

総括研究報告書

(3頁)

分担研究報告書

(2頁)

平成10年度

厚生科学研究費

脳科学研究事業

デュシェンヌ型及びデュシェンヌ様筋ジストロフィーの分子論的研究

主任研究員：吉田幹晴

分担研究員：笹岡俊邦

(国立精神・神経センター、神経研究所)

厚生科学研究費補助金（脳科学研究事業）

（総括・分担）研究報告書

デュシェンヌ型及びデュシェンヌ様筋ジストロフィーの分子論的研究

（主任又は分担）研究者 吉田幹晴 国立精神・神経センター神経研究所 室長

研究要旨 筋肉から抽出、精製したジストロフィンとジストロフィン結合タンパク質（DAP）の複合体（dys-DAP複合体）、これを熱処理することにより、3種類の何れもサルコグリカン（SG）複合体を含む新しい複合体を調製することに成功した。これら複合体の成分解析からSG複合体はジストログリカン（DG）複合体だけでなく、サルコスパン（25DAPの新しい名）やシントロフィン-ジストロブレピン複合体とも結合していること、即ちSG複合体が多面的に相互作用していることが明らかになった。

分担研究者 笹岡俊邦
国立精神・神経センター神経研究所 室長

A. 研究目的

本研究はデュシェンヌ型筋ジストロフィー（DMD）とデュシェンヌ様筋ジストロフィー（SCARMD又はSGP）の本体解明と治療法の開発を究極の目的とするが、当面の目的としてはこれら筋ジストロフィーの病態の分子機構を明らかにすることである。両筋ジストロフィーは原因遺伝子が異なるものの、臨床症状、病理像はともに良く似ている。この類似は両者共通して認められるSG複合体の著しい減少或いは消失に起因するに違いないと我々は考えており、従ってこの複合体の機能を理解できれば、分子機構が説明できるだろうと考えている。これまでに我々はDAPがこのSG複合体やDG複合体など3つの複合体の各成分に分類できることを示し、これらとジストロフィンの筋細胞膜上での結合様式を大まかに定めたモデルを提唱、それは広く一般に用いられてきた。しかし肝心のSG複合体がdys-DAP複合体中でどの様に存在しているのか不明であり、又4種のSGによる複合体の形成機構なども依然不明である。SG複合体の機能を理解するには、これらを明らかにすることが必要である。今年度の我々はSG複合体周辺の構造を明らか

かにする研究（吉田）、そして γ -SG欠損マウスを作成し、その表現形を明らかにする研究（笹岡）等を進め、それぞれに進展があった。

B. 研究方法

dys-DAP複合体はウサギ骨格筋の細胞膜より調製した。この複合体を一定時間、一定温度で加温し、遊離してくる複合体はSuperose 6 HR10/30又はPC3.2/30カラムを装填したスマートシステム（ファルマシア）にて分離した。

必要とされる抗体は手持ちのものや市販品も利用した。しかしサルコスパン対する抗体など多くは既知のアミノ酸配列データに基づき合成ペプチドや融合タンパク質を調製、これらをウサギに免役して新たに作成した。

C. 研究結果

1. SG複合体が結合するDAP又はこれらDAPよりなる複合体の探求

以前我々はdys-DAP複合体をオクチルグルコシドで処理することでSG複合体を発見した。しかしこの処理では、SG複合体が他のDAPといかに結合しているかといった情報は失われていた。そこでオクチルグルコシドとは別の処理を加え、dysDAP複合

体が別な形で部分解裂が起こらないか検討した。様々な方法を検討したが、その中で熱を加えて分子振動を高める方法が有効であることに気づいた。

(1) 精製dys-DAP複合体を0.1M NaCl存在下で熱処理すると分子量の小さな新しい成分が生成することを、我々はゲルろ過と非変性下でのPAGEで認めた。ゲルろ過で分離した新しいピークを回収濃縮し再度同じカラムにのせ精製した後、その試料を様々な特異抗体を用いたイムノプロットで解析した。その結果この試料からはSG複合体とDG複合体の各成分が検出され、ジストロフィンやシントロフィン、ジストロブレヴィンといったDAPは検出されなかった。従ってここで得られた成分はSG複合体とDG複合体からなる糖タンパク質複合体であることが明らかになった。サルコspanもこの成分に検出された。

(2) 次に我々はdys-DAP複合体の塩濃度を上げて(1M NaCl)同様の処理を試みた。すると(1)の成分より更に小さな分子量成分が遊離してくることに気づいた。それは解析の結果、SG複合体を主成分とすることが認められた。しかしこの他にサルコspanやシントロフィン、そしてジストロブレヴィンも検出された。ゲルろ過パターンからの検査から、これらが混入している疑いもあったので α -SGの特異抗体を用いた免疫沈降により同試料中のSG複合体精製を試みた。この処理により、SG複合体各成分の他、サルコspanもそのまま回収された。一方、シントロフィンとジストロブレヴィンについてはその含量が明らかに減少した。しかし依然明確に検出されることがわかった。この結果から我々はSG複合体とサルコspanそしてシントロフィン/ジストロブレヴィンが結合していると判断した。シントロフィン/ジストロブレヴィンが減少したのは熱処理の過程で部分的に解離したためと考えている。

(3) 我々は更に(1)で調製された糖タンパク質複合体(シントロフィン/ジストロブレヴィンを含まない)を高塩濃度下で再度熱処理することにより、4つのSGだけからなる複合体調製を試みた。

シントロフィンやジストロブレヴィンを含まないSG複合体が予想通り得られたが、サルコspanはこうした過酷な処理にも拘わらず、しっかり結合を維持していることが示された。

(4) (3)で得られたSG複合体とジストロフィンの結合の有無を調べた。ジストロフィンの代わりにその融合タンパク質を作成して結合を調べたところ、予備実験ではジストロフィン上の限定領域に選択的結合をされると思われる結果を得た。しかしその後慎重に重ねた実験では、その再現が微妙であり、従って現在結論を棚上げしている。

2. SG複合体のin vitro再構成。

SG複合体の形成機構を研究するために各SGの細胞外ドメインの融合タンパク質を作成し、そのin vitro再構成を計画した。しかし融合タンパク質の調製が想像以上に難儀しており、残念ながら未だに再構成実験に至っていない。

3. ジストロフィンとDG複合体の結合

この研究は初年度に進展があり、結果を整理して論文にまとめる予定であったが、担当者が産休に入ったこともあってまだまとめられないでいる。

D. 考察

以上の研究でSG複合体がサルコspan、そしてシントロフィン/ジストロブレヴィンと結合していることを示すことができた。またSG-サルコspan複合体がDG複合体とジストロフィンなしで結合していることも精製した生体試料を使って明確に示すことができた。我々が得た γ -SG欠損マウスではSG複合体だけでなくサルコspanの激減を認めた(笹岡、分担研究報告)。この観察は両者が強く結合していることを示した今回の結果があって初めて容易に理解できることである。以前我々が報告したSG複合体(オクチルグルコシドにて調製)にはサルコspanは含まれていなかった。このDAPの遺伝子変異が変異未特定のSGP患者に認められるかどうかに関心を持っている。

SG複合体のうち3成分はC端部にEGFレセプター様のシステインクラスターを持っていてレセプター

である可能性がクローン化されて以来指摘されている。一方今回明らかになったSG複合体の結合相手は何れも情報伝達への関与が示唆されている。DGはGrb2と、 α -シントロフィンはNO合成酵素(NOS)と結合することが示されている。又サルコspanはガン細胞においてRasと一緒に増幅される遺伝子の1つとして同定されたものである。今後我々はSG複合体が関係する結合に関して、それぞれの様なDAPが結合に直接与っているかを化学架橋法などにより明らかにし、SG複合体及びその周辺の分子構築について詳細を詰めていく。こうした研究からSG複合体が関係する情報伝達の大きなカスケードが浮き彫りにされてくることを期待している。

E. 結論

dys-DAP複合体中のSG複合体の在り方がこれまで不明であったが、今年度の研究によりそれが明示され、SG複合体の筋表面膜よりの消失がなぜ筋ジストロフィーを発症するのかを構造的な立場からある程度理解できるようになった。

F. 研究発表

1. 論文発表

[1] Ozawa, E. et al. From dystrophinopathy to sarcoglycanopathy: Evolution of a concept of muscular dystrophy. *Muscle Nerve* **21**, 421-438 (1998)

[2] 吉田幹晴 遺伝性筋疾患 (Duchenne型およびDuchenne様筋ジストロフィー) *Molecular Medicine* **35**, 臨時増刊号「症候・病態の分子メカニズム」563-564 (1998)

2. 学会発表

[1] Yoshida, M. et al. The components of dystrophin-DAP complex that interact with the sarcoglycan complex. 9th International Congress on Neuromuscular Diseases, Adelaide Australia, Aug 1998

[2] Yoshida, M. et al. Details of β -dystroglycan-binding region on dystrophin. 9th International Congress on Neuromuscular Diseases, Adelaide Australia, Sep 1998

[3] Ozawa, E. et al. Dystrophin-associated proteins and muscular dystrophies. 5th International union of Biochemistry and Molecular Biology Conference, Jerusalem Israel, Oct 1998

[4] Sasaoka T. et al. Muscular dystrophic phenotype in the gamma-sarcoglycan-deficient mice. American Society of Human Genetics 48th Annual Meeting Denver USA. Oct 1998

[5] 吉田幹晴ら ジストロフィンの β -ジストログリカン結合部位 第71回日本生化学会大会 (1998年9月、名古屋)

[6] 笹岡俊邦ら γ -サルコグリカン欠損マウスにみられた筋ジストロフィー様の所見 第21回日本分子生物学会大会 (1998年12月、横浜)

厚生科学研究費補助金（脳科学研究事業）
（総括・分担）研究報告書

デュシェンヌ型及びデュシェンヌ様筋ジストロフィーの分子論的研究

（主任又は分担）研究者 笹岡 俊邦 国立精神・神経センター 神経研究所 室長

研究要旨 デュシェンヌ様筋ジストロフィーであるサルコグリカンパチー（SGP）の責任分子の1つ γ -サルコグリカン（ γ -SG）欠損マウスを発生工学技術を用いて作成した。 γ -SG欠損マウスは筋力の低下、筋組織の壊死、再生、結合組織の増生を示し、筋線維膜上の分子構築の変化の所見はSGPのものと同様であった。

A. 研究目的

本研究では、SGPの原因遺伝子の1つである γ -SG遺伝子、その欠損マウスを発生工学技術を用いて作成する。 γ -SG欠損マウスはSGP類似の筋病変を示すことが期待されることから、 γ -SG欠損マウスの筋細胞膜の分子構築の変化と筋線維壊死の成立過程を解析し、筋ジストロフィーの病態解明へ向けた基盤研究を目指す。

B. 研究方法

γ -SGのN-末端側、細胞質領域と膜貫通領域をコードするエクソンをネオマイシン耐性遺伝子と置き換えるターゲッティングベクターを作成し、マウスES細胞を用いた常法により γ -SG欠損マウスを作成した。 γ -SGの発現はノーザンブロット、ウエスタンブロットで解析した。筋組織の所見はH&E染色で、筋線維膜の障害の検定は血清クレアチンキナーゼ（CK）活性測定とEvans blue dye（EBD）による生体染色にて行った。筋線維膜上のSG分子群、ジストロフィンおよびSG以外のジストロフィン結合タンパク質の存在は特異抗体を用いる免疫組織化学法で解析した。

C. 研究結果

上記の遺伝子ターゲッティングベクターをES細胞に導入し、相同組換え体2細胞系統を得た。これら2細胞系統からキメラマウスを作成し、

C57BL/6雌マウスとの交配によりES細胞由来のヘテロ変異マウスを同定した。このヘテロ変異マウスを交配することにより、ホモ変異（ γ -SG^{-/-}）マウスを作成した。このマウス筋において γ -SG分子の欠損を確認した。ヘテロ変異マウス交配により得た子の4週令における遺伝子型はメンデル分離比に近く、従って γ -SG^{-/-}マウスは4週令以前に死んでいないと推定した。

γ -SG^{-/-}マウスは発育、繁殖、姿勢および歩行様式に異常を示さなかった。各週令の体重は、正常型マウスとほぼ同等であるが、10週令以降では四肢近位部にやや肥大が、そして金網よじ登り試験では筋力低下が認められた。H&E染色において、横隔膜では2週令で既に壊死線維が見られ、6-8週令になると横隔膜・骨格筋の広い範囲に壊死、再生像が認められた。20週令の横隔膜・骨格筋では広い範囲が再生線維で占められ、壊死線維も散在していた。31週令になると筋の肥大と筋組織の壊死、再生、結合組織の増生がみられた。この結果を mdx マウスと比べると、 γ -SG^{-/-}マウスは早い週令で重症の筋肥大と線維化を示すことがわかった。8週令の γ -SG^{-/-}マウスの血清CK活性は、正常型マウスの百倍以上であった。一方EBDによる生体染色では、2週令、8週令、20週令の γ -SG^{-/-}マウスの横隔膜と骨格筋にEBD染色性筋線維が見られ、筋線維膜の異常が確認された。

筋線維の免疫組織化学法による解析では、 γ -SG

のみならず他の全てのSG分子も消失又は著しい減少を示した。更にサルコspanも激減することがわかった。一方ジストロフィン、 α -、 β -ジストログリカン、シントロフィンの有意な減少は認められなかった。またジストロフィンを欠損したDMDやmdxマウスの筋で認められるユートロフィンの発現上昇はみられなかった。

D. 考察

筋ジストロフィーの原因分子の一つである γ -SG分子の欠損マウスを作成した。 γ -SG欠損マウスは筋力低下、筋線維の壊死、再生の所見を示し、筋線維膜の障害も示唆された。 γ -SG欠損マウスはmdxマウスより早い週令で重症の筋ジストロフィーの所見を示した。 γ -SG欠損マウスは筋線維膜上のジストロフィンおよび結合タンパク質複合体の構築がSGPと同様の異常を示すことから、SGPの病態の分子機構とサルコグリカン複合体の機能の解明に有用であると考えられる。これらの結果は論文として投稿準備中である。

E. 結論

マウス発生工学技術により γ -SG欠損マウスを作成した。 γ -SG欠損マウスは筋力の低下、筋組織の壊死、再生、線維化の所見を示し、筋線維膜上の分子構築の変化の所見はSGPに類似の所見であった。

F. 研究発表

1. 論文発表 なし
2. 学会発表

[1] Sasaoka T. et al. Muscular dystrophic phenotype in the gamma-sarcoglycan-deficient mice. American Society of Human Genetics 48th Annual Meeting 平成10年10月27-31日 米国コロラド州 デンバー

[2] 笹岡俊邦 他 「 γ -サルコグリカン欠損マウスにみられた筋ジストロフィー様の所見」 第21回 日本分子生物学会年会 平成10年12月19日 パシフィコ横浜