

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 1 日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25460357

研究課題名(和文)細胞内リン酸化シグナルによるNMJ形成・維持の制御機構

研究課題名(英文)Molecular mechanisms of the formation and maintenance of NMJs

研究代表者

手塚 徹 (TEZUKA, Tohru)

東京大学・医科学研究所・助教

研究者番号：50312319

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)：我々の呼吸や運動に不可欠の構造である神経筋接合部(Neuromuscular junction: NMJ)の形成・維持には骨格筋特異的な受容体型チロシンリン酸化酵素MuSKが必須である。このMuSKの活性化には運動神経由来のMuSK活性化因子AgrinによるMuSKの共受容体Lrp4を介する活性化と骨格筋蛋白質Dok-7による細胞内からの活性化が必要であるが、本研究において、Dok-7によるMuSK活性化にはLrp4が重要であることを見出した。また、出生後のNMJの維持において、dok-7遺伝子の正常な発現レベルが必要であることも見出した。

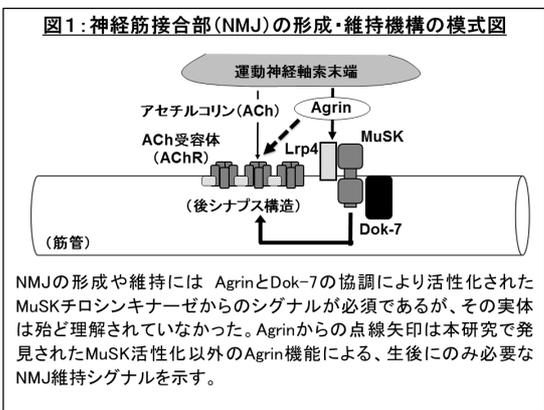
研究成果の概要(英文)：The formation and maintenance of neuromuscular junctions (NMJs), a synapse essential for motoneural control of skeletal muscle contraction, is governed by the muscle-specific receptor-tyrosine kinase MuSK. Activation of MuSK involves Agrin, Lrp4, and Dok-7. Dok-7 is an essential muscle-intrinsic activator of MuSK. On the other hand, motor neuron-derived MuSK activator Agrin binds to MuSK's co-receptor Lrp4 and indirectly activates MuSK. In the current study, by analysis of muscle-specific Dok-7 transgenic mice lacking Lrp4, we demonstrated that Lrp4 is required for efficient activation of MuSK by Dok-7 in vivo. In addition, using recombinant adeno-associated virus vectors carrying short hairpin RNAs targeting the mouse dok-7 gene, we showed that the correct, physiological level of dok-7 gene expression is critical for the postnatal maintenance of NMJs.

研究分野：分子生物学

キーワード：神経科学 神経筋接合部

1. 研究開始当初の背景

神経筋接合部 (Neuromuscular junction: NMJ) は運動神経の軸索末端と筋管 (筋繊維) 上の後シナプス構造を連結するシナプスであり、運動神経による骨格筋収縮の支配に必須の役割を担っている (図 1)。脊椎動物の NMJ ではアセチルコリンが神経伝達物質として働き、その受容体 (AChR) が筋管上の後シナプス部位に凝集して、効率的な神経筋伝達が行われている。この AChR の凝集に代表される NMJ の形成や維持には骨格筋特異的な受容体型チロシンキナーゼ Muscle-specific kinase (MuSK) が必須の役割を果たしている。最近、酵素活性を持たない受容体型分子 Low-density lipoprotein receptor-related protein 4 (Lrp4) が MuSK の共受容体として同定され、運動神経由来の蛋白質 Agrin が Lrp4 との結合を介して MuSK の活性化を誘導することが示された。実際に、Agrin 欠損マウスや Lrp4 欠損マウスは胎生期の NMJ 形成不全を呈し、出生時に呼吸不全で死亡する (*Development*, 133:4993-5000, (2006); *Neuron*, 23:33-44, (1999))。他方、代表者が所属する研究室では、独自に単離したアダプター様蛋白質 Downstream of tyrosine kinases-7 (Dok-7) が MuSK を細胞内から直接活性化することが MuSK 活性化に必要であり、MuSK 依存的な後シナプス構造の形成、ひいては NMJ の形成に不可欠であることを発見し (*Science*, 312:1802-1805, (2006); *Science Signal*, 2:ra7, (2009))、代表者が所属する研究室の発表論文には下線を付ける) Dok-7 と Agrin/Lrp4 による協調的な MuSK 活性化が NMJ の形成シグナルの起点となることを示してきた。さらに、我々は、ヒト *DOK7* 遺伝子の異常によって発症する先天性筋無力症を発見し、その遺伝子変異が Dok-7 の MuSK 活性化能を低下させることを明らかにしている (*Science*, 313:1975-1978, (2006); *J. Biol. Chem.* 283:5518-5524, (2008))。他方、少数の報告ながら、Agrin や Lrp4、MuSK をコードする遺伝子に変異を持つ先天性筋無力症例も存在する。従って、MuSK キナーゼを起点とする筋管細胞内のシグナル伝達 (MuSK シグナル) の破綻はヒトの神経筋疾患に深く関与し、その生理



的な重要性は明らかである。しかしながら、その実体は殆ど解明されていなかった。

2. 研究の目的

- (1) 上述の MuSK シグナルにおいて、起点となる受容体型チロシンキナーゼ MuSK の活性化機構を明らかにする。
- (2) MuSK シグナルの構成因子 (MuSK の下流で起こるシグナル伝達の正・負の制御因子群) を同定する。

以上の研究により、呼吸や運動に不可欠のシナプスである NMJ の形成・維持機構を解明し、また、その成果をもって、NMJ 形成・維持の破綻により起こる筋無力症や関連する神経筋疾患の発症機構の理解や診断・治療法の開発に貢献することを目的とした。

3. 研究の方法

- (1) 骨格筋特異的に Dok-7 を強制発現させたトランスジェニックマウス (Dok-7 Tg マウス、*Science Signal*, 2:ra7, (2009)) と Lrp4 欠損 (以後、KO と記す) (*Development*, 133:4993-5000, (2006)) または Agrin KO マウス (*Neuron*, 23:33-44, (1999)) を交配し、Lrp4 KO; Dok-7 Tg マウス、及び Agrin KO; Dok-7 Tg マウスを作成した。得られたマウスの NMJ や MuSK 活性化レベルを発生・発達段階を追って、組織学・分子生物学の手法により解析した。

- (2) 骨格筋への遺伝子導入に優れたアデノ随伴ウイルスベクター (血清型 9 型、AAV9) を用いて、マウス *dok-7* 遺伝子の発現を抑制する short hairpin RNA (shRNA) の発現ベクター (AAV-shD7) および非標的 shRNA 発現ベクター (AAV-shCTRL) を作製した。これらのベクターを出生後 2 週齢にて投与したマウス (C57BL/6J) について、NMJ や運動機能を 10 週齢において解析した。

- (3) MuSK や Lrp4、Dok-7 を HEK293T 細胞に発現させ、これらと複合体を形成するタンパク質を精製し、質量分析により同定した。同定されたタンパク質の機能をマウスや培養筋管細胞 C2C12 を用いて検討した。

4. 研究成果

- (1) 運動神経由来の MuSK 活性化因子 Agrin による MuSK の活性化には筋内在性の Dok-7 が必要であることが Dok-7 欠損マウス由来の初代培養筋管細胞を用いた実験で明らかになっていた (*Science Signal*, 2:ra7, (2009))。一方、Dok-7 による MuSK の活性化に Agrin や MuSK の共受容体 Lrp4 が必要であるか否かは不明であった。そこで、骨格筋特異的な Dok-7 の強制発現により MuSK の活性化の亢進と NMJ

形成の促進が起こる Dok-7 Tg マウス (*Science Signal.* 2:ra7. (2009))に Lrp4 欠損や Agrin 欠損を導入したマウスを作成・解析することにより、Lrp4 や Agrin の重要性を検討した。まず、Agrin KO;Dok-7 Tg マウスにおいては Dok-7 Tg マウスと同様に MuSK の活性化が亢進し、胎生期の NMJ 形成が促進された。この結果より、Dok-7 による MuSK の活性化には Agrin は不要であることが示された。他方、Lrp4 KO;Dok-7 Tg マウスにおいては、MuSK の活性化は野生型マウスより高いものの、Dok-7 Tg マウスより減弱していた。従って、Dok-7 による MuSK の活性化には Lrp4 が重要であることが明らかになった (雑誌論文)。Lrp4 の作用機序の解明が今後の課題である。

(2) 上述の通り、Agrin KO マウスは胎生期の NMJ 形成不全により出生時に死亡するのに対し、Agrin KO;Dok-7 Tg マウスにおいては MuSK の活性化が亢進し、胎生期の NMJ 形成が促進され、出生時の致死性が回避された。従って、胎生期の NMJ 形成における Agrin の必須の機能は MuSK の活性化能であることが示された。しかし、出生後の Agrin KO;Dok-7 Tg マウスは、MuSK の活性化は Dok-7 Tg マウスと同様に亢進していながら、NMJ の維持が障害され、8 週齢以内に死亡した。この結果より、出生後の NMJ の維持において、Agrin は MuSK 活性化以外の必須の機能を持つことが明らかになった (前頁、図 1 の点線矢印) (雑誌論文)。Agrin の作用機序の解明が今後の課題である。

(3) 前述の通り、これまでの我々の研究によって、Dok-7 が胎生期の NMJ 形成に必須であり、ヒト *DOK7* 遺伝子の異常が NMJ 形成不全を伴う先天性の筋無力症を発症させることが解明されていた (*Science.* 312:1802-1805. (2006); *Science.* 313:1975-1978. (2006); *J.Biol.Chem.* 283: 5518-5524. (2008))。実際に、先天性筋無力症で最も高頻度で同定される *DOK7* 遺伝子変異(c.1124_1127 dupTGCC 変異)に対応する変異を *dok-7* 遺伝子に導入したマウスを作製したところ、当該 *dok-7* 遺伝子変異マウスには NMJ 形成の障害を伴う筋無力症様の病態が認められた (雑誌論文)。しかしながら、出生後の NMJ の維持における Dok-7 の重要性は検証されていなかった。そこで、*dok-7* 遺伝子の発現を抑制する AAV ベクター (AAV-shD7) を 2 週齢において投与することにより、*dok-7* 遺伝子の発現を出生後に減弱させたマウスを作成し、その解析を実施した。その結果、AAV-shD7 投与マウスは運動機能の低下と体重減少を含む筋無力症様の症状を示し、さらに、NMJ の縮小や MuSK シグナルの減弱が認められた。このような異常は AAV-shCTRL 投与マウスや AAV ベクターを投与しなかったマウスには認められなかった。従って、出生後の *dok-7* の正常な発現レベルが

NMJ の維持に必要であることが示された。また、先天性筋無力症には原因遺伝子が不明の症例が多いことが知られており (*Pediatr. Neurol.* 46:141-148. (2012))。本研究から、ヒト *DOK7* 遺伝子の出生後の発現レベルを制御する転写調節領域の変異や、そのような発現制御を担う転写制御因子の遺伝子変異が先天性筋無力症の原因になる可能性が示唆された (雑誌論文)。

(4) MuSK や Lrp4、Dok-7 と結合し、これらのタンパク質の機能を制御する、あるいは、下流にシグナルを伝達するタンパク質を同定するために、MuSK や Lrp4、Dok-7 を HEK293T 細胞に発現させ、これらと複合体を形成するタンパク質の精製・質量分析による同定を行った。その結果、Lrp4 結合タンパク質として、シャペロンタンパク質として知られていた Mesoderm development candidate 2 (*Mesdc2*) が同定された。HEK293T 細胞における強制発現実験の結果、*Mesdc2* との共発現によって、Lrp4 の糖鎖修飾や細胞膜上への発現が促進された。他方、NMJ の後シナプス構造に似た AChR 凝集部位を Dok-7/MuSK 依存的に形成することから、NMJ の後シナプス構造形成の細胞モデルとして広く使用されている培養筋管細胞 C2C12 において *Mesdc2* の発現を抑制したところ、細胞膜上の Lrp4 量が低下し、MuSK の活性化や MuSK 依存性の AChR 凝集も減弱した。以上より、*Mesdc2* が Lrp4 の糖鎖修飾や細胞膜上への発現を促進することにより MuSK シグナルを正に制御する分子であることが細胞レベルで明らかになり、NMJ 形成においても重要な役割を担うことが示唆された (雑誌論文)。他に得られた MuSK や Lrp4、Dok-7 の結合タンパク質についても、順次解析を進めている。

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4件)

Hoshi T, Tezuka T, Yokoyama K, Iemura S, Natsume T, Yamanashi Y. *Mesdc2* plays a key role in cell-surface expression of Lrp4 and postsynaptic specialization in myotubes. *FEBS Lett.* 587:3749-3754. (2013)
doi: 10.1016/j.febslet.2013.10.001. (査読有り)

Arimura S, Okada T, Tezuka T, Chiyo T, Kasahara Y, Yoshimura T, Motomura M, Yoshida N, Beeson D, Takeda S, Yamanashi Y. *DOK7* gene therapy benefits mouse models of diseases characterized by defects in the neuromuscular junction. *Science.* 345:1505-1508. (2014)
doi: 10.1126/science.1250744. (査読有り)

Tezuka T, Inoue A, Hoshi T, Weatherbee SD, Burgess RW, Ueta R, Yamanashi Y.
The MuSK activator agrin has a separate role essential for postnatal maintenance of neuromuscular synapses.
Proc Natl Acad Sci USA. 111:16556-16561.
(2014)
doi: 10.1073/pnas.1408409111. (査読有り)

Eguchi T, Tezuka T, Miyoshi S, Yamanashi Y.
Postnatal knockdown of *dok-7* gene expression in mice causes structural defects in neuromuscular synapses and myasthenic pathology.
Genes Cells. (印刷中)
doi: 10.1111/gtc.12370. (査読有り)

〔学会発表〕(計1件)

手塚 徹、井上 茜、星 太輔、
Weatherbee SD、Burgess RW、植田 亮、
山梨 裕司
神経筋接合部の出生後の維持における Agrin
の新たな役割
日本筋学会
2015年8月8日
国立研究開発法人国立精神・神経医療研究センター(東京都小平市)

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

取得状況(計0件)

〔その他〕

代表者が所属する研究室のホームページ：
<http://www.ims.u-tokyo.ac.jp/genetics/html/home.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

手塚 徹 (TEZUKA, Tohru)
東京大学・医科学研究所・助教
研究者番号：50312319

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

山梨 裕司 (Yamanashi, Yuji)
東京大学・医科学研究所・教授
研究者番号：40202387