

20030760

厚生労働科学研究費補助金

こころの健康科学研究事業

ライソゾーム性筋疾患の病態解明と治療法開発に関する研究

平成15年度 総括研究報告書

主任研究者 西野 一三

平成16(2004)年3月

目 次

I. 総括研究報告

- ライソゾーム性筋疾患の病態解明と治療法開発に関する研究 1
西野 一三 (国立精神・神経センター 神経研究所)

II. 分担研究報告

1. 縁取り空胞を伴う遠位型ミオパチーの分子病態に関する研究 8
西野 一三 (国立精神・神経センター神経研究所)
2. Danon 病類似例に関する研究 11
埜中 征哉 (国立精神・神経センター武蔵病院)
3. 骨格筋の筋萎縮に関する新規分子の研究 13
石浦 章一 (東京大学大学院総合文化研究所)
4. リソゾーム膜蛋白質の機能解析 15
田中 嘉孝 (九州大学大学院薬学研究院)
5. 若年型 acid maltase 欠損症における高コレステロール血症 18
辻野 精一 (国立精神・神経センター神経研究所)

III. 研究成果の刊行に関する一覧表 20

IV. 研究成果の刊行物・別刷 21

I. 総括研究報告書

厚生労働科学研究費補助金（こころの健康科学研究事業）
総括研究報告書

ライソゾーム性筋疾患の病態解明と治療法開発に関する研究

主任研究者 西野一三 国立精神・神経センター神経研究所
疾病研究第一部 部長

研究要旨：ライソゾーム性筋疾患は、自己食空胞性ミオパチー（autophagic vacuolar myopathy; AVM）と縁取り空胞性ミオパチー（rimmed vacuolar myopathy; RVM）とに分類できる。RVMは、二次的ライソゾーム性筋疾患、AVMは一次的ライソゾーム性筋疾患と考えられる。我々は、AVMの病態を解明して治療法開発を目指す目的で、新たなAVMを同定とその病因・病態を明らかにすべく検討を行った。新しく見出された先天性X連鎖性AVMにおいては、Danon病と同様、空胞壁に事実上全ての筋鞘膜タンパクを発現し、さらにアセチルコリンエステラーゼ活性及び非特異的エステラーゼ活性を有していた。また、電顕では、空胞壁に基底膜を認めた。連鎖解析では、Xq28に原因遺伝子が存在する可能性が示された。Autophagosomeの特異的なマーカーであるLC3の分解に何らかの問題があることが明らかとなった。また、RVMに関しては、本邦に患者の多い縁取り空胞を伴う遠位型ミオパチー（DMRV）患者細胞・筋組織においては、シアリル化が減少していることを明らかにした。培地へのGNE代謝産物投与により、これらのシアリル化異常が補正可能であったことから、DMRVが治療可能となる可能性が示唆された。骨格筋萎縮に関与する分子として、ARPPおよびSHPS-1を同定した。acid maltase欠損症においては、高コレステロール血症を認めることを明らかにした。LAMP-1/LAMP-2が脂質代謝と細胞内コレステロールレベルの調節に関与することを示した。

分担研究者

西野一三：国立精神・神経センター神経研究所
疾病研究第一部 部長

埜中征哉：国立精神・神経センター武蔵病院
院長

石浦章一：東京大学大学院総合文化研究科
教授

田中嘉孝：九州大学大学院薬学研究院
細胞生物薬学分野 助手

辻野精一：国立精神・神経センター神経研究所
疾病研究第五部 室長

A. 研究目的

ライソゾーム性筋疾患の研究は立ち遅れており、「ライソゾーム性筋疾患」という言葉に対する定義すら定まっていない。我々は、ライソゾーム性筋疾患を、AVMとRVMに分類する。AVMの1つであるDanon病が、原発性LAMP-2欠損症であることが明らかとなったが、依然としてこれらの疾患で認められる特異な空胞の疾患特異性と形成機序については十分明らかに

されていない。そこで、Danon病と同様の特徴を有する新たな疾患を探索し、その病因・病態の解明を目指した。RVMについては、DMRV患者において生化学的および細胞生物学的実験により、分子病態を明らかにし、治療法開発への手掛かりを得ることを目指した。

B. 研究方法

1. DMRVの病因・病態に関する研究：UDP-GlcNAc 2-epimerase/ManNAc kinase (GNE/MNK)をコードするGNE遺伝子変異を有する組換え体を合成し、GNE及びMNKの酵素活性を測定した。患者培養細胞および筋組織において、シアリル化状態を検討した。また、患者培養細胞においては、見出されたシアリル化異常が、GNE/MNK代謝産物により回復出来るかどうかを検討した。
2. Danon病類似例に関する研究：Danon病と酷似する筋病理所見を示すものの臨床症状の異なる先天性X連鎖性AVMの1家系について、詳細な病理学的検討を行うと共に、遺伝子座

を決定すべく連鎖解析を施行した。

3. 骨格筋の筋萎縮に関する新規分子の研究：
ライソゾーム・オートファジー系の後進が、
筋肉を萎縮させるメカニズムを明らかにす
べく、cDNA マイクロアレイを用いて、新規分
子の探索を行った。具体的には、ラットを用
いた萎縮実験を行い、赤筋、白筋の代表とし
て、それぞれ、Soleus、EDL を摘出し、RNA
抽出後、cDNA マイクロアレイ解析を行った。
4. 若年型 acid maltase 欠損症における高コレ
ステロール血症に関する研究：若年型 acid
maltase 欠損症患者の 10 例および acid
maltase 欠損マウス 33 匹、対照野生型マウ
ス 42 匹より採血を行い、総コレステロール
値、HDL-コレステロール値、トリグリセリ
ド値を測定した。
5. ライソゾーム膜蛋白質の機能解析：LAMP-1
/LAMP-2 ダブルノックアウトマウスを作製し
たが、胎生致死であったため、胎仔由来線維
芽細胞を用いて観察を行った。

C. 研究結果

1. DMRV の病因・病態に関する研究：これまで
に見出された GNE 遺伝子変異を有する組換え
体タンパク質を作製し、酵素活性を測定した。
GNE ドメインの変異体は GNE 酵素活性が、MNK
ドメインの変異体は MNK 酵素活性がそれぞれ
低下していた。また、患者皮膚線維芽細胞お
よび筋培養細胞（筋管細胞）では、シアリル
化が正常対照の 60-75% に低下していた。
このシアリル化異常は、ManNAc や NeuAc など
の GNE 代謝産物投与によって、回復させるこ
とが出来た。一方、患者の血中および尿中シ
アル酸濃度は正常であった。また、患者筋組
織では、シアリル化が低下し、レクチン反応
性が変化した筋線維が散見された。
2. Danon 病類似例に関する研究：生下時直後よ
り筋緊張・筋力低下と呼吸障害を呈し、顔面
筋を含む全身の筋萎縮を認める新しい先天
性の自己食空胞性ミオパチーを見出した。
3 世代にわたり、同様の症状が男性にのみ認
められること、male-to-male transmission
がないことから、X 連鎖性疾患と考えた。筋
病理学的には、Danon 病と同様に、筋線維内
に多数の自己食空胞を認め、その自己食空
胞の膜は、dystrophin を含む各種の筋鞘膜
タンパク質を有していた。さらに、アセチル
コリンエステラーゼ及び非特異的エステラ
ーゼ活性を有していた。ライソゾームマーカ

ーである LIMP-1 と autophagosome のマーカ
ーである LC3 とで二重免疫染色を行ったとこ
ろ、Danon 病では、LC3 と LIMP-1 が共染され
ることは無かったが、本例では、多数の共染
像を認めた。連鎖解析では、1 家系しかない
ことから有意な LOD score を得ることは出来
なかったが、Xq28 付近に原因遺伝子が存在す
る可能性が示唆された。

3. 骨格筋の筋萎縮に関する新規分子の研究：
萎縮と共に遺伝子発現が顕著に上昇する遺
伝子として、cAMP-regulated phosphoprotein
16/19 (ARPP) と SHPS-1 を見出した。ARPP は、
脱神経時に発現が上昇するものの、尾部懸垂
では症状が認められないことから、脱神経特
異的であることが判明した。また、酵母
two-hybrid assay を行ったところ、アクチン
結合蛋白質 formin と結合することが明らか
となった。一方、SHPS-1 は、チロシンホス
ファターゼ SHP-1 の基質であるが機能は不明
である。通常は殆ど発現が認められないが、
萎縮過程においては、筋鞘膜上に発現が認め
られることが明らかとなった。
4. 若年型 acid maltase 欠損症における高コレ
ステロール血症に関する研究：若年型 acid
maltase 欠損症患者では、10 例中 9 例に血
清総コレステロール値の上昇が認められた。
acid maltase 欠損マウスの総コレステロール
値は、25 日齢では、野生型マウスと差がなか
ったが、以後上昇し、210 日齢では、対照群
に比して 50% 程度高い値を示した。HDL-コレ
ステロール値も同様の傾向にあったが、トリ
グリセリド値には有意無さを認めなかつた。
5. ライソゾーム膜蛋白質の機能解析：LAMP-1
/LAMP-2 ダブルノックアウト胎仔由来線維芽
細胞においても、細胞内ライソゾーム酵素活
性およびライソゾーム酵素受容体の発現レ
ベル・分布は正常であり、また、蛋白分解能
も正常であった。しかし、細胞内にはコレス
テロールの蓄積と脂肪滴形成異常が観察さ
れた。このことは、LAMP-1/LAMP-2 が脂質代
謝と細胞内コレステロールレベルの調節に
関与することを示唆している。

D. 考察

1. DMRV の病因・病態に関する研究：DMRV は、
GNE 遺伝子の機能喪失型変異により、酵素活
性が低下し、筋細胞のシアリル化が低下する。
この低シアリル化は GNE/MNK 代謝産物により

補正可能であることから、DMRV は治療出来る可能性が強く示唆される。

2. Danon 病類似例に関する研究：新しい先天性 X 連鎖性 AVM においては、LC3 の分解過程に何らかの問題が存在することが示唆される。LAMP-2 knock-out mouse においては、特定のライソゾーム酵素の mistargeting が示唆されていることから、本疾患においても、LC3 分解に関わる酵素の mistargeting が生じているのかも知れない。
3. 骨格筋の筋萎縮に関する新規分子の研究：萎縮と共に遺伝子発現が顕著に上昇する遺伝子として、cAMP-regulated phosphoprotein 16/19 (ARPP) と SHPS-1 を見出したが、その機能および意味づけに関しては、更なる検討が必要である。
4. 若年型 acid maltase 欠損症における高コレステロール血症に関する研究：これまで、acid maltase 欠損症における高コレステロール血症の存在は指摘されたことがなかった。患者の健康を維持する観点から重要である。
5. ライソゾーム膜蛋白質の機能解析：LAMP-1/LAMP-2 が脂質代謝と細胞内コレステロールレベルの調節に関与することが示唆された。

E. 結論

1. DMRV では、筋細胞に低シアリル化があり、この低シアリル化は GNE/MNK 代謝産物により補正可能である。DMRV は治療出来る可能性が強く示唆される。
2. 新しい先天性 X 連鎖性 AVM を見出した。LC3 の分解過程に何らかの問題が存在することが示唆される。
3. 萎縮と共に遺伝子発現が顕著に上昇する遺伝子として、ARPP と SHPS-1 を見出した。
4. acid maltase 欠損症では、高コレステロール血症を伴う。
5. LAMP-1/LAMP-2 が脂質代謝と細胞内コレステロールレベルの調節に関与する。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

・ Sugie K, Yamamoto A, Murayama K, Takahashi M, Mora M, Riggs JE, Oh SJ,

Colomer J, Inturriaga C, Saitoh S, Byrne E, DiMauro S, oanka I, Hirano M, Nishino I. Clin icopathological features of genetically confirmed Danon disease.

Neurology 58: 1773-1778, 2002.

・ Sugie K, Koori T, Yamamoto A, Ogawa M, Hirano M, Inoue K, Nonaka I, Nishino I.

Characterization of Danon disease in a man and his affected mother. *Neuromuscul Disord* 13: 708-711, 2003.

・ Hinderlich S, Salama I, Eisenberg I, Mitrani-Rosenbaum S, Nishino I, Noguchi S. Distal myopathy with rimmed vacuoles is allelic to hereditary inclusion body myopathy. *Neurology* 61: 145, 2003.

・ Kaneda D, Sugie K, Yamamoto A, Matsumoto H, Kato T, Nonaka I, Nishino I. A novel form of autophagic vacuolar myopathy with late-onset and multi-organ involvement. *Neurology* 61: 128-131, 2003.

・ Noguchi S, Tsukahara T, Fujita M, Kurokawa R, Toda T, Tsujimoto A, Arahata K, Nishino I. cDNA microarray analysis of individual Duchenne muscular dystrophy patients. *Hum Mol Genet* 12: 595-600, 2003.

・ Taniguchi K, Kobayashi K, Saito K, Yamauchi H, Ohnuma A, Hayashi YK, Many Jin DK, Lee M, Parano E, Falsaperla R, Pavone P, Van Coster R, Nishino I, Topaloglu H, Voit T, Endo T, Toda T. Worldwide distribution and broader clinical spectrum of muscle-eye-brain disease. *Hum Mol Genet* 12: 527-534, 2003.

・ Nishino I. Autophagic vacuolar myopathies. *Curr Neurol Neurosci Rep* 3: 64-69, 2003.

・ Yoshikawa A, Mitsuhashi H, Sasagawa N, Tsukahara T, Hayashi Y, Nishino I, Goto Y, Ishiura S. Expression of ARPP-16/19 in rat denervated skeletal muscle. *J Biochem* 134, 57-61, 2003.

・ Kino Y, Oma Y, Takeshita Y, Takahashi N, Sasagawa N, Ishiura S. Direct evidence that EXP/muscleblind interacts with CCUG

- tetranucleotide repeats. *Basic Appl Myol* 13, 293-298, 2003.
- Takeshita Y, Sasagawa N, Usuki F, Ishiura S. Decreased expression of alpha-B-crystallin in C2C12 cells that express human DMPK/160CTG repeats. *Basic Appl Myol* 13, 305-308, 2003.
 - Suo S, Sasagawa N, Ishiura S. Cloning and characterization of a *C. elegans* D2-like dopamine receptor. *J Neurochem* 86, 869-878, 2003.
 - Umeda A, Fujita H, Kuronita T, Hirosako K, Himeno M, Tanaka Y. Distribution and trafficking of MPR300 is normal in cells with cholesterol accumulated in late endocytic compartments: evidence for early endosome-to-TGN trafficking of MPR300. *J Lipid Res* 44: 1821-1832, 2003.
 - Pipo J.R, Feng J.H, Yamamoto T, Ohsak Y, Nanba E, Tsujino S, Sakuragawa N, Martiniuk F, Ninomiya H, Oka A, Ohno K. New GAA mutations in Japanese patients with GSD II (pompe disease). *Pediatric neurology* 29: 284-287, 2003
 - Hirota Y, Masuyama N, Kuronita T, Fujita H, Himeno M, Tanaka Y. Analysis of post-lysosomal compartments. *Biochem Biophys Res Commun* 314: 306-312, 2004.
 - Hirosako K, Imasato H, Hirota Y, Kuronita T, Masuyama N, Nishioka M, Umeda A, Fujita H, Himeno M, Tanaka Y. 3-Methyladenine specifically inhibits retrograde transport of cation-independent mannose 6-phosphate/insulin-like growth factor II receptor from the early endosome to the TGN. *Biochem Biophys Res Commun* 316: 845-852, 2004.
 - Noguchi S, Keira Y, Murayama K, Ogawa M, Fujita M, Kawahara G, Oya Y, Imazawa M, Goto Y, Hayashi YK, Nonaka I, Nishino I. Reduction of UDP-GlcNAc 2-epimerase/ManNA kinase activity and sialylation in distal myopath with rimmed vacuoles. *J Biol Chem* 279:11402-11407, 2004.
 - Ohnishi H, Mizunoe Y, Takade A, Tanaka Y, Miyamoto H, Harada M, and Yoshida S. Legionella dumoffii DjlA, a member of the DnaJ family, is required for intracellular growth. *Infect Immun* in press, 2004.
 - Fujita H, Umezaki Y, Ishikawa D, Uchimura S, Imamura K, Nara A, Yoshimori T, Hayashizaki Y, Kawai J, Ishido K, Tanaka Y, Himeno M. Novel mammalian class E vps proteins, SBP1/mVtalp/Lip5p and SBP3/ mVps2p/ESCRT-III, interact with and regulate the function of an AAA-ATPase SKD1/Vps4p. *J Cell Sci* in press, 2004.
 - Oma Y, Kino Y, Sasagawa N, Ishiura S. Intracellular localization of homopolymeric amino acid-containing proteins expressed in mammalian cells. *J Biol Chem* 2004 in press
 - 姫野 勝、藤田英明、田中嘉孝. 「エンドソーム・リソソームの形成と維持の分子機構」生化学, 75: 486-491, 2003.
 - 藤田英明、田中嘉孝、姫野 勝. 「リソソーム形成の分子機構」福岡医学雑誌、Vol. 94: 259-266, 2003.
 - 辻野精一. 糖原病Ⅱ型(酸性マルターゼ欠損症). 小児内科. 53:398-400, 2003
 - 黒仁田敏雄、姫野 勝、田中嘉孝. 「リソソーム膜蛋白質の役割」蛋白質・核酸・酵素増刊号 -蛋白質の一生- 掲載予定, 2004.
 - 田中嘉孝、藤田英明、姫野 勝 (2004). 「リソソーム蓄積症」蛋白質・核酸・酵素増刊号 -蛋白質の一生- 掲載予定, 2004.
- ## 2. 学会発表
- Noguchi S, Kurokawa R, Fujita M, Tsukahara T, Tsujimoto A, Nishino I. New cDNA micorarray for human skeletal muscles. Vth Japanese-French workshop on muscular dystrophies A challenge to knock out muscular dystrophies, Tokyo 6, 12, 2003.
 - Hayashi YK, Noguchi S, Matsumoto H, Ogawa M, Murayama K, Nonaka I, Nishino I. Molecular analysis of alpha-dystroglycanopathy

Vth Japanese-French workshop on muscular dystrophies. A challenge to knock out muscular dystrophies, Tokyo 6,13, 2003.

• Nishino I, Sugie K, Ishikawa H, Noguchi S, Ogawa M, Hayashi YK, Nonaka I. Collagen VI deficiency is the second leading cause of congenital muscular dystrophy in Japan Vth Japanese-French workshop on muscular dystrophies. A challenge to knock out muscular dystrophies, Tokyo 6,13, 2003.

• Nishino I. Autophagy in human muscle disease Gordon Research Conference. Autophagy in stress, development and disease, Waterville, Maine, USA, 7.26, 2003.

• Noguchi S, Kurokawa R, Fujita M, Tsukahara T, Tsujimoto A, Nishino I: Comprehensive gene expression analysis of the inhibitory effect of myostatin on skeletal myocyte differentiation. 8th International Congress of the World Muscle Society, Szeged, Hungary, 9.4, 2003.

• Nishino I, Sugie K, Nobutoki T, Noguchi S, Nonaka I. A new X-linked autophagic Vacuolar Myopathy. 8th International Congress of the World Muscle Society, Szeged, Hungary, 9.4, 2003.

• Kim DS, Hayashi YK, Matsumoto H, Ogawa M, Noguchi S, Michele DE, Campbell KP, Nonaka I, Nishino I. Abnormal glycosylation and loss of laminin binding activity of alpha-dystroglycan is associated with POMT1 mutation causing Walker-Warburg syndrome. 8th International Congress of the World Muscle Society, Szeged, Hungary, 9.5, 2003.

• Ohashi Y, Hasegawa Y, Yamaguchi S, Fukao T, Nonaka I, Nishino I. Mutations in Japanese patients with very-long-chain acyl-CoA dehydrogenase deficiency. 8th International Congress of the World Muscle Society, Szeged, Hungary, 9.5, 2003.

• Sugie K, Noguchi S, Arikawa-Hirasawa E, Nonaka I, Nishino I. Unique autophagic vacuoles with sarcolemmal features delineate Danon disease and its related autophagic vacuolar myopathies. 8th International Congress of the World Muscle Society, Szeged, Hungary, 9.5, 2003.

• Yoshioka M, Silan F, Asano Y, Minagawa K, Tanizawa T, Sugie K, Nishino I, Toda T. Deficiency of alpha-dystroglycan in congenital muscular dystrophies: clinical and genetic heterogeneity. 8th International Congress of the World Muscle Society, Szeged, Hungary, 9.5, 2003.

• Matsumoto H, Noguchi S, Ogawa M, Murayama K, Hayashi YK, Nishino I. Subcellular localization of fukutin and FKRP in muscle cells. 8th International Congress of the World Muscle Society, Szeged, Hungary, 9.5, 2003.

• Nishino I. Transmembrane lysosomal and enzyme lysosomal proteins and their roles in neuromuscular disorders. XVth Congress of the International Society of Neuropathology, Turin, Italy, 9.17, 2003.

• Nishino I. Clinical and molecular aspects of Japanese patients. Hereditary Inclusion Body Myopathy Workshop, National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, USA, 11.20, 2003

• Fujita H, Ishikawa D, Imamura K, Umezaki Y, Tanaka Y, Nara A, Yoshimori T, Yokota S, Ishido K, Kawai J, Hayashizaki Y, Himeno M. Identification of 3 novel SKD1 binding proteins (SBPs), which are possibly involved in diverse stages of endosomal membrane traffic. The American Society for Cell Biology, 43rd. Annual Meeting December, San Francisco, 13, 2003

• Nishino I. Danon disease-formerly, lysosomal glycogen storage with normal acid maltase 3rd Asian & Oceanian myology center annual scientific meeting, Singapore 1.9, 2004.

• Tanaka Y. Role of lysosomal membrane protein. The 1st Asia Symposium for Pharmaceutical

Sciences. Fukuoka, 1, 30, 2004.

- ・西野一三, 野口 悟, 塚原俊文, 藤田雅子, 黒川留美, 戸田達史, 辻本敦美: 独自に開発したヒト骨格筋用 cDNA マイクロアレイによる遺伝子発現解析. 第 44 回 日本神経学会総会 横浜, 5, 15, 2003.
- ・池添浩二, 古谷博和, 西野一三, 埜中征哉, 吉良潤一. Tubular aggregates における dysferlin の発現: 小胞体ストレスとの関連 第 44 回 日本神経学会総会 横浜, 5, 15, 2003.
- ・高橋俊明, 青木正志, 堅山真規, 小野寺明, 日沼雄二, 吉岡 勝, 今野秀彦, 西野一三, 埜中征哉, 齋藤 博, 糸山素人. 肢帯型筋ジストロフィーの表現型をしめす dysferlinopathy の検討. 第 44 回 日本神経学会総会 横浜, 5, 15, 2003.
- ・吉村まどか, 湯浅勝敏, 杉江和馬, 西野一三, 埜中征哉, 辻 省次, 武田伸一. canine X-linked muscular dystrophy の組織学的検討. 第 44 回 日本神経学会総会 横浜, 5, 15, 2003.
- ・飯島尚子, 中村昭則, 吉田邦広, 武田伸一, 西野一三, 池田修一. ヒトジストロフィン欠損骨格筋における ERK1/2, p38MAPK の検討—他の筋疾患との比較— 第 44 回 日本神経学会総会 横浜, 5, 15, 2003.
- ・松本 浩, 小川 恵, 金 大成, 野口 悟, 林 由起子, 西野一三. 臨床的に WWW/MEB と診断された 6 例における α -DG 発現の検討 第 44 回 日本神経学会総会 横浜, 5, 16, 2003.
- ・杉江和馬, 埜中征哉, 西野一三. Danon 病の自己食空胞に関する病理学的検討. 第 44 回 日本神経学会総会 横浜, 5, 16, 2003.
- ・林 由起子, 野口 悟, 藤田雅子, 黒川留美, 後藤加奈子, 塚原俊文, 西野一三. エメリー・ドレイフス型筋ジストロフィー (EDMD) における遺伝子発現解析. 第 44 回 日本神経学会総会 横浜, 5, 16, 2003.
- ・後藤加奈子, 林 由起子, 西野一三. 顔面甲上腕型筋ジストロフィー (FSHD) 患者とその両親の遺伝子解析. 第 44 回 日本神経学会総会横浜, 5, 16, 2003.
- ・石川晴美, 杉江和馬, 南 成祐, 埜中征哉, 西野一三. Ullrich 病—collagen VI の筋鞘膜特異的欠損例における検討. 第 44 回 日本神経学会総会 横浜, 5, 16, 2003.
- ・南 成祐, 金 大成, 杉江和馬, 村山久美子, 西野一三. 日本人におけるサルコグリカン異常症の原因サブユニット. 第 44 回 日本神経学会総会 横浜, 5, 16, 2003.
- ・喜多也寸志, 森野浩太郎, 米田行宏, 田淵正康, 西野一三, 埜中征哉. 首下がり姿勢を認めた 4 例の臨床的検討. 第 44 回 日本神経学会総会 横浜, 5, 16, 2003.
- ・井上昌彦, 若山吉弘, 小嶋宏子, 澁谷誠二, 鬼木弘明, 西野一三, 埜中征哉. Myoferlin の骨格筋における超微局在と dysferlin 欠損骨格筋での myoferlin 発現の解析. 第 44 回 日本神経学会総会 横浜, 5, 16, 2003.
- ・松本 浩, 林 由起子, 西野一三, 埜中征哉. 福山型先天性筋ジストロフィー患者における遺伝子診断. 第 45 回 日本小児神経学会総会 福岡, 5, 22, 2003.
- ・戸田達史, 齋藤加代子, 山内秀雄, 大沼 晃, 林 由起子, 西野一三. muscle-eye-brain 病患者の世界各地における分布とその広い臨床スペクトラム. 第 45 回 日本小児神経学会総会 福岡, 5, 22, 2003.
- ・杉江和馬, 埜中征哉, 西野一三. 筋鞘膜特異蛋白を有する膜で囲まれた筋線維空胞の疾患特異性に関する検討. 第 45 回 日本小児神経学会総会 福岡, 5, 22, 2003.
- ・大橋裕子, 長谷川有紀, 山口清次, 深尾敏幸, 埜中征哉, 西野一三. 日本人極長鎖アシル CoA 脱水素酵素 (VLCAD) 欠損症患者の遺伝子変異. 第 45 回 日本小児神経学会総会 福岡, 5, 22, 2003.
- ・三牧正和, 須藤 章, 小牧宏文, 西野一三, 埜中征哉, 後藤雄一. ミトコンドリア DNA3243A→

G 変異を有する 203 例の臨床、病理、遺伝学的検討 第 45 回 日本小児神経学会総会 福岡, 5, 22, 2003.

・藤井幸晴, 福水道郎, 須貝研司, 佐々木征行, 三牧正和, 久保田健夫, 後藤雄一, 西野一三.

偶然見つかった高 CK 血症の診断と問題点. 第 45 回 日本小児神経学会総会 福岡, 5, 22, 2003.

・Motokawa T, Katagiri T, Fujita H, Kawai M, Tanaka Y, Himeno M. Inulavosin, a new type of melanogenesis inhibitor, promote tyrosinase degradation. 第 76 回日本生化学会大会 横浜, 10, 2003.

・ Nakata M, Fujita H, Motokawa T, Katagiri T, Kawai M, Yokota S, Wada I, Tanaka Y, Himeno M. Inulavosin, a novel melanogenesis inhibitor, redirects tyrosinase to lysosome and accelerates a degradation of it. 第 76 回日本生化学会大会 横浜, 10, 2003.

・ Fujita H, Ishikawa D, Imamura K, Umezaki Y, Tanaka Y, Nara A, Yoshimori T, Yokota S, Ishido K, Kawai J, Hayashizaki Y, Himeno M. An AAA-ATPase SKD1/Vps4p and its binding proteins (SBPs) are involved in diverse stages of endosomal membrane traffic. 第 76 回日本生化学会大会 横浜, 10, 2003.

・梅田篤、藤田英明、黒仁田敏雄、広佐古香、姫野勝、田中嘉孝. Distribution and trafficking of MPR300 is normal in cells with cholesterol accumulated in late endocytic compartments: evidence for early endosome-to-TGN trafficking of MPR300. 第 26 回日本分子生物学会年会 神戸, 12, 2003.

・西野一三. 『先天性筋ジストロフィー研究—最近の進歩—』 第 7 回 阪神小児神経筋疾患研究会 大阪, 1. 17, 2004.

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得
なし
2. 実用新案登録
なし
3. その他
なし

II. 分担研究報告

1. 縁取り空胞を伴う遠位型ミオパチーの分子病態に関する研究

分担研究者 西野一三 国立精神・神経センター神経研究所
疾病研究第一部 部長
研究協力者 埜中征哉 国立精神・神経センター武蔵病院
院長

研究要旨：縁取り空胞を伴う遠位型ミオパチー (DMRV) は、UDP-N-acetylglucosamine 2-epimerase と N-acetylmannosamine kinase の 2 つのシアル酸代謝酵素をコードする遺伝子 (GNE) の機能喪失型変異により生じる疾患である。患者培養細胞では、シアリル化が著減していたが、シアリル化異常は UDP-N-acetylglucosamine 2-epimerase / N-acetylmannosamine kinase の代謝産物投与により回復した。このことから、DMRV は治療可能である可能性を強く示唆される。

A. 研究目的

ライソゾーム性筋疾患の 1 つ DMRV 患者培養細胞および筋組織におけるシアリル化異常の有無について検討する。

B. 研究方法

GNE 遺伝子変異が確認された患者の筋培養細胞および線維芽細胞においてレクチン染色を行い、シアリル化の程度を評価すると共に、GNE 遺伝子がコードする UDP-N-acetylglucosamine 2-epimerase / N-acetylmannosamine kinase の代謝産物 ManNAc や NeuAc を培地に添加してシアリル化異常が回復されるかを検討した。また、筋組織においてもレクチン染色を行い、シアリル化の程度を評価した。さらに、患者血清中のシアル酸濃度を測定した。

C. 研究結果

患者筋細胞および線維芽細胞においては、培地から血清を除去すると対照に比してシアリル化が著減した。このシアリル化の著減は、UDP-N-acetylglucosamine 2-epimerase / N-acetylmannosamine kinase 代謝産物である ManNAc や NeuAc の培地への添加により回復することが示された。また、患者筋組織においては、シアリル化異常を伴う筋線維が散見された。患者血清中のシアル酸濃度は正常であった。

D. 考察

患者培養細胞において、ManNAc、NeuAc の添加によりシアリル化が回復したことは、これらの代謝産物の投与により DMRV を治療出来る

可能性を強く示唆しており、今後治療法開発を進めていく上で極めて重要な発見である。一方、培地から血清を除去して初めてシアリル化異常が明らかになる事実は、生体内において、骨格筋が血清中のシアル酸を取り込んでいることを示している。一部の筋線維においてのみ異常が認められること、出生後 10 年以上経過してから発症することなどは、患者血清中のシアル酸濃度が正常である事実によって説明されるのかも知れない。

E. 結論

DMRV では、GNE 遺伝子の機能喪失型変異によって筋細胞にシアリル化異常が見られる。このシアリル化異常は、UDP-N-acetylglucosamine 2-epimerase / N-acetylmannosamine kinase の代謝産物投与により回復することから、将来的な治療法開発に繋がる可能性がある。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

・Nishino I, Ozawa E. Muscular dystrophies. *Curr Opin Neurol* 15: 539-544, 2002.

・Nishino I, Noguchi S, Murayama K, Driss A, Sugie K, Oya Y, Nagata T, Chida K, Takahashi T, Takusa Y, Ohi T, Nishimiya J, Sunohara N, Ciafaloni E, Kawai M, Aoki M, Nonaka I. Distal myopathy with rimmed vacuoles is allelic to hereditary inclusion

body myopathy. *Neurology* 59: 1689-1693, 2002.

• Michele DE, Barresi R, Kanagawa M, Saito F, Cohn RD, Satz JS, Dollar J, Nishino I, Kellely RI, Somer H, Straub V, Mathews KD, Moore SA, Campbell KP. Posttranslational disruption of dystroglycan-ligand interactions in congenital muscular dystrophies. *Nature* 418: 417-422, 2002.

• Takahashi M, Yamamoto A, Takano K, Sudo A, Wada T, Goto Y, Nishino I, Saitoh S. Germline mosaicism of a novel mutation in LAMP-2 deficiency (Danon disease). *Ann Neurol* 52: 122-125, 2002.

• Sugie K, Yamamoto A, Murayama K, Takahashi M, Mora M, Riggs JE, Oh SJ, Colomer J, Inturriaga C, Saitoh S, Byrne E, DiMauro S, Noanka I, Hirano M, Nishino I. Clinicopathological features of genetically confirmed Danon disease. *Neurology* 58: 1773-1778, 2002.

• Sugie K, Koori T, Yamamoto A, Ogawa M, Hirano M, Inoue K, Nonaka I, Nishino I. Characterization of Danon disease in a man and his affected mother. *Neuromuscul Disord* 13: 708-711, 2003.

• Yoshikawa A, Mitsuhashi H, Sasagawa N, Tsukahara T, Hayashi Y, Nishino I, Goto Y, Ishiura S. Expression of ARPP-16/19 in Rat Denervated Skeletal Muscle. *J Biochem* 134: 57-61, 2003.

• Nambu M, Kawabe K, Fukuda T, Okuno TB, Ohta S, Nonaka I, Sugie H, Nishino I. A neonatal form of glycogen storage disease type IV with a nucleotide deletion in GBE1 gene. *Neurology* 61: 392-394, 2003.

• Nishino I. Autophagic vacuolar myopathies. *Curr Neurol Neurosci Rep* 3: 64-69, 2003.

• Hirota Y, Masuyama N, Kuronita T, Fujita H, Himeno M, Tanaka Y. Analysis of post-lysosomal compartments. *Biochem Biophys Res Commun* 314: 306-312, 2004.

• Hirosako K, Imasato H, Hirota Y, Kuronita T, Masuyama N, Nishioka M, Umeda A, Fujita H, Himeno M, Tanaka Y. 3-Methyladenine specifically inhibits retrograde transport of cation-independent mannose 6-phosphate/insulin-like growth factor II receptor from the early endosome to the TGN. *Biochem Biophys Res Commun* 316: 845-852, 2004.

• Noguchi S, Keira Y, Murayama K, Ogawa M, Fujita M, Kawahara G, Oya Y, Imazawa M, Goto Y, Hayashi YK, Nonaka I, Nishino I. Reduction of UDP-GlcNAc 2-epimerase/ManNA kinase activity and sialylation in distal myopath with rimmed vacuoles. *J Biol Chem* 279:11402-11407, 2004.

2. 学会発表

• 西野一三, 野口 悟, 塚原俊文, 藤田雅子, 黒川留美, 戸田達史, 辻本敦美. 独自に開発したヒト骨格筋用 cDNA マイクロアレイによる遺伝子発現解析. 第 44 回 日本神経学会総会 横浜, 5, 15, 2003.

• 池添浩二, 古谷博和, 西野一三, 埜中征哉, 吉良潤一. Tubular aggregates における dysferlin の発現: 小胞体ストレスとの関連 第 44 回 日本神経学会総会 横浜, 5, 15, 2003.

• 高橋俊明, 青木正志, 壁山真規, 小野寺好明, 日沼雄二, 吉岡 勝, 今野秀彦, 西野一三, 埜中征哉, 齋藤 博, 糸山素人. 肢帯型筋ジストロフィーの表現型をしめす dysferlinopathy の検討. 第 44 回 日本神経学会総会 横浜, 5, 15, 2003.

• 吉村まどか, 湯浅勝敏, 杉江和馬, 西野一三, 埜中征哉, 辻 省次, 武田伸一. canine X-linked muscular dystrophy の組織学的検討 第 44 回 日本神経学会総会 横浜, 5, 15, 2003.

• 飯島尚子, 中村昭則, 吉田邦広, 武田伸一, 西野一三, 池田修一. ヒトジストロフィン欠損骨格筋における ERK1/2, p38MAPK の検討—他の筋疾患との比較— 第 44 回 日本神経学会総会 横浜, 5, 15, 2003.

・松本 浩, 小川 恵, 金 大成, 野口 悟, 林 由起子, 西野一三. 臨床的に WWW/MEB と診断された 6 例における α -DG 発現の検討 第 44 回 日本神経学会総会 横浜, 5, 16, 2003.

・杉江和馬, 埜中征哉, 西野一三. Danon 病の自己貧食空胞に関する病理学的検討. 第 44 回 日本神経学会総会 横浜, 5, 16, 2003.

・林 由起子, 野口 悟, 藤田雅子, 黒川留美, 後藤加奈子, 塚原俊文, 西野一三. エメリー・ドレイフス型筋ジストロフィー (EDMD) における遺伝子発現解析. 第 44 回 日本神経学会総会 横浜, 5, 16, 2003.

・後藤加奈子, 林 由起子, 西野一三. 顔面甲上腕型筋ジストロフィー (FSHD) 患者とその両親の遺伝子解析. 第 44 回 日本神経学会総会 横浜, 5, 16, 2003.

・石川晴美, 杉江和馬, 南 成祐, 埜中征哉, 西野一三. Ullrich 病-collagen VI の筋鞘膜特異的欠損例における検討. 第 44 回 日本神経学会総会 横浜, 5, 16, 2003.

・南 成祐, 金 大成, 杉江和馬, 村山久美子, 西野一三. 日本人におけるサルコグリカン異常症の原因サブユニット. 第 44 回 日本神経学会総会 横浜, 5, 16, 2003.

・喜多也寸志, 森野浩太郎, 米田行宏, 田淵正康, 西野一三, 埜中征哉. 首下がり姿勢を認めた 4 例の臨床的検討. 第 44 回 日本神経学会総会 横浜, 5, 16, 2003.

・井上昌彦, 若山吉弘, 小嶋宏子, 澁谷誠二, 鬼木弘明, 西野一三, 埜中征哉. Myoferlin の骨格筋における超微局在と dysferlin 欠損骨格筋での myoferlin 発現の解析. 第 44 回 日本神経学会総会 横浜, 5, 16, 2003.

・松本 浩, 林 由起子, 西野一三, 埜中征哉. 福山型先天性筋ジストロフィー患者における遺伝子診断. 第 45 回 日本小児神経学会総会 福岡, 5, 22, 2003.

・戸田達史, 斎藤加代子, 山内秀雄, 大沼 晃, 林 由起子, 西野一三. muscle-eye-brain 病

患者の世界各地における分布とその広い臨床スペクトラム. 第 45 回 日本小児神経学会総会 福岡, 5, 22, 2003.

・杉江和馬, 埜中征哉, 西野一三. 筋鞘膜特異蛋白を有する膜で囲まれた筋線維空胞の疾患特異性に関する検討. 第 45 回 日本小児神経学会総会 福岡, 5, 22, 2003.

・大橋裕子, 長谷川有紀, 山口清次, 深尾敏幸, 埜中征哉, 西野一三. 日本人極長鎖アシル CoA 脱水素酵素 (VLCAD) 欠損症患者の遺伝子変異. 第 45 回 日本小児神経学会総会 福岡, 5, 22, 2003.

・三牧正和, 須藤 章, 小牧宏文, 西野一三, 埜中征哉, 後藤雄一. ミトコンドリア DNA3243A→G 変異を有する 203 例の臨床、病理、遺伝学的検討. 第 45 回 日本小児神経学会総会 福岡, 5, 22, 2003.

・藤井幸晴, 福水道郎, 須貝研司, 佐々木征行, 三牧正和, 久保田健夫, 後藤雄一, 西野一三. 偶然見つかった高 CK 血症の診断と問題点. 第 45 回 日本小児神経学会総会 福岡, 5, 22, 2003.

・西野一三. 『先天性筋ジストロフィー研究—最近の進歩—』 第 7 回 阪神小児神経筋疾患研究会 大阪, 1. 17, 2004.

・西野一三. 自己貧食空胞性ミオパチーの分子病態 第 31 回 遺伝医学研究会 東京, 2. 27, 2004

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得
なし
2. 実用新案登録
なし
3. その他
なし

2. Danon 病類似例に関する研究

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
研究協力者 西野一三 国立精神・神経センター神経研究所
疾病研究第一部 部長

研究要旨：ライソゾーム性筋疾患の内、Danon 病や過剰な自己貪食を伴う X 連鎖性ミオパチー (XMEA) は特異な自己貪食空胞の出現をその病理学的な特徴とする。これまでに同様の空胞を認める疾患として、他に乳児型自己貪食性ミオパチーや成人型の存在を明らかにしてきた。今回、同様の筋線維内空胞を認める生下時直後より筋緊張低下と筋力低下を有する X 連鎖性の新たな自己貪食空胞性ミオパチーを見出した。Danon 病で欠損している LAMP-2 は欠損しておらず、Danon 病とは遺伝学的に異なる。Autophagosome 特異的なマーカーである LC3 の分解に異常が見出された。また、Xq28 に原因遺伝子が存在する可能性が高いことが示された。

A. 研究目的

これまでに我々は、Danon 病に類似した病理所見を呈する疾患群として、乳児型 AVM や成人型 AVM があることを報告してきた。今回、新たにどの疾患とも臨床像を異にする先天性 X 連鎖性 AVM を見出し、Danon 病との比較を行い病態を検討した。

B. 研究方法

発端者は 7 歳男児。9 歳の兄も同様の症状を有する。家系内に 3 世代にわたり同様の症状を有する男性が存在する。Male-to-male transmission はない。発端者の上腕二頭筋より採取された筋生検検体に対して、凍結固定後、厚さ 10・m の連続切片を作製し、ヘマトキシリン・エオジン染色、ゴモリトリクローム変法を含む各種組織化学染色を行った。また、ジストロフィンを含む各種筋鞘膜蛋白、LAMP-2、LIMP-1、LC3 に対してそれぞれ免疫染色を施行した。検体の一部はグルタルアルデヒド溶液で固定し、電顕観察を行った。さらに、Danon 病との遺伝学的異同を明らかにするために、LAMP-2 遺伝子オープンリーディングフレームのシークエンスを行った。また、家人の血液を採取し、連鎖解析を行った。

C. 研究結果

骨格筋の組織化学染色では、筋線維大小不同に加えて、筋線維内に多数の小空胞を認め

た。空胞の一部は空胞壁にアセチルコリンエステラーゼ活性及び非特異的エステラーゼ活性を有していた。免疫染色で LAMP-2 は欠損しておらず、また、LAMP-2 遺伝子変異も見いだされなかった。空胞壁は、各種の筋鞘膜蛋白を発現しており、筋鞘膜の性質を有することが明らかとなった。ライソゾームマーカーである LIMP-1 と autophagosome の間カーである LC3 とで二重免疫染色を行ったところ、Danon 病では、LC3 と LIMP-1 が共染されることはなかったが、本例では、多数の共染像を認めた。電顕的観察では、筋線維内の自己貪食空胞を多数認めると共に、基底膜が重層化しその層間に exocytosis を受けた後と思われる自己貪食産物が多数認められた。連鎖解析では、Xq28 への連鎖が示唆された。

D. 考察

本例は、筋病理学的特徴から Danon 病と同様特異な空胞を有する AVM に分類される疾患である。LAMP-2 が欠損していないことまた LAMP-2 遺伝子変異が見いだされないことから、本例は Danon 病とは異なる疾患であることが明らかとなった。電顕での基底膜重層化の所見は、Danon 病よりはむしろ XMEA で見られる所見であり、本例は XMEA に近い病態を持つことが示唆された。LC3 は、autophagosome の膜上に存在し、autophagosome がライソゾームと癒合して autolysosome に変化すると速やかに

分解されることが知られている。本疾患では、LC3 の分解過程に何らかの問題が存在することを示唆された。LAMP-2 knock-out mouse においては、特定のライソゾーム酵素の mistargeting が示唆されていることから、本疾患においても、LC3 分解に関わる酵素の mistargeting が生じているのかも知れない。連鎖解析では、1 家系しかないことから有意な LOD score を得ることは出来なかったが、Xq28 付近に原因遺伝子が存在する可能性が示唆された。

E. 結論

成人発症型自己食空胞性ミオパチーは Danon 病と同様の空胞を認め、特異な自己食空胞を認める AVM である。LC3 の分解に何らかの異常がある。Xq28 に原因遺伝子が存在する可能性が高い。

F. 健康危険情報

なし。

G. 研究発表

1. 論文発表

・ Sugie K, Yamamoto A, Murayama K, Takahashi M, Mora M, Riggs JE, Oh SJ, Colomer J, Inturriaga C, Saitoh S, Byrne E, DiMauro S, Noanka I, Hirano M, Nishino I. Clinicopathological features of genetically confirmed Danon disease. *Neurology* 58: 1773-1778, 2002.

・ Sugie K, Koori T, Yamamoto A, Ogawa M, Hirano M, Inoue K, Nonaka I, Nishino I. Characterization of Danon disease in a man and his affected mother. *Neuromuscul Disord* 13: 708-711, 2003.

・ Nishino I, Noguchi S, Keira Y, Murayama K, Ogawa M, Fujita M, Kawahara G, Oya Y, Imazawa M, Goto Y, Hayashi YK, Nonaka I, Nishino I. Reduction of UDP-GlcNAc 2-epimerase/ManNAc kinase activity and sialylation in distal myopathy with rimmed vacuoles. *J Biol Chem* 279: 11402-11407, 2004.

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

3. 骨格筋の筋萎縮に関する新規分子の研究

分担研究者 石浦章一 東京大学大学院総合文化研究科
教授

研究要旨：リソソーム・オートファジー系の亢進が筋肉を萎縮させるメカニズムを明らかにする目的で、DNA チップ技術を用いて新規分子の探索を行った。その結果、萎縮のモデルである脱神経の実験から、新規アダプター分子 ARPP と SHPS-1 が萎縮と同時に発現を上昇させることを発見した。

A. 研究目的

筋肉の萎縮の新しい形態であるオートファジーの分子機構を明らかにする目的で、萎縮筋で発現を上昇させる分子と細胞内蛋白質分解との関係を知るために、DNA マイクロアレイを用いて発現変化分子を網羅的に探索することが研究の目的である。

B. 研究方法

ラットを用いた萎縮実験を種々行い（脱神経、尾部懸垂）、骨格筋のうち赤筋、白筋の代表例である Soleus と EDL を取り出し、mRNA を抽出して DNA マイクロアレイを行った。

C. 研究結果

脱神経において特徴的なことは、アセチルコリン受容体の遺伝子発現が急上昇することであるが（約 30 倍）、私たちの実験でもこれが再現された。

このとき同時に、萎縮とともに遺伝子発現が顕著に上昇する遺伝子として、ARPP (cAMP-regulated phosphoprotein 16/19) が発見された。この遺伝子からは 2 つのアイソフォーム蛋白質が作られ、N 末端の差によって ARPP16、ARPP19 と呼ばれている。ARPP の発現は Soleus、EDL とともに上昇していたが、尾部懸垂では上昇が認められないことから、脱神経特異的であることが判明した。ARPP は酵母ツーハイブリッドによって相互作用する蛋白質を調べ、その機能を類推したところ、アクチン結合蛋白質である formin と結合する結果が得られたが、現在、詳細は検討中である。また、ARPP 過剰発現が萎縮とどう関係するかを調べるために ARPP 過剰発現マウスを作成しており、すでに F2 世代 2 系統が得られている。一方、萎縮特異的遺伝子として SHPS-1 という分子も得られた。これは、チロシンホスファターゼである SHP-1 の基質として初めて見つかった分子であるが、機能は明らかではな

かった。平成 15 年度の実験によってこの分子が、通常発現がほとんど見られない骨格筋細胞膜上に萎縮とともに出現することを発見した。

D. 考察

本研究で得られた結果から、萎縮関係する分子は蛋白質分解に関わる因子だけでなく、シグナル伝達分子が多いことが明らかになった。オートファジー関連因子の中には蛋白質分解に関わるプロテアーゼだけでなく、修飾因子、リン酸化酵素などがあることが酵母の研究で明らかになっている。

DNA マイクロアレイは、新規分子の探索には好都合の手法であるが、ポジティブな結論を得るには多くの実験が必要となる。今回の実験で得られた 2 つの分子は機能未知の新しい分子であり、今後の性質の解明が待たれる。また最近、ホモポリアミノ酸によってもオートファジーを誘導する系を確立した。

E. 結論

筋萎縮の過程で、今まで明らかになっていない分子の異常発現が認められた。これらを明らかにすることによって、萎縮のメカニズムや新しい治療法の概念が生まれることが期待される

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

・ Suo S, Sasagawa N, Ishiura S. Cloning and characterization of a *C. elegans* D2-like dopamine receptor. *Neurochem* 86, 869-878, 2003

• Takeshita Y, Sasagawa N, Usuki F, Ishiura S. Decreased expression of alpha-B-crystallin in C2C12 cells that express human DMPK/160CTG repeats. *Basic Appl Myol* 13, 305-308, 2003.

• Kino Y, Oma Y, Takeshita Y, Takahashi N, Sasagawa N, Ishiura S. Direct evidence that EXP/muscleblind interacts with CCUG tetranucleotide repeats. *Basic Appl Myol* 13, 293-298, 2003.

• Yoshikawa A, Mitsunashi H, Sasagawa N, Tsukahara T, Hayashi Y, Nishino I, Goto Y, Ishiura S. Expression of ARPP-16/19 in rat denervated skeletal muscle. *J Biochem* 134, 57-61, 2003.

• Oma Y, Kino Y, Sasagawa N, Ishiura S. Intracellular localization of homopolymeric amino acid-containing proteins expressed in mammalian cells. *J Biol Chem* 2004 in press

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得
なし
2. 実用新案登録
なし
3. その他
なし

4. リソソーム膜蛋白質の機能解析

分担研究者 田中嘉孝 九州大学大学院薬学研究院細胞生物薬学分野

研究要旨： LAMP-2 はリソソーム膜の主要な蛋白質である。LAMP-2 欠損による蛋白質分解能低下とオートファゴソームの蓄積は、リソソーム酵素受容体 (MPR46) のオートファゴソームでの選択的な分解とそれに伴うリソソーム酵素の分泌増加により引き起こされる。今回、LAMP-2 が細胞内における脂質代謝と輸送を調節することにより、リソソーム形成・維持および機能発現に関与していることを明らかにした。

A. 研究目的

我々は、リソソーム膜蛋白質の1つである LAMP-2 の機能解明を目的とし、LAMP-2 欠損マウスを作成し、LAMP-2 欠損が蛋白質分解能低下とそれに伴う未成熟なオートファゴソームの蓄積、心機能低下を引き起こすことを明らかにした。LAMP-2 の生理的重要性は Danon 病が原発性 LAMP-2 欠損症であることから支持される。一方、リソソーム膜には LAMP-2 と構造上極めて類似した蛋白質として LAMP-1 が発現している。我々は以前、LAMP-1 欠損マウスを作成し表現型を解析したところ、種々の臓器における LAMP-2 の発現量の増加以外に正常マウスと比べ際立った表現型は観察されなかった。この結果は、LAMP-1 の欠損を LAMP-2 が機能相補出来ることを示唆している。本研究は、LAMP-1 および LAMP-2 のダブルノックアウトマウス (LAMP-1^{-/-}/LAMP-2^{-/-}) を作成しそれぞれのシングルノックアウトマウスとの比較解析を通して、LAMP-2 欠損により引き起こされるオートファゴソーム蓄積の分子機構ならびに LAMP-2 のより詳細な生理機能の解明を目的とした。

B. 研究方法

LAMP-1 および LAMP-2 heterozygote をかけ合わせることで LAMP-1 および LAMP-2 ダブルノックアウトマウス (LAMP-1^{-/-}/LAMP-2^{-/-}) を作成した。LAMP-1^{-/-}/LAMP-2^{-/-} は胎児期 14.5 - 16.5 日で死亡したため、以下の解析は 12.5 - 13.5 日目の胎児あるいは trypsin 処理により得られた胎児由来繊維芽細胞を用いて行なった。

C. 研究結果

LAMP-1 および LAMP-2 シングルノックアウトマウスと異なり、LAMP-1^{-/-}/LAMP-2^{-/-} は胎生致死であった。また LAMP-1^{-/-}/LAMP-2^{-/-} 胎児繊維芽細胞の細胞内にはオートファゴソームの蓄積が観察されたが、LAMP-2 ノックアウトマウスで観察されたような未成熟なオートファゴソームではなく成熟型であった。リソソームの密度は低下したが、細胞内リソソーム酵

素活性およびリソソーム酵素受容体の発現レベル・分布は LAMP-1^{-/-}/LAMP-2^{-/-} 胎児繊維芽細胞においてほぼ正常であった。これらの結果からも予測できるように、LAMP-1^{-/-}/LAMP-2^{-/-} 胎児繊維芽細胞における蛋白分解能も正常であった。興味深いことに、LAMP-1^{-/-}/LAMP-2^{-/-} 胎児繊維芽細胞では細胞内にコレステロールの蓄積と脂肪滴形成異常が観察された。このような表現型は LAMP-2 の強制発現により回復した。LAMP-1^{-/-}/LAMP-2^{-/-} 胎児繊維芽細胞において観察されたリソソーム密度の低下はコレステロールの蓄積に起因することが示唆された。

D. 考察

LAMP-1 あるいは LAMP-2 シングルノックアウトマウスと異なり、LAMP-1 および LAMP-2 ダブルノックアウトマウスは胎生致死を示したことから、これらリソソーム膜蛋白質は部分的に重複した機能を有することが示唆された。LAMP-2 は細胞質蛋白質の選択的なリソソーム分解 (シャペロン介在性マイクロオートファジー) において受容体として機能することが報告されていた。しかしながら、LAMP-2 シングルノックアウトマウスの繊維芽細胞を用いた解析結果は細胞質蛋白質のシャペロン介在性マイクロオートファジーによる分解に LAMP-2 が受容体として機能しないことを明確に示した。むしろ、LAMP-2 は脂質代謝と細胞内コレステロールレベルの調節に関与することが示唆された。

E. 結論

これらの結果より、LAMP-2 は脂質代謝と或は輸送を調節することにより、リソソーム形成・維持および機能発現に寄与していることが示唆された。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- Umeda A, Fujita H, Kuronita T, Hirosako K, Himeno M, Tanaka Y. Distribution and trafficking of MPR300 is normal in cells with cholesterol accumulated in late endocytic compartments: evidence for early endosome-to-TGN trafficking of MPR300. *J Lipid Res* 44: 1821-1832, 2003.
- Hirota Y, Masuyama N, Kuronita T, Fujita H, Himeno M, Tanaka Y. Analysis of post-lysosomal compartments. *Biochem Biophys Res Commun* 314: 306-312, 2004.
- Hirosako K, Imasato H, Hirota Y, Kuronita T, Masuyama N, Nishioka M, Umeda A, Fujita H, Himeno M, Tanaka Y. 3-Methyladenine specifically inhibits retrograde transport of cation-independent mannose 6-phosphate/insulin-like growth factor II receptor from the early endosome to the TGN. *Biochem Biophys Res Commun* 316: 845-852, 2004.
- Ohnishi H, Mizunoe Y, Takade A, Tanaka Y, Miyamoto H, Harada M, and Yoshida S. Legionella dumoffii DjlA, a member of the DnaJ family, is required for intracellular growth. *Infect Immun* In press, 2004.
- Fujita H, Umezaki Y, Ishikawa D, Uchimura S, Imamura K, Nara A, Yoshimori T, Hayashizaki Y, Kawai J, Ishido K, Tanaka Y, and Himeno M. Novel mammalian class E vps proteins, SBP1/mVtalp/Lip5p and SBP3/mVps2p/ESCRT-III, interact with and regulate the function of an AAA-ATPase SKD1/Vps4p. *J Cell Sci* in press, 2004.
- 姫野 勝、藤田英明、田中嘉孝. 「エンドソーム・リソソームの形成と維持の分子機構」生化学、75: 486-491, 2003.
- 藤田英明、田中嘉孝、姫野 勝. 「リソソーム形成の分子機構」福岡医学雑誌、94: 259-266, 2003.
- 黒仁田敏雄、姫野 勝、田中嘉孝. 「リソソーム膜蛋白質の役割」蛋白質・核酸・酵素増刊号 -蛋白質の一生- 掲載予定, 2004

• 田中嘉孝、藤田英明、姫野 勝. 「リソソーム蓄積症」蛋白質・核酸・酵素増刊号 -蛋白質の一生- 掲載予定, 2004.

2. 学会発表

- Fujita H, Ishikawa D, Imamura K, Umezaki Y, Tanaka Y, Nara A, Yoshimori T, Yokota S, Ishido K, Kawai J, Hayashizaki Y, Himeno M. Identification of 3 novel SKD1 binding proteins (SBPs), which are possibly involved in diverse stages of endosomal membrane traffic. The American Society for Cell Biology, 43rd. Annual Meeting San Francisco, 12, 13, 2003.
- Tanaka Y. Role of lysosomal membrane protein. The 1st Asia Symposium for Pharmaceutical Sciences. Fukuoka, 1, 30, 2004.
- Motokawa T, Katagiri T, Fujita H, Kawai M, Tanaka Y, Himeno M. Inulavosin, a new type of melanogenesis inhibitor, promote tyrosinase degradation. 第76回日本生化学会大会 横浜, 10, 2003.
- Nakata M, Fujita H, Motokawa T, Katagiri T, Kawai M, Yokota S, Wada I, Tanaka Y, Himeno M. Inulavosin, a novel melanogenesis inhibitor, redirects tyrosinase to lysosome and accelerates a degradation of it. 第76回日本生化学会大会 横浜, 10, 2003.
- Fujita H, Ishikawa D, Imamura K, Umezaki Y, Tanaka Y, Nara A, Yoshimori T, Yokota S, Ishido K, Kawai J, Hayashizaki Y, Himeno M. An AAA-ATPase SKD1/Vps4p and its binding proteins (SBPs) are involved in diverse stages of endosomal membrane traffic. 第76回日本生化学会大会 横浜, 10, 2003.
- 梅田篤, 藤田英明, 黒仁田敏雄, 広佐古香, 姫野勝, 田中嘉孝. Distribution and trafficking of MPR300 is normal in cells with cholesterol accumulated in late endocytic compartments: evidence for early endosome-to-TGN trafficking of MPR300. 第26回日本分子生物学会年会 神戸, 12, 2003.