベクターを構築するため、3'非翻訳領域を含む染色体DNAクローンを新たに単離した。さらに、マウスFcmd遺伝子がヒトFCMD遺伝子が存在する9q31のシンテニー領域である第4番染色体上のD4Mit111の近傍に位置することをRHマッピングにより明らかとした。

新たに10例のFCMD生検筋をバンク入りさせ、将来の研究資源とすることとした。FCMD骨格筋はnon-FCMD筋に比し結合織の増生が病初期からあり、それが病態を説明する鍵を握っていると考えられた。遺伝子発現をみる限り再生には欠陥はなかった。

急速凍結ディープエッチレプリカ法により作成した試料を、電子顕微鏡内で傾斜撮影することにより、溶液中あるいは細胞内の蛋白質の高分解能の3次元像を得ることが可能である。われわれはその手法の完成、実用化、そして実際の試料への応用に向け努力を続けている。

E. 研究発表

1. Kobayashi K, Nakahori Y, Miyake M, Matsumura K, Kondo-Iida E, Nomura Y, Segawa M, Yoshioka M, Saito K, Osawa M, Hamano K, Sakakihara Y, Nonaka I, Nakagome Y, Kanazawa I, Nakamura Y, Tokunaga K, Toda T. An ancient retrotransposal insertion causes Fukuyama-type congenital muscular dystrophy. *Nature* 394:388-392, 1998
2. Kobayashi K, Nakahori Y, Mizuno K, Miyake M, Kumagai T, Honma A, Nonaka I, Nakamura Y, Tokunaga K, Toda T. Founder-haplotype analysis in Fukuyama-type congenital muscular dystrophy (FCMD). *Hum Genet* 103:323-327, 1998
3. Takai Y, Tsutsumi O, Harada I, Fujii T, Kashima T, Kobayashi K, Toda T, Taketani Y. Prenatal diagnosis of Fukuyama-type congenital muscular dystrophy by microsatellite analysis. *Hum Reprod* 13: 320-323, 1998
4. Saito K, Kondo-Iida E, Kawakita Y, Juan D, Ikeya K, Osawa M, Fukuyama Y, Toda T,

- Nakabayashi M, Yamamoto T, Kobayashi M. Prenatal diagnosis in eight Fukuyama type congenital muscular dystrophy families by haplotype analysis using the new markers closest to the gene. *Am J Med Genet* 26:310-316, 1998
5. Yoshioka M, Toda T, Kuroki S. Broader clinical spectrum of Fukuyama congenital muscular dystrophy manifested by haplotype analysis. In Perat MV (ed) *New Developments in Child Neurology*. Monduzzi Editore, Bologna, pp317-320, 1998
 6. Kotliarova SE, Toda T, Takenaka O, Matsushita I, Hida A, Shinka T, Goto J, Tokunaga K, Nakagome Y, Nakahori Y. Novel marker DXYS241 on the human Y chromosome shows four evolutionary event after divergence of human and chimpanzee. *Hum Biol* (in press)
 7. Voit T, Cohn RD, Sperner J, Leube B, Toda T, Herrmann R. Merosin positive congenital muscular dystrophy with transient brain dysmyelination and mental retardation. *Neuromuscul Disord* (in press)
 8. Toda T. The Fukuyama-type congenital muscular dystrophy story. *Neuromuscul Disord* (in press)
 9. Sunada Y, Saito F, Matsumura K, Shimizu T. Differential expression of the parkin gene in the human brain and peripheral leukocytes. *Neurosci Lett* 254:180-182, 1998
 10. Sasaki T, Yamada H, Matsumura K, Shimizu T, Kobata A, Endo T. Detection of O-mannosyl glycans in rabbit skeletal muscle α -dystroglycan. *Biochim Biophys Acta* 1425:599-606, 1998
 11. Saito F, Masaki T, Kamakura K, Anderson LVB, Fujita S, Fukuta-Ohi H, Sunada Y, Shimizu T, Matsumura K. Characterization of the transmembranemolecular architecture of the dystroglycan complex in Schwann cells. *J Biol Chem* (in press)
 12. Sunada Y, Saito F, Higuchi I, Matsumura K, Shimizu T. Deficiency of a 180-kDa Extracellular matrix protein in Fukuyama type congenital muscular dystrophy. (submitted)
 13. Katayama E. Quick-freeze deep-etch electron microscopy of the actin-heavy meromyosin complex during the in vitro motility assay. *J Mol Biol* 278:349-367, 1998
 14. Katayama E, Ohmori G, Baba N. Three-dimensional image analysis of myosin head as captured by quick-freeze deep-etch replica electron microscopy. In: H. Sugi & G.R. Pollack (eds), *Mechanism of Work production and work absorption in muscle*. pp.37-45. Plenum Press, 1998
 15. Shingyoji C, Higuchi H, Yoshimura M, Katayama E, Yanagida T. Dynein arms are oscillating force generators. *Nature* 393: 711-714, 1998
 16. Ikebe M, Kambara T, Stafford WF, Sata M, Katayama E, Ikebe R. A hinge at the central helix of the regulatory light chain of myosin is critical for phosphorylation-dependent regulation of smooth muscle myosin motor activity. *J Biol Chem* 273:17702-17707, 1998
 17. Tomita T, Ishikawa D, Noguchi T, Katayama E, Hashimoto Y. Assembly of flammutoxin, a cytotoxic protein from the edible mushroom *Flammulina velutipes*, into a pore-forming ring-shaped oligomer on the target cell. *Biochem J* 333:129-137, 1998
 18. Ito K, Liu X, Katayama E, Uyeda TQP. Cooperativity between two heads of dictyostelium myosin II in in vitro motility and ATP hydrolysis. *Biophys J* 76:985- 992, 1999
 19. Nonaka I. Animal models of muscular dystrophies. *Lab Animal Sci* 48:8-17, 1998
 20. Hagiwara Y, Ishii A, Nonaka I, Kikuchi T, Takeda S. Fiber-type-dependent expression of adenovirus-mediated transgene in mouse skeletal muscle fibers. *Acta Neuropathol* 96:228-232, 1998
 21. Nonaka I, Murakami N, Suzuki Y, Kawai M. Distal myopathy with rimmed vacuoles. *Neuromuscul Disord* 8:333-337, 1998
 22. Kubo S, Tsukahara T, Yakemitsu M, KB Yoon, Utsumi H, Nonaka I, Arahata K. Presence of emerinopathy in cases of rigid spine syndrome. *Neuromuscul Disord* 8:502-507, 1998
 23. Horie M, Okutomi K, Taniguchi Y, Ohbuchi Y, Suzuki M, Takahashi E. Isolation and characterization of a new member of the human Ly6 gene family (LY6H). *Genomics* 53:365-368, 1998
 24. Shimada Y, Saito A, Suzuki M, Takahashi E, Horie M. Cloning of a novel gene (ING1L) homologous to ING1, a candidate tumor suppressor. *Cytogenet Cell Genet* (in press)

厚生科学研究費補助金（脳科学研究事業）
分担研究報告書

福山型先天性筋ジストロフィーにおける欠損蛋白の解析

分担研究者 松村喜一郎 帝京大学医学部神経内科助教授

研究要旨

われわれは福山型先天性筋ジストロフィーにおいては何らかの細胞外マトリックス蛋白の欠損が発症に関与していると考え、免疫生化学的手法を用いて欠損蛋白の同定を試みた。まず、強アルカリ条件で可溶化した骨格筋細胞外マトリックス成分に対する単クローン抗体を作製し、その中からFCMD骨格筋における欠損蛋白を認識する抗体を確立した。この抗体はヒト骨格筋のウエスタンブロット解析で、分子量180 kDsの蛋白(p180)を認識した。またFCMD骨格筋ではp180が欠損していた。p180の欠損はFCMDに特異的にみられ、その病態に関与することが示唆される。

A. 研究目的

福山型先天性筋ジストロフィーにおける分子発症機構を解明する目的で、骨格筋における欠損蛋白の同定を試みた。

B. 研究方法

単クローン抗体の作製：ウサギ骨格筋pH12抽出分画(細胞外マトリックス蛋白を含む)でbalb/cマウスを免疫し、その脾細胞をマウスミエローマ細胞と融合させたハイブリドーマを作製した。その中からsarcolemmaを免疫染色するクローンを選別した。

免疫組織化学：ヒト生検骨格筋(FCMD3例、対照3例)より凍結切片を作製し、FITC標識抗マウス二次抗体を用いて間接免疫蛍光染色を行った。

生検筋のウエスタンブロット解析：FCMD 2例、対照 2例について、凍結切片を20 vol.のBuffer Aでhomogenizeし、遠心後pelletの2% Triton-X100/Buffer Aの可溶化画分をウエスタンブロット解析した。

C. 研究結果

得られた単クローン抗体の一つM1抗体を用いると対照ヒト骨格筋凍結切片ではsarcolemmaに一致した免疫染色がみられた。ところが3例のFCMD生検筋においては全例でsarcolemmaの免疫染色性が著減していた。

次いで、ヒト対照骨格筋よりpH12アルカリ抽出分画を調整し、M1抗体を用いてウエスタンブロット解析を行ったところ分子量180kDaの蛋白(p180)が検出された。このp180は10mM EDTAあるいは2% Triton-X 100存在下でも可溶化された。一方、非還元状態で電気泳動を行った場合にはウエスタンブロット解析で、p180は検出されなかった。そこで、FCMD 2例の筋生検材料および2例の対照筋生検材料より2% Triton-X100可溶化分画を調整し、M1抗体を用いてウエスタンブロッ

ト解析を行った。FCMD 2例とも、対照に比べてp180の発現が著減していた。

D. 考察

われわれはFCMD骨格筋ではM1抗体で検出される180kDa蛋白(p180)が欠損していることをみいだした。p180は、界面活性剤だけでなくpH12という強アルカリ条件、およびEDTA存在下で可溶化されることから、膜貫通蛋白integral membrane proteinではなくCa²⁺依存性細胞外マトリックス蛋白であると推測される。fukutinの推定分子量(53.6kDa)を考慮すると、p180がfukutin自体である可能性は低いと思われる。われわれはp180がfukutin結合蛋白でありFCMD筋で二次的に欠損しているのではないかと推察している。今後fukutinの生理機能の解明、FCMDの病態の解明の上からもp180の同定が必要であると思われる。

E. 結論

FCMD骨格筋では細胞外マトリックス蛋白と考えられる180kDa蛋白(p180)が欠損しており、発症の分子機構に関与すると思われる。

F. 研究発表

1. 論文発表

Sunada Y. et al. Deficiency of a 180-kDa extracellular matrix protein in Fukuyama type congenital muscular dystrophy skeletal muscle. (投稿中)

2. 学会発表

Sunada Y. et al. A 180-kDa protein is deficient in FCMD skeletal muscle. IX International Congress on Neuromuscular Diseases (Adelaide), 1998

福山型先天性筋ジストロフィの病態解明に関する研究

分担研究者 片山 栄作 東京大学医科学研究所 微細形態学研究部 助教授

研究要旨： 福山型筋ジストロフィの原因遺伝子産物は、そのアミノ酸配列から、膜蛋白質あるいは分泌型蛋白質である可能性が示唆されている。その構造解析に用いる予定の急速凍結フリーズレプリカ電子顕微鏡法は、高い空間・時間分解能で個々の分子の実像を与える強力な手法であり、溶液中、細胞内のいずれの蛋白質分子にも柔軟に適用できるという極めてユニークな特長を有する。この方法で得られる像に含まれる構造情報を十分に活用するため、われわれは、電子顕微鏡内で傾斜撮影された一連の像から、対象分子の3次元像再構成を行うことを目指している。昨年度までに試みた逆投影法に加え、全く別原理に基づく、より精度の高い新手法を開発中である。

A. 研究目的

戸田らのグループにより、福山型筋ジストロフィの原因遺伝子に由来する蛋白質のアミノ酸配列は決定されたが、その生理的機能は全く不明であり、細胞内における局在部位も未だ確定していない。本研究における分担者の役割は、細胞内や溶液中における問題の分子の構造を、急速凍結ディープエッチレプリカ電子顕微鏡を駆使して高分解能で観察することであるが、現時点ではまだそのような手法の活用できる段階には至っていない。急速凍結電子顕微鏡法によれば、立体構造を良く保った1個1々の蛋白質の像を、約1ミリ秒の時間分解能と1 nmの空間分解能で、しかも高いコントラストで得ることができる。さらにそれらは、表面像であるため、溶液中はもちろん、細胞内における蛋白質分子でさえ直接観察できるという大きな特長を有し、ひとたび遺伝子産物の分子の特定ができれば、本研究における構造解析の手段として大きな力を発揮するものと期待される。その日に備え、昨年度は、近い将来得られるはずの遺伝子産物の構造解析に役立つ新しい3次元画像解析法の開発を進めた。レプリカ試料中の特定の対象の電子顕微鏡写真を広い角度範囲にわたって撮影し、逆投影法を用いて3次元像

を再構成することによりかなり良い結果は得られたものの、いわゆる“missing cone”の影響により高さ方向の像の伸びを生じ、最終分解能には未だ不満を残すものであった。逆投影法を用いる限りその問題は避けられない。そこで本年度は、これまでと全く異なる原理に基づく新たなプログラムを開発し、昨年度までの方法と併せて、実用的な一連の手法を確立することを目指した。

B. 研究方法

急速凍結ディープエッチレプリカ法により得られた像から3次元再構成を行う一連の処理行程の試験材料として、筋収縮や多くの細胞運動において張力の発生を担うミオシン分子を選んだ。特に、滑り運動中のアクトミオシン複合体における個々のミオシンクロスブリッジの示すさまざまな構造の解析は他の手段ではまず絶対に不可能と考えられ、それ自体が有用な研究対象である。実際には、マイカ細片にアクトミオシンを吸着させ、そのまま、あるいはATPを加えて滑り運動を起こした状態で液体ヘリウムにより急速凍結した。フリーズエッチング装置を用い、凍結試料にシャドウィングを施して作成したレプリカを電子顕微鏡に挿入し、傾斜撮影用ゴニ

オメータにより、同一部位の像を -50° ~ $+50^{\circ}$ の傾斜角の範囲で 5° 毎に撮影した。次に、同一視野の一連の像を、広い階調をもつ冷却 CCD カメラによりデジタル化してコンピュータに取り込み、新開発のプログラムにより傾斜軸および位置補正を精密に行った後、濃度を正規化し、逆投影法を適用して各断面の濃度分布を出して3次元再構成像を得た。精密な位置補正をした像を連続表示してアニメーションにすると立体感がこのほかに良く把握できることを見出したのは有用な副産物であった。現在、2方向への投影像の濃度分布の違いに基づき純代数的演算により断面の立体形状を再構成するアルゴリズムを実行するプログラムを開発中である。

C. 研究成果

ミオシン頭部はアクチンフィラメントに結合して張力を発生するクロスブリッジの本体である。筆者は既に、滑り運動中のクロスブリッジの構造を ATP を加える前の硬直複合体と比較し、見出された大きな構造変化の様子を論文として発表している。昨年度は、単独のミオシン頭部の像から逆投影法を用いて3次元再構成を行い、X-線結晶解析によるこの蛋白質の原子モデルと対応した結果、分子内のサブドメイン構造がレプリカ像において良く認められること、そして ATP が結合したときにその配置が変化していることを示した。今年度は、上記の滑り運動中のクロスブリッジの傾斜像を多数撮影し、それらを精密に位置合わせして上記と同様に再構成することを試みたが、アクチンと結合した状況では構造が複雑に入り組んでおり、高さ方向の分解能が未だ不十分ではあった。しかし、傾斜撮影した画像を連続したアニメーションとして表示したところ見事な立体感が得られ、立体的な構築を把握することが十分可能となった。それによると、滑り中には上下 50KD ドメインのうち上位 50KD 部分の、しかもその先端のみがアクチンに結合し、これまで未知であったサブドメインの配置が明らかとなっ

た。またモータードメインに観察されるさまざまな構造の様子は、最近、滑り運動の分子メカニズムとして想定されているいわゆる lever-arm 部分の振動で説明することはかなり難しいことを示唆する結果であった。

D. 考察

急速凍結ディープエッチ・レプリカ法は、一瞬に凍結固定された生体試料の表面の凹凸の情報を高いコントラストの電子顕微鏡像として直接観察することのできるユニークな方法である。溶液中の蛋白質でも細胞内の構造でも同様に、これほどの高い空間分解能で観察できる方法は他に例を見ない。われわれはさらに、レプリカ試料が本質的に2次元物体であることを利用して、そのような像から試料蛋白質の3次元構造を再構成することを目指し、その一連の手法の完成に向けて努力を重ねている。初期には、ステレオ像の立体視差から試料の高さの情報を得る手法でアルゴリズムを構築したが、凹凸の激しい試料では死角が生じた。そこで、より正統的に、傾斜撮影像から逆投影法を用いるコンピュータ断層法を採用して分子の立体構造を調べたが、今度は、高さ方向の分解能が不十分であった。現在、死角の影響を受けない純代数的演算による方法を従来の方法と組み合わせて再構成することが最も実用的な方策と考えている。

E. 結論

急速凍結ディープエッチレプリカ法により作成した試料を、電子顕微鏡内で傾斜撮影することにより、溶液中あるいは細胞内の蛋白質の高分解能の3次元像を得ることが可能である。われわれはその手法の完成、実用化、そして実際の試料への応用に向け努力を続けている。

F. 研究発表

1. 論文発表

1) E. Katayama: Quick-freeze deep-etch electron microscopy of the actin-heavy meromyosin complex during the in vitro motility assay. *J. Mol. Biol.* 278: 349-367. (1998)

2) E. Katayama, G. Ohmori & N. Baba: Three-dimensional image analysis of myosin head as captured by quick-freeze deep-etch replica electron microscopy. In: H. Sugi & G.R. Pollack (eds), *Mechanism of Work production and work absorption in muscle*. pp.37-45. Plenum Press. (1998)

2. 学会発表

日本生物物理学会第36回年会：片山栄作，大森剛毅，小山智宏、馬場則男：急速凍結フリーズレプリカ像からの滑り運動中のクロスブリッジの3次元像再構成

福山型先天性筋ジストロフィーの臨床、病理学的解析

分担研究者 埜中征哉 国立精神・神経センター武蔵病院院長

研究主旨：福山型先天性筋ジストロフィー研究を推進するために本症の生検筋のバンク（research resource bank）を目指し、1998年末までに164検体をバンク入りさせた。本症の病理発生をみるため非福山型生検筋との病理学的比較検討を行った。福山型では病早期からの結合織の増生がみられるのが特異的であった。この結合織の増生は再生遅延によることが一つの要因と考えられるが、筋発生分化誘導遺伝子（*myoD*、*myogenin*）の発現は正常であった。

A. 研究目的

福山型先天性筋ジストロフィー（FCMD）骨格筋の病態を明らかにするため、生検筋のバンクを確立する。さらにその病理学的特徴を非福山型先天性筋ジストロフィーの病理と比較し明らかにする。

B. 研究方法、結果

- 1) 生検筋バンクの確立：臨床的にFCMDと診断された症例の生検筋を凍結保存し、将来の研究資源とした。
- 2) FCMD 100例、非福山型先天性筋ジストロフィー（non-FCMD）100例の骨格筋病変の相違を比較検討した。特に再生に着目し、代表例5例ずつを選び筋発生分化誘導遺伝子 *myoD*、*myogenin* の発現を免疫組織化学的にみた。

C. 研究結果

1) 生検筋バンクの確立

1998年1年間で新たに10例のFCMD生検筋をバンク入りさせた。国立精神・神経センターには過去に154例のFCMD筋が存在したので合計164例の検体がバンク入りした。フクチン遺伝子がクローニングされたので、今後この蛋白の局在、機能を明らかにする研究に役立てたい。

2) FCMD、non-FCMD 骨格筋病変の比較検討

FCMD筋では活発な壊死、再生と病初期からの強い結合織の増生があった。一方 non-FCMD は一般的に軽く、壊死線維の存在はなく再生繊維のみ認められる例も存在した。結合織の増生は軽く、以上の所見は臨床的な軽症さを反映していた。

myoD、*myogenin* とも両方で発現していた。壊死、再生が活発なFCMDの筋に両遺伝子の発現は強くみられた。現在再生を指標とするタイプ2C線維の頻度と両遺伝子発現陽性線維の数量的検討を行っている。

D. 考察

FCMDは主任研究者戸田らによりクローニングされ、その責任蛋白はフクチン（fukutin）と命名された。まだその局在、機能は明らかにされていない。今後の研究を推進するため、FCMDの生検筋をバンク入りさせている。

FCMD、non-FCMD生検筋を比較検討すると、同じ先天性筋ジストロフィーでありながら、FCMD筋には早期から結合織の増生がみられる。このことはFCMD筋には早期から間質の異常を来すので細胞外マトリックスに何らかの一時的変化が存在する可能性、再生の遅延の可能性を示唆する。再生に関しては筋発生分化誘導遺伝子の発現をみたが、FCMD筋でその発現が抑制されている所見はなかった。ただ数量的検討はしていないので、その必要性があり、今後研究を進める予定である。

E. 結論

新たに10例のFCMD生検筋をバンク入りさせ、将来の研究資源とすることとした。FCMD骨格筋はnon-FCMD筋に比し病初期があり、それが病態を説明する鍵を握っていると考えられた。遺伝子発現をみる限り再生には欠陥はなかった。

F. 研究発表

1) 論文発表

・ Jin Y, Murakami N, Saito Y, Nonaka I: *MyoD* and *myogenin* expression in human neuromuscular disorders. Acta Neuropathol (submitted)

2) 学会発表

・ 神裕子、村上信行、斎藤陽子、埜中征哉：進行性筋ジストロフィーにおける *myoD* および *myogenin* の発現について 第39回小児神経学会1998.6

分担研究者 堀江 正人 大塚GEN研究所 ゲノム機能解析室室長

研究要旨 福山型先天性筋ジストロフィー原因遺伝子FCMDのノックアウトマウス作製用遺伝子ターゲティングベクターをマウスES細胞に導入し、相同組換えにより一方のFcmd遺伝子座が不活性化されたES細胞株を樹立した。このES細胞株を用いてキメラマウス及びF1ヘテロ変異マウスの作製を行った。また、Radiation Hybrid Panelを用いた解析により、マウスFcmd遺伝子が第4番染色体上のDNAマーカーD4Mit111の近傍に位置することが明らかとなった。

A. 研究目的

ジーンターゲティングにより福山型先天性筋ジストロフィーの疾患モデルマウスを作製し、筋ジストロフィー発症のメカニズムをin vivoにて精査する。

B. 研究方法

昨年度単離したマウスFcmd染色体DNAクローンを用いて、翻訳開始コドンを含むエクソンを相同組換えにより欠損させる遺伝子破壊用ターゲティングベクターを作製する。このFcmd遺伝子ターゲティングベクターをマウスES細胞に導入し、Fcmd遺伝子座を不活性化したES細胞を樹立する。このES細胞由来キメラマウスを作製し、交配によりヘテロ変異マウスおよびホモ変異マウスを作製する。さらに、ヒトFCMD遺伝子3'非翻訳領域のレトロトランスポゾンマウスFcmd遺伝子の3'非翻訳領域に挿入し、福山型先天性筋ジストロフィー患者と同じ変異を持つマウスを作製する。また、マウスRadiation Hybrid (RH) Panel (Research Genetics社)を用いて、マウスFcmd遺伝子の染色体上のマップポジションを決定し、既存の自然発生変異マウスのマップポジションと比較することで、マウスFcmd遺伝子の自然発生変異マウスへの関与を検討する。

C. 研究結果

Fcmd遺伝子ターゲティングベクターを構築し、相同組換えにより一方のFcmd遺伝子座が不活性化されたES細胞株を樹立した。このES細胞をC57BL/6Jマウス由来の胚盤胞に注入し、キメラマウスを作製した。雄キメラマウスと雌C57BL/6Jとの交配により、FCMD遺伝子の片方の遺伝子座が不活性化されたF1ヘテロ変異マウスを作製した。さらに、遺伝子ターゲティングによりマウスFcmd遺伝子の3'非翻訳領域にヒトFCMD遺伝子3'非翻訳領域のレトロトランスポゾンを挿入するため、3'非翻訳領域を含むマ

ウスFcmd染色体DNAクローンを単離した。また、マウスFcmd遺伝子の翻訳開始コドンを含むエクソンを増幅するプライマーセットを用いてRHマッピングを行った結果、この遺伝子がマウス第4番染色体上のDNAマーカーD4Mit111より約11 cRの位置に存在することが明らかとなった。

D. 考察

今回行ったRHマッピングの結果、Fcmd遺伝子がD4Mit111より約11 cRの位置にあることが明らかとなったが、現時点において、このDNAマーカーの近傍にマップされている自然発生変異マウスはならず、福山型先天性筋ジストロフィーのモデルマウス作製におけるジーンターゲティングの必要性が再確認された。

E. 結論

Fcmd遺伝子の翻訳開始コドンを含むエクソンを欠損させたノックアウトマウス作製は、F1ヘテロ変異マウス作製過程に至った。一方、マウスFcmd遺伝子の3'非翻訳領域置換用ターゲティングベクターを構築するため、3'非翻訳領域を含む染色体DNAクローンを新たに単離した。さらに、マウスFcmd遺伝子がヒトFCMD遺伝子が存在する9q31のシンテニー領域である第4番染色体上のD4Mit111の近傍に位置することをRHマッピングにより明らかとした。

F. 研究発表

論文発表

Horie M, Okutomi K, Taniguchi Y, Ohbuchi Y, Suzuki M, and Takahashi E. Genomics 53:365-368 (1998)

Shimada Y, Saito A, Suzuki M, Takahashi E, and Horie M. Cytogenet Cell Genet, in press.

