

199900399A-B

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
(課題番号 H11-脳-026)

平成9-11年度厚生科学研究費補助金
脳科学研究事業

平成12年4月

主任研究者 吉田幹晴
(国立精神・神経センター 神経研究所)

総括研究報告書概要版

(3頁)

総括研究報告書

(3頁)

分担研究報告書

(3頁)

平成11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

主任研究者：吉田幹晴

分担研究者：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研究報告書

平成12年 4月 5日

厚生大臣 丹羽 雄哉 殿

住 所 _____

フリガナ ヨシ ダ ミキ ハル

研究者 氏 名 吉 田 幹 晴

(所属施設 国立精神・神経センター)

平成11年度厚生科学研究費補助金(脳 科 学 研究事業)に係る研究事業を完了したので、次のとおり報告する。

研究課題名(課題番号) : 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
(H11-脳-026)

国庫補助金精算所要額 : 金 31,000,000 円也

1. 厚生科学研究費補助金総括研究報告書概要版及びこれを入力したフロッピーディスク (別添1のとおり)
2. 厚生科学研究費補助金総括研究報告書 (別添2のとおり)
3. 厚生科学研究費補助金分担研究報告書 (別添3のとおり)
4. 研究成果の刊行に関する一覧表

刊行書籍又は雑誌名(雑誌のときは雑誌名、巻号数、論文名)	刊行年月日	刊行書店名	執筆者氏名
<i>Hum Molec Genet</i> vol 9 Biochemical evidence for association of dystrobrevin with the sarcoglycan-sarcospan complex as a basis for understanding sarcoglycanopathy	2000	Oxford University Press	Yoshida M, Hama H, Ishikawa-Sakurai M, Imamura M, Mizuno Y, Araishi K, Wakabayashi-Takai E, Noguchi S, Sasaoka T and Ozawa E
<i>Neurosci News</i> vol 3 Dystrophinopathy and sarcoglycanopathy	2000	G+B Magazines, The Gordon and Breach Publishing Group	Ozawa E, Imamura M, Noguchi S and Yoshida M
<i>Eur J Biochem</i> vol 267 Formation of sarcoglycan complex with differentiation in cultured myocytes	2000	Blackwell Science	Noguchi S, Wakabayashi E, Imamura M, Yoshida M and Ozawa E

<i>Hum Molec Genet</i> vol 8 Loss of the sarcoglycan complex and sarcospan leads to muscular dystrophy in β -sarcoglycan-deficient mice	1999	Oxford Univ. Press	Araishi K, Sasaoka T, Imamura M, Noguchi S, Hama H, Wakabayashi E, Yoshida M, Hori T, Ozawa E
<i>Biochem Biophys Res Commun</i> vol 262 Developmental expression of sarcoglycan gene products in cultured myocyte	1999	Academic Press, Inc.	Noguchi S, Wakabayashi E, Imamura M, Yoshida M, Ozawa E
<i>Mol Cell Biochem</i> vol 190 Creatine kinase, cell membrane and Duchenne muscular dystrophy	1999	Kluwer Academic Publishers. Netherlands	Ozawa E, Hagiwara Y, Yoshida M

5. 研究成果による特許権等の知的財産権の取得状況

研究費の名称 = 厚生科学研究費補助金

研究事業名 = 脳科学研究事業

研究課題名 = 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

国庫補助金精算所要額 = 31,000,000

研究期間 = 1997-1999

研究年度 = 1999

主任研究者名 = 吉田幹晴 (国立精神・神経センター、神経研究所)

分担研究者名 = 笹岡俊邦 (国立精神・神経センター、神経研究所)

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にあった。両筋ジストロフィーは原因遺伝子が異なるものの、臨床症状や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サルコグリカン (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や特性を理解できれば、分子機構が説明できるだろうと考えて研究を進めてきた。今年度我々はこの目的に従い、幾つかの研究を行った。1) 昨年明らかにしたSG複合体と他のDAPとの結合のうち、シントロフィン (Syn) 及びジストロブレピン (DB) との結合について更に解析を進め、SG複合体の機能を考える上で興味ある成果を得た。2) SG複合体の特性である各成分、何れの遺伝子変異によっても複合体全体が失われる機構を理解するため、その生合成過程を筋由来の培養細胞を使って調べ興味ある結果を得た (以上、吉田)。3) β -SG欠損マウスを作成し、その表現形を γ -SG欠損マウスと比較検討して新たな知見を得た (笹岡)。

研究方法 = Dys-DAP複合体はウサギ骨格筋細胞膜より精製した。カルパイン消化及びWGAゲルクロマトグラフィーは既報に従った。培養細胞はマウスC2C12細胞を使った。β-SG欠損マウスの作成はβ-SGのN-末端側、細胞質領域の一部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に置き換えるターゲティングベクターを作成し、マウスES細胞を用いる常法により行った。以上の実験で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、これらをウサギ等に免疫して新たに作成した。

結果と考察 = (1) DBのN末端側がSG複合体と結合している：Dys-DAP複合体のカルパイン消化はDysを断片化したが、Synを含む殆どのDAPについてはその変化を認めなかった。一方DBはC末側が分解され、N末側38kDa程の断片になることが新事実として見出された。消化物をWGAゲルで分画してみるとDB断片は糖鎖がないにもかかわらずSG-SPN複合体を含む結合画分に検出された。DB断片はDys結合部位を失っており、従ってSG-SPN複合体に結合していることを強く示唆する結果であった。ただし結合画分に同じく含まれるDG複合体と結合する可能性は否定できなかった。そこで消化物のWGA結合画分を基に熱処理によってDG複合体を含まないSG-SPN複合体を調製し、そこにDB断片が含まれるか否かを調べた。DB断片が検出され、我々はDBのN末側にSG-SPN複合体と結合する部位があると結論した。DBはオルタナティブスプライシングにより様々なサイズの分子種が発現可能である。筋においては共通のN末を持つ3種(DB-1, -2, -3)が主に発現している。今回の結果から、その何れもがSG-SPN複合体と結合すると考えられる。DB-1, -2は他にDys及びSyn結合部位を持ち、DB-3はこれを持たない。従ってDB-1と-2はDysとSG-SPN複合体をつなぎとめていることになり、その間にSynが割って結合しているとみなされる。α-SynはnNOSと結合することが知られており、従ってSG-SPN複合体とnNOSは物理的につながっているものと考えられる。

(2) β-SGノックアウトマウス作成：β-SG^{-/-}マウスを昨年報告したγ-SG^{-/-}マウスと同様の方法で作成した。筋ジストロフィー症状を示し、その状況は同時期で比較してその症状が若干激しい印象を受けるものの、γ-SG^{-/-}マウスと良く似ていた。ただγ-SG^{-/-}マウスにおいて認められたSGおよびSPNの二次的減少は、その程度がγ型のものに比べ激しく、事実上検出できないことがわかった。変異SGの差によるこうした違いはSGPの患者でも認められていた。この不思議な現象は以下に述べるSG複合体形成機構の研究で明らかにされたこと、即ちβ-SGがSG複合体形成の核であるという事実によって説明できる。

(3) SG複合体の生合成過程：一般に細胞膜に存在する膜タンパク質は粗面小胞体で合成され、小胞体や

ゴルジ装置で糖鎖等の修飾を受けた後細胞表面に運ばれる。そこで培養6日目の細胞を使い、ブレフェルジンAによる小胞体からゴルジ装置へのタンパク質輸送を阻害した後、レクチン認識の差を用いて小胞体画分とポストゴルジ画分を分離調製した。SGおよびジストログリカン (DG) はどちらの画分にも存在していたが、SPNはポストゴルジ画分にも含まれていた。小胞体においてSGはDG複合体と独立して4量体を形成しうることが見出された。SG複合体形成過程を探るため、少量のSGが検出され始めた分化2日目のサンプルについて、複合体形成における中間生成物の同定を様々な抗体を利用した免疫沈降法にて行った。その結果、1) β -SGのみ、2) β -SG $\cdot\delta$ -SG、3) β -SG $\cdot\gamma$ -SG、4) β -SG $\cdot\gamma$ -SG $\cdot\delta$ -SG、5) α -SG $\cdot\beta$ -SG $\cdot\gamma$ -SG $\cdot\delta$ -SGの複合体のみが検出された。この結果から複合体形成が各成分の乱雑な会合でなく、ある決まった順序で進行することが明らかとなった。どの複合体にも β -SGが含まれていることから、このSGが複合体が形成の核になっていると考えられる。

(4) SG複合体の消失はDG複合体の不安定化を促す：SG複合体が、DG複合体と結合していることは昨年報告した。細胞膜の安定化に関するDysとDG複合体の結合、それがSG複合体の消失によってどう影響するかを調べるため、今回作成した β -SG $^{-/-}$ マウスの筋を使って解析した。筋をジギトニン存在下で均質化後溶性画分を回収し、WGA親和クロマト (α -DGと反応) およびDys抗体と β -DG抗体を用いた免疫沈降法で分画し、イムノプロットにより解析した。その結果、 α -DGと β -DGの結合および β -DGとDysの間の結合それぞれが野生種との比較により部分的に壊れていることが示され、結合力の劣化が認められた。このことはSGPがDMDと類似していることをよく説明する。

結論 = SG複合体はレセプターである可能性が指摘されている。従って何らかのリガンドがこれに結合し、シグナル分子であるnNOSの活性が制御される可能性を考えることもできよう。NOはその作用に二面性を持ち、従ってその量的制御は重要と思われる。サルコグリカノパチーの様にSG複合体が欠如する場合、NO産生制御が困難となって筋の障害が導かれる可能性を考えても良いのではなかろうか。

我々がかって提唱したSGP仮説ではSG複合体の一成分が遺伝子変異により失われると複合体全体が失われるとされた。しかしその後調べられた患者筋ではこの限りでなく、変異SG遺伝子の違いによって他のSGの二次的減少に差が認められた。我々が作成した2つのSG欠損マウスでもそれが再現される一方、私どものSG複合体生合成過程の研究からはそれを理解する機構を明らかにすることができた。

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 精製したジストロフィン（Dys）-ジストロフィン結合タンパク質（DAP）複合体（Dys-DAP複合体）のカルパインによる部分消化物を解析することにより、サルコグリカン（SG）複合体がジストロブレリン（DB）のN末端側と結合していることを明らかにした。このことからSG複合体がシグナル伝達分子nNOSと物理的に結合していると考えることができ、SG複合体の新たな機能を考える上で重要な結果となった。SG複合体の生合成過程を培養細胞を使って調べた結果、患者筋やSG遺伝子変異マウスで認められた不思議な現象を説明可能な特性を明らかにできた。

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（SCARM2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にあつた。両筋ジストロフィーは原因遺伝子が異なるものの、臨床症状や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サルコグリカン（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や特性を理解できれば、分子機構が説明できるだろうと考えて研究を進めてきた。今年度我々はこの目的に従い、幾つかの研究を行った。1) 昨年明らかにしたSG複合体と他のDAPとの結合のうち、シントロフィン（Syn）及びDBとの結合について更に解析を進め、SG複合体の機能を考える上で興味ある成果を得た。2) SG複合体の特性である各成分、何れの遺伝子変異によっても複合体全体が失われる機構を理解するため、その生合成過程を筋由来の培養細胞を使って調べ興味あ

る結果を得た（以上、吉田）。3) β -SG欠損マウスを作成し、その表現形を γ -SG欠損マウスと比較検討して新たな知見を得た（笹岡）。

B. 方法

Dys-DAP複合体はウサギ骨格筋細胞膜より精製した。カルパイン消化及びWGAゲルクロマトグラフィーは既報に従った。培養細胞はマウスC2C12細胞を使った。抗体は以前我々が作製したもの、今回新しく作製したもの、それに市販のものを取り混ぜて使用した。

（倫理面への配慮）

本研究における動物実験は、実験実施場所である国立精神・神経センター神経研究所が定める「動物実験に関する倫理指針」に基づいて行ったものであり、動物愛護については十分に配慮した。

C. 研究結果

1) DBのN末端側がSG複合体と結合している

Dys-DAP複合体のカルパイン消化はDysを断片化した。Synを含む殆どのDAPについてはその変化を認めなかった。ただDBはC末端側が分解され、

N末側38kDa程の断片になることが新事実として見出された。消化物をWGAゲルで分画してみるとDB断片は糖鎖がないにもかかわらずSG-SPN複合体を含む結合画分に検出された。DB断片はDys結合部位を失っており、従ってSG-SPN複合体に結合していることを強く示唆する結果であった。ただし結合画分に同じく含まれるDG複合体と結合する可能性は否定できなかった。そこで消化物のWGA結合画分を基に熱処理によってDG複合体を含まないSG-SPN複合体を調製し、そこにDB断片が含まれるか否かを調べた。DB断片が検出され、我々はDBのN末側にSG-SPN複合体と結合する部位があると結論した。

2) SG複合体の生合成過程

SG複合体の各成分、何れの遺伝子変異によっても、それを含まずすべてのSGの発現が影響を受け、複合体全体が失われる。こうした現象があるためにSGPという一群の筋ジストロフィーが発症する。この機構を理解するために我々は、筋由来の培養細胞を使ってSG複合体の生合成過程の研究を行った。一般に細胞膜に存在する膜タンパク質は粗面小胞体で合成され、小胞体やゴルジ装置で糖鎖等の修飾を受けた後細胞表面に運ばれる。そこでC2C12細胞を培養して6日、分化してからは2日目の細胞を使い、小胞体からゴルジ装置へのタンパク質輸送をプレフェルジンAにより阻害した後、レクチン認識の差を用いて小胞体画分とポストゴルジ画分を分離調製した。SG及びジストログリカン(DG)はどちらの画分にも存在していたが、SPNはポストゴルジ画分のみ含まれていた。小胞体においてSGはDG複合体と独立して4量体を形成しうることが見出された。

SG複合体形成過程を探るため、少量のSGが検出され始めた分化2日目のサンプルについて、複合体形成における中間生成物の同定を様々な抗体を利用した免疫沈降法にて行った。その結果、i) β -SGのみ、ii) β -SG \cdot δ -SG、iii) β -SG \cdot γ -SG、iv) β -SG \cdot γ -SG \cdot δ -SG、v) α -SG \cdot β -SG \cdot γ -SG \cdot δ -SGの各複合体がDGと結合する形で検出

された。

D. 考察

DBはオルタナティブスプライシングにより様々なサイズの分子種が発現可能である。筋においては共通のN末を持つ3種(DB-1, -2, -3)が主に発現している。今回の結果から、その何れもがSG-SPN複合体と結合すると考えられる。DB-1, -2は他にDys及びSyn結合部位を持ち、DB-3はこれを持たない。従ってDB-1と-2はDysとSG-SPN複合体をつなぎとめていることになり、その間にSynが割って結合しているとみなされる。Synの中少なくとも α -SynについてはnNOSと結合することが知られており、従ってSG-SPN複合体とnNOSが物理的につながっていると考えられる。一方でSG複合体がレセプターである可能性が指摘されている。想像を逞しくすれば、何らかのリガンドがSG-SPN複合体に結合し、シグナル分子であるnNOSの活性が制御抑制されると考えられなくもない。NOはその作用に二面性を持ち、従ってその量的制御は重要と思われる。SGPの様にSG複合体が欠損する場合、NO産生制御が困難となって筋の障害が導かれる可能性を考えても良いのではなかろうか。

SG複合体形成途上の中間複合体を検索することでこの複合体の形成が各成分の乱雑な会合でなく、ある決まった順序で進行することが明らかとなった。どの複合体にも β -SGが含まれていることから、このSGが複合体形成の核になっていると考えられる。換言すると β -SGPや β -SG欠損マウスのように β -SGが失われると以後の複合体形成が進行しないだろうし、これが存在する γ -SG欠損マウスの場合には不完全ながら複合体形成が起こると想定できる。我々が作成した β -と γ -SG欠損マウスを解析した結果、実際にこうした状況が確認された(笹岡俊邦、分担研究)。

E. 結論

精製Dys-DAPを使った生化学的研究から

SG-SPN複合体がnNOSと物理的につながっていることを示唆する結果を得た。従って、筋ジストロフィーの発症をシグナル伝達の立場から考慮する必要性が出てきた。

SG複合体の生合成過程を培養細胞を使って調べた結果、複合体の形成機構について新しい知見を得、四つのSGP間において認めらる違いの一端を説明できた。

F. 研究発表

1. 論文発表

[1] Yoshida, E. et al. Biochemical evidence for association of dystrobrevin with the sarcoglycan-sarcospan complex as a basis for understanding sarcoglycanopathy. *Hum Molec Genet*, in press

[2] 吉田幹晴 サルコグリカノパチー—その概念成立と最近における研究の進歩— 神経研究の進歩 44巻2号、2000 印刷中

[3] Ozawa, E et al. Dystrophinopathy and sarcoglycanopathy. *Neurosci News*, 3, 13-19, 2000

[4] Noguchi, S et al. Formation of sarcoglycan complex with differentiation in cultured myocytes. *Eur J Biochem* 267, 640-648, 2000

[5] Araishi, K et al. Loss of the sarcoglycan complex and sarcospan leads to muscular dystrophy in β -sarcoglycan-deficient mice. *Hum Molec Genet* 8, 1589-1598, 1999

[6] Noguchi, S et al. Developmental expression of sarcoglycan gene products in cultured myocyte. *Biochem Biophys Res Commun* 262, 88-93, 1999

[7] Ozawa E et al. Creatine kinase, cell membrane and Duchenne muscular dystrophy. *Mol Cell Biochem* 190, 143-151, 1999

2. 学会発表

[1] Yoshida, M. et al. Biochemical evidence for association of dystrobrevin with the sarcoglycan-sarcospan complex. COE Symposium 2000 on muscular dystrophy. Tokyo, Japan Mar 2000

[2] Sasaoka, T. et al. Modeling muscular dystrophy in sarcoglycan deficient mice. COE Symposium 2000 on muscular dystrophy. Tokyo, Japan Mar 2000

[3] Yoshida, M. et al. Biochemical evidence for association of dystrobrevin with the sarcoglycan-sarcospan complex. International Congress of Myology. Nice, France Mar 2000

[4] Yoshida, M. et al. Sarcoglycan-sarcospan complex interacts with syntrophins/ α -dystrobrevins as well as the dystroglycan complex. The 49th Annual Meeting of the American Society of Human Genetics. San Francisco, US Oct 1999

[5] Araishi, K. et al. Loss of the sarcoglycan complex and sarcospan leads to muscular dystrophy in the β -sarcoglycan-deficient mice. The 49th Annual Meeting of the American Society of Human Genetics. San Francisco, US Oct 1999

[6] 吉田幹晴ら サルコグリカンと結合しているジストロフィン結合タンパク質 第72回日本生化学会大会 (1999年 10月、横浜)

[7] 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の所見 第72回日本生化学会大会 (1999年 10月、横浜)

[8] 新石健二ら β -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の所見 第72回日本生化学会大会 (1999年 10月、横浜)

[9] 野口 悟ら マウス骨格筋細胞におけるサルコグリカン複合体形成過程 第72回日本生化学会大会 (1999年 10月、横浜)

[10] 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の所見 第22回 日本神経科学大会 (1999年 7月、大阪)

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 デュシェンヌ型筋ジストロフィー（DMD）に似た臨床経過をとるサルコグリカノパチー（SGP）の責任分子である β -サルコグリカン欠損（BSG $^{-/-}$ ）マウスを発生工学技術を用いて作成した。昨年報告した γ -サルコグリカン欠損（GSG $^{-/-}$ ）マウスと同様、筋ジストロフィー症状を示した。GSG $^{-/-}$ マウスを使って筋肥大を詳細に検討し貴重な知見を得た。

A. 研究目的

本研究では、SGPの原因遺伝子の一つ β -サルコグリカン（SG）遺伝子を欠損したマウスを発生工学技術を用いて作成する。BSG $^{-/-}$ マウスは β -SGP類似の筋病変を示すことが期待されるので、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むけた基盤研究を目指す。

B. 研究方法

マウス β -SG遺伝子を操作してこれを欠損させるターゲティングベクターを作成し、常法に従いマウスES細胞を用いて、BSG $^{-/-}$ マウスを作成した。 β -SGの発現はノーザンブロット、イムノ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（Dys）及び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及びイムノブロットで解析した。

（倫理面への配慮）

本研究における動物実験は、実験実施場所である国立精神・神経センター神経研究所が定める「動物実験に関する倫理指針」に基づいて行ったものであり、動物愛護については十分に配慮した。

C. 研究結果

BSG $^{-/-}$ マウスはGSG $^{-/-}$ マウスと同様、成育及び生殖は野生型と差はなかった。ヘテロマウス交配からの子孫マウスの遺伝子型を調べたところ、ホモ変異マウスは致死でないことがわかった。ノーザンブロット及びイムノブロットにより、 β -SGの欠損を確認した。

1) BSG $^{-/-}$ マウス骨格筋の免疫組織化学

免疫組織化学法で観察したところ、BSG $^{-/-}$ マウスでは、筋線維膜上においてすべてのSG（ α -、 β -、 γ -、 δ -SG）、サルコspan（SPN）が欠失していた。一方GSG $^{-/-}$ マウスでは、骨格筋の線維膜上で γ SGは欠失していたが、少量の α -、 β -、 δ -SG、SPNは存在していた。BSG $^{-/-}$ マウスはGSG $^{-/-}$ マウス同様Dys、 α -及び β -ジストログリカン（ α -DG、 β -DG）、ラミニン- α 2（Lam- α 2）は存在していた。この所見は、 β -SGP及び γ -SGPの所見と同様であった。

2) 病理学的所見と筋線維壊死

BSG $^{-/-}$ マウスの骨格筋の組織像はGSG $^{-/-}$ マウスのものと基本的に似ており、8週令で著しい筋壊死と再生が認められ、20週令では95%以上の筋線維が中心核線維で置換され、筋線維の大小不同がみられた。BSG $^{-/-}$ マウス、GSG $^{-/-}$ マウスともに心筋に病理変化が見られた。血清クレアチンキナーゼ活性、EBDによる生体染色を用いて筋壊死を調べたところ、組織像観察に対応して6-10週令で著しい筋線維壊死が見られることがわかった。

3) 筋肥大とその組織所見

BSG^{-/-}マウスはGSG^{-/-}マウスと似て12週令頃から四肢、肩、腰部に筋肥大が見られ、週令とともにその程度は増した。前脛骨筋(TA)の大きさは野生型の約1.5倍くらい大きかった。また皮膚を剥離した筋肉の中に白色の帯が認められた。これらの白色の帯は変性筋線維であることが組織学的検索で分かった。肥大筋の組織所見をGSG^{-/-}マウスを使って詳細に解析した。線維数を数えたところ、17, 21, 57週令で正常対照の約2倍に増加していた。比較的太い線維では、fiber splittingが見られたこと、fiber splittingにより分枝した細い線維も中心核を持つ再生線維であることがわかった。筋肥大は主に再生筋線維の増加によることが明らかになった。

4) Dys-DAP複合体分子構築の生化学的解析

BSG^{-/-}マウスを対象として、筋膜分画のイムノブロットを行った。免疫組織化学の結果と一致してβ-SGだけでなく、α-, γ-, δ-SGとSPNもほとんど検出できなかった。しかしDG複合体、Dysは野生型と同じように検出された。骨格筋RNAのノーザンブロット解析では、α-, γ-, δ-SG及びSPNのmRNAは野生型と差がなかった。このことはα-, γ-, δ-SGとSPNの減少が転写レベルでは影響されてないことを示している。

BSG^{-/-}マウスにおけるDys-DAP複合体の様子を調べるため、骨格筋のジギトニン抽出物からWGAアフィニティークロマトグラフィーまたは免疫沈降法によりDys-DAP複合体を調製し、イムノブロットにより解析した。WGAはα-DGの糖鎖と結合し、このDGと直接、間接的に結合しているDys及びDAPも結合する。BSG^{-/-}マウスの結合分画では、野生型マウスのものに比べてβ-DGとDysが減少しており、その分結合しない分画に検出された。抗Dys抗体を用いた免疫沈降法ではα-及びβ-DGの減少が認められた。また抗β-DG抗体を用いた免疫沈降法では、Dysだけでなくα-DGの減少が認められた。

D. 考察

今回作成したBSG^{-/-}マウスは昨年報告したGSG^{-/-}マウスと同様、進行性の筋ジストロフィーを示した。進行の程度は、mdxマウスよりも早期にみられた。SGPモデル動物筋ジストロフィー(δ-SG欠損)ハムスターや他グループにより作成されたγ-及びδ-SG欠損マウスでは心筋症所見も報告されている。我々のBSG^{-/-}及びGSG^{-/-}マウス心筋でもそれは認められるが、それほど顕著でない。生後約1年になって心筋内に線維化した部分が散見され、EBDの浸入した筋線維も認められた。

BSG^{-/-}及びGSG^{-/-}マウスのいずれも12週令頃より骨格筋で筋肥大が見られる。これらはDMDやベッカー型筋ジストロフィー、SGPに特徴的な所見であり、α-, γ-, δ-SG欠損マウスやδ-SG欠損ハムスターと同様である。筋肥大は線維数の増加によることを我々は明らかにした。そしてその原因は再生筋線維のsplittingにより単一の筋線維から複数本の筋線維へと分岐するためであった。

昨年我々はGSG^{-/-}マウスについてγ-SG以外のSG及びSPNの二次的減少を報告した。この研究で得たBSG^{-/-}マウスの場合もそれは同様であったが、GSG^{-/-}マウスの場合と比較してその程度が激しく、事実上検出できないことがわかった。変異SGの差によるこうした違いはSGPの患者でも認められていた。この謎は我々が今回明らかにしたSG複合体形成機構の研究(吉田 幹晴、総括研究報告)で明らかにされたこと、即ちβ-SGがSG複合体形成の核であるという事実によって説明される。

上述のようにBSG^{-/-}マウス筋ではSG複合体がほぼ完全に失われている。このマウス筋におけるDys-DAP複合体の様子を調べた結果、α-DGとβ-DGの結合及びβ-DGとDysの間の結合それぞれが野生マウスとの比較により部分的に壊れていることが示された。SG複合体がDG複合体の安定性、及びこの複合体とDysの結合の補強に寄与していることを示す結果である。DG複合体とDysの結合は細胞膜の安定化に必須な基底膜と細胞内膜骨格の結合の根幹であり、それがSGPにおいて変質していることを意味する。この結果はSGPがDMDと

類似していることをよく説明する。

E. 結論

遺伝子ターゲティング法を用いて、昨年の GSG^{-/-}マウスに続き BSG^{-/-}マウスを作成した。

このマウスは GSG^{-/-}マウスと同様、筋線維膜上の分子構築は SGP の所見を良く反映していた。BSG^{-/-}マウス、GSG^{-/-}マウスとも筋ジストロフィーの所見と筋の肥大の所見を示した。筋肥大は再生筋の splitting による線維数の増加によることが明らかになった。SG 複合体の欠損により Dys-DAP 複合体が不安定なることが明らかになった。

BSG^{-/-}マウス、GSG^{-/-}マウスは SGP の良いモデル動物であると考えられる。

F. 研究発表

1. 論文発表

[1] Rios, M. et al. Catecholamine synthesis is mediated by tyrosinase in the absence of tyrosine hydroxylase. *J. Neurosci.*, 19, 3519-3526 (1999).

[2] Araishi, K. et al. Loss of the sarcoglycan complex and sarcospan leads to muscular dystrophy in β -sarcoglycan-deficient mice. *Hum. Mol. Genet.* 8, 1589-1598 (1999)

[3] Yoshida, M. et al. Biochemical evidence for association of dystrobrevin with the sarcoglycan-sarcospan complex as a basis for understanding sarcoglycanopathy. *Hum. Mol. Genet.*, (In press)

[4] Sasaoka, T. et al. Muscle degeneration and hypertrophy in muscular dystrophy; Pathologic analysis in γ -sarcoglycan deficient mice. (Submitted)

2. 学会発表

[1] Sasaoka, T. et al. Modeling muscular dystrophy in sarcoglycan deficient mice. COE Symposium 2000, Muscular Dystrophy, molecular and cellular mechanisms and gene therapy. Tokyo, March 14-16, 2000

[2] Yoshida, M. et al. Biochemical evidence for association of dystrobrevin with the sarcoglycan-sarcospan

complex. COE Symposium 2000, Muscular Dystrophy, molecular and cellular mechanisms and gene therapy. Tokyo, March 14-16, 2000

[3] Araishi, K. et al. Loss of the sarcoglycan complex and sarcospan leads to muscular dystrophy in the β -sarcoglycan-deficient mice. The 49th Annual Meeting of the American Society of Human Genetics. San Francisco, US Oct 1999

[4] Yoshida, M. et al. Sarcoglycan-sarcospan complex interacts with syntrophins/ α -dystrobrevin as well as the dystroglycan complex. American Society of Human Genetics, 49th Annual Meeting. San Francisco, California, USA, October 19-23, 1999

[5] 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の所見 第72回 日本生化学会大会, パシフィコ横浜, 10月6-9日, 1999年

[6] 新石健二ら β -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の所見 第72回 日本生化学会大会, パシフィコ横浜, 10月6-9日, 1999年

[7] 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の所見 第22回 日本神経科学大会, 大阪, 7月6-8日, 1999年

