

20020914

厚生労働科学研究費補助金
こころの健康科学研究事業

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 14 年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 今村道博

平成 15 年 (2003) 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	-----	5
-------------------------	-------	---

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	-----	9
-------------------------	-------	---

吉田幹晴

III. 研究成果の刊行に関する一覧	-----	12
--------------------	-------	----

IV. 研究成果の刊行物・別刷	-----	13
-----------------	-------	----

厚生労働科学研究費補助金（こころの健康科学研究事業）
（総括・分担）研究報告書

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、互いに酷似した筋症状を示す。我々はサルコグリカン(SG)複合体の減少という、両疾患に共通する現象に着目し、これが両者の筋症状と密接に関連することを示してきた。構造の減少は機能の低下を意味するため、SG複合体の機能をいかに回復させるかという問題が生じる。そこで、我々は、疾患筋においても安定に存在するSG複合体の構築法を検討し、筋ジストロフィーモデルマウスの筋線維変性に及ぼす効果を検証した。また、SG複合体が細胞内情報伝達系に関与するという観点から、神経型一酸化窒素合成酵素(nNOS)の局在に注目して、これがSG複合体とジストロプレビン分子種の相互作用によって規定され、細胞膜上の特異な領域に存在する可能性を示した。

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。サルコグリカノパチー(SGP)と呼ばれる筋ジストロフィーはDMDとは異なる原因遺伝子によるにも関わらず、DMDに酷似した筋症状を示すことが知られている。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きた。これまでの筋ジストロフィーモデルマウスの作成と解析から、この仮説は強く支持された。それでは、SG複合体を構造的に安定化させれば筋症状は改善するのか？また、構造に依らずに機能を回復させる方法は存在しないのか？という問題が生じる。本年度は、これらを明らかにする目的で、①新しいSG分子を

用いた安定なSG複合体構築の可能性を検討すると同時に、この分子の導入がDMDやSGPの筋変性に及ぼす効果について検証した。また、②SG複合体とnNOSとが分子連鎖によって繋がることから、nNOSの機能発現とSG複合体によって規定される局在との関連について解析を行った。

B. 方法

前年度に作成した ϵ -SG遺伝子導入マウス(Tg-ESGマウス)骨格筋についてH&E染色、免疫抗体染色法による組織学的解析を行った。また、Tg-ESGマウス骨格筋より細胞膜分画を調製し、ジストロフィンとジストロフィン結合タンパク質の発現、また、SG複合体の分子組成について解析した。さらにTg-ESGマウスを α -SG欠損マウス(SGA)、 γ -SG欠損マウス(GSG)、ジストロフィン欠損マウス(mdx)と交配し、 ϵ -SG分子の発現上昇が筋線維変性へ及ぼす影響について生化学的、組織学的解析を行った。

nNOSとSG複合体との解析では、ウサギ骨格筋より精製したdys-DAP複合体を用いた。筋細胞膜

標品の化学架橋、及びラフトの調製、さらには免疫組織化学的手法を用いることにより、骨格筋におけるnNOS, DB, SG複合体の局在について解析を行った。

(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 ϵ -SG遺伝子導入により形成されるSG複合体と、疾患筋における機能の解析

ϵ -SG遺伝子を導入したTg-ESGマウスについて、5つのラインを樹立した。免疫抗体染色では下肢部骨格筋、横隔膜、舌の筋細胞膜において ϵ -SGの顕著な発現が認められた。一方、心筋での発現は弱いものであり、使用した γ -SG遺伝子プロモーターの発現パターンと一致していた。ジストロフィン結合タンパク質とジストロフィンの発現について調べたところ、 α -SGの染色性のみが抑制されていた。この α -SGの発現抑制はイムノブロットにおいても確認されたが、ノーザンブロット解析からはmRNAレベルでの変化は認められなかった。

Tg-ESGマウス骨格筋における ϵ -SGの存在様式を免疫沈降法で解析したところ、この導入SGは β -SG, γ -SG, δ -SGと共に複合体を形成し、平滑筋型のSG複合体を形成していることが示された。このSG複合体はジストログリカン, ジストロフィン, サルコspanとも会合しており、形成された平滑筋型SG複合体はジストロフィン-ジストロフィン結合タンパク質複合体(dys-DAP複合体)の構成ユニットとして存在することが示された。

Tg-ESGとの交配により α -SGPモデルマウス(SGA), γ -SGPモデルマウス(GSG), DMDモデルマウス(mdx)の骨格筋に ϵ -SG遺伝子を導入したところ、SGAマウスにおいては β -SG, γ -SG, δ -SG, サルコspanの発現が回復し、GSGマウ

スにおいては β -SG, δ -SG, サルコspanの発現が回復した。両者の血中クレアチンキナーゼ活性は野生型マウスと同レベルであり、組織学的にも異常は認められなかった。これらの結果は ϵ -SGの発現上昇がSGA, GSGの両SGPモデルマウス骨格筋の筋線維変性を抑えたことを示していた。

SGAとGSGマウスの骨格筋には著しい筋肥大が観察されるが ϵ -SGを導入した場合にはコントロールレベルにまで回復していた。筋肥大のネガティブレギュレーターであるマイオスタチン(DGF-8)のmRNAを調べたところ、SAG, GSGで発現低下していたものが、 ϵ -SG遺伝子導入によってコントロールレベルにまで回復した。

mdxマウスとの交配による ϵ -SG遺伝子の導入においては、わずかにSG分子の発現を上昇させたものの、筋線維変性に対する効果を認めなかった。

② dys-DAPに対するnNOSの結合と局在

dys-DAP複合体の精製標品中において、nNOSはタンパク質染色レベルでは検出されないがイムノブロットでは僅かに検出された。精製dys-DAP複合体と筋細胞膜分画の双方に含まれるnNOS量をdys分子含量を基準にして比較したところ、精製標品においては明らかな減少が認められるため、dys-DAP複合体に対するnNOSの結合は弱いものであり、筋組織からの抽出及び精製過程においては多くが解離してしまうことを示唆していた。さらに、抗DB抗体と抗SYN抗体を用いた免疫沈降解析によりnNOSとの相互作用を調べたが、nNOSは検出範囲外であり、精製複合体を用いた場合と同様に、dys-DAP複合体に対するnNOS結合の弱さを示していた。

SG複合体に結合するDBには3種類の分子種(DB1, DB2, DB3)があり、dys-DAP複合体はそれぞれの分子種を独立に擁している。我々はDB1とDB2がnNOSを支持し得るのに対して、DB3はnNOSを支持できないことを示してきた。これらのDB分子種を擁するdys-DAP複合体の局在について解析したところ、nNOSはコスタメアに局限して存在する可能性が示唆された。

D. 考察

横紋筋型SG複合体においては、 α から δ までの4つのSG分子のうち、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の機能を代償するばかりでなく、 γ -SGが欠失した場合でも安定な複合体を形成して筋症状を改善することを示した。この結果は、 ε -SGという新しいSG分子が少なくとも α -SGPと γ -SGPの治療においては有用なツールとなり得ることを示唆していた。膜タンパク質を遺伝子治療の対象とする場合、免疫応答などの問題が生じるが、 ε -SGはSGPにおいても発現が認められる分子であり、外来抗原とはなり難い。すなわち α -SGや γ -SGの代償分子として、SGPの筋変性を防ぐものと期待される。さらに ε -SGの応用としては内因性の ε -SGを横紋筋細胞で発現上昇させるという方法が考えられた。横紋筋における ε -SG発現は筋分化に伴って減少するようにプログラムされている。この ε -SGの発現抑制機構を解明し正方向への制御を行うことが可能になれば、外来の遺伝子導入に頼らずにSGPの筋線維変性に対して効果をもたらすものと期待される。

今回、mdxマウスへの ε -SGの導入は筋線維変性そのものを抑えることはできなかった。但し、筋組織の線維化や脂肪化に対する効果については長期的解析の下で評価せねばならない。さらに、発現用プロモーターの選択など、導入遺伝子の構造についても検討する余地が残った。

我々は、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するため、筋細胞膜上では両者が混在した状態にあるというこれまでとは異なる考え方を示した。さらに、nNOSを擁するdys-DAP複合体がコスタメア特異的に存在する可能性を指摘した。今後、筋変性におけるnNOSの役割を明らかにして行くためには、これらの異なる構造(性質)をもつdys-DAP複合体がどのような分子機構によって形成され、どのように特定の領域に局在するようになるのかという問題を明ら

かにすることが重要になると考えられた。

SGPモデルマウス骨格筋では筋肥大が認められ、これがマイオスタチンmRNAの発現抑制に関連することが報告されているが、今回、我々は ε -SG遺伝子の導入がSGA, GSGマウスにおけるマイオスタチン発現を回復させることを示し、安定なSG複合体の構築がアクチビン受容体(ActRIIB)を介したシグナル伝達に関連することを示唆した。これは、SG複合体が細胞内情報伝達系に関わるという議論を進める上で重要な情報になるものと期待された。

E. 結論

① ε -SGの発現上昇が α -SGP及び γ -SGPモデルマウス骨格筋において機能的SG複合体を形成することを明らかにすると同時に、これが両疾患の克服を目指す上で重要なツールとなることを強く示唆した。但し、現時点ではDMDに対する効果は認められず、この点についてはより長期的な解析の下で評価を行う必要があると結論された。

② SG複合体が細胞内シグナル伝達系へ関与する可能性についてnNOSを中心に解析を行った結果、両者を架橋するDB分子の多様性がnNOSの局在を特異化させる可能性が示唆された。さらに、SG複合体の存在はマイオスタチンの発現に影響し、ActRIIBを介したシグナル伝達に関係することを示唆した。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

Sasaoka, T., Imamura, M., Araishi, K., Noguchi, S., Mizuno, Y., Takagoshi, N., Hama, H., Wakabayashi-Takai, E., Yoshimoto-Matsuda, Y., Nonaka, I., Kaneko, K., Yoshida, M. and Ozawa, E. Pathological analysis of muscle hypertrophy and degeneration in muscular dystrophy in

γ -sarcoglycan-deficient mice. Neuromusc. Disord, San Francisco, USA, Dec. 17, 2002
13, 193-206, 2003

Dressman, D., Araishi, K., Imamura M., Sasaoka, T.,
Liu, L. A., Engvall, E. and Hoffman, E.P. Delivery of
 α - and β -sarcoglycan by recombinant
Adeno-associated virus: Efficient rescue of muscle,
but differential toxicity. Human Gene Therapy, 13,
1631-1646, 2002

Hosaka, Y., Yokota, T., Miyagoe-Suzuki, Y., Yuasa,
K., Imamura, M., Matsuda, R., Ikemoto, T., Kameya,
S. and Takeda, S. α 1-Syntrophin-deficient skeletal
muscle exhibits hypertrophy and aberrant formation of
neuromuscular junctions during regeneration. J Cell
Biol. 158, 1097-1107, 2002

2. 学会発表

(国内)

西山章代、武田伸一、今村道博：中枢神経系に発現
する ϵ -サルコグリカンの構造解析 第55回日本細胞
生物学会大会, 横浜, 5月, 2002年

今村道博、武田伸一： ϵ -サルコグリカン遺伝子導
入マウスの作成と解析 第76回日本薬理学会年会,
福岡, 3月, 2003年

吉田幹晴、Beryl N. Ampong、武田伸一：シント
ロフィンがジストロフィン複合体に結合するため
には、ジストロフィン及び α -ジストロプレピン双方
のシントロフィン結合部位が必要である 第75回
日本生化学会大会 京都, 5月, 2002年

(国際学会)

Imamura M and Takeda S: Transgenic Mouse
Expressing ϵ -sarcoglycan under Muscle-specific
Promoter Predominantly Made Smooth Muscle-type
Sarcoglycan Complex in Skeletal Muscle. 42nd
American Society for Cell Biology Annual Meeting,

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 異なる原因遺伝子によるにも関わらず、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酷似した筋症状を呈する。我々は、筋細胞膜でのサルコグリカン(SG)複合体の減少という両疾患に共通な現象に着目し、これが両者の筋症状と密接に関連していることを示してきた。それでは、SG複合体の発現を回復できれば両者の筋症状が改善するののかという問題が生じる。そこで、我々は筋ジストロフィーモデルマウスを用いることにより、①疾患筋における安定なSG複合体の構築法を検討し、②筋ジストロフィーモデルマウスの筋線維変性に及ぼす効果について解析した。その結果、新しいSG分子種の導入がサルコグリカノパチーモデルマウスの筋細胞膜に安定なSG複合体を形成し、筋変性を抑制することを明らかにした。

A. 研究目的

デュシェンヌ型筋ジストロフィー(DMD)とサルコグリカノパチー(SGP)は原因遺伝子が異なるにも関わらず酷似した筋症状を示す。我々は、これが筋細胞膜におけるSG複合体の消失という両者に共通の分子機構に関連することを示してきた。そこで、本年度は、疾患筋における安定なSG複合体構築の可能性と、これがDMDやSGPの筋変性抑制に及ぼす効果を明らかにする目的で解析を行った。

DMDの原因遺伝子産物であるジストロフィン¹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、サルコスパン、シントロフィン、ジストロブ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

α -SG, β -SG, γ -SG, δ -SGの4分子から成るが、これらのうち、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。SG複合体はDGと結合していること、また、SGPではDGサブユニット間とDG-ジストロフィン分子間の結合が脆弱になることから、SG複合体の機能はDG-ジストロフィンによって形成される細胞外基質から細胞骨格までの分子架橋構造を強化することにあると考えられる。

最近発見され、 ϵ -SGと名付けられた新しいSG分子は平滑筋やシュワン細胞においてSG複合体(非横紋筋型)を形成しているが、これらは横紋筋型複合体とは異なり、DMDやSGPにおいても安定に存在することができる。我々はこの安定性に注目し、非横紋筋型複合体を疾患筋に導入して横紋筋型SG複合体の機能代償を行わせることを試みた。

B. 方法

翻訳領域の3'末端にcMyc-Tag配列を付加したマウス ϵ -SG 遺伝子(ϵ -SGmyc)を γ -SG 遺伝子プロモーターの下流につなげ、これを発現ベクターとしたトランスジェニックマウス(Tg-ESGマウス)の骨

骨格筋についてH&E染色、免疫抗体染色法による組織学的解析を行った。また、Tg-ESGマウス骨格筋より細胞膜分画を調製し、ジストロフィンとジストロフィン結合タンパク質の発現、さらには、SG複合体の分子組成について解析した。

Tg-ESGマウスを α -SG欠損マウス(SGA)、 γ -SG欠損マウス(GSG)、ジストロフィン欠損マウス(mdx)と交配し、 ϵ -SG分子の発現上昇が筋線維変性へ及ぼす影響について生化学的、組織学的解析を行った。SGAマウスについては4ラインのTg-ESGマウスと、GSG、mdxマウスについては2ラインのTg-ESGと交配を行い、得られたマウスの解析は10週齢までの範囲で行った。尚、 α -SG欠損マウスは米国Burnham Instituteより供与された。

(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 Tg-ESGマウス骨格筋の生化学的、組織学的解析

我々は ϵ -SGmycを導入したTg-ESGマウスについて、導入遺伝子の発現量が異なる5つのラインを樹立した。抗cMyc抗体を用いた免疫組織染色では下肢部骨格筋、横隔膜、舌の筋細胞膜において、導入 ϵ -SGの顕著な発現が認められた。一方、心筋での発現は弱いものであり、 γ -SG遺伝子プロモーターの発現パターンとよく一致していた。既存のジストロフィン結合タンパク質とジストロフィンの発現について調べたところ、 α -SGの染色性が抑制されていたが、 β -SG、 γ -SG、 δ -SG、サルコspan、ジストログリカン、シントロフィン、ジストロブレピン、ジストロフィンの発現に変化はなかった。 α -SGの発現抑制についてはイムノブロットにおいても確認されたが、ノーザンブロットによる解析からmRNAレベルには変化がないことを示していた。

免疫沈降法により、導入した ϵ -SGの存在様式に

ついて解析したところ、これが、 β -SG、 γ -SG、 δ -SGと共に複合体を形成し、平滑筋型のSG複合体を形成していることが示された。さらに、このSG複合体はジストログリカン、ジストロフィン、サルコspanとも会合しており、形成された平滑筋型SG複合体はdys-DAP複合体の構成ユニットとして存在することが示された。 ϵ -SGの発現が最も強いTg-ESGラインについて調べたところ、 α -SGにより形成される横紋筋型SG複合体はほとんど認められず、骨格筋に存在するSG複合体のほとんどが平滑筋型へ置換されたことを示していた。

② ϵ -SGの発現上昇が筋ジストロフィーモデルマウス骨格筋に及ぼす効果について。

ϵ -SGmycを疾患筋に導入するため、SGA、GSG、mdxの各筋ジストロフィーモデルマウスとTg-ESGマウスとを交配し解析した。

ϵ -SGmyc遺伝子を導入したSGAマウス(α -SGPモデルマウス)の骨格筋においては β -SG、 γ -SG、 δ -SG、サルコspanの発現が回復した。また、組織学的にはいかなる異常も認められなかった。血中クレアチンキナーゼ(CK)の活性も野生型と同レベルであり、これらの結果は ϵ -SG遺伝子の導入によってSGAマウスの筋線維変性が完全に抑制されたことを示していた。この抑制効果は交配した複数の異なるTg-ESGラインで確認された。 ϵ -SG遺伝子を導入したGSGマウス(γ -SGPモデルマウス)においては β -SG、 δ -SG、サルコspanの発現が回復していた。組織学的所見、及び血中CK値はSGAマウスの場合と同様であり筋変性が完全に抑制された。

SGAとGSGマウスの骨格筋は著しい筋肥大を生じるが ϵ -SGを導入したSGA、GSGマウスの骨格筋においてはコントロールレベルに回復していた。筋肥大のネガティブレギュレーターであるマイオスタチン(DGF-8)の発現を調べたところ、SAG、GSGマウスでは発現低下していたのに対して、 ϵ -SG遺伝子の導入個体ではコントロールレベルにまで回復していた。

mdxマウス(DMDモデルマウス)との交配によ

る ϵ -SG 遺伝子の導入においては、わずかに SG 分子の発現を上昇させたものの、筋線維の大小不同と中心核線維の存在、そして浸潤細胞など mdx に特徴的な病理像が観察され、筋変性が抑制されていないことを示していた。

D. 考察

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 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。今回、 ϵ -SG の発現を骨格筋で上昇させたところ、これが平滑筋型 SG 複合体 (β -SG, γ -SG, δ -SG, ϵ -SG より成る) を形成することが示された。Tg-ESG マウスにおいては α -SG の mRNA レベルに変化は認められないがタンパク質レベルでの発現が抑制されていた。このことは SG 複合体形成の過程において ϵ -SG が α -SG に対して競合的に働くことを示していた。

横紋筋型 SG 複合体においては、 α から δ までの 4 つの SG 分子のうち、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 が欠失した場合でさえも ϵ -SG は安定な複合体を形成して筋症状を改善することを示した。このことは、 ϵ -SG という新しい SG 分子が少なくとも α -SGP、及び γ -SGP の治療において有用なツールとなり得ることを示唆していた。我々は、SG のような膜タンパク質を遺伝子治療の対象とした場合、免疫応答などの問題が生じることを報告している。しかしながら、 ϵ -SG は SGP においても発現が認められるため外来抗原とはなり難い。すなわち α -SG や γ -SG に代わってこれを導入すれば、安定な SG 複合体を形成し、筋変性を防ぐものと期待される。さらに ϵ -SG によるの疾患治療への応用として、内因性の ϵ -SG を横紋筋細胞で発現上昇させることが注目される。通常、 α -SG の発現が筋分化に伴って

増大して行くのに対して ϵ -SG は減少して行く。 α -SG 欠損マウスの筋細胞においても ϵ -SG の発現パターンは変わらないため、横紋筋における ϵ -SG の低レベル発現は遺伝的プログラムによるものと考えられる。この抑制機構を解明して解除することが可能になれば、外来からの遺伝子導入に頼らずに SGP の筋症状を改善する可能性がある。

SGP モデルマウス骨格筋では筋肥大が認められ、これがマイオスタチン mRNA の発現抑制に関連することが報告されている。今回、我々も SGA, GSG の両マウスにおいてマイオスタチン mRNA の発現が減少していることを確認したが、Tg-ESG マウスとの交配により、これがコントロールレベルにまで回復することを見出した。このことは ϵ -SG 遺伝子の導入がマイオスタチンの mRNA 発現に影響することを示していたが、転写、翻訳のどのレベルで作用したのかは明らかでなかった。

我々は前年度までのジストロフィンと SG 遺伝子の 2 重欠損マウスを用いた解析から、SG 複合体が筋組織変性時の線維化及び脂肪化と密接に関連することを示している。今回、mdx マウスへの ϵ -SG 遺伝子の導入は SG 分子の発現を僅かに上昇させたものの、筋線維変性を抑えることはできなかった。但し、線維化や脂肪化などの組織変性に対する効果は明らかでない。従って、より長期的な解析によってその効果を評価する必要がある。

E. 結論

我々は、 ϵ -SG 遺伝子導入マウスの作成と解析から、 ϵ -SG の発現上昇が α -SGP 及び γ -SGP モデルマウス骨格筋において機能的 SG 複合体を形成することを示すと同時に、これが両疾患の治療法開発において重要なツールとなることを強く示唆した。但し、現時点では DMD に対する効果は認められず、この点では、より長期的な解析を行う必要があると結論された。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

Sasaoka, T., Imamura, M., Araishi, K., Noguchi, S., Mizuno, Y., Takagoshi, N., Hama, H., Wakabayashi-Takai, E., Yoshimoto-Matsuda, Y., Nonaka, I., Kaneko, K., Yoshida, M. and Ozawa, E. Pathological analysis of muscle hypertrophy and degeneration in muscular dystrophy in γ -sarcoglycan-deficient mice. *Neuromusc. Disord*, 13, 193-206, 2003

Dressman, D., Araishi, K., Imamura M., Sasaoka, T., Liu, L. A., Engvall, E. and Hoffman, E.P. Delivery of α - and β -sarcoglycan by recombinant Adeno-associated virus: Efficient rescue of muscle, but differential toxicity. *Human Gene Therapy*, 13, 1631-1646, 2002

Hosaka, Y., Yokota, T., Miyagoe-Suzuki, Y., Yuasa, K., Imamura, M., Matsuda, R., Ikemoto, T., Kameya, S. and Takeda, S. α 1-Syntrophin-deficient skeletal muscle exhibits hypertrophy and aberrant formation of neuromuscular junctions during regeneration. *J Cell Biol.* 158, 1097-1107, 2002

2. 学会発表

(国内)

西山章代、武田伸一、今村道博：中枢神経系に発現する ϵ -サルコグリカンの構造解析 第55回日本細胞生物学会大会, 横浜, 5月, 2002年

今村道博、武田伸一： ϵ -サルコグリカン遺伝子導入マウスの作成と解析 第76回日本薬理学会年会, 福岡, 3月, 2003年

(国際学会)

Imamura M and Takeda S: Transgenic Mouse Expressing ϵ -sarcoglycan under Muscle-specific

Promoter Predominantly Made Smooth Muscle-type Sarcoglycan Complex in Skeletal Muscle. 42nd American Society for Cell Biology Annual Meeting, San Francisco, USA, Dec. 17, 2002

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 SG複合体による α -ジストロブレピン（DB）を介した一酸化窒素合成酵素（nNOS）の活性制御を想定して解析を進めてきた。前年度において、我々はジストロフィン（dys）-ジストロフィン結合タンパク質（DAP）複合体には、結合するDB分子種（DB1/DB2/DB3）によって区別される3種類が存在すること、そしてこれらの中ではDB3を擁した複合体だけがnNOSアンカータンパク質であるシントロフィンを結合していないことが明らかになった。本年度はこのヘテロなdys-DAP複合体の存在がnNOS、そしてこれと結合するカベオリン-3の局在とどう関係するかを焦点を当てて研究を行った。nNOSやカベオリン-3の発現、局在が筋線維崩壊に関与することが議論されており、この研究はその意味で重要であると考えた。

A. 研究目的

ジストロフィン（dys）はdys結合タンパク質（DAP）と呼ばれる多数のタンパク質と共に大きな複合体（dys-DAP複合体）を形成している。DAPの一つ α -ジストロブレピン（DB）は骨格筋において3種類の分子種（DB1, DB2, DB3）が発現しているが、それぞれは共通のN末端部を持ち、サイズの異なるC末端がこれに続く。その構造的差異のためにDB1とDB2ではdysとシントロフィン（SYN）結合部位が存在するが、DB3では無い。N末端共通領域にはサルコグリカン（SG）複合体（dys-DAP複合体の一部を構成する小複合体でその構成成分の消失、著減は一群の筋ジストロフィーを発症する）の結合部位が存在する。我々はこれまでの研究から精製したdys-DAP複合体には各DB分子種を擁する3種類が存在すること、そしてその中ではDB3を結合する複合体だけがSYNを結合していないことを明らかにした。SYNは神経型一酸化窒素合成酵素（nNOS）と、またnNOSはカベオリン（Cav）-3と結合することが知られており、我々の結果によればDB3を結合した複合体だけがnNOS

やCav-3と結合していないことを示唆する。nNOSやCav-3の発現、局在が筋線維崩壊に関与することが議論されており、我々の見出したヘテロなdys-DAP複合体の存在がどのような意味を持つのかに関心を持ち、研究を行った。

B. 方法

本研究の解析では、ウサギ骨格筋より精製したdys-DAP複合体を用いた。DB分子種およびSYNに対する抗体の特性、また免疫沈降の方法については昨年報告どおりである。筋細胞膜標品の化学架橋は文献（Neely et al. PNAS 2001）を参考にした。ラフトの調製は文献（Galbiati et al. JBC 2001）に従った。免疫組織化学染色ではラット後肢筋の凍結切片を使って行った。観察はライカの共焦点レーザー顕微鏡を用いて行った。

（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

dys-DAP複合体中のnNOSをイムノプロットで解析したところ痕跡程度に検出された。dys-DAP複合体とその調製元である筋細胞膜双方に含まれるnNOSの量をdysの含量を基準にして比較したところ、複合体において多少のばらつきはあるが明らかに減少していた。即ちnNOSの結合は強いものではなく、ジギトニン抽出を含む精製過程でかなり解離してしまうものと見なされた。DBやSYN抗体による免沈物はこのような試料を出発にしていることから、nNOS解析は困難が予想されたので計10種に及ぶnNOS市販抗体を入手し、その中から当初使用したものよりかなり強いシグナルを示す抗体を選択して解析した。抗SYNによる免沈は比較的高収率であり、従って検出抗体が免沈と同じウサギ抗体であるにも関わらずバックグラウンドは低く抑えられたので、高分子量(160 kDa)のnNOSはその意味で解析可能であった。しかし含量が少なすぎ、結果としてnNOSの検出はできなかった。このようにnNOSとdys-DAP複合体の結合は弱いと考えられたので、文献(Neely et al. PNAS 2001)を参考に結合の安定化を試みた。まず筋細胞膜標品を十分稀釈した上で解裂可能な化学架橋剤(DSP)で処理し、超遠心操作により再度濃縮した。ジギトニン抽出物の免沈を行い、得られた免沈物の架橋を還元処理して破壊し解析を行った。しかし筋細胞膜標品が架橋によって強く不溶化したことがわかり、解析は難しかった。架橋条件を緩和して検討を続けている。

報告(Galbiati et al. JBC 2001)によればCav-3は筋細胞膜中でラフトを形成し、dysの一部はこれと一致して挙動することが示されている。ラフトはシグナル伝達場として注目されている構造である。我々の結果に基づけばDB1やDB2を擁するdys-DAP複合体だけがCav-3と結合することが予想されたので、ラフトとそれ以外の分画におけるdys-DAP複合体のDB組成に関心を持ち、解析を行った。しかし報告にあるようなラフト分画が今のところ得られず、まだ結論を出すに至っていない。

ラフト(Cav-3)による分別局在という考え方と並行して以下の考え方に基づく検討も行った。dys-DAP複合体は細胞膜上を筋線維に対し縦横に並ぶ格子状のコスタメアと呼ばれる構造に沿って局在しており、横方向の構造は筋原線維のZ線及びM線と重なる(仮名:Z-コスタメア、M-コスタメア)。最近DB分子に結合する新規の中間径線維デスマスリンが報告された(Mizuno et al. PNAS 2001)。この分子はデスミン結合タンパク質でもあった。一方デスミンはプレクチンと結合することが知られている。デスミンとプレクチンはZ線の他、Z-コスタメアにも分布しているが、M-コスタメアでは検出されない。デスマスリンについての詳細はこの点不明であるが、M-コスタメア上のdysはデスミンやプレクチンと共存していないことからデスマスリンとは結合しないと思われる。一方報告から推定されるDB上のデスマスリン結合部位を考えると、DB3ではそれが一部欠けているように思われる。こうしたことから我々はM-コスタメアに局在するdys-DAP複合体はDB3を擁するのではないかと、即ちZ-とM-コスタメアに局在するDBの分布に差があるのではないかと考えた。我々はラットの骨格筋を免疫組織化学的に解析した。後肢筋の横断面を抗DB3で染めると基本的に細胞膜が染まった。縦断面(線維方向)を染めてコスタメアを観察したが、抗体の力価が弱いためかこれまでのところ確かな像を観察できていない。間接法でなく、抗体を直接蛍光ラベルして染めてみたが改善されなかった。抗体の力価ばかりでなく、組織の作成法にも問題があると判断して現在検討している。また抗DB3抗体だけでなく手持ちのDB1/2/3やDB1/2を認識する抗体を使い、これらと抗SYN、抗nNOS抗体などを組み合わせた染色を様々に試みている。

E. 結論

我々の系(精製dys-DAP複合体)でnNOSのことを議論するためにはその検出が必須であるが、それが意外に困難となっている。細胞膜の不溶化を軽減する架橋条件の検討、及び架橋後の抽出条件の検

討は方向としては間違っていないと思うし、他にも応用が期待されるので続けていく。高次構造を維持した状態での研究も成果が期待できるので、技術を改善して結論を得る努力を続けて行きたい。これまでの成果については論文にまとめ投稿した。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

Sasaoka T et al. Pathological analysis of muscle hypertrophy and degeneration in muscular dystrophy in gamma-sarcoglycan-deficient mice
Neuromuscul Disord 13, 193-206, 2003

2. 学会発表

吉田幹晴、Beryl N. Ampong、武田伸一：シントロフィンがジストロフィン複合体に結合するためには、ジストロフィン及び α -ジストロブレピン双方のシントロフィン結合部位が必要である 第75回日本生化学会大会 京都、10月、2002年

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

なし

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
Sasaoka T, Imamura M, Araishi K, Noguchi S, Mizuno Y, Takagoshi N, Hama H, Wakabayashi-Takai E, Yoshimoto-Matsuda Y, Nonaka I, Kaneko K, Yoshida M, Ozawa E.	Pathological analysis of muscle hypertrophy and degeneration in muscular dystrophy in γ -sarcoglycan-deficient mice.	Neuromusc. Disord	13	193-206	2003
Dressman D, Araishi K, Imamura M, Sasaoka T, Liu LA, Engvall E and Hoffman EP	Delivery of α - and β -sarcoglycan by recombinant Adeno-associated virus: Efficient rescue of muscle, but differential toxicity.	Human Gene Therapy	13	1631-1646	2002
Hosaka Y, Yokota T, Miyagoe-Suzuki Y, Yuasa K, Imamura M, Matsuda R, Ikemoto T, Kameya S and Takeda S	α 1-Syntrophin-deficient skeletal muscle exhibits hypertrophy and aberrant formation of neuromuscular junctions during regeneration.	J Cell Biol.	158	1097-1107	2002

20020914

以降は雑誌/図書に掲載された論文となりますので、
P.12の「研究成果の刊行に関する一覧表」をご参照ください。