

このようなヘテロプラスミーを示す代表的な病型は、眼球運動障害を主徴とする慢性進行性外眼筋麻痺症候群、脳卒中様症状を特徴とする MELAS (mitochondrial myopathy, encephalopathy, lactic acidosis and stroke-like episodes), MERRF (myoclonus epilepsy associated with ragged-red fibers) などが知られている (表 1)。

一方、同じミトコンドリア DNA 変異で起きる病気でも、ヘテロプラスミーではなく、ほとんどすべてが同じ変異をもつ (ホモプラスミーという) 場合、もしくは、核 DNA 上の遺伝子変異でおきる場合は、比較的類似した臨床症状を有する場合が多い。小児期に発症するリー脳症、青年期に発症するレーバー視神経萎縮症などはそのような例である (表 1)。

表 1 代表的なミトコンドリア病

病型	慢性進行性外眼筋麻痺症候群	ミトコンドリア脳筋症・乳酸アシドーシス・脳卒中様発作症候群	赤色ぼろ線維・ミオクローヌスてんかん症候群	リー脳症	レーバー遺伝性視神経萎縮症
英文略語	CPEO	MELAS	MERRF		LHON
英文名	chronic progressive external ophthalmoplegia	mitochondrial myopathy, encephalopathy, lactic acidosis and stroke-like episodes	myoclonic epilepsy associated with ragged-red fibers	Leigh encephalopathy	Leber's hereditary optic neuropathy
mtDNA 変異	単一欠失, 多重欠失	3243, 3271, 13513 変異など	8344 変異など	8993, 9176, 13513 変異など	11778 変異など
核 DNA 変異	<i>ANT1, POLG, TP</i> など	—	—	<i>SURF1, PDHA1</i> など	—
遺伝形式	様々	主に母系遺伝	主に母系遺伝	様々	母系遺伝
発症年齢	小児~成人	小児~成人	小児~成人	乳児~小児	若年~成人
主な症状	眼瞼下垂, 全方向性眼球運動障害, 嚥下障害, 白質脳症など (網膜色素変性, 心伝動障害を伴ったものをカーンズ・セイヤ症候群という)	脳卒中様症状 (けいれん, 意識障害, 半盲・視野狭窄, 運動麻痺など), くりかえす頭痛・嘔吐発作, 精神症状	ミオクローヌス, てんかん, 小脳症状	精神運動発達遅滞, けいれん, 嚥下困難など	夜盲から始まって急速に視力障害が進行
その他の症状	糖尿病・難聴, 低身長, 副甲状腺機能低下症など	低身長, 筋力低下, 糖尿病・難聴, 心筋症, 糸球体病変, 多毛など	筋力低下, 心筋症など	典型的な症例では早期に呼吸不全に至る	時に, ジストニアなどの神経症状を合併
血中乳酸値	軽度上昇	中等度~高度に上昇	中等度~高度に上昇	高度に上昇	正常~軽度上昇
筋病理所見	特徴的变化あり	特徴的变化あり	特徴的变化あり	特徴的变化なし	特徴的变化なし
特記事項	ミトコンドリア病で唯一のマウスモデルが存在	脳卒中様発作の予防にアルギニン投与が有効という報告あり	多発性脂肪腫を合併する症例あり (May-White 症候群)	予後不良な例が多い	自然軽快する症例あり

3. 診断

ミトコンドリア病では多種多様な臨床症状が存在することから、単に臨床症状の組み合わせから確定診断することはできない。患者は、あらゆる診療科にかかっている可能性があり、関連のない臓器症状が同時に存在する場合は、まずミトコンドリア病を疑うことが肝要になる。

その中でも、中枢神経症状、骨格筋症状、心症状は比較的頻度の高い症状であり、また検査所見としては血中・髄液の乳酸・ピルビン酸が高値であることが多い (図 4)。

確定診断を行うには、分子遺伝学、病理学、生化学的方法で、ミトコンドリア異常の証拠を示す必要がある。その意味で、骨格筋を検査対象にすることで、これら 3 つの方法でミトコンドリア異常を同定できる。しかし、すべての症例でこれら 3 つの方法で陽性所見が得られないこともあり、そのことがミトコンドリア病の診断を難しいものになっている。さらに、分子遺伝学、病理学、生化学それぞれの検査手法に専門性が要求されることも診断を困難にしている一因である。

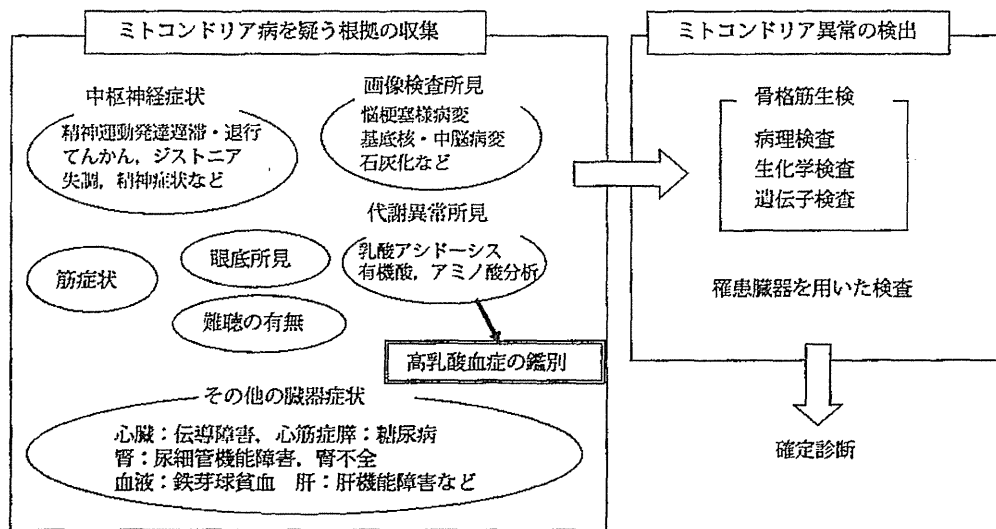


図4 ミトコンドリア病診断の進め方

4. 治療の現状と問題点

4.1 エネルギー代謝改善薬

ミトコンドリア内のエネルギー代謝に関わる酵素は 100 余りあるため、原因となっている酵素活性低下が判明すれば、その酵素を補充したり、基質や反応物を補充したりできる可能性がある (図 5)。ただし、ミトコンドリア内のエネルギー代謝回路は複雑に入り組んでいるために、一箇所を改善できても全体としての代謝改善になるかどうかは未知数である。また現実には原因酵素の特定に至らない症例が多く、ミトコンドリア内のエネルギー代謝全般を高める目的で、ビタミン (B1, B2, B3, B6, ビオチン, C + K) などを複合的に投与されたり、電子伝達系酵素系の一部を担うコエンザイム Q10 などが使用されたりしている (表 2)。しかしながら、これらの薬剤が有効であることを臨床試験で明確にされてはいない。

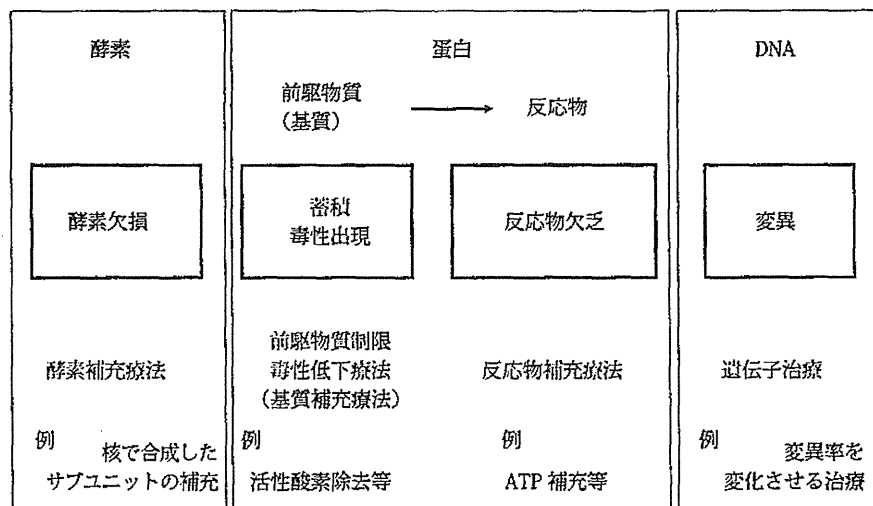


図5 ミトコンドリア代謝異常治療の考え方

表2 ミトコンドリア病の主な治療薬

基質, 反応物 コエンザイム Q* チトクローム c コハク酸 ATP など	代謝賦活剤 カルニチン* ジクロロ酢酸 など
ビタミン類 B1 (チアミン) B2 (リボフラビン) B3 (ナイアシン) B6 (ピリドキサルリン酸) ビオチン リボ酸 C + K など	その他 L-アルギニン タウリン クレアチン* ビタミン E* ウリジン など

* 活性酸素除去作用あり

4.2 活性酸素除去薬

ミトコンドリア病における活性酸素の役割が明確になっているわけではないが、コエンザイム Q10、カルニチン、クレアチン、ビタミン E などは、酵素反応と同時に活性酸素を除去する反応にも関与する。これらについてもコントロールされた臨床試験が行われておらず、その効果については定まっていない。

5. 治療法, 診断法開発の動向

5.1 エネルギー代謝関連

代謝を賦活させる目的で脂質代謝を高めるカルニチン、ピルビン酸脱水素酵素複合体活性を高めるジクロロ酢酸がある。カルニチンはその効果は明確ではないが臨床的にはよく使われている。一方、ジクロロ酢酸は大規模な臨床試験が米国で行われ、ほぼ全例が末梢神経障害を起こし試験が中止されている。日本ではジクロロ酢酸とビタミン B1 投与を行って臨床的に効いている症例の報告があるが、臨床試験を行っていないのでその有効性については確実な証拠はない。

血管の拡張作用を主目的にして MELAS に対する L-アルギニン治療の医師主導型治験が行われた。現在、その有効性についてのデータマネージメントが行われているところである。さらに、ミトコンドリア DNA 変異の代表である 3243 変異や 8344 変異があると、それらが存在するロイシン転移 RNA やリジン転移 RNA のアンチコドンにおけるタウリン修飾不全の起きることが証明された。その事実を踏まえてタウリン大量治療を臨床試験で行おうという計画がある。

5.2 DNA を操作する方法

ヘテロプラスミーで起きる病態の場合、変異率を人為的に下げることができれば細胞障害を予防できたり治療できたりする可能性がある。現在のところ、実験室レベルで研究が行われているのみである。

5.3 生殖補助医療 (表 3)

受精卵には大量のミトコンドリア DNA が含まれており、それらのなかに存在するミトコンドリア DNA の変異型が多いと、病気の子が産まれる可能性がある。しかし、変異率の時間的変化や、変異率の高い細胞の出現の可能性、その分布などについて予測することが困難であるため、出生前診断・着床前診断は実質的に意味がない。一方、核 DNA 上の遺伝子変異やホモプラスミーで発症するミトコンドリア DNA 変異例の場合は、出生前診断・着床前診断は適応となりうる。

また、先端的な治療・予防法として、細胞質移植、核移植が検討されているが、技術的な問題とともに、2人の母由来の2種類ミトコンドリアDNAが混じることの遺伝学的問題、卵を操作する倫理的問題などのために実用化されていない。

表3 ミトコンドリア病に対する生殖補助医療

	絨毛又は羊水による出生前診断	着床前診断	細胞質移植	核移植	Oocyte donation
費用と手技の単純性	+++	+	++	+	++
妊娠に至る可能性	+++	+	++	?	++
当該手技が現実的に可能かどうか	+++	++	++	++	+
人工妊娠中絶の回避	+	+++	++	++	+++
検査結果の解釈の容易さ	+	++	+	+	+++
適応する条件	再発リスクが低い女性	変異率が低い、又は中等度の女性	未だ推奨はできないが、おそらく変異率の高い女性	未だ推奨はできないが、おそらく変異率の高い女性	変異率が中等度、又は、高い女性
核DNAとmtDNAの由来	核：父と母 mt：母	核：父と母 mt：母	核：父と母 mt：Donor（と母）	核：父と母 mt：母（とDonor）	核：Donorと母 mt：Donor

6. 今後求められる診断・治療

診断に関しては、検査法の標準化が不可欠である（図6）。特に、ミトコンドリア関連遺伝子の網羅的解析法の応用とともに、生化学検査法の充実が必要である。これらの技術は専門性が必要であるので、検査施設の集約化と診断医の養成も課題になる。

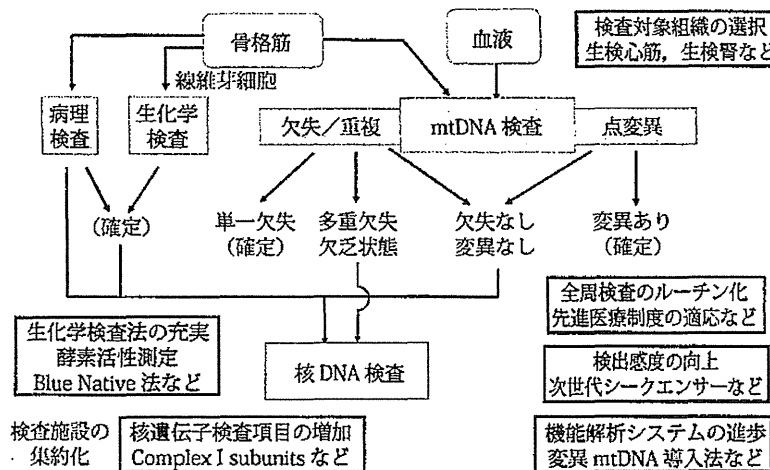


図6 ミトコンドリア病診断の今後の課題

治療に関しては、DNA レベル、ミトコンドリアレベル、細胞レベル、組織・臓器レベルを考慮しながら、様々な課題に対応することが不可欠である。細胞レベル以下の根本的な治療に直結する問題と、組織・臓器レベルの多くの専門診療科で関わるべき問題とがある。難聴に対する人工内耳、心伝導ブロックに対するペースメーカー装着など対症療法が有効な臨床症状が多いことも念頭におき、各専門診療科の治療の進歩を積極的に取り入れて行くことが大事である。

生殖補助医療を含む遺伝に関する問題も複雑であり、遺伝カウンセリングに対応する診療体制の整備も重要な課題である。

7. 治療効果判定

臨床症状が多彩であるため、個々の臓器症状に対応した治療効果判定ツールが必要になる。これは、各臓器の専門家である専門医が適切な検査法と評価法を構築する必要がある。臨床経過も進行性、緩徐進行性、一過性、自然軽快などと多様であるので、評価期間の設定にも注意を要する。

8. 研究開発に役立つ文献・論文

ミトコンドリア病. 埜中征哉, 後藤雄一編著, 医学書院, 東京, 1994

ミトコンドリア糖尿病. 岡芳知, 後藤雄一著. 診断と治療社, 東京, 1994

Mitochondrial Medicine. DiMauro S, Hirano M, Schon EA, ed. Informa Healthcare, UK, 2006

8 ミトコンドリア病 (ミトコンドリア脳筋症)

後藤雄一

1 ミトコンドリア病とは？

ミトコンドリア病とは、細胞小器官であるミトコンドリアの機能障害を本態とする病気の総称である。ミトコンドリアの最大の役割は細胞内のエネルギー産生であり、したがってミトコンドリアの機能障害はエネルギー不足をきたし、細胞の機能が低下したり、細胞が失われたりする。ミトコンドリアはあらゆる細胞に存在し、その機能障害はいろいろな症状を引き起こす可能性がある。実際は、エネルギーを多量に使用すると考えられる中枢神経（神経細胞）、骨格筋（筋細胞）、心臓（心筋細胞）が障害されやすく、以前はミトコンドリア脳筋症と称していたが、現在ではミトコンドリア病と呼ばれることが一般的になった。

2 ミトコンドリア病の疫学

ミトコンドリア病の臨床的特徴は多様性である。ミトコンドリアはあらゆる細胞に存在するので、エネルギーを多量に必要とする神経細胞、筋細胞、心筋細胞などに加えて、ホルモン分泌細胞、血管細胞なども障害されることで、まさにあらゆる臨床症状を引き起こす可能性がある。したがって、ミトコンドリア病の診断は症状から見極めることは難しく、世界的に定まった診断基準もない。

そのためにミトコンドリア病の正確な有病率を求めることは難しく、典型的な病型や代表的な遺伝子変異の頻度などの統計が断片的にあるのみである。ミトコンドリア病の頻度は、10万人あたり9.2～16.3人とされ、最も頻度の高い遺伝子変異である3243変異による典型的な症状を示すのは10万人あたり3.7人という報告がある。また3243変異は糖尿病・難聴という臨床病型をとることがあり、糖尿病患者の約1%で認められることが欧米各国から報告されている。

3 発症機序・病態

ミトコンドリア病を理解するには、ミトコンドリア異常を解剖学的な種々のレベルに分けて考える必要がある（図1）。

1) DNA レベル

DNAレベルでは、核DNA変異とミトコンドリアDNA異常とがある。核DNA上には、ミトコンドリアに関連するタンパクをコードするおおよそ1,500種類の遺伝子があるとされており、今までのところヒトの病気に関連する100種類以上の原因遺伝子が同定されている。さらに、最近の次世代シーケンサーによる検索で新たな原因遺伝子が次々と判明している（図2）。

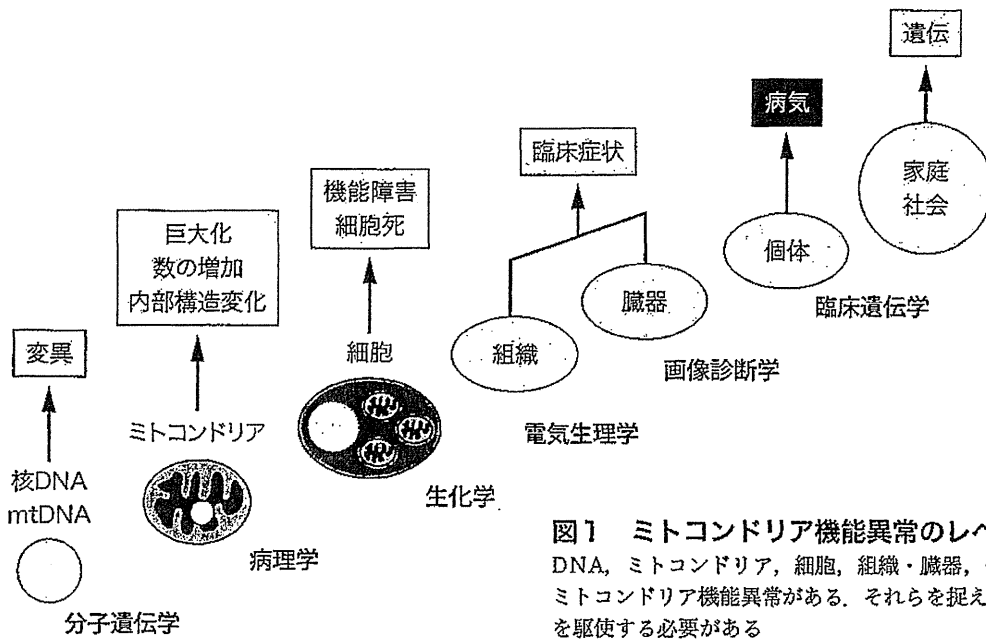


図1 ミトコンドリア機能異常のレベルと検出する方法
DNA, ミトコンドリア, 細胞, 組織・臓器, 個体, 社会の各レベルのミトコンドリア機能異常がある。それらを捉えるには, いろいろな手法を駆使する必要がある

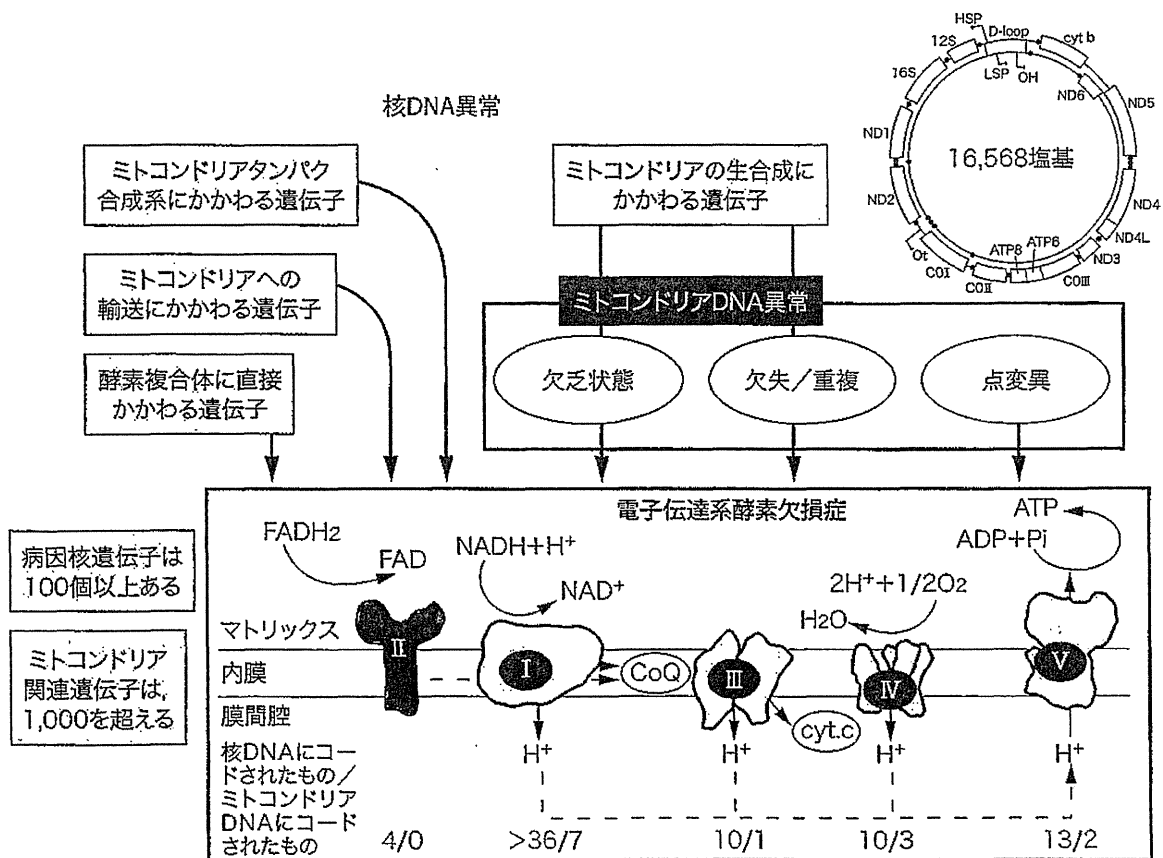


図2 ミトコンドリア病の病因

ミトコンドリアDNAの異常と核DNA上の遺伝子変異がある。ミトコンドリアDNA異常があると、電子伝達系酵素活性が低下する。その理由は、ミトコンドリア上にコードされているタンパク質は、複合体Iサブユニットが7個、複合体IIIユニットが1個、複合体IVサブユニットが3個、複合体Vユニットが2個であるからである。また、核DNA上の原因遺伝子は、現在すでに100個以上が報告されている。今後、次世代シーケンサーを用いた網羅的な検査が実用化されるであろう。FADH₂:還元型フラビンアデニンジヌクレオチド FAD:フラビンアデニンジヌクレオチド NADH:還元型ニコチンアミドアデニンジヌクレオチド H⁺:水素イオン NAD⁺:ニコチンアミドアデニンジヌクレオチド CoQ:コエンザイム cyt.c:シトクロムC H₂O:水 O₂:酸素 ADP:アデノシン二リン酸 Pi:リン酸 ATP:アデノシン三リン酸

一方、ミトコンドリアDNAは核DNAと異なり、細胞質に存在するミトコンドリア内に5～10コピー、1細胞内では数千コピー存在する。核DNA上の遺伝子が、父由来、母由来の2コピーしか存在しないことと大きく違っている。この違いは、ミトコンドリアDNA異常の特徴に反映され、ミトコンドリア病患者ではミトコンドリアDNAの量が減少する場合（ミトコンドリアDNA欠乏症候群）と、ミトコンドリアDNAの欠失/重複や点変異などの質的変化を認める場合がある。その際、欠失/重複の場合と点変異の一部は、1細胞内に野生型と変異型が混在する状態（ヘテロプラスミーという）で存在する（図3）。

2) ミトコンドリアレベル

ミトコンドリアレベルの変化は、形態学的な変化として捉えられる。ヒト疾患では、主に骨格筋を用いて研究されてきたが、ミトコンドリアの数が増加し、大きさが増し（巨大化）、内部構造の変化（クリスタの増殖、封入体など）を認める。骨格筋のように融合して存在する組織の場合は、このような形態変化が同定できるが、神経細胞や血液細胞などのように単独で存在している細胞はミトコンドリア異常があると細胞死に陥り、ミトコンドリアレベルの変化が捉えられないことが多い。

またミトコンドリアの生物学的役割はエネルギー産生が最も重要であることは疑いないが、それに加えて、活性酸素の発生、アポトーシスへの関与、細胞内カルシウムイオン濃度調節、感染防御などのさまざまな機能もある。ミトコンドリア病において、エネルギー代謝障害以外のこれらのミトコンドリア機能がどのように変化しているかは解明されているとはいえない。しかし、エネルギー産生だけ改善させても症状がよくなるかどうかについては、今後の病態研究、治療研究において追求すべき問題である。

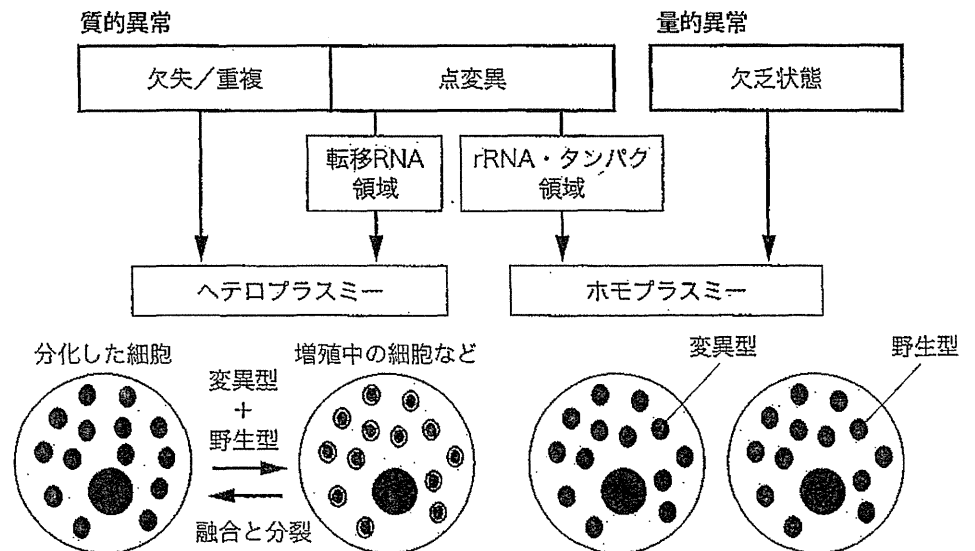


図3 ●ミトコンドリアDNA異常の種類

ミトコンドリアDNAは1細胞に数千コピー存在する。それらがすべて同じ場合をホモプラスミー、2種類以上の配列の異なるものが存在する場合をヘテロプラスミーという。病気の違いや変異の種類によって、ヘテロプラスミーの場合とホモプラスミーの場合がある。増殖中の細胞内ではミトコンドリアが融合と分裂をくり返しており、もしもヘテロプラスミーがあれば、平均化している可能性が高い。一方、分化した細胞ではミトコンドリアの融合と分裂が不十分であり、ミトコンドリアごとに変異率が異なる可能性がある。

3) 細胞レベル

細胞レベルのミトコンドリア異常は、細胞の機能障害と細胞死としてみられる。ヘテロプラスミーのミトコンドリアDNA変異で起きる病態の場合、細胞ごとに変異率が異なることが知られており、さらに変異率がある値（閾値）以上にならないと細胞機能障害が起きない。また細胞分裂ごとに変異率が変化してゆくことも知られており、分裂増殖する細胞では変異率が変化してゆく。

4) 組織・臓器レベル

組織・臓器レベルでみると、変異率の高い細胞が集まっている組織や臓器で臨床症状が出現すると考えられる。個々の症例で変異率の高い細胞の分布がどのようになっているかの予測は難しく、よって予後の予測は困難である。またこの組織・臓器ごとの違いにより、臨床症状が大きく異なり、この性質がミトコンドリア病でみられる、いかなる症状、いかなる年齢、いかなる臨床経過をも示す「臨床症状の多様性」の根拠となっている。

このようなヘテロプラスミーを示す代表的な病型は、眼球運動障害を主徴とする慢性進行性外眼筋麻痺症候群、脳卒中様症状を特徴とするMELAS (mitochondrial myopathy, encephalopathy, lactic acidosis and stroke-like episodes, 図4), MERRF (myoclonus epilepsy associated with ragged-red fibers) などが知られている (表1)。

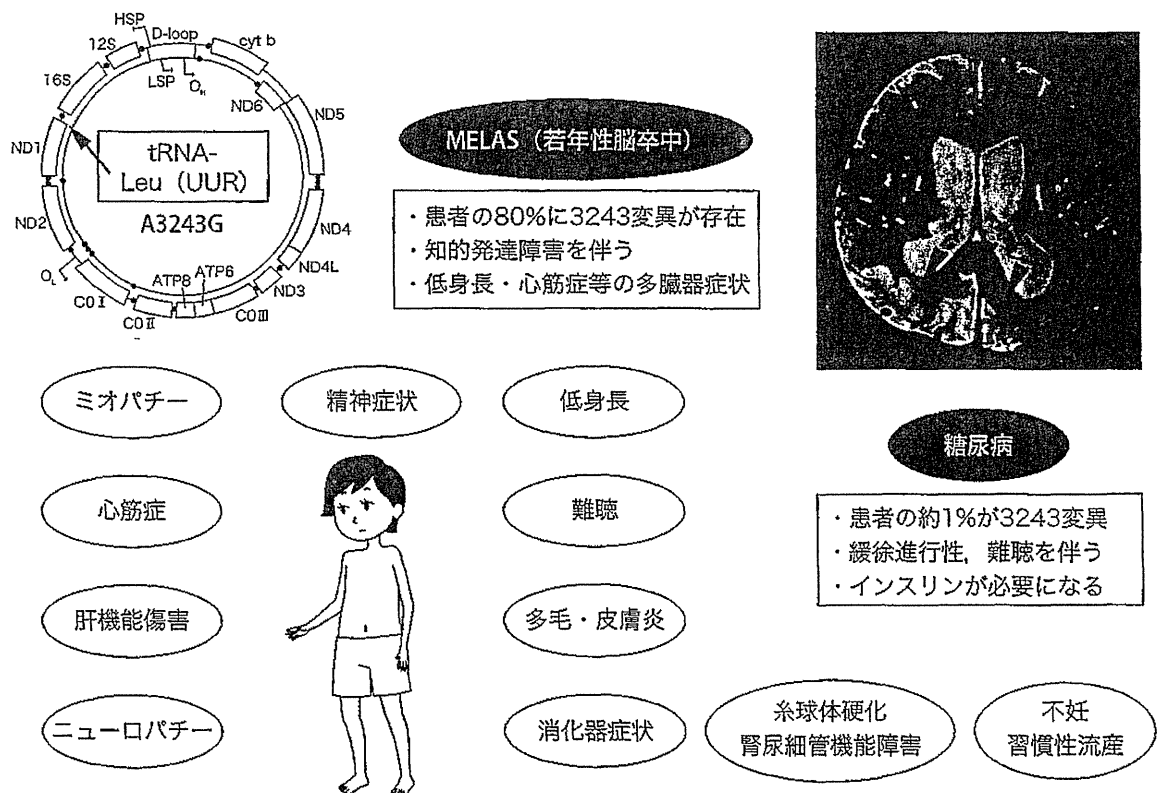


図4 MELASの3243変異例の臨床的多様性

3243変異は脳卒中様症状を特徴とするMELAS患者の80%に認める変異である。中枢神経症状以外にも、心筋症、肝障害、低身長、難聴、腎障害、糖尿病などを認めることが知られている。MRI (T2強調) は典型的な所見で、病変部位 (▶) は血管支配領域に一致しないことが多く、同時に浮腫性の変化を伴うことが多い

表1 ○代表的なミトコンドリア病

病型	慢性進行性 外眼筋麻痺 症候群	ミトコンドリア脳筋症・ 乳酸アシドーシス・ 脳卒中様発作症候群	赤色ほろ線維・ ミオクローヌス てんかん症候群	Leigh 脳症	Leber 遺伝性視 神経萎縮症
英文略語	CPEO	MELAS	MERRF	—	—
英文名	chronic progressive external ophthalmoplegia	mitochondrial myopathy, encephalopathy, lactic acidosis and stroke-like episodes	myoclonic epilepsy associated with ragged-red fibers	Leigh encephalopathy	Leber's hereditary optic neuropathy
mtDNA 変異	単一欠失, 多重欠失	3243, 3271, 13513 変異など	8344 変異など	8993, 9176, 13513 変異など	11778 変異など
核DNA 変異	<i>ANT1, POLG, TP</i> など	—	—	<i>SURF1,</i> <i>PDHA1</i> など	—
遺伝形式	さまざま	主に母系遺伝	主に母系遺伝	さまざま	母系遺伝
発症年齢	小児～成人	小児～成人	小児～成人	乳児～小児	若年成人
主な症状	眼瞼下垂, 全方向性 眼球運動障害, 嚥下 障害, 白質脳症など (網膜色素変性, 心 伝動障害を伴ったも のを Kearns-Sayrs 症候群という)	脳卒中様症状 (痙攣, 意識障害, 半盲・視野 狭窄, 運動麻痺など), くり返す頭痛・嘔吐発 作, 精神症状	ミオクローヌス, てんかん, 小脳 症状	精神運動発達遅 滞, 痙攣, 嚥下 困難など	夜盲から始まって 急速に視力障害が 進行
その他の 症状	糖尿病・難聴, 低身 長, 副甲状腺機能低 下症など	低身長, 筋力低下, 糖 尿病・難聴, 心筋症, 糸球体病変, 多毛など	筋力低下, 心筋 症など	典型的な症例で は早期に呼吸不 全に至る	時に, ジストニア などの神経症状を 合併
血中 乳酸値	軽度上昇	中等度～高度に上昇	中等度～高度に 上昇	高度に上昇	正常～軽度上昇
筋病理 所見	特徴的変化あり	特徴的変化あり	特徴的変化あり	特徴的変化なし	特徴的変化なし
特記事項	ミトコンドリア病で 唯一のマウスモデル が存在	脳卒中様発作の予防に アルギニン投与が有効 という報告あり	多発性脂肪腫を 合併する症例あ り (May-White 症候群)	予後不良な例が 多い	自然軽快する症例 あり

一方, 同じミトコンドリアDNA変異で起きる病気でも, ヘテロプラスミーではなく, ほとんどすべてが同じ変異をもつ (ホモプラスミーという) 場合, もしくは, 核DNA上の遺伝子変異で起きる場合は, 比較的類似した臨床症状を有する場合が多い。小児期に発症する Leigh 脳症, 青年期に発症する Leber 視神経萎縮症などはそのような例である (表1)。

4 診断

ミトコンドリア病では多種多様な臨床症状が存在することから, 単に臨床症状の組合わせから確定診断することはできない。患者はあらゆる診療科にかかっている可能性があり, 関連のない臓器症状が同時に存在する場合は, まずミトコンドリア病を疑うことが肝要になる。

神経内科的な症状としては、くり返す頭痛・嘔吐発作、痙攣、ミオクローヌス、意識障害を伴う脳卒中様発作、ジストニア、夜盲、小脳症状、認知症、感音性難聴などがよく認められる。しかし、このような神経症状以外の多臓器の症状を合併することが特徴といえる（図4）。

検査所見としては血中・髄液の乳酸・ピルビン酸が高値であることが多い。血中の乳酸の値は、食事や運動で大きく変動する。しかし、髄液の乳酸値は直近の痙攣などがなければ大きく変動することは少なく、中枢神経症状がある場合は髄液の乳酸・ピルビン酸値は重要な検査となる。

確定診断を行うには、分子遺伝学、病理学、生化学的方法で、ミトコンドリア異常の証拠を示す必要がある。その意味で、骨格筋を検査対象にすることで、これら3つの方法でミトコンドリア異常を検査すべきではある。しかし、すべての症例でこれら3つの方法で陽性所見が得られないこともあり、そのことがミトコンドリア病の診断を難しいものになっている。さらに、分子遺伝学、病理学、生化学それぞれの検査手法に専門性が要求されることも診断を困難にしている一因である。

5 診断依頼施設

遺伝子検査、病理検査、生化学検査の3つの検査を専門的に行っている施設は、国内では国立精神・神経医療研究センターである。

遺伝子検査は、国内の大学病院や公立病院の一部、検査会社の（株）ビー・エム・エル、G&Gサイエンス（株）などであるが、調べるミトコンドリアDNA変異の種類が異なっており、欠失を調べるサザンブロット法などを行っていない施設もある。

病理学的検査は、一部の大学病院で行われているが、外部から検査を引き受けているのは国立精神・神経医療研究センターのみである。

生化学検査は、埼玉医科大学小児科、千葉こども病院代謝科、国立精神・神経医療研究センターである。なお、筆者の所属する国立精神・神経医療研究センターのTMC受付ではこれらの検査についての問い合わせを受け付けている。

6 治療の現状と問題点

ミトコンドリア病の治療は、原因治療と対症療法がある。原因治療はミトコンドリア機能の回復を目指すものであるが、現在のところ確定的なものはない。図5に示すように、各レベルでの治療法研究が行われている。そのなかで、細胞を標的にした薬物治療が試みられている。主に、ミトコンドリア内に存在する酵素の基質や補酵素であるビタミンなどである。また、一部酵素活性を上げる目的で使用されているものがある（表2）。

今のところ、正式な臨床試験が行われた薬剤は、MELASに対するアルギニン治療とミトコンドリア病全般に行われたジクロロ酢酸治療だけである。アルギニン治療は久留米大学小児科古賀靖敏教授が行った医師主導型治験が終了して、その効果判定を待っているところである。MELASの発作急性期に劇的に効く症例も報告されている。ジクロロ酢酸は米国で臨床試験が行われたが、成人高乳酸血症患者での有効性が認められず、また別の試験では全例で末梢神経障害が報告され試験そのものが中止になった。しかし、日本では長期間にわたっ

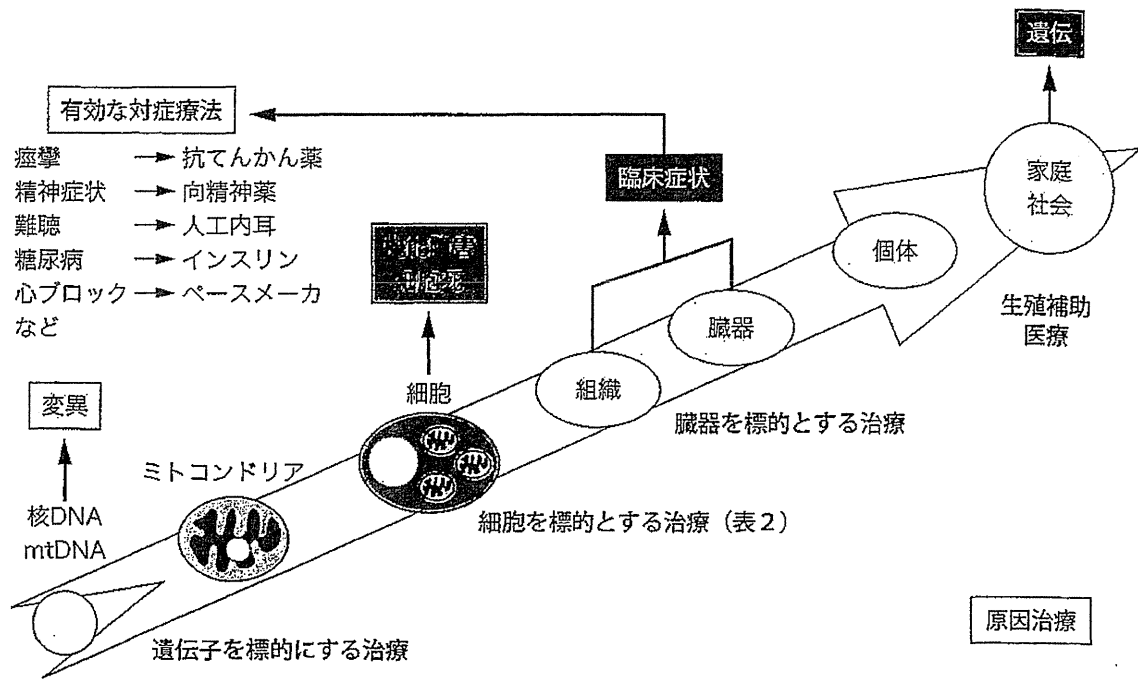


図5 ●ミトコンドリア病に対する治療

対症療法は有効なものがあり、各臓器症状の特徴を踏まえて行うべきである。一方、原因治療としては確立したものはない。ミトコンドリア機能異常の各レベルに応じた治療法の研究が進められているところである

表2 ●細胞を標的にする薬物治療

基質, 反応物	代謝賦活剤	ビタミン類	その他
コエンザイムQ10*	カルニチン*	B1 (チアミン)	L-アルギニン
ピルビン酸ナトリウム	ジクロロ酢酸 など	B2 (リボフラビン)	
コハク酸ナトリウム		B3 (ナイアシン)	クレアチン*
ATP など		B6 (ピリドキサルリン酸)	ビタミンE
		ビオチン	ウリジン など
		リボ酸	
		C+K など	

ミトコンドリア機能を高める目的で使用されている薬物である。ほとんどがミトコンドリア内のエネルギー産生を補助する目的で使用されるが、コエンザイムQ10、カルニチン、クレアチンは活性酸素除去作用もあり、ミトコンドリア病の病態で活性酸素がかかっていると予想される際には効果があると予想されている。しかし、活性酸素がどの程度症状発現に寄与しているかは明らかにはなっていない

*活性酸素除去作用あり

てビタミンB1とともに投与して効果があったと考えられる症例も存在している。ただし、血中ピルビン酸が下がりすぎて意識障害が出現した症例もある。

ミトコンドリア病の治療に関しては定まったものではなく、厚生労働省のミトコンドリア病研究班では標準的な治療基準の作成を目指している。

7 生殖補助医療と遺伝カウンセリング

ミトコンドリアDNA変異で起きる疾患では、その変異型を子に伝わらないようにして予防する方法が研究されている。出生前診断、着床前診断、細胞質移植、核移植などである。今のところ、ホモプラスミーで起きる病気の場合に、着床前診断を含む出生前診断が適応になる場合がある。しかし、細胞質移植、核移植については、技術的問題や倫理的問題があるために行われていない。

ミトコンドリア病の遺伝形式は、母系遺伝、メンデル遺伝、突然変異などあらゆる形式があり、また生殖補助医療の適応などについても、病気の遺伝性の理解が前提であるので、必要に応じて遺伝カウンセリング（p.359第6章6参照）を受けられるように患者や患者家族に配慮することが重要である。

文献

- 1) Koga, Y. et al. : L-Arginine improves the symptoms of strokelike episodes in MELAS. *Neurology*, 64 : 710-712, 2005
- 2) Stacpoole, P.W. et al. : A Controlled Clinical Trial of Dichloroacetate for Treatment of Lactic Acidosis in Adults. *N Eng J Med*, 327 : 1564-1569, 1992
- 3) Kaufmann, P. et al. : Dichloroacetate causes toxic neuropathy in MELAS : a randomized, controlled clinical trial. *Neurology*, 66 (3) : 324-330, 2006
- 4) ミトコンドリア病ハンドブック（医師用に作成）：http://www.nanbyou.or.jp/upload_files/mt_handbook.pdf からダウンロード可能

ミトコンドリア脳筋症

mitochondrial encephalomyopathy

1 起こり方

ミトコンドリア脳筋症とは、ミトコンドリア自体およびミトコンドリア内に存在する DNA やタンパクに異常が存在し、ミトコンドリアのもっとも重要な機能であるエネルギー産生に障害をきたした疾患群を総称している。とくに、中枢神経と骨格筋の症状が前景に出ることが多いのでミトコンドリア脳筋症と称されるが、後述するように全身の多くの臓器症状を認めることから、ミトコンドリア病と呼称されることが多くなってきた。

ミトコンドリア脳筋症の病因は、核 DNA 変異、ミトコンドリア DNA (mtDNA) 変異、そしてその両者が同時に存在することがある。

ミトコンドリア脳筋症の本態は、細胞のエネルギー代謝障害である。ミトコンドリア内のどの経路に障害があっても、結果的にエネルギー保有物質である ATP の合成の低下が起こる。その中でも、電子伝達系の障害をもつ患者がもっとも多い。電子伝達系とはエネルギー代謝の最終経路である。電子伝達系に障害のある場合は、ATP がうまく合成されない。さらに、この部分の障害の影響は、クエン酸回路やその上流のピルビン酸のミトコンドリアへの移行にも影響し、細胞内の乳酸やアラニンの量が増加する。ほとんどのミトコンドリア脳筋症患者では、血中や髄液中の乳酸やピルビン酸値が上昇しており、これが重要な検査所見になる。

2 症状と診断のすすめ方

病 状

ミトコンドリア脳筋症の臨床症状は多彩であ

表 1 ミトコンドリア脳筋症の症状

精神症状	けいれん、ミオクローヌス、失調、脳卒中様症状、知能低下、片頭痛、精神症状、ジストニー、ミエロパチー
骨格筋	筋力低下、易疲労性、高クレアチンキナーゼ血症、ミオパチー
心臓	伝導障害、ウォルフ・パーキンソン・ホワイト [Wolff-Parkinson-White (WPW)] 症候群、心筋症、肺高血圧症
視覚	視神経萎縮、外眼筋麻痺、網膜色素変性
肝臓	肝機能障害、肝不全
腎臓	ファンconi (Fanconi) 症候群、尿細管機能障害、糸球体病変、ミオグロビン尿
内分泌	糖尿病、外分泌不全
血液	鉄芽球性貧血、汎血球減少症
聴覚	感音性難聴
消化器	下痢、便秘
皮膚	発汗低下、多毛
その他	低身長、低カルシウム血症

る(表1)。それは、ミトコンドリアが個体の(一部の例外を除き)あらゆる細胞に存在しているために、そのミトコンドリアの障害はさまざまな臓器に異常を引き起こすからである。また多くの場合、個々の症例により障害される臓器や組織が大きく異なることも特徴である。

このような臨床症状の多様性や症例ごとの違いがあるなかで、ミトコンドリア脳筋症では比較的能量をよく使う組織や細胞が障害されやすい。実際、中枢神経、骨格筋、心筋などはミトコンドリア脳筋症の主な罹患臓器である。したがって、まず中枢神経症状を主体にした疾患分類がつくられ、さらにそのほかの臓器症状を主体とする疾患が分類表に書き加えられ

表2 ミトコンドリア脳筋症の分類

生化学的検査による分類	臨床症候による分類
1. 基質の転送障害 a) カルニチンパルミトイル転移酵素欠損症 b) カルニチン欠乏症 2. 基質の利用障害 a) ピルビン酸カルボキシラーゼ欠損症 b) ピルビン酸脱水素酵素複合体欠損症 c) β 酸化の障害 3. クエン酸回路の障害 4. 酸化リン酸化共役の障害 ルフト(Luft)病 5. 電子伝達系酵素の障害 a) 複合体I欠損症 b) 複合体II欠損症 c) 複合体III欠損症 d) 複合体IV欠損症 e) 複合体V欠損症 f) 複数の複合体欠損症	1. 3大病型 a) 慢性進行性外眼筋麻痺 [カーンズ・セイヤー (Kearns-Sayre) 症候群を含む] b) ミオクローヌスを伴うミトコンドリア病: MERRF c) 卒中様症状を伴うミトコンドリア病: MELAS 2. その他の病型 a) レーバー (Leber) 遺伝性視神経萎縮症 b) リー (Leigh) 脳症 c) ピアソン (Pearson) 病 d) NARP e) MNGIE f) その他 [ウォルフラム (Wolfram) 症候群, アルツハイマー (Alzheimer) 病など] MERRF: myoclonus epilepsy associated with ragged-red fibers MELAS: mitochondrial myopathy, encephalopathy, lactic acidosis, and stroke-like episodes NARP: neuropathy, ataxia and retinitis pigmentosa MNGIE: mitochondrial neurogastrointestinal encephalomyopathy

るという歴史的経過をとった(表2)。

検査所見と診断

ミトコンドリア脳筋症の検査は、障害がどの臓器に、どの程度及んでいるかを調べる検査と、ミトコンドリア異常の有無を確認する検査とに分けるとわかりやすい。前者の検査は、各臓器特有の検査法に従うことになり、状況に応じて各専門医の協力を得る必要がある。後者の検査は、ミトコンドリア病の確定診断に不可欠な検査であり、血液の乳酸・ピルビン酸値、中枢神経症状がある場合は髄液の乳酸・ピルビン酸値の測定が重要である。また、現在のところ確定診断にいたるうえでもっとも情報量が多く、有用な検査は筋生検である。

生検された筋は、病理学的、生化学的、分子遺伝学的検査に利用できる。病理学的には、ゴモリ・トリクローム変法染色やシトクロム酸化酵素染色などの各種組織化学的検査を行うとともに、電子顕微鏡的にミトコンドリア形態異常の有無を検査する。ミトコンドリア病の中でも、代表的な MELAS, MERRF, 慢性進行性外眼筋麻痺症候群 [カーンズ・セイヤー (Kearns-Sayre) 症候群を含む] の患者の筋では、ミトコンドリア形態異常の証拠である ragged-red fiber (赤色ぼろ線維) やシトクロム酸化酵素

活性のない筋線維が確認できる。ただし、骨格筋には明らかな形態異常を確認できないこともある。

生化学的検査では、新鮮材料を用いて酸素消費量を測定したり、凍結検体を用いて電子伝達系酵素の活性を測定する。ピルビン酸脱水素酵素 (PDHC) 活性低下やカルニチン欠乏などの生化学的異常が明らかになれば、治療薬の選択に貴重な情報を与えることになる。

分子遺伝学的には、ミトコンドリア DNA 異常と核 DNA 変異を調べる。ミトコンドリア DNA 異常には、量的異常と質的異常がある。通常1細胞内に数千コピー存在するミトコンドリア DNA の量が減少すると、ミトコンドリア DNA 欠乏症候群と称される病気が発症する。一方、ミトコンドリア DNA の質的異常として、欠失・重複などの構造異常と点変異がある。核 DNA 変異としては、シトクロム酸化酵素欠損症の原因である *SURF1*, *SCO1* や *SCO2* 遺伝子をはじめとして、多くの原因遺伝子が同定されてきており、それらを一気に調べる次世代シーケンサーを用いる方法も開発され、この分野の進歩が著しい。

8 治療の実際

①原因を除去する治療法はなく、エネルギー代謝改善薬を用いる。

ミトコンドリア内の代謝に関係するいくつかの薬剤が用いられている。コエンザイム Q10 や PDHC の補酵素であるチアミン(ビタミン B₁) やリボ酸(ビタミン B₂) は、一般的に用いられている。それ以外に、複合体 I 欠損症のときのコハク酸、複合体 III 欠損症のときのビタミン C と K の併用、カルニチン欠乏時のカルニチンなどがある。最近では、PDHC の活性を高めるジクロロ酢酸が有効であったという報告があるが、末梢神経障害の出現が高頻度にあると報告された。また、MELAS の脳卒中症状に対してアルギニン投与が試みられており、現在医師主導型治験が行われている。

②多彩な臓器症状を把握し、適切な対症療法を行う。

ミトコンドリア脳筋症では、多彩な症状が出現する。したがって、現在症状の進行や新たな症状の出現に注意するとともに、たとえば糖尿病やけいれんなどの治療可能な臓器症状に対しては、積極的な薬物治療を行うことが重要である。感音性難聴に対しては、人工内耳治療も有効である。

③活性酸素を除去する薬剤を試みる。

ミトコンドリアの機能低下にはエネルギー産生が減少するだけでなく、活性酸素が増加することも知られている。そのため活性酸素を

除去する作用をもつ薬剤の投与が有効な場合がある。コエンザイム Q10、カルニチン、ビタミン E などがそのような働きをもつ。

④エネルギー代謝に悪影響を与える薬物の投与は避ける。

ミトコンドリア脳筋症患者がてんかんを合併することがある。その際、バルプロ酸は、カルニチン代謝に影響し、ミトコンドリア内のエネルギー産生基質の運搬を低下させる可能性があるため、慎重に用いることが必要である。アルコールはミトコンドリア内のエネルギー代謝を阻害するので、飲酒は禁忌である。

💡 看護のポイント

- ・生活指導：食生活がミトコンドリア機能にとって重要であり、ビタミンが多いバランスのよい食事をとるように指導する。飢餓や過食、過労や睡眠不足、感染症などで症状が急に悪化する場合があるので、日常生活における指導を行うとともに、調子の悪いときは早めに受診するように指導する。
- ・定期検診：新たな症状が出現することがあり、その早期発見のためにも、病状変化があまりない場合でも定期的な検査を受けるように指導する。
- ・遺伝形式：原因によってさまざまな遺伝様式があるので遺伝子診断が重要である。原因遺伝子が判明した場合は、専門の遺伝カウンセリングが受けられるように配慮することが必要である。
(後藤雄一)

The C2A domain in dysferlin is important for association with MG53 (TRIM72)

November 5, 2012 · *Advanced Diagnostics and Biomarkers*

Chie Matsuda¹, Katsuya Miyake, Kimihiko Kameyama², Etsuko Keduka³, Hiroshi Takeshima⁴, Toru Imamura⁵, Nobukazu Araki⁶, Ichizo Nishino⁷, Yukiko Hayashi⁸

1 Biomedical Research Institute, National Institute of Advanced Industrial Science and Technology; Department of Neuromuscular Research, National Institute of Neuroscience, National Center of Neurology and Psychiatry, **2** Biomedical Research Institute, National Institute of Advanced Industrial Science and Technology, **3** Department of Neuromuscular Research, National Institute of Neuroscience, National Center of Neurology and Psychiatry, **4** Department of Biological Chemistry, Kyoto University Graduate School of Pharmaceutical Science, **5** Biomedical Research Institute, National Institute of Advanced Industrial Science and Technology, **6** Department of Histology and Cell Biology, School of Medicine, Kagawa University, **7** Department of Neuromuscular Research, National Institute of Neuroscience, National Center of Neurology and Psychiatry; Department of Clinical Development, Translational Medical Center, National Center of Neurology and Psychiatry, **8** Department of Neuromuscular Research, National Institute of Neuroscience, National Center of Neurology and Psychiatry; Department of Clinical Development, Translational Medical Center, National Center of Neurology and Psychiatry

Matsuda C, Miyake K, Kameyama K, Keduka E, Takeshima H, Imamura T, Araki N, Nishino I, Hayashi Y. The C2A domain in dysferlin is important for association with MG53 (TRIM72). *PLOS Currents Muscular Dystrophy*. 2012 Nov 5 [last modified: 2012 Nov 5]. Edition 1. doi: 10.1371/5035add8caff4.

Abstract

In skeletal muscle, Mitsugumin 53 (MG53), also known as muscle-specific tripartite motif 72, reportedly interacts with dysferlin to regulate membrane repair. To better understand the interactions between dysferlin and MG53, we conducted immunoprecipitation (IP) and pull-down assays. Based on IP assays, the C2A domain in dysferlin associated with MG53. MG53 reportedly exists as a monomer, a homodimer, or an oligomer, depending on the redox state. Based on pull-down assays, wild-type dysferlin associated with MG53 dimers in a Ca²⁺-dependent manner, but MG53 oligomers associated with both wild-type and C2A-mutant dysferlin in a Ca²⁺-independent manner. In pull-down assays, a pathogenic missense mutation in the C2A domain (W52R-C2A) inhibited the association between dysferlin and MG53 dimers, but another missense mutation (V67D-C2A) altered the calcium sensitivity of the association between the C2A domain and MG53 dimers. In contrast to the multimers, the MG53 monomers did not interact with wild-type or C2A mutant dysferlin in pull-down assays. These results indicated that the C2A domain in dysferlin is important for the Ca²⁺-dependent association with MG53 dimers and that dysferlin may associate with MG53 dimers in response to the influx of Ca²⁺ that occurs during membrane injury.

To examine the biological role of the association between dysferlin and MG53, we co-expressed EGFP-dysferlin with RFP-tagged wild-type MG53 or RFP-tagged mutant MG53 (RFP-C242A-MG53) in mouse skeletal muscle, and observed molecular behavior during sarcolemmal repair; it has been reported that the C242A-MG53 mutant forms dimers, but not oligomers. In response to membrane wounding, dysferlin accumulated at the injury site within 1 second; this dysferlin accumulation was followed by the accumulation of wild-type MG53. However, accumulation of RFP-C242A MG53 at the wounded site was impaired relative to that of RFP-wild-type MG53. Co-transfection of RFP-C242A MG53 inhibited the recruitment of dysferlin to the sarcolemmal injury site. We also examined the molecular behavior of GFP-wild-type MG53 during sarcolemmal repair in dysferlin-deficient mice which show progressive muscular dystrophy, and found that GFP-MG53 accumulated at the wound similar to

wild-type mice. Our data indicate that the coordination between dysferlin and MG53 plays an important role in efficient sarcolemmal repair.

Funding Statement

This study was partly supported by intramural Research Grant 23-4 (YKH) and 23-5 (CM, IN) for Neurological and Psychiatric Disorders of NCNP; partly by Research on Intractable Diseases, Comprehensive Research on Disability Health and Welfare (YKH, IN), and Applying Health Technology from the Ministry of Health Labour and Welfare (IN); and partly by JSPS KAKENHI Grant Numbers of 18590966 (CM), 24390227 (YKH), and 24659437 (YKH).

Introduction

Dysferlin is a sarcolemmal protein, and dysferlin deficiency causes Miyoshi myopathy (MM) and limb girdle muscular dystrophy type 2B (LGMD2B) [1,2]. Based on the observation that dysferlin accumulates at wound sites in myofibers in a Ca^{2+} -dependent manner, dysferlin is thought to mediate Ca^{2+} -dependent sarcolemmal repair [3].

Mitsugumin 53 (MG53), also known as muscle-specific tripartite motif 72, is a recently identified protein involved in membrane repair in skeletal muscle [4]. Mice lacking MG53 suffer progressive myopathy [4], similar to dysferlin-null mice [3]. MG53 is localized in intracellular vesicles and plasma membranes in skeletal muscle, and it accumulates at injury sites in an oxidation-dependent, but not Ca^{2+} -dependent, manner [4].

MG53 interacts with dysferlin and caveolin-3 to regulate sarcolemmal repair [5]. When expressed in C2C12 myoblasts that lack endogenous MG53, damaged membrane sites cannot be repaired in the presence of GFP-dysferlin, however, co-transfection of MG53 and GFP-dysferlin in these myoblasts results in GFP-dysferlin accumulation at injury sites [5]. These findings indicated that recruitment of dysferlin to the injury site of the membrane depends on MG53. However, it remains unclear whether the absence of dysferlin perturbs recruitment of MG53 to the injury site for membrane repair. A previous report has demonstrated the association of dysferlin with MG53 with co-immunoprecipitation (IP) assays using mouse skeletal muscle and C2C12 myoblasts transfected with dysferlin and MG53 [5]. However, which protein domains participate in this interaction between dysferlin and MG53 and whether this interaction is dependent on Ca^{2+} remain unclear. MG53 oligomerizes via disulfide bonds [4] and forms homodimers via a leucine-zipper motif in the coiled-coil domain [6]. The interaction between dysferlin proteins and MG53 monomers or oligomers has not been characterized in detail. To understand the precise role of dysferlin and MG53 in sarcolemmal repair, it would be helpful to determine whether dysferlin associates with MG53 monomers, oligomers, or both in a Ca^{2+} -dependent manner.

Thus, to examine the biological role of the association between dysferlin and MG53, we used the following strategy to examine the effect of the absence of MG53 oligomers on dysferlin. We co-transfected mouse skeletal muscle with wild-type dysferlin-EGFP and RFP-tagged wild-type MG53 or a RFP-tagged MG53 mutant (RFP-C242A-MG53), and conducted a membrane-repair assay using a two-photon laser microscope. The C242A-MG53 mutant has been reported to form dimers, but not oligomers [6]. There is no report of simultaneous observation of dysferlin and MG53 during sarcolemmal repair; however, we have successfully performed real-time imaging of dysferlin-GFP and MG53-RFP after membrane injury in mouse skeletal muscle.

Dysferlin protein is absent or severely reduced in the skeletal muscle of patients with dysferlinopathy [7] and of SJL and A/J mice with mutations in the dysferlin genes [8]. To examine whether the absence of dysferlin affects the recruitment of MG53 to injury sites, we transfected skeletal muscle from dysferlin-deficient SJL and A/J mice with EGFP-MG53 and conducted membrane repair assays. These experiments are helpful in elucidating the

molecular pathology of dysferlinopathy and revealed that MG53 accumulated in the skeletal muscles of dysferlin-deficient mice, which develop progressive muscular dystrophy.

We present evidence indicating that efficient sarcolemmal repair requires both dysferlin and MG53.

Methods

Immunoprecipitation. To examine the interaction between MG53 and dysferlin, mouse gastrocnemius muscles were lysed in lysis buffer containing 20 mM Tris-HCl (pH 7.5), 150 mM NaCl, 1% NP-40, and Complete mini EDTA-free protease inhibitor cocktail (Roche) [9] supplemented with 1 mM CaCl_2 or 2 mM EGTA. Lysates pre-cleared with Protein A/G agarose (Pierce) were incubated with polyclonal antibodies against mouse MG53 [4] or mouse dysferlin; the anti-dysferlin antibody was made in rabbit by injecting bacterial recombinant protein containing residues 1669 to 1790. The immunoprecipitated proteins were separated by SDS-PAGE and detected on immunoblots using the same antibodies used for IP or the anti-human dysferlin monoclonal antibody, NCL-Hamlet (Novocastra Laboratories).

A human MG53 cDNA was amplified by PCR and subcloned into pFLAG-CMV-4 (Sigma). Wild-type and truncated human dysferlin that were each tagged with c-myc were generated previously [10]. We also created five truncated human dysferlin constructs with the C2A domain (aa 1-149, 1-349, and 1-1080) and without the C2A domain (aa 130-2080 and 1081-2080). The sequence of each construct was verified by DNA sequencing. FuGENE 6 or E-xtremeGENE 9 (Roche) was used to transiently transfect COS-7 cells with MG53 and wild-type or mutant dysferlin constructs. Transfectants were cultured for 48 h and subsequently lysed in the same lysis buffer used to lyse mouse muscle, except that this buffer lacked CaCl_2 and EGTA. Lysates pre-cleared with Protein G-Sepharose (GE Healthcare) were incubated with anti-FLAG (M2, Sigma) or anti-c-myc (9E10, Santa Cruz Biotechnology) monoclonal antibodies; Protein G-Sepharose was then added. Immunoprecipitated proteins were analyzed by immunoblotting using M2 and anti-c-myc polyclonal (A14, Santa Cruz Biotechnology) antibodies.

Pull-down assay. Fragments of the dysferlin C2A domain (corresponding to aa 1-129 of human dysferlin) were amplified as cDNA by PCR and subcloned into pGEX-5X-3 (GE Healthcare). Dysferlin p.W52R (TGG to CGG at c.527-529) and p.V67D (GTG to GAT at c.572-574) mutations were introduced by PCR using appropriate primers. GST fusion proteins expressed in BL21 *E. coli* were purified using sarkosyl [11] and bound to glutathione Sepharose 4B (GE Healthcare). COS-7 cells overexpressing FLAG-tagged human MG53 were lysed in lysis buffer containing 10 mM Na_2HPO_4 , 1.8 mM KH_2HPO_4 , 1% NP-40 (pH 7.4), 2 mM EGTA, various concentration of CaCl_2 , and Complete mini EDTA-free protease inhibitor cocktail. EGTA was used to chelate the free Ca^{2+} in solution and CaCl_2 at various concentrations. The free calcium concentration was calculated using the free software CALCON3.6. Lysates were centrifuged to remove cellular debris, supplemented with 5 mM N-methylmaleimide (NEM) or 5 mM dithiothreitol (DTT), and finally subjected to protein cross-linking by treating with 2 mM glutaraldehyde (GA) for 5 min at room temperature, which was quenched with 100 mM Tris-HCl (pH 7.5) [6]. The cross-linked lysates were diluted with 75 mM Tris-HCl (pH 7.5), 150 mM NaCl, 1% NP-40, 2 mM EGTA, various concentrations of CaCl_2 , and Complete mini EDTA-free protease inhibitor cocktail. Lysates pre-cleared with GST bound to glutathione Sepharose 4B were divided into aliquots and incubated with wild-type, p.W52R, and p.V67D dysferlin C2A-GST fusion protein bound to beads for 2 hr at 4°C. After three washes in lysis buffer containing 75 mM Tris-HCl (pH 7.5), 2× sample buffer (125 mM Tris-HCl (pH 6.8), 4% SDS, 20% (v/v) glycerol, and 0.004% bromophenol blue) was added to the beads, and the mixtures were incubated for 10 min at 85°C. Bound proteins were separated by SDS-PAGE and subjected to immunoblotting with the anti-FLAG antibody M2.

In vivo transfection and membrane repair assay. Twenty micrograms of N-terminal RFP-tagged human MG53 cDNA/pcDNA3.1 and/or C-terminal GFP-tagged human dysferlin cDNA/pcDNA3.1 plasmid DNA were injected into

the flexor digitorum brevis of anesthetized, 4-week-old male C57BL6J and dysferlin-deficient SJL and A/J mice. Electroporation of plasmid DNA was performed using an electric pulse generator (CUY21SC, NEPAGENE) as described previously [12]. Seven days after electroporation, skeletal muscle myocytes (for whole-mount viewing) or individual myofibers were isolated and subjected to plasma membrane injury created by a two-photon laser microscope, LSM 710NLO with GaAsp Detectors (Zeiss) and Chameleon Vision II System (Coherent)[3]. Myofiber wounding using the 820-nm infrared laser and resealing analysis based on the kinetics and extent of FM1-43 or 4-46 dye (Molecular Probes) entry through open disruptions was carried out as previously described [3,13,14].

Ethics Statement. All experiments involving animals were performed according to the Procedure for Handling Experiments Involving Animals of AIST (National Institute of Advanced Industrial Science and Technology) and approved by the Institutional Animal Care and Use Committee of AIST.

Results

Association of MG53 and dysferlin in mouse skeletal muscle

We used an IP assay with protein from mouse muscle to confirm that endogenous MG53 associates with dysferlin *in vivo*. MG53 and dysferlin associated only in the absence of EGTA and CaCl_2 (Fig. 1). The same result was obtained using C2C12 myotubes (data not shown). MG53 was specifically co-immunoprecipitated by the anti-dysferlin antibody, and conversely dysferlin was specifically co-immunoprecipitated by the anti-MG53 antibody. Thus, we confirmed that endogenous MG53 and endogenous dysferlin form a protein complex in mouse skeletal muscle without EGTA or CaCl_2 supplementation.