

機関番号：12601

研究種目：基盤研究（A）

研究期間：2008～2010

課題番号：20247024

研究課題名（和文）生体高次機能の新たな制御機構の解明

研究課題名（英文）Molecular signaling in neuromuscular synaptogenesis, hematopoiesis, and related disorders.

研究代表者

山梨 裕司（YAMANASHI YUJI）

東京大学・医科学研究所・教授

研究者番号：40202387

研究成果の概要（和文）：

本研究においては、独自に発見した Dok-7 による受容体型チロシンキナーゼ MuSK の細胞内からの活性化機構と神経筋シナプスの形成機構、並びに、Dok-1/2 による造血・免疫システムの抑制機構に関する最新の研究成果を背景として、生体高次機能の新たな制御機構の解明を目指す研究を推進した。その結果、Dok-7 が MuSK を直接活性化する細胞内リガンドとして機能することを発見した。さらに、重症筋無力症に付随する新たな自己抗体を発見し、また、Dok-1/2/3 による組織球肉腫の抑制機構の存在を明らかにした。

研究成果の概要（英文）：

To understand molecular signaling involved in neuromuscular synaptogenesis, hematopoiesis, and related disorders, we focused on the Dok-family of adaptor proteins. Our findings together revealed that the cytoplasmic protein Dok-7 directly interacts with the receptor tyrosine kinase MuSK and activates it to form neuromuscular synapses. We also revealed that autoantibodies to Lrp4, a MuSK's coreceptor, in patients with myasthenia gravis, and that Dok-1/2/3 suppress histiocytic sarcoma.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	10,700,000	3,210,000	13,910,000
2009年度	10,900,000	3,270,000	14,170,000
2010年度	11,500,000	3,450,000	14,950,000
年度			
年度			
総計	33,100,000	9,930,000	43,030,000

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：生物科学・細胞生物学

キーワード：シグナル伝達、アダプター、タンパク質チロシンキナーゼ

1. 研究開始当初の背景

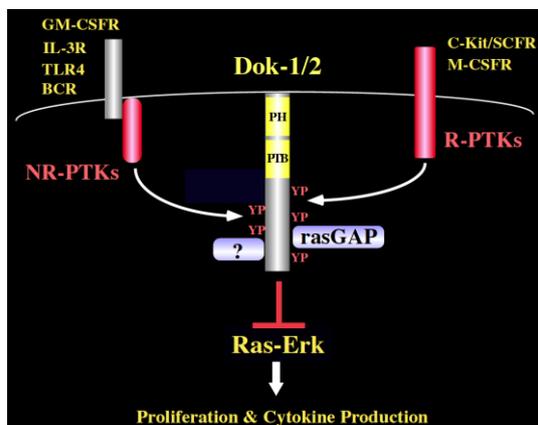
研究代表者は、1990年にPawsonらのグループによって多様なタンパク質チロシンキナーゼ（PTK: protein-tyrosine kinase）の共通な基質として報告された正体不明のタンパク質 p62 に興味を頂き、細胞内のアダプター分子 Dok-1 として同定した。Dok-1 は細

胞の膜構造への局在が予想される pleckstrin homology (PH) ドメインとリン酸化チロシンを含む標的配列（NPXpY 配列）への会合が予想される phosphotyrosine binding (PTB) ドメインを有する IRS に類似アダプター分子であった。その後、他のグループが同様の一次構造を共有する類縁分子として

Dok-2 から Dok-6 までを同定し、申請者らが骨格筋上に形成される神経筋接合部の後シナプス領域（骨格筋側）や心臓に高発現する Dok-7 を報告した。

Dok 類縁分子の生理機能の研究は申請者らの Dok-1 欠損マウスの解析によって始まった。その結果、少なくとも B 細胞受容体シグナルにおいて、Dok-1 が Erk の活性化と細胞増殖を負に制御していることは判明したが、Dok-1 欠損マウスに顕著な異常は認められなかった。そこで、Dok-1 と最も類縁の Dok-2 との二重欠損マウスを樹立し、両者が骨髓球造血や自然免疫シグナルに必須のシグナル抑制分子であることを明らかにした（図 1）。さらに、Dok-1/2 二重欠損マウスが胸腺依存性抗原に対する過剰な抗体産生応答を示すことを見出し、両者が T 細胞受容体下流においても負の制御因子として機能することを解明している。しかしながら、造血系細胞に高発現する Dok 類縁分子全体の生理機能の理解には、同じく造血系細胞に高発現する Dok-3 を含めた解析が必要であり、また、非造血系細胞に高発現する Dok-4/5/6 からなるサブファミリーの生理機能については未解明であった。ただし、Dok-7 については、それが、骨格筋の運動神経支配を司る神経筋シナプス（神経筋接合部/NMJ: neuromuscular junction）の形成に必須の受容体型 PTK である MuSK の活性化因子であり、MuSK と同じく、神経筋接合部の形成に不可欠のシグナル分子として筋管細胞内で機能していることを代表者らが報告していた。さらに、我々は Dok-7 における劣性の遺伝性変異が神経筋接合部の形成不全を伴う先天性筋無力症候群（CMS: congenital myasthenic syndrome）の原因となることも解明していた（DOK7 myasthenia、もしくは、DOK7 型筋無力症と命名）。

図 1 : Dok-1/2 は多様な受容体シグナルの



流でチロシンリン酸化を受け、rasGAP 等との会合を介して細胞の増殖や活性化に重要な Ras-Erk シグナルを負に制御する。

2. 研究の目的

上述の通り、我々が発見した Dok-7 に特徴的な機能である MuSK の活性化には、細胞内のアダプター様分子による受容体型 PTK の活性化と言う他に類を見ない特色がある。また、DOK7 型筋無力症において最も高頻度に認められる異常をもった Dok-7 分子では、この MuSK 活性化機能が著しく低下していることも既に明らかにしていた。他方、Dok-1/2/3 の作用機構については議論の余地が多く、Dok-4/5/6 の生理機能や作用機構と共に、未解明の重要課題となっていた。そこで、細胞内シグナルによる生体高次機能の新たな制御機構の理解を目指し、Dok 類縁分子の生理機能と作用機構の解明を本基盤研究の中心的な目的とした。

3. 研究の方法

(1) Dok-7 の個体レベルでの MuSK 活性化能の解析

細胞内分子による受容体型 PTK の活性化は全く新たなシグナル伝達機構であり、それが本当に個体レベルで機能しているかどうか確認する必要があった。そこで、筋管特異的に Dok-7 を高発現するトランスジェニックマウスを樹立し、その MuSK 活性化能と NMJ 形成能について検討した。

(2) Dok-7 による MuSK 活性化機構の解析

① ヒト疾患における異常の解析

Dok-7 による MuSK 活性化機構の解析においては、Dok-7 の MuSK 活性化能の低下によって発症する DOK7 型筋無力症における異常の解析が重要と考えられた。そこで、同疾患に伴う様々な変異体の MuSK 活性化能について培養筋管細胞を用いた解析を進め、MuSK 活性化に重要な Dok-7 上の領域を検討した。

② Dok-7 による MuSK 活性化に必要な MuSK 上の領域の解析

Dok-7 が細胞内分子であることを考えると、MuSK 活性化因子の誘導による間接的な活性化と MuSK の細胞内領域に対する直接的な活性化の可能性が考えられた。そこで、内在性の Dok-7 や MuSK の発現が認められない HEK-293T 細胞での過剰発現による Dok-7 依存的な MuSK 活性化の系を用いて、MuSK の細胞外領域や膜貫通領域の必要性を検討した。

③ Dok-7 による MuSK 活性化の in vitro 再構成系の確立

後述の通り、上記②の解析によって、Dok-7 による MuSK の活性化に後者の細胞外領域も膜貫通領域も共に不必要であることが判明した。そこで、Dok-7 による MuSK の直接的な活性化の可否を検討するために、MuSK の細胞

内領域 (MuSK-cyt) と Dok-7 をそれぞれ大腸菌で産生し、高度に精製し、in vitro のリン酸化反応系により Dok-7 による MuSK-cyt の活性化の有無を検討した。

(3) Dok-7/MuSK シグナルに関連する他のシグナル伝達機構の解析

Dok-7/MuSK シグナル関連分子について、各々の会合分子を探索し、当該シグナルに機能的に関与するシグナル分子の同定を試みた。また、他の報告から予想される関連分子についても NMJ における機能解析を進めた。

(4) 重症筋無力症における新たな自己抗体の解析

本研究の過程で、MuSK の共受容体として Lrp4 が同定された。そこで、自己免疫疾患である重症筋無力症の病因自己抗体として MuSK が知られていることを考慮し、当該症例における抗 Lrp4 抗体の力価をルシフェラーゼにて標識した Lrp4 の細胞外領域を免疫沈降する血清中の抗体価として検討した。

(5) Dok-1/2/3 の協調的な機能の解析

血球に高発現し、シグナル抑制機能をもつと考えられている Dok-1/2/3 について、その協調的な機能を知る目的で Dok-1/2 二重欠損マウス、Dok-3 単欠損マウス、そして、Dok-1/2/3 三重欠損マウスを樹立し、その影響を精査した。

4. 研究成果

(1) Dok-7 の個体レベルでの MuSK 活性化能の解析

Dok-7 を筋特異的に発現するトランスジェニックマウス (Dok-7 Tg マウス) における NMJ 形成を検討したところ、正常な部位 (筋管の中央部分) での NMJ 形成が著しく亢進していた。さらに、骨格筋における MuSK の自己リン酸化の亢進と MuSK の下流でチロシンリン酸化を受けるアセチルコリン受容体 ($\beta 1$ サブユニット) のチロシンリン酸化の亢進が認められた。他方、Dok-7 欠損マウスの骨格筋におけるアセチルコリン受容体のチロシンリン酸化は全く検出されなかったことから、やはり、Dok-7 は個体レベルで MuSK 活性化能をもつことが判明した。興味深いことに、それまで MuSK の活性化因子として認められてきた運動神経由来の Agrin が、Dok-7 非存在下では MuSK を活性化できないことも明らかとなった。これらの知見は、Dok-7 が MuSK の第一義的な活性化因子であることを示すものである。

(2) Dok-7 による MuSK 活性化機構の解析

① ヒト疾患における異常の解析

DOK7 型筋無力症に認められる様々な Dok-7 変異体について検討したところ、培養筋管細胞では、Dok-7 の PH ドメイン、PTB ドメインの変異や、C 末端側のチロシンリン酸化部位の欠失により MuSK 活性化能が喪失、または、減弱することが明らかになった。ただし、当該疾患においては、機能喪失型の変異をホモ、もしくは、ヘテロな組合せとしてもつ症例はなかった。この事実は、ヒトにおいても、Dok-7 の機能喪失が NMJ の欠失に帰結することを強く示唆するものである。

② Dok-7 による MuSK 活性化に必要な MuSK 上の領域の解析

まず、Dok-7 が MuSK の細胞外活性化因子の発現を誘導する可能性を考えて、MuSK の細胞外領域の欠失変異体と Dok-7 の相互作用を確認したところ、MuSK 変異体の強い活性化が確認された。さらに、MuSK の膜貫通領域を欠失させても、Dok-7 による強い活性化をうけた。これらの結果から、Dok-7 は MuSK の細胞内領域に働きかけて、活性化する機能をもつことが判明した。

③ Dok-7 による MuSK 活性化の in vitro 再構成系の確立

前項②の結果は Dok-7 が MuSK の細胞内領域に直接働きかけ、活性化することを示唆している。そこで、MuSK の細胞内領域 (MuSK-cyt) と Dok-7 を大腸菌で産生し、精製した上で in vitro 反応系にて解析したところ、Dok-7 による MuSK-cyt の活性化能が確認された。この事実は、Dok-7 が受容体型 PTK である MuSK を細胞内から直接活性化するという前例のない作用機構を意味するものである。

(3) Dok-7/MuSK シグナルに関連する他のシグナル伝達機構の解析

Dok-7/MuSK シグナル関連分子の会合分子のひとつに着目して解析を進めたところ、それが、他のシグナル分子の翻訳後修飾の制御機能をもち、また、MuSK シグナルと協調的に機能することを発見した。さらに、他の報告から予想された関連分子についても、NMJ 形成に関わる機能が確認された。

(4) 重症筋無力症における新たな自己抗体の解析

前述の通り、ルシフェラーゼで標識した Lrp4 の細胞外領域を免疫沈降する活性について、病因自己抗体が未知の重症筋無力症の血清を検討したところ、その約 3% で抗体陽性例を発見した。

(5) Dok-1/2/3 の協調的な機能の解析

多様な Dok 欠損マウスについて検討したと

ころ、Dok-1/2/3 三重欠損マウス特異的に組織球肉腫の発症を確認した。この事実は、Dok-1/2/3 が協調的に当該腫瘍を抑制していることを示すが、その他の知見を含めて、Dok-1/2/3 三重欠損マウスが組織球肉腫の良いモデルであることも判明した。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 8 件)

1. Hamuro Johko, Yukihiko Hishida, Osamu Higuchi, and Yuji Yamanashi. The transcription factor Sp1 plays a crucial role in dok-7 gene expression. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 408: 293-299, 2011 (査読有)
2. Osamu Higuchi, Hamuro Johko, Masakatsu Motomura, and Yuji Yamanashi. Autoantibodies to Low-Density Lipoprotein Receptor-Related Protein 4 in Myasthenia Gravis. *Ann. Neurol.*, 69: 418-422, 2011 (査読有)
3. Ryuichi Mashima, Honda Kazuho, Yi Yang, Yohei Morita, Akane Inoue, Sumimasa Arimura, Hiroshi Nishina, Hideo Ema, Hiromitsu Nakauchi, Brian Seed, Hideaki Oda, and Yuji Yamanashi. Mice lacking Dok-1, Dok-2, and Dok-3 succumb to aggressive histiocytic sarcoma. *Lab. Investigation*, 90: 1357-1364, 2010 (査読有)
4. Akane Inoue, Kiyoko Setoguchi, Yosuke Matsubara, Kumiko Okada, Nozomi Sato, Yoichiro Iwakura, Osamu Higuchi, and Yuji Yamanashi. Dok-7 activates the muscle receptor kinase MuSK and shapes synapse formation. *Science Signaling*, 2: ra7, 2009 (査読有)
5. Ryuichi Mashima, Yukihiko Hishida, Tooru Tezuka, and Yuji Yamanashi. The roles of Dok family adaptors in immunoreceptor signaling. *Immunological Reviews*, 232: 273-285 (2009) (査読有)
6. Johko Hamuro, Osamu Higuchi, Kumiko Okada, Makiko Ueno, Shun-ichiro Iemura, Tooru Natsume, Hayley Spearman, David Beeson, and Yuji Yamanashi. Mutations causing *DOK7* congenital myasthenia ablate functional motifs in Dok-7. *J. Biol. Chem.*, **283**, 5518-5524 (2008) (査読有)
7. Tetsuya Hosooka, Tetsuya Noguchi, Ko Kotani, Takehiro Nakamura, Hiroshi Sakaue, Hiroshi Inoue, Wataru Ogawa, Kazutoshi Tobimatsu, Kazuo Takazawa, Mashito Sakai, Yasushi Matsuki, Ryuji Hiramatsu, Tomoharu Yasuda, Mitchell A. Lazar, Yuji Yamanashi,

and Masato Kasuga. Dok-1 mediates high-fat diet-induced adipocyte hypertrophy and obesity through modulation of PPAR γ phosphorylation. *Nature Med.*, **14**, 188-193 (2008) (査読有)

8. Yuji Yamanashi, Osamu Higuchi, and David Beeson. Dok-7/MuSK signaling and a congenital myasthenic syndrome. *Acta Myologica*: 27, 25-29 (2008) (査読有)

[学会発表] (計 1 件)

1. Yuji Yamanashi. Plenary Lecture: Dok-7, MuSK, and the development of neuromuscular junction. International Conference on Myasthenia Gravis. (Organized by the EuroMyasthenia Network) Paris, December 1-2, 2009

[図書] (計 2 件)

1. 手塚徹、山梨裕司: 先天性筋無力症の分子基盤、生体の科学、医学書院、62 巻 (第 2 号)、2011、p106-1121
2. 井上茜、瀬戸口喜代子、樋口理、山梨裕司: 受容体型キナーゼの細胞内からの活性、実験医学、羊土社、27 巻 (6 月号)、2009、p1384-1387

[産業財産権]

○出願状況 (計 1 件)

名称: 筋特異的チロシンキナーゼの活性化を制御するポリペプチドをコードする DNA
発明者: 山梨裕司、他
権利者: 東京医科歯科大学
出願番号: 特願 2008-520460
出願年月日: 2007 年 4 月 26 日
国内外の別: 国内

出願番号: US12/329208

出願年月日: 2008 年 12 月 5 日

国内外の別: 国外 (米国: 許可通知受領済)

出願番号: EP07742485.1

出願年月日: 2007 年 4 月 26 日

国内外の別: 国外 (欧州)

[その他]

ホームページ等

<http://www.ims.u-tokyo.ac.jp/genetics/html/home.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

山梨 裕司 (YAMANASHI YUJI)

東京大学・医科学研究所・教授

研究者番号: 40202387

(2) 研究分担者

樋口 理 (HIGUCHI OSAMU)
東京大学・医科学研究所・准教授
研究者番号：50361720
真嶋 隆一 (MASHIMA RYUICHI)
東京大学・医科学研究所・助教
研究者番号：00401365