

平成11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 フクチン遺伝子は発生過程から Cajal-Rezius 細胞を含む遊走に關する神経細胞に発現が認められ、成人まで継続していた。また FCMD 患者において、病変部、正常部の発現レベルに差が見られた。FCMD 遺伝子には9種類の異なる fukutin 転写産物が発現していた。ホモ欠損マウスが胎生致死であることが判明し、F2 マウス胚の genotype を調べた結果、胎生 8.5-9.5 日前後にホモ欠損マウス胚が死亡することが明らかとなった。フクチンは発生に必須の物質である。in situ hybridization により、マウスの様々な組織で Fcmd 遺伝子のメッセージを検出できたが、中枢および末梢神経系において特に強い発現が認められた。Two-color ISH 法によって、(1) mutant allele 由来の mRNA は患者細胞核内では低レベルにしか存在しない、(2) 反復配列を含む領域部分の転写産物は、核内に多く存在していた。新たに7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。WWS 筋は FCMD 筋に似た病理学的所見をみた。急速凍結ディーブ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、ほぼその手法を完成させた。

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）
斎藤 深美子（東京医科歯科大学難治疾患研究所・助手）
堀江 正人（大塚製薬(株)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種であり、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しており、今年度は以下のことを明らかにした。

B. 研究方法・研究結果

(1) 福山型先天性筋ジストロフィーの多小脳回出生前診断による胎児剖検例脳病変の解析で、glia limitans-基底膜の破綻を伴い、神経細胞が overmigration した結果、層構築の障害が報告されている。今回我々は脳病変への関与を検討する

ために FCMD 遺伝子の特に脳における発現を、ノーザンプロット、RT-PCR、in situ hybridization により解析した。

ノーザン解析において、胎児組織、成人脳各部位で、同程度 FCMD 遺伝子の発現が確認された。RT-PCRでも胎児各時期、小児、成人脳組織で発現に大きな差は認められず、コントロール胎児と FCMD 胎児、コントロール成人と FCMD 患者の比較では、患者において発現の著明な低下が認められた。細胞株の比較では、グリア系の性質を示す glioblastoma に比較して、神経細胞の性質を持つ neuroblastoma、hNT neuron で有意な発現が見られた。

次に、In situ hybridization により発現を解析した。プローブは、ジゴキシゲニンで標識した RNA プローブを使用し、アルカリフォスファターゼにより発色しプローブの可視化を行った。

in situ hybridization では、胎児脳で神経前駆細胞を含む発生過程の全ての神経細胞と Cajal-Rezius 細胞に発現が見られた。成人脳でも、大脳皮質神経細胞に発現が継続して認められた。また海馬錐体細胞、歯状回神経細胞、小脳のプルキンエ細胞、顆粒細胞にも発現が認められた。glia limitans-基底膜複合体には発現を認めず、分子層、白質のグリア細胞にも発現を認めなかった。FCMD 胎児脳では、正常部では弱く発現する細胞を比較的連続的に認め、病変部では著明に発現が低下していた。FCMD 成人患者では、全体として発現は低下しているが、正常部では比較的よく発現しており、病変部では著明に発現が低下する細胞群と弱く発現する細胞群が混在していた。

(2) 福山型先天性筋ジストロフィー遺伝子の選択的スプライシング

松村、砂田は、fukutin mRNAの発現をRT-PCR法により解析した。骨格筋と脳のpoly(A)+ RNA分画からRT-PCRにより単一のfragmentではなく複数のfragmentが増幅された。それらのPCR産物をシーケンスしたところ少なくとも9種類の異なるfukutin転写産物が発現していた。variant transcriptの中に見つかった塩基配列は全てintronと考えていた部分に存在しその周辺の塩基配列はsplice部位としての特徴に合致していたので、従来報告されていた10個の exon以外に新たなexonが存在すると考えられた。

(3) FCMDノックアウトマウスの解析

堀江は、昨年度得られたFcmd遺伝子のF1ヘテロ欠損マウスは、見かけ上は正常であり、繁殖可能であった。このF1ヘテロ欠損マウス間の交配により得られるF2離乳マウスのgenotypingを行ったところ、ホモ欠損マウスが胎生致死であることが判明した。さらに、F2マウス胚のgenotypeを調べた結果、胎生8.5-9.5日前後にホモ欠損マウス胚が死亡することが明らかとなった。

in situ hybridizationにより、様々な組織でFcmd遺伝子のメッセージを検出できたが、中枢および末梢神経系において特に強い発現が認められた。

ヒトFCMD遺伝子3'非翻訳領域のレトロトランスポゾン挿入した遺伝子改変マウスを作製するため、loxP配列を組み入れた3'非翻訳領域置換用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遺伝子座が置換されたES細胞株を樹立した。

(4) 福山型遺伝子RNAの動態及び性状

常染色体性劣性遺伝病の福山型筋ジストロフィー(FCMD)は、戸田らの研究により新規遺伝子が同定され、3'側の非翻訳領域に数種の反復配列を含むDNA断片(トランスポーザブル・エレメント)が挿入されていることが判明している。非翻訳領域でのDNA異常の場合、疾患発症の原因はタンパク異常では説明不可能で、理論的には遺伝子の転写時あるいは転写後の異常(つまりRNAレベルの異常)が考えられるため、斎藤はFCMDに関して、転写後のRNAの動態およびその性状を検索する目的で、ISH法を行った。プローブとして用いたcDNAクローンは、(1)FCMD原因遺伝子の3'側非翻訳領域部分(挿入部位より上流の領域)(緑黄色)、及び(2)患者の遺伝子で検出される挿入DNA断片(赤色)を含むクローンで、Two-colorのin situハイブリダイゼーション

(Two-color ISH)法を行った。その結果、(1)mutant allele由来のmRNAは患者細胞核内では低レベルにしか存在しないこと、(2)反復配列を含む領域部分の転写産物は、核内に多く存在することが示された。

(5) 福山型先天性筋ジストロフィーの臨床、病理学的解析

埜中は、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、1999年末までに171検体をバンク入りさせた。

本症の病理発生をみるためWalker-Warburg症候群(WWS)生検筋との病理学的比較検討を行った。フクチン遺伝子に変異を認めないWWS4例では、活発な壊死・再生があり筋ジストロフィーの所見をみた。さらに結合織の増生も著しく多くの組織学的類似点を見た。

(6) 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、膜蛋白質あるいは細胞外蛋白質である可能性が唆されている。片山は、急速凍結フリーズレプリカ法を駆使して、任意の蛋白質の3次元構造や細胞内におけるその存在様式を探索するための様々な方法を開発中である。今年度は、レプリカ試料中の蛋白質の3次元構造を、電子顕微鏡内で傾斜撮影した多くの像から再構成する手法をほぼ完成した。滑り運動中のミオシクロスブリッジの構造にその方法を適用した結果、これまでに全く未知の構造が実現していることが判明した。福山型筋ジストロフィーの原因遺伝子産物を研究するにあたっての、その有用性は明らかである。

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。

神経細胞の遊走に関して、神経前駆細胞は脳室壁に沿ってventricular zoneに存在する。最初に分化する神経細胞はCajal-Rezius細胞で、最表層のmarginal layerに遊走する。神経細胞に分化した順番にintermediate layerを經由して接線方向に脳表側へ移動していき、胎生9週頃よりcortical plateが形成される。cortical plateに到達した神経細胞は、Cajal-Rezius細胞が分泌するリーリンや、

その他の脳表側の因子により遊走を終え positioning を決定し、早期に分化した神経細胞ほど深部に位置し inside-out の配列と言われている。FCMD 胎児、成人の病理所見の検討により、病変部では glia limitans-基底膜に破れがあり、この破れが病変の遠因であり、フクチンはアストロサイトが主な役割を担う基底膜に関与すると考え易いが、今回のデータは発生過程から Cajal-Rezius 細胞を含む遊走に関与する神経細胞に発現が認められ、成人まで継続していた。

すなわち本来基底膜と接していないニューロンで発現が見られており、フクチン蛋白質が神経細胞の遊走自体に関与する可能性や、フクチン蛋白質（細胞外蛋白質？）がニューロンで産生され分泌され基底膜の形成に関与する可能性もある。また FCMD 患者において、病変部、正常部の発現レベルに差が見られたことは、FCMD 遺伝子変異による mRNA の不安定性が、発生のある段階で細胞ごとに mRNA 量の差を生じ、病変部正常部を区別する可能性も考えられる。

今回の検討で FCMD 遺伝子転写産物は多様な alternative splicing を受けていることが初めて示された。この alternative splicing により fukutin アイソフォームが存在することは、組織・細胞ごとに以前に見出した FCMD で欠損している細胞外蛋白 p180 をはじめとする fukutin 結合・関連蛋白との結合・相互作用部位が様々に異なる可能性を示唆している。今後、fukutin の生理学的機能の解明、FCMD の病態の解明の上からも p180 など fukutin 結合・関連蛋白の生理学的機能の解明が重要である。

in situ hybridization の結果より、マウス胚発生過程において、中枢および末梢神経系を含む様々な組織で *Fcmd* 遺伝子が機能していることが示唆された。さらに、*Fcmd* 遺伝子のホモ欠損マウスは胎生 8.5-9.5 日前後に死亡することが明らかとなり、*Fcmd* 遺伝子がマウスの胚発生に必須であることが示唆された。これらの事実、ヒト FCMD 遺伝子にノンセンス点変異をホモで持つ患者が、これまでのところ見つかっていない疫学的事実と合致するものである。

今回の RNA *in situ* hybridization の結果から、FCMD 遺伝子の 3' 側非翻訳領域部分を指標にした場合、FCMD 遺伝子の転写産物は、患者群（平均 0.69）では正常者群（平均 3.35）に比べて約 20% の低いレベルを示した。これは戸田らのノーザンハイブリダイゼーションや RT-PCR の結果

(Kobayashi et al, 1998; Kondo-Iida et al., 1999) と矛盾しない。つまり、DNA 断片の挿入を持つ mutant allele 由来の転写産物はある程度転写されるが細胞核内でも低レベルであることが示唆された。

一方、挿入 DNA 断片を含む pINS クローンにより ISH 解析をした結果、この配列を含む転写産物が正常細胞でも存在することが示唆され、患者細胞核では約 1.5 倍多いことが判明した。正常細胞で検出される転写産物が何を示しているかは不明であるが、挿入 DNA 断片部分は反復配列やポリ A 配列を含むことからこれらの配列を含有する mRNA とクロスハイブリダイゼーションしている可能性があり、今後検討する必要がある。それにもかかわらず患者細胞での値が正常の 1.5 倍を示すことは何を意味しているのだろうか。前の FCMD 遺伝子の 3' 側非翻訳領域部分の ISH の結果と合わせて考察すると、(1) 挿入 DNA を含む mutant allele 由来の mRNA はその構造上（あるいは他の理由で）不安定で分解され易い、(2) 反復配列を含む領域部分は何らかの理由で分解されにくく核内に蓄積する、等のことが考えられる。

しかし、今回の結果はまだ一次的なものであり、考察はまだ推論の域を越えないため、今後 ISH 法の方法論・条件設定等をさらに改良して詳細に検討すると共に、分子生物学的な他の手法によって別の側面からも検討する必要があると思われる。

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組織の増生がみられる。ただ、non-FCMD の中でも WWS はその病理像が FCMD によく類似していた。また免疫組織化学的にもメロシン染色で薄く染色されることは共通であった。WWS では電顕的に核の変化が強く apoptosis の関与が考えられた。今後 FCMD 筋でも apoptosis を含めて筋変性のメカニズムを明らかにすべきと考え、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。今回、それらを適切に組み合わせることで当初の目標をほぼ達成することができた。

D. 結論

フクチン遺伝子は発生過程からCajar-Rezius細胞を含む遊走に関与する神経細胞に発現が認められ、成人まで継続していた。またFCMD患者において、病変部、正常部の発現レベルに差が見られた。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遺伝子ホモ欠損マウスは胎生致死であり、この遺伝子のマップされたD4Mit272の近傍に、責任遺伝子がマップされている自然発生変異マウスの報告もないため、ヒトFCMD遺伝子3'非翻訳領域のレトロトランスポゾン挿入した遺伝子改変マウスの作製がFCMD発症メカニズムの解明に必要である。Two-color ISH法によって、(1) mutant allele 由来のmRNAは患者細胞核内では低レベルにしか存在しない、(2) 反復配列を含む領域部分の転写産物は、核内に多く存在する。新たに7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。WWS筋はFCMD筋に似た病理学的所見をみた。FCMDとnon-FCMDの病理学的比較検討が病態を説明する鍵を握っていると考えられた。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きたが、とりあえずほぼ完成したといえる。

E. 研究発表

1. Kotliarova ES, Toda T, Takenaka O, Matsushita I, Hida A, Shinka T, Goto J, Tokunaga K, Nakagome Y, Nakahori Y. Novel (CA)_n marker DXYS241 on the

- nonrecombinant part of the human Y chromosome. *Hum Biol* 71:261-275, 1999
2. Voit T, Cohn RD, Sperner J, Leube B, Sorokin L, Toda T, Herrmann R. Merosin-positive congenital muscular dystrophy with transient brain dysmyelination, pontocerebellar hypoplasia and mental retardation. *Neuromuscular Disord* 9:95-101, 1999
3. Shinka T, Tomita K, Toda T, Kotliarova SE, Lee J, Kuroki Y, Jin DK, Tokunaga K, Nakamura H, Nakahori Y. Genetic variations on the Y chromosome in the Japanese population and implications for modern human Y chromosome lineage. *J Hum Genet* 44:240-245, 1999
4. Belpaire-Dethiou M-Cl, Saito K, Fukuyama Y, Kondo-Iida E, Toda T, Duprez Th, Verellen-Dumoulin C, Van den Bergh PYK. Congenital muscular dystrophy with central and peripheral nervous system involvement in a Belgian patient. *Neuromuscular Disord* 9:251-256, 1999
5. Kuroki Y, Iwamoto T, Lee J, Yoshiike M, Nozawa S, Nishida T, Ewis AA, Nakamura H, Toda T, Tokunaga K, Kotliarova SE, Kondoh N, Koh E, Namiki M, Shinka T, Nakahori Y. Spermatogenic ability is different among males in different Y chromosome lineage. *J Hum Genet* 44:289-292, 1999
6. Kondo-Iida E, Kobayashi K, Watanabe M, Sasaki J, Kumagai T, Koide H, Saito K, Osawa M, Nakamura Y, Toda T. Novel mutations and genotype-phenotype relationships in 107 families with Fukuyama-type congenital muscular dystrophy (FCMD). *Hum Mol Genet* 8:2303-2309, 1999
7. Yoshioka M, Toda T, Kuroki S, Hamano K. Broader clinical spectrum of Fukuyama-type congenital muscular dystrophy manifested by haplotype analysis. *J Child Neurol* 14:711-715, 1999
8. Toda T, Kobayashi K. Fukuyama-type congenital muscular dystrophy: the first human disease to be caused by an ancient retrotransposal integration. *J Mol Med* 77:816-823, 1999
9. Futaki M, Yamashita T, Yagasaki H, Toda T, Yabe M, Kato S, Asano S, Nakahata T. The IVS4+4 A-T mutation of the Fanconi anemia gene FANCC is not associated with a severe phenotype in Japanese patients. *Blood*

- 95:1493-1498, 2000
10. Jong YJ, Kobayashi K, Toda T, Kondo-Iida E, Huang SC, Shen YZ, Nonaka I, Fukuyama Y. Genetic heterogeneity in three Chinese children with Fukuyama congenital muscular dystrophy. *Neuromuscular Disord* 10:108-112, 2000
 11. Toda T, Kobayashi K, Kondo-Iida E, Sasaki J, Nakamura Y. The Fukuyama congenital muscular dystrophy story. *Neuromuscular Disord* 10:153-159, 2000
 12. Toda T, Kobayashi K, Nonaka I. Congenital muscular dystrophies with special reference to the Fukuyama type. *Neurosci News* 3:39-45, 2000
 13. Saito K, Osawa M, Wang Z-P, Ikeya K, Fukuyama Y, Kondo-Iida E, Toda T, Ohashi H, Kurosawa K, Wakai S, Kaneko K. Haplotype-phenotype correlation in Fukuyama congenital muscular dystrophy. *Am J Med Genet* (in press)
 14. Saito F, Masaki T, Kamakura K, Anderson L V B, Fujita S, Fukuta-Ohi H, Sunada Y, Shimizu T, Matsumura K. Characterization of the transmembrane molecular architecture of the dystroglycan complex in Schwann cells. *J Biol Chem* 274:8240-8246, 1999
 15. Shimoji Y, Ng V, Matsumura K, Fischetti VA, Rambukkana A. A 21-kDa surface protein of *Mycobacterium leprae* binds peripheral nerve laminin-2 and mediates Schwann cell invasion. *Proc Natl Acad Sci USA* 96: 9857-9862, 1999
 16. Matsumura K, Saito F, Yamada H, Hase A, Sunada Y, Shimizu T. Sarcoglycan complex: a muscular supporter of dystroglycan-dystrophin interplay? *Cell Molec Biol* 45:751-762, 1999
 17. 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
 18. Murayama T, Oba T, Katayama E, Oyamada H, Oguchi K, Kobayashi M, Otsuka @j Ogawa Y. Further characterization of the type 3 ryanodine receptor (RyR3) purified from rabbit diaphragm. *J Biol Chem* 274:17297-17308, 1999
 19. Sakakibara H, Kojima H, Sakai Y, Katayama E, Oiwa K. inner-arm dynein subspecies c of *Chlamydomonas flagella* is a single-headed processive motor with strain sensitivity. *Nature* 400:586-590, 1999
 20. Konishi N, Torii Y, Yamamoto T, Miyagi A, Ohta H, Fukui K, Hanamoto S, Matsuno H, Komatsu H, Kodama T, Katayama E. Structure and enzymatic properties of genetically truncated forms of the water-insoluble glucan-synthesizing glucosyltransferase from *Streptococcus sobrinus*. *J Biochem* 126:287-295, 1999
 21. Tobe T, Tatsuno I, Katayama E, Wu CY, Schoolnik GK, Sasakawa C. A novel chromosomal locus of enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC), which encodes a bfpT-regulated chaperone-like protein, TrcA, involved in microcolony formation by EPEC. *Mol Microbiol* 33 (4):741-752, 1999
 22. Yamane K, Katayama E, Sugawara K, Tsuruo T. Retinoblastoma susceptibility protein, pRb, possesses multiple BRCT-Ws, BRCA1 carboxyl-terminus-related W regions with DNA break-binding activity: *Oncogene*. (in press)
 23. Jin Y, Murakami N, Saito Y, Nonaka I. *MyoD* and *myogenin* expression in human neuromuscular disorders. *Acta Neuropathol* (in press)
 24. Horie M, Suzuki M, Takahashi E, Tanigami A. Cloning, expression, and chromosomal mapping of the human 14-3-3g gene (YWHAG) to 7q11.23. *Genomics* 60:241-243, 1999
 25. Sugimoto N, Fukuda Y, Saito-Ohara F, Kamiyama R, Nakagawa A, Mukae N, Nagata S, Inazawa J. The human caspase-activated DNase gene (hCAD): genomic structure, exonic single-nucleotide polymorphisms, and a highly polymorphic dinucleotide repeat at the hCAD locus. *J Hum Genet* 44:408-411, 1999

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の病態解明に関する研究

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 福山型先天性筋ジストロフィー（FCMD）において fukutin と結合・相互作用する蛋白の異常が筋細胞障害の発症に関与している可能性を検討した。可溶化した骨格筋細胞外基質成分に対する単クローン抗体を作製し、その中から FCMD 筋における欠損蛋白を認識する抗体を確立した。この抗体は正常人筋のイムノブロット解析で分子量 180 kDa の蛋白（p180）を認識したが、FCMD 筋では p180 は欠損していた。p180 の欠損は FCMD に特異的にみられことより、これが FCMD の病態に関与すると推定した。また FCMD 遺伝子転写産物の多様な alternative splicing を明らかにし、これが p180 をはじめとする fukutin 関連蛋白との結合・相互作用部位の多様性に関与する可能性を検討した。

A. 研究目的

本研究の目的は FCMD における筋細胞障害の分子発症機構を解明するために、（1）fukutin 結合・関連蛋白の候補を探すとともに（2）これらの蛋白の fukutin 内の結合・相互作用ドメインを解明することにある。

B. 研究方法

（1）ウサギ骨格筋 pH12 抽出分画（細胞外基質蛋白を含む）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。その中から筋細胞膜を免疫染色するクローンを選別した。FCMD 生検筋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。さらに FCMD 凍結切片をイムノブロット解析した。

（2）ヒト骨格筋と脳の poly(A)+RNA 分画から oligo(dT)プライマーを用いて逆転写を行い、fukutin cDNA の 5' UTR と 3' UTR に位置するプライマーで PCR を行った。さらに内部プライマーを用いて nested PCR を行った。

C. 研究結果

（1）得られた単クローン抗体の一つ M1 抗体を用いると正常筋凍結切片では筋細胞膜に一致した免疫染色がみられた。しかし FCMD 生検筋では全例で筋細胞膜の免疫染色性が著減していた。正常人筋より pH12 アルカリ抽出分画を調整し、M1 抗体を用いてイムノ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イムノブロット解析で p180 は検出されなかった。FCMD 2 例の生検筋および 2 例の正常対照筋より 2% Triton-X100 可溶化分画を調整し、M1 抗体を用いてイムノブロット解析を行った。FCMD 2 例では正常に比べて p180 の発現が著減していた。

（2）nested PCR では予想されたサイズの単一の fragment だけではなく複数の fragment が増幅された。これらの PCR 産物を TA vector

に subcloning したところ骨格筋と脳で各々 6 種類のサイズの異なる断片が得られた。すべての断片をシークエンスしたところ骨格筋と脳において、少なくとも 9 種類の異なる fukutin 転写産物が発現していることがわかった。exon skipping がみられるもの 3 種類、新規の塩基配列が挿入されたもの 3 種類、その両者が組合わさったもの 2 種類であった。挿入されていた塩基配列は全て従来 intron と考えていた部分に存在し、その周辺の塩基配列は splice 部位としての特徴に合致したことから、これらは fukutin 遺伝子転写産物が多様な alternative splicing を受けて生じた variant transcript と考えられた。したがって、従来報告されていた 10 個の exon 以外に新たな exon (exon 3A, exon 3B, exon 9A) が存在し、また exon 9 はさらに 31 塩基延長して exon 9' としても使われることが判明した。今回われわれが同定した variant transcript からは 56~396 アミノ酸残基に及ぶ 6 種類のサイズの異なる蛋白の発現が予想され、このうち多くは frame shift により異なった C 端部分を持つ。

D. 考察

われわれは FCMD 骨格筋では p180 が欠損していることを見出した。p180 は界面活性剤、強アルカリ条件、EDTA 存在下で可溶化されることから膜貫通蛋白ではなく Ca²⁺依存性細胞外基質蛋白であると推測される。一方、fukutin の推定分子量 (53.6 kDa) を考慮すると p180 が fukutin 自体である可能性は低い。われわれは p180 が fukutin と結合・相互作用する蛋白であり FCMD 筋では二次的に欠損しているのではないかと推察している。一方、今回のわれわれの検討で FCMD 遺伝子転写産物は多様な alternative splicing を受けて

いることが初めて示された。この alternative splicing により fukutin アイソフォームが存在することは、組織・細胞ごとに p180 をはじめとする fukutin 結合・関連蛋白との結合・相互作用部位が様々に異なる可能性を示唆している。今後、fukutin の生理学的機能の解明、FCMD の病態の解明の上からも p180 など fukutin 結合・関連蛋白の生理学的機能の解明が重要である。

E. 結論

FCMD 骨格筋では細胞外基質蛋白と考えられる p180 が欠損しており、FCMD における筋細胞障害発症の分子機構に関与すると考えられる。

F. 研究 (論文) 発表

1. Kobayashi, K., Nakahori, Y., Miyake, M., Matsumura, K., Kondo-lida, E., Nomura, Y., Segawa, M., Yoshioka, M., Saito, K., Osawa, M., Hamano, K., Sakakibara, Y., Nonaka, I., Nakagome, Y., Kanazawa, I., Nakamura, Y., Tokunaga, K., and Toda, T. (1998) An ancient retrotransposal insertion causes Fukuyama-type congenital muscular dystrophy. *Nature* 394, 388-392.
2. Sunada, Y., Saito, F., Matsumura, K., and Shimizu, T. (1998) Differential expression of the parkin gene in the human brain and peripheral leukocytes. *Neurosci. Lett.* 254, 180-182.
3. Sasaki, T., Yamada, H., Matsumura, K., Shimizu, T., Kobata, A., and Endo, T. (1998) Detection of O-mannosyl glycans in rabbit skeletal muscle α -dystroglycan. *Biochim. Biophys. Acta* 1425, 599-606.

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：急速凍結フリーズレプリカ電子顕微鏡法は、1ミリ秒以内に凍結された生物材料中の個々の分子の表面プロファイルを、1 nm を超えるほどの空間分解能で探索できる能力を有するばかりか、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持つ構造解析法である。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が、当方法はその蛋白質自体の構造解析、あるいは細胞内での存在様式を探るためにも大変有用であると考えられる。

そのようなレプリカ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方法を開発することを目指し、ほぼ完成に近づいた。滑り運動中のミオシンクロスブリッジの像に適用した結果、機能遂行中にその分子内ドメイン配置が変化している様子まで観察することに成功した。

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早々に決定されたが、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や存在様式を、急速凍結ディー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、ここ3年間、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。当初は、レプリカ試料中の特定視野の電子顕微鏡写真を広い角度範囲にわたって傾斜撮影した多数の像から、逆投影法を用いて3次元像を再構成することを試みた。実際、かなりの結果は得られたものの、いわゆる“missing cone”の影響による高さ方向の像の伸びを生じ、最終像には甚だ不満を残すものであった。その問題は正に逆投影法の原理に由来するものであり、逆投影法を単独で適用する限り避けられない。そこで本年度は、数年前に開発した方法を用いて、視差測定により決定した試料表面のいくつかの特徴点の高さの値を3次元データに取り込んで画像を補完するとともに、元の傾斜電子顕微鏡像を次々に連続表示するアニメーションを参照しながら、詳細な部分を修正していく手法を導入し、その対策によりどの程度まで再構成像の改善ができるかを検証することにした。他の再構成技術も継続して検討中である。

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、マイカ細片の表面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直後に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イ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。さらに、ある程度離れた角度で撮影した同一粒子の像の中でいくつかの識別し易い特徴点を探し、以前作成した視差測定プログラムによりその高さを測定した。一方、精密に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良く把握できることを昨年度に見出したが、それを参照することにより、再構成像の中から元の像には存在しないゴーストを取り除く作業は非常に有効であった。

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

子を論文発表している。また、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明瞭に認められること、そして ATP が結合した粒子ではその配置が変化していることを示した。昨年度は、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態では構造が複雑に入り組んでおり、高さ方向の分解能が甚だ不十分であった。そこで今年度は、視差測定によって分子表面のいくつかの特徴点の高さを決定して、逆投影法と組み合わせた。さらに、できあがった再構成像を、昨年度に考案した元のレプリカ像のアニメーション表示と注意深く比較しながらゴーストを除いた。このように、いくつかの方法を有機的に組み合わせることにより、当初の目的はほぼ達成されたと言える。

ミオシン頭部およびアクチン分子の構造に関しては、両者とも X線結晶回折による詳細な原子モデルが発表されている。それに基づき、それぞれの分子にロータリー・シャドウイングを施したときにどのように見えるべきかのシミュレーションを行い、実際に観察された電子顕微鏡像との異同を調べた。アクチンフィラメントでは、細部まで非常に良い一致を見たのに対し、アクトミオシン硬直複合体中のミオシン頭部においては各ドメインの相対的な位置が微妙に変化していることが判明した。これは、アクチンとミオシンの結晶構造のデータだけを基にして、コンピュータ内で無理に結合させて作ったモデルが必ずしも真の構造を反映していない可能性を示唆するものである。一方、これまで未知であった滑り運動中のミオシン頭部のサブドメイン配置は概ね3種類に分別されるものであった。上下 50KD ドメインのうち上位 50KD 部分のみがアクチンに結合したもの、下位のみが結

合したもの、そして両者ともに結合したものである。またモータードメインに観察された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 部分の首振り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。このような状態におけるクロスブリッジの構造を他の方法で捉えることは、現時点では不可能であり、分担者の研究が世界で唯一のものであるので、残念ながら、他のデータと比較することはできない。

D. 考察

急速凍結ディープエッチ・レプリカ法は、一瞬にして凍結固定された生体試料の表面の凹凸の情報を高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物でも同様に、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て十分な再構築ができなかった。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。今回、それらを適切に組み合わせることで当初の目標をほぼ達成することができた。しかし、1視野の情報を得るためには30-50枚あるいはそれ以上の数の傾斜画像が必要であり、撮影者にとっては甚大な負担である。それを少しでも軽減するために、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再構成することが最も実用的な方策と考え、さらに開発を進めている。

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きたが、とりあえず、ほぼ完成したと言える。電子顕微鏡内で2軸方向に傾斜することで、より死角の少ないデータを集めることができれば更に精度が向上することは間違いない。しかし、現在の方法を実施するためには、撮影者の負担が余りにも大きいので、それを少しでも軽減すべく、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層面の立体形状を再構成するプログラムを開発中である。

F. 研究発表

- 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) M. Ikebe, T. Kambara, W.F. Stafford, M. Sata, E. Katayama & R. Ikebe: 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)
- 3) C. Shingyoji, H. Higuchi, M. Yoshimura, E. Katayama & T. Yanagida: Dynein arms are oscillating force generators. *Nature*, 393: 711-714, (1998)
- 4) H. Niwa, E. Katayama, M. Yanagida & K.

- Morikawa: Cloning of the fatty acid synthetase β subunit from fission yeast, coexpression with the α subunit, and purification of the intact multifunctional enzyme complex. *Protein Express. Purif.* 13: 403-413, (1998)
- 5) T. Tomita, D. Ishikawa, T. Noguchi, E. Katayama & Y. Hashimoto: Assembly of flammutoxin, a cytolytic protein from the edible mushroom *Flammulina velutipes*, into a pore-forming ring-shaped oligomer on the target cell. *Biochem. J.* 333: 129-137, (1998)
- 6) 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)
- 7) E. Katayama: Electron microscopy coupled with quick freezing: In: H. Sugi (ed), *Current Methods in Muscle Physiology: Advantages, Problems and Limitations.*, pp. 287-301, Oxford Univ. Press, New York, (1998)
- 8) K. Ito, X. Liu, E. Katayama & T.Q.P. Uyeda: Cooperativity between two heads of *Dictyostelium* myosin II in in vitro motility and ATP hydrolysis. *Biophys. J.* 76, 985-992, (1999)
- 9) T. Murayama*, T. Oba*, E. Katayama*, H. Oyamada, K. Oguchi, M. Kobayashi, K. Otsuka & Y. Ogawa. Further characterization of the type 3 ryanodine receptor (RyR3) purified from rabbit diaphragm. *J. Biol. Chem.* 274:17297-17308. (1999)
- [*First three authors equally contributed to this work.]
- 10) H. Sakakibara, H. Kojima, Y. Sakai, E. Katayama & K. Oiwa: Inner-arm dynein subspecies c of *Chlamydomonas flagella* is a single-headed processive motor with strain sensitivity. *Nature*, 400, 586-590, (1999)
- 11) N. Konishi, Y. Torii, T. Yamamoto, A. Miyagi, H. Ohta, K. Fukui, S. Hanamoto, H. Matsuno, H. Komatsu, T. Kodama & E. Katayama: Structure and enzymatic properties of genetically truncated forms of the water-insoluble glucan-synthesizing glucosyltransferase from *Streptococcus sobrinus*. *J. Biochem.* 126, 287-295, (1999)
- 12) T. Tobe, I. Tatsuno, E. Katayama, C.Y. Wu, G.K. Schoolnik & C. Sasakawa: A novel chromosomal locus of enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC), which encodes a bfpT-regulated chaperone-like protein, TrcA, involved in microcolony formation by EPEC. *Mol. Microbiol.* 33 (4): 741-752, (1999)
- 13) K. Yamane, E. Katayama, K. Sugawara & T. Tsuruo: Retinoblastoma susceptibility protein, pRb, possesses multiple BRCT-Ws, BRCA1 carboxyl-terminus-related W regions with DNA break-binding activity. *Oncogene*, in press

分担研究報告書

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、1999 年末までに 171 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先天性筋ジストロフィーと Walker-Warburg 症候群 (WWS) 生検筋との病理学的比較検討を行った。非福山型筋先天性筋ジストロフィーでは病理所見は軽度であった。フクチン遺伝子に変異を認めない WWS 4 例では、活発な壊死・再生があり、より強い筋ジストロフィーの所見をみた。さらに結合織の増生も著しく、福山型に多くの組織学的類似点をみた。

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

- 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) 先天性筋ジストロフィー筋での再生：福山型先天性筋ジストロフィーは、病初期から強い結合織の増生があり、再生に大きな欠陥があると考えられている。そこで筋発生分化誘導遺伝子である *MyoD*、*myogenin* の発現を福山型 10 例、非福山型 10 例で免疫組織化学的に検討した。
- 3) 遺伝子検査で、フクチン遺伝子に変異を認めない WWS 4 例の病理学的検討 (組織化学、免疫組織化学、電顕的検索) を行い、その結果を福山型のそれと対比させた。

C. 研究結果

1) 生検筋バンクの確立

1999 年 1 年間で新たに 7 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 164 例の FCMD 筋が存在したので合計 171 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線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。すなわち FCMD の再生遅延は両遺伝子発現異常ではないことが分かった。

3) WWS の筋病理学的特徴

WWS では筋線維の大小不同、活発な壊死、再生があり、筋ジストロフィーとしての所見を備えていた。特に年齢の低い例では、筋線維の未熟性が前景に立っていた。年齢が進むに従い、問題の結合織の増生が進み、FCMD 筋病理所見と類似するようになった。ジストロフィン、ジストロフィン関連蛋白、メロシンの発現は症例により異なっていたが、明らかな欠損例はなかった。電顕的には核の変化が強く、現在 apoptosis との関連を検索中である。

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。ただ、non-FCMD の中でも WWS はその病理像が FCMD によく類似していた。また免疫組織化学的にもメロシン染色で薄く染色されることは共通であった。WWS では電顕的に核の変化が強く apoptosis の関与が考えられた。今後 FCMD 筋でも apoptosis を含めて筋変性のメカニズムを明らかにすべきと考え、研究を進める予定である。

E. 結論

新たに 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。WWS 筋は FCMD 筋に似た病理学的所見をみた。FCMD と non-FCMD の病理学的比較検討が病態を説明する鍵を握っていると考えられた。

F. 研究発表

1) 論文発表

- Nonaka I, Kobayashi O, Osari S, Yamashita Y, Matsuishi T, Goto M, Tanabe Y, Hayashi Y, Arahata K, Ozawa E: Classical (occidental) congenital muscular dystrophy: clinical and pathologic evaluation. In: Congenital Muscular Dystrophies, ed by Fukuyama Y, Osawa M, Saito K. Elsevier, Amsterdam, 69-77, 1997.
- Ishii H, Hayashi YK, Nonaka I, Arahata K: Electron microscopic examination of basal lamina in Fukuyama congenital muscular dystrophy. *Neuromuscul Disord* 7:191-197, 1997.
- Miyagoe Y, Hanaoka K, Nonaka I, Hayasaka M, Nabeshima Y, Arahata K, Nabeshima Y, Takeda S: Laminin $\alpha 2$ chain-null mutant mice by targeted disruption of the *Lama2* gene: a new model of merosin (laminin 2)-deficient congenital muscular dystrophy. *FEBS Lett* 415:33-39, 1997.
- Jin Y, Murakami N, Saito Y, Nonaka I:

MyoD and *myogenin* expression in human neuromuscular disorders. *Acta Neuropathol.* (in press).

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
- Kuo Yung-Ting, Nonaka I: The histomorphologic findings in Walker-Warburg syndrome 第 40 回小児神経学会 2000.6 (発表予定) .

福山型筋ジストロフィーの病態と病因に関する研究

分担研究者 齋藤 深美子 東京医科歯科大学難治疾患研究所 助手

研究要旨：常染色体性劣性遺伝病の福山型筋ジストロフィー（FCMD）は、戸田らの研究により新規遺伝子が同定され、3'側の非翻訳領域に数種の反復配列を含むDNA断片（トランスポーザブル・エレメント）が挿入されていることが判明している。非翻訳領域でのDNA異常の場合、疾患発症の原因はタンパク異常では説明不可能で、理論的には遺伝子の転写時あるいは転写後の異常（つまりRNAレベルの異常）が考えられるため、FCMDに関して、転写後のRNAの動態およびその性状を検索する目的で、ISH法を行った。プローブとして用いたcDNAクローンは、(1) FCMD原因遺伝子の3'側非翻訳領域部分（挿入部位より上流の領域）（緑黄色）、及び(2)患者の遺伝子で検出される挿入DNA断片（赤色）を含むクローンで、Two-colorのin situハイブリダイゼーション（Two-color ISH）法を行った。その結果、(1) mutant allele由来のmRNAは患者細胞核内では低レベルにしか存在しないこと、(2) 反復配列を含む領域部分の転写産物は、核内に多く存在することが示された。

A. 研究目的

福山型筋ジストロフィー（FCMD）は、先天性筋ジストロフィーに脳奇形を伴う常染色体性劣性遺伝疾患で、特に日本では発症率が高く、1万人の出生児当たり約1人に発症するため、原因解明が急務であった。主任研究者の戸田らはFCMDに関して分子遺伝学的手法を駆使して研究を行い、最近その原因遺伝子を同定した（Nature, 98）。その結果、FCMDの95%以上で、本体遺伝子の3'側の非翻訳領域に数種の反復配列を含むDNA断片（トランスポーザブル・エレメント）が挿入されていることが判明した（創始者ハプロタイプ）。しかし、疾患発症の分子機構に関しては全く不明である。

一般に、疾患に至る遺伝子異常の部位はタンパク質翻訳領域であるが、ごく稀に、FCMDの様に非翻訳領域の場合もあり得る。この場合、疾患発症の原因はタンパク異常では説明不可能である。理論的には、遺伝子の転写時あるいは転写後の異常（つまりRNAレベルの異常）が考えられ、これは遺伝疾患発症の分子機構としては、新しい概念に属する。

近年、本研究者は、この稀な非翻訳領域

での遺伝子異常による疾患の一つである筋緊張性ジストロフィー（DM）（トリプレットリピート病の一種）に関して研究を進めているが、異常遺伝子由来の転写産物（pre-mRNAおよびmRNA）の核内での蓄積をin situハイブリダイゼーション法（ISH法）で可視的に捉えることに成功したことから、転写後のRNAの動態異常が疾患の原因と推察した。そこで、FCMDでも非翻訳領域での遺伝子異常が疾患の原因であることから、その転写時ならびに転写後のRNAの動態に関する研究は、FCMDの発症の分子機構に関して極めて重要な情報を提供するものと考えられる。

以上のことから、本研究の目的は、非翻訳領域での遺伝子異常を示すFCMDに関して、転写後のRNAの動態およびその性状をISH法ならびに分子生物学的手法を用いて検索することにより、疾患発症の分子機構を探ることにある。

B. 研究方法

患者細胞の核内でのRNAの動態およびその性状に関して、FCMD遺伝子由来のcDNAプローブを用いたin situハイブリダイゼー

ション法 (ISH 法)を用いて検索した。

具体的には、患者および正常人のリンパ芽球細胞株を用いて RNAse free の状態で標本作製し、Biotin-16-dUTP あるいは Digoxigenin-11-dUTP にて Nick translation 法によりラベルした cDNA クローンをプローブとして in situ ハイブリダイゼーション (ISH) 法を行った。

プローブとして用いた cDNA クローンは、(1) FCMD 原因遺伝子の 3' 側 非翻訳領域部分 (挿入部位より上流の領域) を含むクローン (pDF1-7; 約 3Kb), 及び (2) 患者の遺伝子で検出される挿入 DNA 断片 (トランスポーザブル・エレメント) を含むクローン (pINS; 約 3Kb) である。前者は Biotin-16-dUTP, 後者は Digoxigenin-11-dUTP でラベルし、各々アビジン-FITC 及び抗 Dig-ローダミンで検出する (Two-color ISH 法)。

C. 研究結果

ISH 法は、(a) 創始者ハプロタイプ ホモ接合の患者 (3Kb 挿入断片をホモに持つ患者)、(b) 複合ヘテロ接合の患者 (創始者ハプロタイプと他の DNA 変異を有する患者) 及び (c) 正常対照者の各々のリンパ芽球細胞株由来の核標本を用いて行った。

今回用いた Two-color ISH 法では FCMD 原因遺伝子の 3' 側 非翻訳領域部分を含む pDF1-7 cDNA クローンによるシグナルは緑黄色に、また患者の遺伝子で創始者ハプロタイプとして検出される挿入 DNA 断片を含む pINS クローンによるシグナルは赤色に描画された。

患者および健常人の各細胞群における各々のシグナルの値をカウントした結果、pDF1-7 cDNA クローンの場合は、(c) 正常対照者では 1 細胞核あたり平均 3.06 であったが、(a) 創始者ハプロタイプ ホモ接合の患者群では、平均 0.56、(b) 複合ヘテロ接合の患者では、平均 0.96 の値を示した。一方、挿入 DNA 断片の pINS クローンの場合は、(c) 正常対照者では 1 細胞核あたり平均 9.67 であったが、(b) 複合ヘテロ接合の患者では、平均 14.06 の値を示した。

D. 考察

今回の結果から、FCMD 遺伝子の 3' 側 非

翻訳領域部分を指標にした場合、FCMD 遺伝子の転写産物は、患者群 (平均 0.69) では正常者群 (平均 3.35) に比べて約 20% の低いレベルを示した。これは戸田らのノーザンハイブリダイゼーションや RT-PCR での結果 (Kobayashi et al, 1998; Kondo-Iida et al., 1999) と矛盾しない。つまり、DNA 断片の挿入を持つ mutant allele 由来の転写産物はある程度転写されるが細胞核内でも低レベルであることが示唆された。

一方、挿入 DNA 断片を含む pINS クローンにより ISH 解析をした結果、この配列を含む転写産物が正常細胞でも存在することが示唆され、患者細胞核では約 1.5 倍多いことが判明した。正常細胞で検出される転写産物が何を示しているかは不明であるが、挿入 DNA 断片部分は反復配列やポリ A 配列を含むことからこれらの配列を含有する mRNA とクロスハイブリダイゼーションしている可能性があり、今後検討する必要がある。それにもかかわらず患者細胞での値が正常の 1.5 倍を示すことは何を意味しているのだろうか。前の FCMD 遺伝子の 3' 側 非翻訳領域部分の ISH の結果と合わせて考察すると、(1) 挿入 DNA を含む mutant allele 由来の mRNA はその構造上 (あるいは他の理由で) 不安定で分解され易い、(2) 反復配列を含む領域部分は何らかの理由で分解されにくく核内に蓄積する、等のことが考えられる。

しかし、今回の結果はまだ一次的なものであり、考察はまだ推論の域を越えないため、今後 ISH 法の方法論・条件設定等をさらに改良して詳細に検討すると共に、分子生物学的な他の手法によって別の側面からも検討する必要があると思われる。

E. 結論

Two-color ISH 法によって、(1) mutant allele 由来の mRNA は患者細胞核内では低レベルにしか存在しない、(2) 反復配列を含む領域部分の転写産物は、核内に多く存在する。

F. 研究発表

1. 論文発表

Liu J., Koyano-Nakagawa N., Amasaki Y., Saito-Ohara F., Ikeuchi T., Imai S., Takano

- T., Arai N., Yokota T. & Arai K.: Calcineurin-dependent nuclear translocation factor NFATx: molecular cloning and functional characterization. *Mol. Biol. Cell* 8: 157-170, 1997.
- Suzuki T., Nishio K., Sasaki H., Kurokawa H., Saito-Ohara F., Ikeuchi T., Tanabe S., Terada M. & Saijo N.: cDNA cloning of a short type of multidrug resistance protein homologue, SMRP, from a human lung cancer cell line. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 216: 258-264, 1997.
- Orii K. O., Aoyama T., Saito-Ohara F., Ikeuchi T., Orii T., Kondo N. & Hashimoto T.: Molecular characterization of the mouse very-long-chain acyl-CoA dehydrogenase gene. *Mammalian Genome* 8: 516-518, 1997.
- Tang X., Saito-Ohara F., Song J., Koga C., Ugai H. & Yokoyama K.: Assignment of the human gene for KBF2/RBP-Jk to chromosome 9p12-13 and 9q13 by fluorescence in situ hybridization. *Jpn. J. Hum. Genet.* 42: 337-341, 1997.
- Zhao J., Saito T., Kadotani T., Watanabe Y., Tanaka T., Saito-Ohara F. & Ikeuchi T.: Reconfirmation of a previously reported de novo case of partial 7q trisomy by means of whole chromosome painting. *Chromosome Sci.* 1: 35-38, 1997.
- Saito-Ohara F., Ikeuchi T., Matsumoto M. & Kurata S.: Assignment of the mouse heme oxygenase genes: heme oxygenase-1 (Hmox1) to chromosome 10 band C1 and heme oxygenase-2 (Hmox2) to chromosome 16 band B1. *Cytogenet. Cell Genet.* 77: 180-181, 1997.
- Orii K. O., Saito-Ohara F., Ikeuchi T., Orii T., Kondo N., Aoyama T. & Hashimoto T.: Assignment of the gene for very-long-chain acyl-CoA dehydrogenase (Acadvl) to mouse chromosome band 11B2-B5 by in situ hybridization. *Cytogenet. Cell Genet.* 78: 25-26, 1997.
- Song J., Murakami H., Yang Z. Q., Koga C., Adati N., Murata T., Geltinger C., Saito-Ohara F., Ikeuchi T., Matsumura M., Itakura K., Kanazawa I., Sun K. & Yokoyama K.: Human genes for KNLSL4 and Maz are located close to one another on chromosome 16p11.2. *Genomics* 52: 374-377, 1998.
- Ishibashi K., Yamauchi K., Kageyama Y., Saito-Ohara F., Ikeuchi T., Marumo F., & Sasaki S. Molecular characterization of human Aquaporin-7 gene and its chromosomal mapping. *Biochim. Biophys. Acta* 1399: 62-66, 1998.
- Ide H., Saito-Ohara F., Ohnami S., Osada Y., Ikeuchi T., Yoshida T., & Terada M.: Assignment of the BMPRIA and BMPRI B genes to human chromosome 10q22.3 and 4q23->q24 by in situ hybridization and radiation hybrid mapping. *Cytogenet. Cell Genet.* 81: 285-286, 1998.
- Sugimoto N., Fukuda Y., Saito-Ohara F., Kamiyama R., Nakagawa A., Mukae N., Nagata S. & Inazawa J.: The human caspase-activated DNase gene (hCAD): genomic structure, exonic single-nucleotide polymorphisms, and a highly polymorphic dinucleotide repeat at the hCAD locus. *J. Hum. Genet.* 44: 408-411, 1999.

2. 学会発表

- Ikeuchi T., Zhao J., Saito-Ohara F., Shimizu T. & Ichimura K.: Constitutional chromosome mutations in patients with neurofibromatosis type 2. UICC Symposium. Familial Cancer and Prevention. Molecular Epidemiology (Kobe), 1997.

齋藤深美子、塚原俊文、古城徹、後藤加奈子、荒畑喜一、池内達郎：Myotonic dystrophy 原因遺伝子 (MTPK) の転写産物に関する ISH 法を用いた分子細胞遺伝学的検索 (II)。日本人類遺伝学会第 42 回大会、神戸、1997 年 10 月。

池内達郎、林 愛子、石塚朋樹、佐々木博己、齋藤深美子、河野晴一、寺田雅昭：胃がん及び食道がん細胞株における cERBB2 遺伝子増幅ユニットの染色体上での存在様式：FISH 法による解析。日本人類遺伝学会第 42 回大会、神戸、1997 年 10 月。

池内達郎、林 愛子、齋藤深美子、石塚朋樹、佐々木博己、寺田雅昭：がん細胞株における cERBB2 遺伝子増幅ユニットの FISH 法による解析。日本癌学会第 56 回総会。京都、1997 年 9 月。

池内達郎、林 愛子、杉本奈々、齋藤深美子、河野晴一：ファイバー FISH の技術検討とヒト染色体各種領域における DNA クローン配列解析への応用。日本遺伝学会第 70 回大会、札幌、1998 年 9 月。

齋藤深美子、塚原俊文、古城徹、後藤加奈子、池内達郎、稲澤譲治、荒畑喜一：非翻訳領域でのトリプレットリピート病における RNA の細胞核内局在に関する分子細胞遺伝学的研究。日本人類遺伝学会第 43 回大会、山梨、1998 年 10 月。

池内達郎、楊増全、横森欣司、齋藤深美子、山本興太郎、梶井 正：Total premature chromatid separation (total PCS): 小児腫瘍の発生に関連した新しい遺伝形質。日本癌学会第 58 回総会。広島、1999 年 9 月。
齋藤深美子、福田陽司、伊藤昌弘、小畑慶子、松尾雅文、稲澤譲治：デュシャンヌ型筋ジストロフィー症と重度の精神遅滞を合併した男児患者における逆位 X 染色体切断部位の構造解析。日本人類遺伝学会第 44 回大会、仙台、1999 年 11 月。

池内達郎、楊増全、向井裕幸、齋藤深美子、辻 陽一郎、横森欣司、菅野恵子、橋本幸子、

梶本 寛、山本興太郎、梶井 正：Total premature chromatid separation (total PCS) 遺伝形質のホモ接合体から樹立した各種細胞株の細胞遺伝学的・細胞生物学的性状：小児腫瘍の好発性との関連。日本人類遺伝学会第 44 回大会、仙台、1999 年 11 月。

G. 知的所有権の取得状況
特になし。

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の病態解明に関する研究

分担研究者 堀江 正人 大塚製薬（株） 主任研究員

研究要旨 福山型先天性筋ジストロフィー原因遺伝子FCMDのマウスホモローグFcmdを単離し、この遺伝子がマウス第4染色体上にあることを明らかとした。さらに、作製したFcmd遺伝子欠損マウスの解析により、この遺伝子が胚発生に重要であること等を明らかとした。

A. 研究目的

マウスFcmd遺伝子変異マウスをジーンターゲットング法により作製し、福山型先天性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

マウスFcmd遺伝子のcDNA及びゲノミックDNAクローンを単離する。得られるcDNAよりanti-sense RNAプローブを調製し、マウス組織におけるFcmd遺伝子発現部位をin situ hybridizationにて検討する。また、マウスRadiation hybrid (RH) panel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。さらに、マウスFcmd遺伝子破壊用ターゲットングベクターを作製し、Fcmd遺伝子座を不活性化したES細胞を樹立する。このES細胞より得られるキメラマウスの交配により、ヘテロ欠損マウスおよびホモ欠損マウスを作製し、その表現型を解析する。さらに、3'非翻訳領域を含むマウスFcmdゲノミックDNAクローンよりFcmd遺伝子3'非翻訳領域ターゲットングベクターを構築し、Cre-loxPシステムにより、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挿入した遺伝子改変マウスを作製する。

C. 研究成果

ヒトFCMD遺伝子の翻訳開始コドンを含むエクソン2をプローブとして、マウス脳由来cDNA libraryおよび129SvEvマウス由来cosmid libraryより、それぞれcDNAおよびゲノムDNAクローンを得た。マウスFcmd遺伝子は、翻訳領域において核酸レベルで87.5%、また、アミノ酸レベルでは89.6%と、ヒトFCMD遺伝子に高い相同性を示した。anti-sense RNAプローブを用いたin situ hybridizationにより、Fcmd mRNAの分布をマウス胚で調べたところ、様々な組織でFcmd遺伝子のメッセージを検出できたが、中枢および末梢神経系において特に強い発現が認められた。成熟マウスの脳においては、海馬のCA領域と歯状回、小脳のプルキンエ細胞層と顆粒層でその発現が認められた。

また、RH panelを用いて染色体マッピングを行ったところ、マウスFcmd遺伝子はヒトFCMD遺伝子の存在する9q31のシンテニー領域にあたるマウス第4染色体上のDNAマーカーD4Mit272のテロメア側、約2 cRに位置

することが明らかとなった。

ジーンターゲットングにより作製されたFcmd遺伝子のF1ヘテロ欠損マウスは、見かけ上は正常であり、また、繁殖可能であった。このF1ヘテロ欠損マウス間の交配により得られるF2離乳マウスのgenotypingを行ったところ、ワイルドタイプマウス：ヘテロ欠損マウス：ホモ欠損マウス=35：62：0であり、ホモ変異マウスが胎生致死であることが明らかとなった。さらに、F2マウス胚のgenotypeを調べた結果、8.5日胚、9.5日胚、10.5日胚、13.5日胚で、ワイルドタイプマウス胚：ヘテロ欠損マウス胚：ホモ欠損マウス胚が、それぞれ8：13：2、24：34：2、2：7：0、14：27：0であった。

マウスFcmd遺伝子の3'非翻訳領域を含むマウスFcmdゲノミックDNAクローンの塩基配列を決定し、詳細な制限酵素地図を作成した。これをもとにloxP配列を組み入れた3'非翻訳領域置換用ターゲットングベクターを構築した。このターゲット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遺伝子座が置換されたES細胞株を樹立した。

D. 考察

in situ hybridizationの結果より、マウス胚発生過程において、中枢および末梢神経系を含む様々な組織でFcmd遺伝子が機能していることが示唆された。さらに、Fcmd遺伝子のホモ欠損マウスは胎生8.5-9.5日前後に死亡することが明らかとなり、Fcmd遺伝子がマウスの胚発生に必須であることが示唆された。これらの事実は、ヒトFCMD遺伝子にノンセンス点変異をホモで持つ患者が、これまでのところ見つかっていない疫学的事実と合致するものである。

E. 結論

Fcmd遺伝子ホモ欠損マウスは胎生致死であり、この遺伝子のマップされたD4Mit272の近傍に、責任遺伝子がマップされている自然発生変異マウスの報告もないため、ヒトFCMD遺伝子3'非翻訳領域のレトロトランスポゾン挿入した遺伝子改変マウスの作製が、福山型先天性筋ジストロフィー発症メカニズムの解明に必要であると示唆された。そのレトロトランスポゾン挿入マウス作製は、その第1段階であるマウスFcmd遺伝子3'非翻訳領域へのloxP導入ES細胞株樹立の過程に至った。Fcmdホモ欠損マウス胚の詳細な病理組織学的解析ならびにレトロトランスポゾン挿入マウスの解析が、福山型先天性筋ジストロフィー発症の分子メカニズム解明の糸口になると期待される。

F. 研究発表

論文発表

Kyushiki, H., Kuga, Y., Suzuki, M., Takahashi, E., and Horie, M. *Cytogenet. Cell Genet.*, **79**: 114-117 (1997)

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.* **83**: 232-235 (1998)

Horie, M., Suzuki, M., Takahashi, E., and Tanigami, A. *Genomics*, **60**: 241-243 (1999)