

変異 caveolin-3 (P104L) トランスジェニックマウス骨格筋における遺伝子発現: アポトーシスシグナルの動向

山田 治来

caveolin は細胞膜のフラスコ状陥入構造である caveola を構成する膜貫通蛋白であり、そのうち caveolin-3 は主に骨格筋に発現する isoform である。caveolin-3 遺伝子異常による常染色体優性肢帯型筋ジストロフィー (limb-girdle muscular dystrophy : LGMD1C) の分子発症機構の解明を目的として、Sunada らはヒト caveolin-3 遺伝子変異 (Pro 104 Leu ミスセンス変異) を導入したトランスジェニック (Tg) マウスを作製した。Tg マウスは病理組織学的に明らかなミオパチーを発症しており、モデルマウスとして有用である。Tg マウス骨格筋では変異 caveolin-3 mRNA が過剰に発現する一方で、筋形質膜に局在する caveolin-3 蛋白の欠損が確認されたことから、caveolin-3 遺伝子変異が dominant negative 効果を持つと考えられる。また、従来 caveolin-3 は nNOS と結合し、その活性を抑制させることが知られているが、Tg マウス骨格筋では nNOS 活性が増加し、筋変性の病態に nNOS 活性上昇が関与することが考えられる。この Tg マウスにおける筋変性の分子機構解明をすすめるため、DNA membrane array および gene chip を用いて発現プロファイル解析により病態関連遺伝子のスクリーニングを行った。さらにスクリーニングにより得られた候補遺伝子のうちアポトーシス関連の遺伝子発現を Northern blot 法により解析した。その結果、病態関連遺伝子のスクリーニングで、多くの遺伝子の発現上昇および低下が確認された。また、Northern blot 解析により、アポトーシス関連遺伝子として *COXVaL* および *CIDE-A*、またアポトーシス抑制遺伝子として *Dad-1*、*Ribophorin I* および *Ribophorin II* の発現上昇がみられた。アポトーシス関連遺伝子とアポトーシス抑制遺伝子の発現上昇がみられたことは、骨格筋細胞にアポトーシスを生じるメカニズムが働く一方で、アポトーシスを抑制し筋細胞死を防御するメカニズムがともに働いていることが示唆される。このことから、caveolin-3 遺伝子変異を導入した Tg マウスでは、筋細胞内のアポトーシスシグナル伝達経路の変化が、筋変性の病態に関与している可能性が考えられる。

(平成15年10月25日受理)

Gene Expression Analysis of Skeletal Muscle from Mutant Caveolin-3 (P104L) Transgenic Mice : Apoptotic Signaling Trends

Haruki YAMADA

Caveolins are membrane proteins which are the principal components of caveolae, flask-shaped invaginations of the plasma membrane. Caveolin-3 is the muscle specific isoform of the caveolin

protein family. Specific mutations in the caveolin-3 gene, including the Pro 104 Leu missense mutation, cause a deficiency in caveolin-3 in the sarcolemma and contribute to an autosomal dominant limb-girdle muscular dystrophy (LGMD1C). The molecular mechanism by which these mutations cause the deficiency in caveolin-3 in the sarcolemma leading to muscle cell degeneration remains unknown. Sunada et al generated transgenic (Tg) mice expressing the Pro 104 Leu missense mutation. Those Tg mice showed a severe myopathic phenotype concomitant with an excessive expression of the mutant caveolin-3. However, they showed a deficiency in caveolin-3 in the sarcolemma, indicating a dominant negative effect of the mutant caveolin-3. The Tg mice showed a great increase in nNOS activity in skeletal muscle. For the screening of genes involved in the pathogenesis of caveolin-3 deficiency, I did gene expression profiling using a DNA membrane array and gene chip technology, and found many up-regulated or down-regulated genes in Tg mice skeletal muscle. Northern blot analysis revealed upregulation of several apoptosis-related genes. In addition, several anti-apoptotic genes were also up-regulated, probably due to a defense mechanism to prevent muscle cell death. These results suggest that a caveolin-3 deficiency leads to alteration in apoptotic signaling pathways and results in muscle degeneration. (Accepted on October 25, 2003)

Kawasaki Igakkaishi 29(3) : 241-248, 2003

Key Words ① LGMD1C ② Caveolin-3 ③ Transgenic mice
④ Gene expression analysis ⑤ Apoptotic signaling

はじめに

肢帯型筋ジストロフィー (limb-girdle muscular dystrophy : LGMD) は主として肩甲帯・腰帯筋と四肢近位筋を侵す進行性筋ジストロフィーの総称であり、遺伝学的に多様な疾患を包括しているが、現在はその遺伝形式と遺伝子座位に基づいて分類されている。常染色体優性遺伝形式のものを LGMD1, 劣性のものを LGMD2 とし、遺伝子座位がマップされた順番に A, B, C … をつけて表記される¹⁾。LGMD1C は第3染色体短腕 3p25 に遺伝子座位を持つ caveolin-3 遺伝子異常に起因する肢帯型筋ジストロフィーである²⁾。caveolin は細胞膜のフラスコ状陥入構造である caveola を構成する膜貫通蛋白であり^{3), 4)}、異なる遺伝子によりコードされる3つの isoform (caveolin-1, -2, -3) があり、このうち caveolin-3 は主に骨格筋に発現している⁵⁾。

caveolin は homo-oligomer を形成し caveola の形態形成に関与するのみならず、G-protein, NOS, c-Src, H-Ras, protein kinase C など種々

の signaling 分子と結合し、シグナル伝達を調節している⁶⁾。LGMD1C の分子発症機構の解明を目的として Sunada らは caveolin-3 遺伝子の Pro 104 Leu ミスセンス変異を導入したトランスジェニック (Tg) マウスを作製した⁷⁾。この Tg マウスは全身の骨格筋萎縮、歩行異常、骨格筋病理組織上ミオパチー変化がみられ、ミオパチーモデルと考えられた。Tg マウス骨格筋では変異 caveolin-3 mRNA が過剰に発現する一方で、筋形質膜に局在する caveolin-3 蛋白の欠損が確認されたことから、caveolin-3 遺伝子変異が dominant negative 効果を持つと考えられる。caveolin-3 は homo-oligomer を形成して機能するため、変異 caveolin-3 蛋白が合成されると正常な homo-oligomer が形成されず蛋白分解を受けて caveolin-3 蛋白が欠損すると推測される。一方、caveolin-3 は骨格筋で neuronal nitric oxide synthase (nNOS) に結合しその活性を抑制することが知られている⁸⁾。Tg マウス骨格筋では、caveolin-3 蛋白欠損により nNOS 活性が有意に増加し、その筋変性の病態に nNOS 活性上昇が関与することが考えられる^{7), 9)}。この Tg マウ

スにおいて、nNOS 以外の他の signaling 分子の動向を調べ、それが筋変性にどう関与するかの解明をすすめるため、DNA membrane array および gene chip を用いて発現プロファイル解析により病態関連遺伝子のスクリーニングを行った。さらにスクリーニングにより得られた候補遺伝子のうち、アポトーシス関連の遺伝子発現を Northern blot 法により解析した。その結果、筋変性の病態にアポトーシスの関与を示唆するデータが得られたので報告する。

方 法

本実験は川崎医科大学動物実験委員会 (No. 00-123) の承認のもと、川崎医科大学動物実験指針に基づいて実施された。

(1) 変異 caveolin-3 トランスジェニック (Tg) マウスの作出

変異 caveolin-3 トランスジーンは、LGMD1C のイタリア人家系で認められた点突然変異 (P104L)¹⁰⁾ をマウス caveolin-3 cDNA に導入し、骨格筋特異的プロモーターである MCK (muscle creatine kinase) プロモーター下流に挿入し作製した⁷⁾。このトランスジーンを C3H/He マウスの受精卵にマイクロインジェクションし、変異 caveolin-3 トランスジェニック (Tg) マウスを作出した。Tg マウスは、川崎医科大学医用生物センターにおいて繁殖、維持された。マウス尾からゲノム DNA を抽出し、トランスジーン特異的プライマーを用いた PCR により遺伝子型 (genotype) を確認した⁷⁾。

(2) 骨格筋全 RNA の抽出とポリ (A)⁺ RNA の精製

24週齢の野生型 (Wt) マウス及び Tg マウスからそれぞれ骨格筋組織を摘出し、凍結破砕の後、TRIZOL™ (GibcoBRL) 試薬 20 ml を加え、ホモジェナイズした。次いで 12,000×g で10分間遠心して得られた上清にクロロホルム 4 ml を加え混和後、12,000×g で 4℃15分間遠心し、その上清に isopropanol 10 ml を加え、12,000×g で 4℃15分間遠心し、RNA ペレットを得た。75

%エタノール洗浄後、diethylpyrocarbonate (DEPC) H₂O 300 µl 中で再懸濁し、骨格筋全 RNA を得た。全 RNA からオリゴ (dT) セルロース法 [MessageMaker™ Kit (GibcoBRL)] により、骨格筋ポリ (A)⁺ RNA を精製した。

(3) DNA membrane array による解析

Wt マウス及び Tg マウス骨格筋ポリ (A)⁺ RNA 1 µg から、逆転写反応により [α -³²P] 標識 cDNA プローブを作成した。それぞれ、Atlas™ Mouse 1.2 DNA Array メンブレン (Clontec) (1,176 cDNAs ~ 200 bp-length) とハイブリダイゼーションを行った。オートラジオグラフィーの後、ImageAnalyzer™ (Fuji Film) を用いて、Wt および Tg マウス間で発現に差異のある病態関連遺伝子群をスクリーニングした。

(4) gene chip による解析

Wt マウス及び Tg マウス骨格筋ポリ (A)⁺ RNA 1 µg から、T7-(dT)₂₄ primer & Superscript II™ RTase (GibcoBRL) を用いて第1鎖 cDNA 合成を行い、DNA ligase & E.coli DNA polymerase™ (GibcoBRL) を用いて第2鎖 cDNA 合成を行った。続いて Biotinated ribonucleotide & T7 RNA polymerase™ (GibcoBRL) を用いて Biotinated cRNA プローブを作製した。GeneChip™ (Affimetrix) (36,000 cDNAs from RIKEN mouse ESTs ~ 21bp-length) と、それぞれハイブリダイゼーションを行った。次いで streptavidin phcoerythrin conjugate で発色し、GeneArray Scanner (Hewlett-Packard) に取り込み、Affymetrix GeneChip software を用いて、輝度を解析した。

(5) Northern blot 解析

Wt マウス及び Tg マウス骨格筋全 RNA を、それぞれ 10 µg ずつ、7%ホルムアルデヒドを含む 1%アガロースゲルで泳動後、Hybond-N +™ メンブレン (Amersham) にプロットした。

DNA membrane array 及び gene chip で発現に差異のあった各々の遺伝子について、それぞれの翻訳領域を含む約 400 bp の cDNA を、RT-PCR 法により増幅した。次いでマルチプライム法 [Megaprime DNA labeling system™ (Amersham)] により [α -³²P] 標識 cDNA プローブ

ブを作成した。

メンブレンと各々の [α -³²P] 標識 cDNA プローブをハイブリダイゼーションした。オートラジオグラフィーの後、ImageAnalyzer™ (Fuji Film) で解析を行った。

結 果

(1) DNA membrane array による解析

24週齢の Wt マウス及び Tg マウス骨格筋由来の標識 cDNA を用いて、総計1,176個の遺伝子の発現を解析した。Tg マウス骨格筋で発現が上昇する遺伝子 (up-regulated gene) として、c-Jun, ubiquitin conjugate E2 β , G-protein coupled

receptor 25, laminin β 2, defender against apoptotic cell death (*Dad-1*) など7種類、発現が低下する遺伝子 (down-regulated gene) として、Glucocorticoid receptor form A, TNF receptor 1 など4種類を同定した (Table 1) (Fig. 1)。なお、実験は2回施行し、遺伝子発現の上昇、低下に再現性が認められたものについて Table 1 に示した。

(2) gene chip による解析

理研脳科学総合研究センターの Affymetrix GeneChip を用いて、更に多数の遺伝子発現について解析した。総計36,000個の Mouse cDNA の解析では、up-regulated gene として213種類、down-regulated gene として142種類を同定した。

このうち、代表的な既知遺伝子について Table 2 に示した。なお、DNA membrane array と gene chip とで共通の遺伝子は、*Dad-1* のみであった。今回使用した gene chip は21塩基対の中で11個めのヌクレオチドに SNP (single nucleotide polymorphism) を入れたものを background として使用しているため、DNA membrane array に比較し、特異性が高いと考えられる。

(3) Northern blot 解析

(1), (2) でスクリーニングした病態関連候補遺伝子のうち、アポトーシス関連遺伝子の発現について Northern blot により解析した。apoptotic gene である *COXVIaL* および DNA fragmentation factor である *CIDE-A* の発現上昇 (upregulation) がみられた (Fig. 2)。*COXVIaL* および *CIDE-A* はそれぞれ、野生型マウスに比べ約2.1倍、約10.6倍の upregulation を示した。更に anti-apoptotic gene である *Dad-1*, *Ribophorin I* および *Ribophorin II* もそれぞれ、野生型マウスに比

Table 1. DNA membrane array による解析結果

| Up-Regulated Genes | Down-Regulated Genes |
|--------------------------------|--|
| Laminin β 2 | Glucocorticoid receptor form A |
| Ubiquitin conjugate E2 β | TNFR1 |
| G-protein coupled receptor 3 | Nuclear factor of Activated T cells 1 (NFAT 1) |
| G-protein coupled receptor 25 | |
| Dad 1 | AhR nuclear translocator 2 (Arnt 2) |
| c-Jun | |
| Survival motor neuron | |

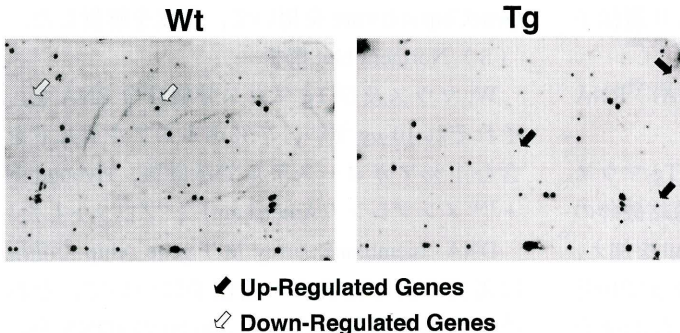


Fig. 1. DNA membrane array
 Wt: 野生型 (wild type) マウス Tg: トランスジェニックマウス
 黒矢印: up-regulated gene
 白矢印: down-regulated gene

Table 2. gene chip による解析で遺伝子発現に変動を認めた遺伝子群
 網掛け：up-regulated gene
 その他：down-regulated gene

| Genebank# | Description | Fold Change | Genebank# | Description | Fold Change |
|--|--|-------------|---|--|-------------|
| Transcription factors | | | Chaperone | | |
| M28845 | Early growth response 1 (ERG1) | 10.4 | M12571 | Heat shock 70-KD protein 3 | 2.4 |
| U47543 | Ngfi-A binding protein 2 | 5.8 | Glucose Methabollism | | |
| V00727 | c-fos proto-oncogene | 4.6 | L09192 | Pyruvate kinase | -1.8 |
| AF009414 | Sox11 | 4.4 | Protease and Protease Inhibitors | | |
| U10374 | Peroxisome proliferator-activated receptor- γ | 2.7 | J00389 | Glandular kallikrein | 11.4 |
| F038939 | Peg3/Pw1 | 2.1 | X58628 | Prorenin converting enzyme | 7.1 |
| M24377 | Early growth response 2 (ERG2) | 2.1 | X93037 | WND11 protein | 6.3 |
| AB029349 | HSF4b | 1.9 | AJ000990 | Legumin | 2 |
| AF051368 | p53 | 1.9 | Calcium binding Proteins | | |
| X15784 | Myogenin | 1.7 | M36579 | S100A4 | 4.3 |
| AF091998 | Core binding factor- β | -1.7 | X99921 | S100A13 | 4 |
| DI4572 | Polyoma virus enhancer binding protein | -1.7 | U72941 | Annexin IV | 1.6 |
| Growth factors and cell signalling proteins | | | M59821 | Immediate early gene pip92 | 2.3 |
| AF084466 | Rad | 5.7 | AF084459 | Calpain 1 large subunit | 2.4 |
| M17962 | Epidermal groth factor binding protein type C | 2.9 | AF087687 | S100A1 | 1.7 |
| AF089751 | P2X4 | 3.4 | X59382 | Parvalbumin | -1.8 |
| U66058 | Frizzled-related protein (FRZB) | 2.6 | AB016080 | DNA-dependent protein kinase- interacting protein 2 (Kip2) | -2.1 |
| L41352 | Amphiregulin | 2.5 | Cytoskeletal proteins | | |
| U38196 | Membrane protein palmitylated 1 (MPP1) | 2.3 | AF083876 | Xmp | 3.1 |
| AF009246 | DEXRAS1 | 1.7 | X61940 | T-cadherin | 1.8 |
| U84005 | Myostatin/GDF8 | -6.5 | AJ131711 | Troponin T | 1.8 |
| AB011030 | PRDC | -6.6 | AF093775 | α -actinin3 | -1.7 |
| Cell cycle-related proteins | | | U16741 | Capping protein muscle-Z-line, α -2 | -1.6 |
| U09507 | Cyclin dependent kinase inhibitor 1A (p21) | 5.9 | AJ012072 | Myomesin/skelemin | -1.8 |
| X66235 | Retinoid X receptor- γ (RXR γ) | -10 | U76758 | Ankyrin 1 | -2.5 |
| Ion channel proteins | | | U68267 | Myosin binding protein H (MvBP-H) | -2.7 |
| AJ131398 | MimK-like protein | 4.4 | Others | | |
| X93038 | FXD3/MAT8 | 3.5 | J04698 | Acetylcholine receptor ϵ | 13.7 |
| M28383 | Solute carrier family 4, member 3 (Slc4a3) | 2.5 | U36579 | Caveolin-3 | 4.5 |
| AF031127 | Inositol triphosphate receptor type 2 | 2.3 | M21247 | Uncoupled protein 1 | 3.8 |
| Apoptosis-related proteins | | | X72862 | β 3-adrenergic receptor | 3.2 |
| AF04137 | Cell death activator CIDE-A | 3.8 | D21207 | Benzozyazepine receptor, peripheral type | 1.8 |
| XM122764 | Defender against apoptotic cell death 1 (Dad1) | 1.9 | U41465 | BCL-6 | -1.8 |
| U08440 | Chytochrome c oxidase VIaL | 1.7 | Y17850 | Ganglioside-induced differentiation-associated protein 1 (GDAP1) | -2.6 |
| D89613 | Cytokine inducible SH2-containing protein (CIS) | -1.7 | | | |
| U88325 | Suppressor of cytokine signalling 1 (SOCS1) | -9.8 | | | |

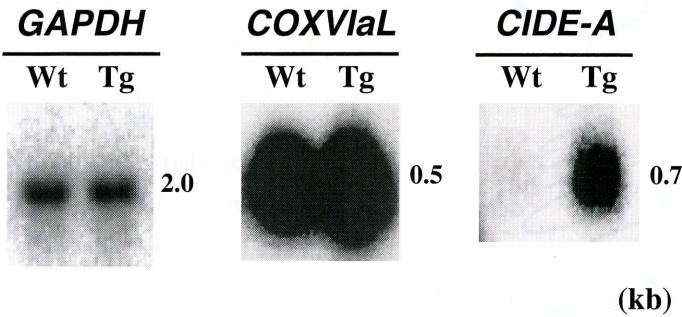


Fig. 2. Northern blot 法によるアポトーシス関連遺伝子の発現解析

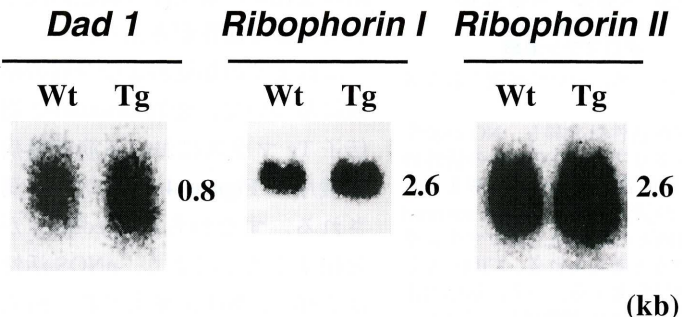


Fig. 3. Northern blot 法によるアポトーシス抑制遺伝子の発現解析

べ約1.4倍, 約3.1倍, 約1.6倍の upregulation を示した (**Fig. 3**).

考 察

caveolin-3 遺伝子変異を導入した Tg マウスの骨格筋では, Northern blot 解析により, アポトーシス関連遺伝子およびアポトーシス抑制遺伝子双方の発現上昇がみられた. ヒトの生検筋を用い, 筋ジストロフィーにおいてアポトーシスが関与しているとする知見は, 常染色体劣性肢帯型筋ジストロフィー (LGMD2A) との関連を示した Baghdiguian らの報告¹¹⁾や, Duchenne 型筋ジストロフィーとの関連を示した Sandri らの報告¹²⁾, α -sarcoglycan 欠損との関連を示した Tews らの報

告¹³⁾などがある。

今回我々のモデルマウスで upregulation が確認された *CIDE-A* は、アポトーシス経路の下流に位置し DNA 断片化を促進する。*CIDE-A* は、cell-death-inducing DFF45-like effectors (CIDEs) の一つで¹⁴⁾、DNA fragmentation factor (DFF) の 45kDa の subunit の一つである DFF45 と同源性をもつ。caspase により活性化された DNase (Caspase-activated DNase (CAD)) はそのインヒビターである ICAD (inhibitor of caspase-activated DNase) とヘテロ二量体をつくり不活性化されており、アポトーシス誘導時には caspase-3 により ICAD が分解され ACAD (activated CAD) への活性化がおこる^{15), 16)}。*CIDE-A* 発現上昇は、この CAD の活性化を直接的に促進する。これにより、アポトーシスにおける DNA の断片化やクロマチンの濃縮が生じると考えられている。

COX IVaL は核の DNA でコードされた cytochrome c oxidase (COX) の subunit の一つで

ある *COX IVa* の liver (L) isoform で、ミトコンドリアにおける電子伝達系に関与する¹⁷⁾。これは、肝臓のみならず骨格筋を含む多くの組織に存在することが知られている。*COX IVaL* の活性上昇により、ミトコンドリアの cytochrome c が何らかの機序で細胞質へ漏出し、caspase を活性化することにより、アポトーシスが促進されると考えられている。

一方、*Dad-1* は、*Ribophorin I*、*Ribophorin II* および *OST48* (oligosaccharyltransferase) とともに粗面小胞体の膜を貫通する蛋白で、OST complex とよばれる複合体を形成し、抗アポトーシス作用を示す¹⁸⁾。OST complex は、粗面小胞体の腔内で新たに合成されたポリペプチドの *N*-glycosylation (oligosaccharide である $\text{Glc}_3\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2$ を結合させる) を触媒する。ポリペプチドの *N*-glycosylation は、アポトーシスを抑制するのに必要であると考えられている。

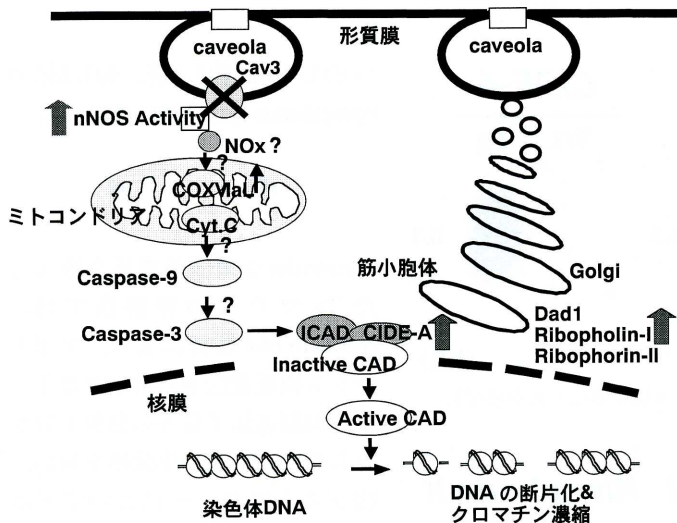


Fig. 4. 変異 caveolin-3 トランスジェニックマウスにおいて推測される病態機序

caveolin-3 が欠損することにより、nNOS 活性は上昇し、NO が産生され、何らかの機序により、ミトコンドリアで *COX IVaL* の活性の上昇に至る。引き続き cytochrome c が細胞質へ漏出すると考えられる。それにより、caspase-9、caspase-3 の活性化と、caspase-activated DNase (CAD) 活性化による、染色体 DNA の断片化、クロマチン濃縮などのアポトーシスの最終機構に至ると考えられる。*CIDE-A* 発現上昇は、この CAD の活性化を直接的に促進する。一方、筋小胞体においては、*Dad 1*、*Ribophorin I*、*Ribophorin II* が発現し、アポトーシスを抑制する方向に働いていると考えられる。

caveolin-3 遺伝子変異を導入した Tg マウスで、アポトーシス関連遺伝子とアポトーシス抑制遺伝子双方の発現上昇がみられたことは、骨格筋細胞にアポトーシスを生じるメカニズムが働く一方で、アポトーシスを抑制し筋細胞死を防御するメカニズムがともに働いていることが示唆される。このことから、caveolin-3 遺伝子変異を導入した Tg マウスでは、筋細胞内のアポトーシスシグナル伝達経路の変化が、筋変性の病態に関与している可能性が考えられる。

これまでの知見および今回の結果に基づいて、変異 caveolin-3 遺伝子 Tg マウスにおける筋変性病態機序は Figure 4 のように推測される。すなわち、caveolin-3 が欠損することにより、nNOS 活性は上昇し、NO が産生され、何らかの機序により、ミトコンドリア

で *COX VIaL* の活性の上昇に至る。引き続き cytochrome c が細胞質へ漏出すると考えられる。それにより、caspase-9, caspase-3 の活性化と、caspase-activated DNase (CAD) 活性化による、染色体 DNA の断片化、クロマチン濃縮などのアポトーシスの最終機構に至ると考えられる。*CIDE-A* 発現上昇は、この CAD の活性化を直接的に促進する。一方、筋小胞体においては、*Dad 1*, *Ribopholin I*, *Ribopholin II* が発現し、アポトーシスを抑制する方向に働いていると考えられる。

今回の研究で筋変性に到るメカニズムとしてのシグナル伝達異常の解明の手がかりが得られたことにより、LGMD1C の発症機序、病態の把握、さらに治療法の開発へつながるかもしれない。今後はこのモデルマウスを用いて更なる

解析を進め、筋変性に到るメカニズムとしてのシグナル伝達異常を解明することが重要と考えられる。

謝 辞

稿を終えるにあたり、御指導と御校閲を賜りました川崎医科大学内科学（神経）教室 砂田芳秀教授に深甚なる謝意を表します。また、研究を直接御指導頂きました同教室 大澤 裕 前講師に深謝致します。GeneChip 解析に協力頂いた、理研脳科学総合研究センター坂本尚昭先生、貫名信行先生に深謝致します。なお、本研究の一部は川崎医科大学プロジェクト研究費 (No. 13-105, 14-117) および文部科学省・学術振興会科学研究費補助金 (課題番号14370212) の援助により行われた。

文 献

- 1) 砂田芳秀：Caveolin-3 欠損症と常染色体優性肢帯型筋ジストロフィー。「Annal Review 神経 2000」(後藤文男, 高倉公朋, 木下真男, 柳澤信夫, 清水輝夫編). 初版. 東京, 中外医学社. 2000, pp 255-269
- 2) 砂田芳秀：LGMD1C (caveolin-3 欠損症). 別冊 日本臨牀 領域別症候群シリーズ No. 35 : 73-75, 2001
- 3) Tang Z, Scherer PE, Okamoto T, Song K, Chu C, Kohtz DS, Nishimoto I, Lodish HF, Lisanti MP : Molecular cloning of caveolin-3, a novel member of the caveolin gene family expressed predominantly in muscle. *J Biol Chem* 271 : 2255-2261, 1996
- 4) Song KS, Scherer PE, Tang Z, Okamoto T, Li S, Chafel M, Chu C, Kohtz DS, Lisanti MP : Expression of caveolin-3 in skeletal muscle, cardiac, and smooth muscle cells. Caveolin-3 is a component of the sarcolemma and cofractionates with dystrophin and dystrophin-associated glycoproteins. *J Biol Chem* 271 : 15160-15165, 1996
- 5) Way M, Porton RG : M-caveolin, a muscle-specific caveolin-related protein. *FEBS Lett* 376 : 108-112, 1995
- 6) Lisanti MP, Scherer PE, Tang Z, Sargiacomo M : Caveolae, caveolin and caveolin-rich membrane domains : a signaling hypothesis. *Trends Cell Biol* 4 : 231-235, 1994
- 7) Sunada Y, Ohi H, Hase A, Ohi H, Hosono T, Arata S, Higuchi S, Matsumura K, Shimizu T : Transgenic mice expressing mutant caveolin-3 show severe myopathy associated with increased nNOS activity. *Hum Mol Genet* 10 : 173-178, 2001
- 8) Venema VJ, Ju H, Zou R, Venema RC : Interaction of neuronal nitric-oxide synthase with caveolin-3 in skeletal muscle. *J Biol Chem* 272 : 28187-28190, 1997
- 9) 砂田芳秀, 長谷麻子, 大井博子, 松村喜一郎, 清水輝夫, 大井浩明, 荒田 悟, 大澤 裕, 市川弥生子, 村上龍文, 森本和恵：筋ジストロフィー発症機構の生化学・分子生物学的研究. 厚生労働省「精神・神経疾患研究委託費」筋ジストロフィー及び関連疾患の臨床病態解明と治療法開発に関する研究 荒畑班/清水班 平成11~13年度報告書 : 38-39, 2002
- 10) Minetti C, Sotgia F, Bruno C, Scartzzzini P, Broda P, Bado M, Masetti E, Mazzocco M, Egeo A, Donati MA : Mutations in the caveolin-3 gene cause autosomal dominant limb-girdle muscular dystrophy. *Nat Genet* 18 : 365-368, 1998

- 11) Baghdiguian S, Martin M, Richard I, Pons F, Astier C, Bourg N, Hay RT, Chemaly R, Haraby G, Loiselet J, Anderson LVB, Munain AL, Fardeau M, Mangeat P, Beckmann JS, Lefranc G : Calpain 3 deficiency is associated with myonuclear apoptosis and profound perturbation of I κ B α /NF- κ B pathway in limb-girdle muscular dystrophy type 2A. *Nat Med* 5 : 503 - 511, 1999
- 12) Sandri M, Minetti C, Pedemonte M, Carraro U : Apoptotic myonuclei in human Duchenne muscular dystrophy. *Lab Invest* 78 : 1005 - 1016, 1998
- 13) Tews DS, Goebel HH : DNA-fragmentation and expression of apoptosis-related proteins in muscular dystrophy. *Neuropathol Appl Neurobiol* 23 : 331 - 338, 1997
- 14) Liang L, Zhao M, Xu Z, Yokoyama KK, Li T : Molecular cloning and characterization of CIDE-3, a novel member of the cell-death-inducing DNA-fragmentation factor (DFF45)-like effector family. *Biochem J* 370 : 195 - 203, 2003
- 15) Inohara N, Koseki T, Chen S, Wu Xiaoyu, Nunez G : CIDE, a novel family of cell death activators with homology to the 45kDa subunit of the DNA fragmentation factor. *EMBO J* 17 : 2526 - 2533, 1998
- 16) Lugovskoy AA, Zhou P, Chou JJ, McCarty JS, Li P, Wagner G : Solution structure of the CIDE-N domain of CIDE-B and a model for CIDE-N/CIDE-N interactions in the DNA fragmentation pathway of apoptosis. *Cell* 99 : 747 - 755, 1999
- 17) Schmidt TR, Jaradat SA, Goodman M, Lomax MI, Grossman LI : Molecular evolution of cytochrome c oxidase : rate variation among subunit VIa isoforms. *Mol Biol Evol* 14 : 595 - 601, 1997
- 18) Sanjay A, Fu J, Kreibich G : DAD1 is required for the function and the structural integrity of the oligosaccharyltransferase complex. *J Biol Chem* 273 : 26094 - 26099, 1998