

200/0627

厚生科学研究費補助金

脳科学研究事業

筋ジストロフィーにおける筋線維崩壊の本体の解明

平成 13 年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 今村道博

平成 14 年（2002）年 4 月

目 次

I. 総括研究報告

筋ジストロフィーにおける筋線維崩壊の本体の解明 ----- 1

今村道博

II. 分担研究報告

筋ジストロフィーにおける筋線維崩壊の本体の解明 ----- 4

今村道博

筋ジストロフィーにおける筋線維崩壊の本体の解明 ----- 7

吉田幹晴

III. 研究成果の刊行に関する一覧 ----- 10

IV. 研究成果の刊行物・別刷 ----- 11

筋ジストロフィーにおける筋線維崩壊の本体の解明

（主任又は分担）研究者 今村道博 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とサルコグリカノパチーは異なる原因遺伝子により生じるが、筋症状は酷似している。両疾患においてはサルコグリカン複合体と呼ばれるジストロフィン結合糖タンパク質群の減少が認められるため、これが両者の筋症状に関連すると推察した。我々はこれを明らかにするため、1) 筋ジストロフィーモデルマウスを作成し、その筋症状を解析した。また、両疾患筋におけるSG複合体の機能回復を目的として、2) これに代わる類似構造の構築について検討した。さらに、3) SG複合体と一酸化窒素合成酵素との分子連関を明らかにする目的で両者を仲介するジストロブレピタンパク質の解析を行った。

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

A. 研究目的

筋ジストロフィーの3分の2を占めるデュシェンヌ型筋ジストロフィー（DMD）の克服のためには、この疾患における筋線維崩壊の分子機構を明らかにする必要がある。我々はサルコグリカノパチー（SGP）と呼ばれる筋ジストロフィーがDMDとは異なる原因遺伝子によるにも関わらず、その筋症状がDMDに酷似していることに注目してこれらに共通の分子機構が存在するものと推察した。SGPおよびDMDのモデルマウスを用いた解析により、両疾患筋にはサルコグリカン（SG）複合体の消失という共通の現象が認められた。そこで、我々は両者に酷似する筋症状の本体がSG複合体の形成障害にあると考え、これを明らかにすることを目的として本研究を推進している。

DMDの原因遺伝子産物であるジストロフィン筋細胞膜においてジストロフィン結合タンパク質群と巨大複合体（dys-DAP複合体）を形成している。この複合体は細胞外基質から細胞内アクチン

骨格までを架橋することにより、収縮などの機械的ストレスから筋細胞膜を保護するものと考えられる。細胞外基質との結合はラミニン結合糖タンパク質であるジストログリカン（DG）複合体によって成され、細胞内アクチン骨格との結合はジストロフィンによって成されている。dys-DAP複合体の構成ユニットであるサルコグリカン（SG）複合体はDGと結合するが、その機能についてはいくつかの考えが提出されている。一つはジストロフィンとDGによって形成される細胞外基質から細胞内骨格までの支持構造を強化するという物理的調節因子としての機能、もう一つは細胞内情報伝達系に関わる調節因子としての機能である。

本研究は新しい筋ジストロフィーモデルマウスを用いて、SG複合体の形成と筋症状との関連を解析すると同時に、SG複合体の機能について上記の2つの側面から解析するものである。

B. 方法

SGPのモデルである γ -SG遺伝子を欠損させたGSGマウスとDMDのモデルあるmdxマウスを交配し、 γ -SGとジストロフィン、両遺伝子を欠損するダブルノックアウトマウスを得た。このマウ

スの筋症状は組織学的、生化学的に解析した。

マウス ϵ -SG cDNAを γ -SG遺伝子プロモーター下流に繋いだものを発現ベクターとしてC57BL/6マウス骨格筋で特異的に ϵ -SGを発現するトランスジェニックマウスを作成した。

ジストロブレピン分子種およびシントロフィン分子に対する抗体を作製し、ウサギ骨格筋より精製した dys-DAP複合体を材料として詳細な免疫沈降解析を行った。

(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」に基づいて行われており、動物福祉への配慮は十分に行われた。

C. 研究結果

1) γ -SG、ジストロフィン両遺伝子を欠損するダブルノックアウトマウス (GSG-mdx) の解析

GSG-mdxマウスは加齢に伴い、脊柱の湾曲と運動障害が現れるようになった。寿命は約1年と短く、体重も20週齢前後から減少する傾向にあった。組織学的解析から、筋線維の壊死-再生に加えて、結合組織と脂肪組織の増勢が認められた。このような病理像は多くの骨格筋に広く認められたが、舌では比較的緩慢なものであった。さらに心筋においても線維化が認められたが、これは骨格筋よりも遅れて現れる傾向にあった。生化学的解析によりGSG-mdxマウス筋線維の dys-DAP複合体構成タンパク質を調べたところSG複合体の著しい発現低下が認められた。

2) 疾患筋におけるSG複合体再構築

横紋筋型 dys-DAP複合体の主要構成成分であるSG複合体は α -、 β -、 γ -、 δ -SGの4分子から形成されている。我々は α -SGのホモログとして発見された ϵ -SGが微量ながらもmdxやGSGの疾患筋に発現し、比較的安定なSG複合体を形成することを見出した。そこで ϵ -SGにより形成されるSG複合体の発現を上昇させれば、横紋筋型複合体の機能代償が行われるのかという問題を検討

するため、このSGを骨格筋特異的に高発現するトランスジェニックマウスを作成した。予備的解析によれば、 ϵ -SGの発現量が多いマウス骨格筋においては α -SGが消失することで、 $\alpha\beta\gamma\delta$ という横紋筋型SG複合体が $\epsilon\beta\gamma\delta$ という平滑筋型複合体に変換されることが示唆された。

3) 一酸化窒素合成酵素 (NOS) の機能に関わる dys-DAP複合体の多様性の解析

我々は、骨格筋細胞膜直下に存在する神経型 NOS (nNOS) が複数のジストロフィン結合タンパク質の仲介によりSG複合体と連結していることを明らかにしている。この仲介分子の中心となるジストロブレピン (DB) に注目して解析を行ったところ、骨格筋には3種類のDB分子種 (DB1、DB2、DB3) が発現するが、dys-DAP複合体はそれぞれの分子種を独立に擁することを明らかにした。さらにDB1とDB2を含むdys-DAP複合体がnNOSを連結するのに対して、DB3を含む複合体はnNOSを細胞膜に支持できないことが示された。

D. 考察

GSG-mdxダブルノックアウトマウスはGSG、mdxマウスと比べて明らかに重篤な筋症状を示していた。このマウスのdys-DAP複合体構成要素はSG複合体の極端な減少を除いてはmdxマウスのものと同等の発現量を示すことから、SG複合体の形成障害が筋症状と密接に関連することが示唆された。組織学的解析から、このマウス骨格筋では結合組織の増大と脂肪化が顕著であるため、これらがSG複合体の機能に関連する可能性が指摘された。

SGPとDMDに共通して認められるSG複合体の発現抑制が筋症状に関連するならば、人為的にSG複合体を安定化させられれば、筋症状が回復するのかという問題が提起される。我々の昨年度の解析結果は ϵ -SG分子の発現を上昇させれば α -SGもしくは γ -SGを欠損するSGPやDMDの筋細胞内でも安定なdys-DAP複合体が構築される可能性を示唆していた。従って、今回作成した ϵ -SGトランスジェニックマウスはSG複合体の機能回復を検

討するための重要な実験動物になるものと期待される。

nNOS自体が存在しても筋細胞膜直下への局在が阻害されると筋線維変性が生じると考えられており、nNOSの足場を提供するdys-DAP複合体の役割が注目されている。しかしながら我々は、これまでの考え方とは異なり、dys-DAP複合体にはnNOSを連結するものとしなないものが存在し、筋細胞膜上では両者が混在した状態であることを強く示唆した。これらの異なる性質をもつ複合体がどのような分子機構によって形成され、筋細胞膜上でどのような局在を示すのかという問題を明らかにすることが筋変性とnNOS活性との関連を明らかにする上で重要になると考えられた。

E. 結論

1) GSG-mdxマウスの解析により、SG複合体の著しい形成阻害が筋症状の発現に関連することが強く示唆された。

2) ϵ -SGの発現を上昇させることで、横紋筋型SG複合体を平滑筋型複合体へ変換させられる可能性を示し、これが疾患筋におけるSG複合体の安定化を検討する上で重要な分子となることを示した。

3) 筋細胞膜へのnNOSの局在がDB分子種によって規定されることを示し、dys-DAP複合体周辺に形成される微少環境に不均一性があることを示唆した。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

Mizuno, Y., Thompson, T.G., Guyon, J.R., Lidov, H.G., Brosius, M., Imamura, M., Ozawa, E., Watkins, S.C., Kunkel, L.M. Desmuslin, an intermediate filament protein that interacts with alpha-dystrobrevin and desmin. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 98, 6156-6161, 2001

吉田幹晴 骨格筋ジストロフィン複合体の分子構築 生体の科学 52巻4号, 301-307, 2001

2. 学会発表

(国内)

今村道博, 野口悟, 小沢鎧二郎: サルコグリカン複合体形成における ϵ -サルコグリカンの特性について 第75回日本薬理学会年会, 熊本, 3月, 2002年

吉田幹晴 α -ジストロプレビン-3はジストロフィン複合体の構成成分 第74回日本生化学会 京都, 10月, 2001年

(国際学会)

Ishikawa H, Nishino I, Mizuno Y, Imamura M, Nonaka I: Negative results in a search for human alpha-dystrobrevin deficiency. 6th International Congress of World Muscle Society, Salt Lake City, USA, September 6, 2001.

Hagiwara Y, Sasaoka T, Araishi K, Imamura M, Yorifuji H, Nonaka I, Ozawa E, and Kikuchi T: Caveolin-3 deficiency leads to muscle degeneration in mice. 6th International Congress of World Muscle Society, Salt Lake City, USA, September 7, 2001

Dressman D, Liu L, Engvall E, Araishi K, Imamura M, Sasaka T, Ozawa E, and Hoffman E: alpha- and beta-sarcoglycan delivery by AAV: Efficient rescue of muscle, but differential persistence of gene expression. The American Society of Human Genetics, 51st Annual Meeting San Diego, USA, Oct., 16, 2001

H. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む)

特になし

筋ジストロフィーにおける筋線維崩壊の本体の解明

（主任又は分担）研究者 今村道博 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とサルコグリカノパチーは異なる原因遺伝子により生じるが、その筋症状は酷似している。両疾患においてはサルコグリカン（SG）複合体と呼ばれるジストロフィン結合糖タンパク質群の減少が認められるため、これが両者の筋症状と密接に関連していると推察した。我々はこれを明らかにする目的で、1) 新しい筋ジストロフィーモデルマウスを作成してその筋症状を解析した。また、SG複合体の*in vitro*再構成解析により得た結果をもとに、2) 疾患筋におけるSG複合体の再構築について検討した。

A. 研究目的

我々はサルコグリカノパチー（SGP）と呼ばれる筋ジストロフィーがDMDとは異なる原因遺伝子の損傷によって生じるにも関わらず両者の筋症状が酷似していることに注目して、これらに共通の分子機構が存在すると考えた。SGPおよびDMDのモデルマウスを用いて解析を行ったところ、両疾患筋に共通して、サルコグリカン（SG）複合体の著しい減少が認められた。そこで、我々はSGPとDMDとの酷似する筋症状の本体がSG複合体の形成障害にあると考え、これを明らかにすることを目的として本研究を行っている。

DMDの原因遺伝子産物であるジストロフィンは筋細胞膜においてジストログリカン（DG）複合体、SG複合体、サルコパン、シントロフィン、ジストロプレピンなどのジストロフィン結合タンパク質群と巨大複合体を（dys-DAP複合体）を形成している。この複合体は細胞外基質から細胞内アクチン骨格までを架橋することにより、収縮などの機械的ストレスから筋細胞膜を保護するものと考えられる。細胞外基質との結合はラミニン結合糖タンパク質であるDG複合体によって成され、細胞内アクチン骨格との結合はジストロフィンによって成されている。dys-DAP複合体の構成ユニットであるSG複合体は

DGと結合するが、その機能については、いくつかの考えが提出されている。一つはジストロフィンとDGによって形成される細胞外基質から細胞内骨格までの支持構造を強化するという物理的調節因子としての機能、もう一つは、細胞内情報伝達系に関わる調節因子としての機能である。

本研究は新しい筋ジストロフィーモデルマウスを用いて、SG複合体を物理的機能の側面から解析すると同時に疾患筋における機能回復の方策を検討するものである。

B. 方法

SG複合体が筋線維変性に及ぼす影響を調べるため、1) ジストロフィンを欠損するDMDのモデル動物（mdxマウス）の横紋筋型SG複合体を極端に減少させた新しい筋ジストロフィーモデルマウスを作成、解析すると同時に、2) 疾患筋におけるSG複合体の機能回復法を検討した。

1) γ -SG遺伝子を欠損させたサルコグリカノパチーモデルマウスであるGSG(-/-)とDMDのモデルマウスであるmdx(-/-)マウスを交配しGSG+/-, mdx-/Yを作成した。これをmdxの雌マウスと交配してGSG+/-, mdx-/Y（雄）およびGSG+/-, mdx-/-（雌）得た。この雌雄を交配することによ

り γ -SGとジストロフィンの両遺伝子を欠損するダブルノックアウトマウスとmdxマウスを得た。

2) マウス ϵ -SGのcDNAをクローニングし、その翻訳領域の3'末端にcMyc-Tag配列を付加した(eSGmyc)。eSGmyc cDNAを γ -SG遺伝子プロモーターの下流に繋ぎ、両者の間にはウサギ β グロビンのイントロン2を挿入すると同時に3'末端にはSV40のpoly Aアデニレーションシグナルを連結した。これを発現ベクターとしてC57BL/6マウスの受精卵に導入し、骨格筋特異的に ϵ -SGmycを発現するトランスジェニックマウスを作成した。

(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」に基づいて行われており、動物福祉への配慮は十分に行われた。

C. 研究結果

1) γ -SG、ジストロフィン両遺伝子を欠損するダブルノックアウトマウス(GSG-mdx)の解析

交配によって得られたGSG-mdxマウス横紋筋のdys-DAP複合体について、その構成タンパク質にどのような変化が生じているのかを生化学的に解析した。その結果、GSG-mdxの骨格筋ではSG複合体のみが著しく減少していたが、他の構成成分についてはmdxマウスと同じレベルであった。

生存率について調べたところ、GSG-mdxマウスでは生後41週に50%、52週で約90%が死亡したが、mdxマウスでは生後43週目に一匹が死亡したのみであった。GSG-mdxマウスでは20週齢頃から脊椎の彎曲が認められるようになり、30週齢前後から歩行障害を持つものが現れ、体を横に倒すと起き上がり難いという特徴を有していた。体重の推移について調べたところ、GSG-mdxマウスでは21週齢を境にして緩やかに体重が減少して行くのが認められたが、mdxマウスでは21週齢以降も増加して行った。GSG-mdxマウスの体重減少パターンは雌雄による差はなく対照群との有意な差は25週齢で現れることが示された。この時期におけるGSG-mdxマウス

横紋筋の組織学的解析を行ったところ、筋線維の大小不同、中心核線維の存在に加えて著しい結合組織の増大が観察された。さらに、GSG-mdxマウスの半数が死亡する41週齢の筋組織では、結合組織の増大に加えて著しい脂肪化も認められた。また、25週齢とは異なり心筋組織に線維化を生じるものが増加した。

2) 疾患筋におけるSG複合体再構築

横紋筋型dys-DAP複合体の主要構成成分であるSG複合体は α -、 β -、 γ -、 δ -SGの4分子から形成されている。我々は近年、 α -SGのホモログとして発見された ϵ -SGに注目し、これが横紋筋以外において新しいタイプのSG複合体を形成すると同時にdys-DAP複合体類似構造を構成することを発見した。我々はこの類似構造が横紋筋型複合体の機能代償を行う可能性を追及するため ϵ -SGを骨格筋特異的に高発現するトランスジェニックマウスを作成した。その結果、導入遺伝子のコピー数が異なる5ラインの系統を確立した。予備的解析によれば、 ϵ -SGの発現量が多いマウス個体の骨格筋においては α -SGが消失し、 $\alpha\beta\gamma\delta$ という組成の横紋筋型SG複合体のほとんどが $\epsilon\beta\gamma\delta$ という平滑筋型複合体に変換されていることが示唆された。

D. 考察

GSG-mdxダブルノックアウトマウスについては重篤な筋症状を示すようになった。性染色体上のジストロフィン遺伝子が障害されたmdxマウスにおいては常染色体ホモログであるユートロフィンの発現上昇が認められ、これに加えて二次的なSG複合体の減少が生じる。一方、 γ -SGを欠損したGSGマウスではmdxよりも著しいSG複合体の減少が認められるが、ジストロフィンの発現にはほとんど影響しない。従って両遺伝子を欠損させた場合にはユートロフィン存在下でSG複合体が著減するものと予測された。実際にGSG-mdxマウス骨格筋の生化学的解析結果はこれを支持しており、mdx横紋筋の分子環境下において、SG複合体の形成阻害をすることが重篤な筋症状の発現を誘導するものと

考えられた。また、組織学的解析では対照群との比較において明らかな結合組織の増大と脂肪化とが観察されたため、SG複合体の機能との関連が注目される。

SG複合体の形成不全が筋症状の程度に関連するとすれば、SG複合体を安定化させることができれば、筋症状が回復するののかという問題が提起される。

そこで、我々は ϵ -SGに注目した。横紋筋型SG複合体は $\alpha\beta\gamma\delta$ の4つの分子より構成され、どれか1つに異常が生じると複合体全体が消失してSGPとなる。ところが我々は ϵ -SGが α -SGの機能を代償すること、そして、 γ -SGが欠失しても ϵ -SGは安定な複合体を形成することを昨年度の*in vitro*再構成解析により示した。さらに、 ϵ -SGにより成る平滑筋型および末梢神経型(シュワン細胞型)SG複合体はユートロフィンと共にdys-DAP複合体を形成することが示されている。このことは、 ϵ -SG分子の発現を上昇させることができれば α -SGもしくは γ -SGを欠損するSGPやDMDの筋細胞内でも安定なdys-DAP複合体が構築される可能性を示唆している。従って、今回作成した ϵ -SGトランスジェニックマウスはこれを検証するための重要な実験動物になるものと期待される。

E. 結論

GSG-mdxマウスの解析により、SG複合体の著しい形成障害が筋症状の発現に関連することが強く示唆された。

ϵ -SGの発現レベルを上昇させることにより、横紋筋型SG複合体を平滑筋型複合体へ変換できることが示唆され、 ϵ -SGトランスジェニックマウスは疾患筋でのSG複合体再構築を検討するための有用な実験動物であると結論された。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

Mizuno, Y., Thompson, T.G., Guyon, J.R., Lidov, H.G., Brosius, M., Imamura, M., Ozawa, E., Watkins, S.C., Kunkel, L.M. Desmuslin, an intermediate filament protein that interacts with alpha-dystrobrevin and desmin. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 98, 6156-6161, 2001

2. 学会発表

(国内)

今村道博、野口悟、小沢鉄二郎：サルコグリカン複合体形成における ϵ -サルコグリカンの特性について
第75回日本薬理学会年会, 熊本, 3月, 2002年

(国際学会)

Ishikawa H, Nishino I, Mizuno Y, Imamura M, Nonaka I: Negative results in a search for human alpha-dystrobrevin deficiency. 6th International Congress of World Muscle Society, Salt Lake City, UT, USA, September 6, 2001.

Hagiwara Y, Sasaoka T, Araishi K, Imamura M, Yorifuji H, Nonaka I, Ozawa E, and Kikuchi T: Caveolin-3 deficiency leads to muscle degeneration in mice. 6th International Congress of World Muscle Society, Salt Lake City, UT, USA, September 7, 2001

Dressman D, Liu L, Engvall E, Araishi K, Imamura M, Sasaka T, Ozawa E, and Hoffman E: alpha- and beta-sarcoglycan delivery by AAV: Efficient rescue of muscle, but differential persistence of gene expression. The American Society of Human Genetics, 51st Annual Meeting San Diego, USA, Oct., 16, 2001

H. 知的財産権の出願・登録状況(予定を含む)

特になし

筋ジストロフィーにおける筋線維崩壊の本体の解明

（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 我々はSG複合体と神経型一酸化窒素合成酵素（nNOS）とがジストロフィン結合タンパク質（DAP）である α -ジストロブレピン（DB）によって連結していることを明らかにし、nNOSの機能制御におけるSG複合体の機能について解析を進めている。骨格筋においては3種類のDB分子種が発現しているが、今回、ジストロフィン-ジストロフィン結合タンパク質（dys-DAP）複合体にもそれぞれのDBを擁する3種類が存在すること、そして、これらの中ではDB3を結合した複合体だけがnNOSを結合し得ないことを明らかにした。nNOS活性の抑制が筋線維崩壊に関与することが議論されており、この発見は筋細胞におけるnNOS活性制御という観点からも重要であると考えられた。

A. 研究目的

サルコグリカン（SG）複合体はジストロフィン（dys）とdys結合タンパク質（DAP）からなる巨大複合体（dys-DAP複合体）の主要な構成ユニットである。SG遺伝子の変異により、SG複合体の著しい減少もしくは消失が生じると筋ジストロフィー（サルコグリカノパチー）になることが示されているが、その分子機構については明らかでない。我々は骨格筋において、DAPの一つである α -ジストロブレピン（DB）がそのN末端側でSG複合体と結合していることを発見した。DBは別の領域でシントロフィン（syn）と呼ばれるDAPと結合すること、さらにsynは神経型一酸化窒素合成酵素（nNOS）と結合することが示されている。このことから、SG複合体は筋細胞においてnNOSの足場形成に関与することが強く示唆された。一方、筋線維変性を生じるDBノックアウトマウスにおいてはDB以外のdys-DAP複合体の構成タンパク質の発現に変化はないが、筋細胞膜直下に局在するはずのnNOSが消失し、酵素活性の低下を生じることが報告されている。DBがSG複合体に結合してnNOSの足場形成に関与することを考え合わせると、SG複合体が極端

に減少するサルコグリカノパチーにおいては、その筋変性の分子機構にnNOSの関与が考えられた。我々はこの問題を明らかにするため、DB分子に注目して本研究を進めている。

本年度は骨格筋に3種類のDB分子種（DB1, DB2, DB3）が存在していることに注目し、これらとnNOSの存在様式との関係について詳細な解析を行った。

B. 方法

本研究の解析では、精製dys-DAP複合体を用いると共にDB分子種およびsynに対する抗体による免疫沈降法を行った。

DB3の特異抗体作製については昨年度の報告書に記載した通りである。DB1に対する特異抗体作製では、ヒトDB1のC末端側にある特異配列領域（AA#: 579-686）を、synに対する特異抗体作製ではヒト β 1-synの一部（AA#: 111-207）に相当する領域をグルタチオン-S-トランスフェラーゼ融合タンパク質として精製し、抗原とした。これらをウサギに免疫し抗血清を得た後、アフィニティ精製した。DB1抗体は精製dys-DAP複合体のDB1との

み反応し、DB2やDB3とは反応しなかった。syn抗体は β 1-だけでなく α -synも強く反応した。dys-DAP複合体はウサギ骨格筋細胞膜より精製した。免疫沈降物はこのdys-DAP複合体と上記抗体を混ぜて一晩反応させた後、抗体をプロテインGゲルで回収して調製した。免疫沈降物の組成解析はイムノプロットにより行った。

(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

精製したdys-DAP複合体を抗DB3抗体により免疫沈降した後、イムノプロットで解析したところ、DB3の他、dys、SG複合体、ジストログリカン複合体が検出されたが、この沈降物中にDB1とDB2は検出されなかった。一方、抗DB1抗体を用いた免疫沈降においてはDB1の他、上記と同じ成分が検出され、DB2とDB3は検出されなかった。DB1とDB2にはSG複合体結合領域の他、syn結合構造とdys結合構造が存在しているが、DB3は後者の二構造を欠いている。これらの事実は、原理的には、1つのdys-DAP複合体中に異なる複数のDB分子種が共存する可能性を示している。しかしながら得られた結果は同一のdys-DAP複合体中に異なる3種類のDB分子種は共存しないことを示していた。さらに興味深いことに、抗DB1抗体を用いた沈降物にsynは存在していたが、抗DB3抗体を用いたものには存在していなかった。これを確認するため、抗syn抗体による免疫沈降を行ったところ、その沈降物にはsynの他、dys、SG複合体、ジストログリカン複合体、DB1、DB2が検出されたが、DB3は検出されなかった。これらの結果は、骨格筋細胞のdys-DAP複合体にはDB1とDB2、そしてDB3のそれぞれに結合した異なる構成のものが混在していること、そしてDB3を含むdys-DAP複合体のみがsynを欠いていること、すなわちnNOSを連結しな

いことを示していた。

D. 考察

3種類のDB分子の全てはSG複合体に結合できるがDB3のみがsynやdysに対する結合構造を欠失している。このためDB3を結合したSG複合体にはnNOSは連結されない。ところが、nNOSと直接結合しているsynの結合サイトはDB分子のみならず、dysにも存在している。このことはSG複合体にnNOSが繋がれなくても、dys-DAP複合体にはdysを介してnNOSが連結できることを示している。これまでの骨格筋のnNOS局在に関する研究では、むしろ、このdysとの連関を前提として議論されてきた。しかしながら、今回の結果はこの前提を覆すものであった。dys-DAP複合体におけるsynの存在はdysが存在するだけでは不十分であり、DB分子の共存が重要であると推察された。すでに報告されているDBノックアウトマウスの免疫組織化学解析ではDBの消失にもかかわらず、synが筋細胞膜に存在するのが示されている。この結果は、一見、我々の結果と矛盾しているように見えるが、重要なのは同マウスにおいてはnNOSが消失しているという事実である。synの持つPDZドメインはnNOSの結合ターゲットであるため、この結果は細胞膜直下に検出されるsynがnNOSを繋ぎ止められる正常な状態にないことを示唆している。synはDBの欠損によってdysとの結合も不完全となり、nNOSが結合できなくなったと考えられる。

E. 結論

nNOSに足場を提供しているdys-DAP複合体は均一な分子組成により構成されていると考えられてきたが、今回の我々の解析は、これがnNOSを連結するものと、連結できないものとに区別されることを明らかにした。最近になり、DB分子に結合する新規の中間径線維結合タンパク質が発見され、コストメア構造におけるDB分子の局在が注目されている。異なるDB分子種を擁するヘテロなdys-DAP複合体がどのような細胞膜領域に存在し、その微少環

境がnNOS活性の発現にどのように関連するかという問題が重要であると考えられた。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

吉田幹晴 骨格筋ジストロフィン複合体の分子構築
生体の科学 52巻4号、301-307, 2001

2. 学会発表

吉田幹晴 α -ジストロブレピン-3はジストロフィン複合体の構成成分 第74回日本生化学会 京都
2001年10月28日

H. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む）

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
吉田幹晴	骨格筋ジストロフィン複合体の分子構築	石川春律	生体の科学	医学書院	東京	2001	301-307

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表雑誌	巻号	ページ	出版年
Mizuno Y, Thompson TG, Guyon JR, Lidov HG, Brosius M, Imamura M, Ozawa E, Watkins SC, Kunkel LM	Desmuslin, an intermediate filament protein that interacts with alpha-dystrobrevin and desmin.	Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.	98	6156-6161	2001

20010627

以降のページは雑誌/図書等に掲載された論文となりますので
「研究成果の刊行に関する一覧表」をご参照ください。