

機関番号：12601

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2009～2010

課題番号：21790266

研究課題名（和文）先天性筋無力症の克服を目指したDok-7/MuSKシグナルの解明

研究課題名（英文）Roles of Dok-7 and MuSK in neuromuscular synaptogenesis

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

研究成果の概要（和文）：神経筋シナプスは神経筋接合部（NMJ: neuromuscular junction）とも呼ばれ、運動神経の興奮を骨格筋に伝達するシナプスである。NMJ は運動機能ひいては健康な生活に重要であり、その形成・機能不全は重症筋無力症や先天性筋無力症などの、筋力低下と易疲労性を伴う難治性の疾患を引き起こす。この NMJ の形成には、受容体型チロシンキナーゼ MuSK とその細胞内からの活性化分子である Dok-7 が必須の役割を担っている。しかし、Dok-7 による MuSK 活性化の分子機構や、MuSK の活性化により惹起される細胞内シグナル伝達系の構成分子はよくわかっていない。これらを明らかにするために、MuSK や Dok-7 と結合する分子や培養筋管細胞において MuSK の活性化に伴い、リン酸化レベルが変動する分子を同定した。

研究成果の概要（英文）：The neuromuscular junction (NMJ) is a synapse between a motor neuron and skeletal muscle. Defects in the formation and function of the NMJ are associated with neuromuscular disorders such as congenital myasthenic syndromes and myasthenia gravis. The muscle-specific receptor tyrosine kinase MuSK and its cytoplasmic activator Dok-7 are essential for the formation of the NMJ. To understand the molecular mechanism underlying Dok-7-mediated activation of MuSK and intracellular signaling evoked by activation of MuSK, we carried out proteomic studies. We identified proteins that bound to MuSK and Dok-7, and those that were phosphorylated upon activation of MuSK in cultured myotubes. Roles of these proteins in the formation and function of the NMJ are under investigation.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	2,100,000	630,000	2,730,000
2010年度	1,200,000	360,000	1,560,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：医化学一般

科研費の分科・細目：基礎医学・医化学一般

キーワード：神経筋接合部、シグナル伝達、チロシンリン酸化

## 1. 研究開始当初の背景

神経筋シナプスは神経筋接合部（NMJ: neuromuscular junction）とも呼ばれ、運動神経の興奮を骨格筋に伝達するシナプスで

あり、運動神経による骨格筋収縮の支配に必須の役割を果たしている。NMJ は運動機能ひいては健康な生活に重要であり、その形成・機能不全は重症筋無力症や先天性筋無力症

などの、筋力低下と易疲労性を伴う難治性の疾患を引き起こす。この NMJ の形成や維持には筋管細胞上に発現する受容体型チロシンキナーゼ MuSK が必要である。これまでに、MuSK の活性化には運動神経から分泌される Agrin による、MuSK の共受容体 LRP4 を介した筋管細胞外からの活性化と、PH (pleckstrin homology) および PTB (phosphotyrosine-binding) ドメインを持つタンパク質である Dok-7 による筋管細胞内からの活性化が必須であることがわかってきた。実際に、*DOK7* の遺伝子変異は *DOK7* 型筋無力症と呼ばれる先天性筋無力症を発症させる。しかし、Dok-7 による MuSK 活性化の分子機構や、MuSK の活性化により惹起される細胞内シグナル伝達系の構成分子はよくわかっていない。

## 2. 研究の目的

Dok-7 による MuSK 活性化の分子機構を明らかにし、また、MuSK の活性化により惹起される細胞内シグナル伝達系の構成分子を同定する。これらの成果により、NMJ の形成や維持を担う分子機構の解明と *DOK7* 型筋無力症や関連する神経筋疾患に対する治療法の開発に貢献することを本研究の目的とした。

## 3. 研究の方法

Dok-7 による MuSK の活性化や MuSK からのシグナル伝達に関わる分子を同定するために、FLAG タグを付加した MuSK や Dok-7 を C2C12 培養筋管細胞や 293T 細胞に発現させ、これらの分子と複合体を形成する分子を抗 FLAG 抗体を用いた免疫沈降法により精製した後、質量分析の手法により解析した。また、MuSK からのシグナル伝達に関わる分子群を同定するために、無刺激または MuSK の細胞外からの活性化分子である Agrin による刺激を行った C2C12 筋管細胞からリン酸化タンパク質を精製し、質量分析の手法により解析した。

## 4. 研究成果

MuSK や Dok-7 と結合する分子を同定するために、C 末端側に FLAG タグを付加した MuSK や Dok-7 を C2C12 培養筋管細胞や 293T 細胞に発現させた。これらの分子と複合体を形成する分子を抗 FLAG 抗体を用いた免疫沈降法により精製した後、高精度・高感度の質量分析システムを用いて解析した。その結果、既に研究代表者が所属する研究室において Dok-7 結合分子として同定されていたアダプター分子 Crk (Hamuro J, et. al. J. Biol. Chem. 2008; 283: 5518-24) を含め、MuSK や Dok-7 に結合する分子を複数同定した。これらの MuSK や Dok-7 結合分子は

未報告のものであり、NMJ における機能も未知であるが、MuSK の活性化や MuSK からのシグナル伝達を制御する可能性が考えられる。今後、これらの分子が MuSK からのシグナル伝達や NMJ の形成・維持において果たす役割を検討する。一方、MuSK からのシグナル伝達に関わる分子群を同定するために、無刺激または Agrin による刺激を行った C2C12 筋管細胞からリン酸化タンパク質を精製し、高精度・高感度の質量分析システムを用いて解析した。その結果、MuSK の活性化に伴い、チロシンリン酸化レベルが亢進することが知られているアセチルコリン受容体の  $\beta$  および  $\delta$  サブユニットや前述のアダプター分子 Crk を含め、多数の分子のリン酸化レベルが Agrin 刺激により亢進することを見いだした。これらの分子の NMJ における機能はほとんど未知であるが、MuSK からのシグナル伝達に關与する可能性が考えられる。今後、これらの分子が MuSK からのシグナル伝達や NMJ の形成・維持において果たす役割を検討する。

## 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 3 件)

- (1) Delawary M, Tezuka T, Kiyama Y, Yokoyama K, Inoue T, Hattori S, Hashimoto R, Umemori H, Manabe T, Yamamoto T, Nakazawa T. NMDAR2B tyrosine phosphorylation regulates anxiety-like behavior and CRF expression in the amygdala. Mol Brain. 査読有 3: 37, 2010
- (2) Taniguchi S, Nakazawa T, Tanimura A, Kiyama Y, Tezuka T, Watabe AM, Katayama N, Yokoyama K, Inoue T, Izumi-Nakaseko H, Kakuta S, Sudo K, Iwakura Y, Umemori H, Inoue T, Murphy NP, Hashimoto K, Kano M, Manabe T, Yamamoto T. Involvement of NMDAR2A tyrosine phosphorylation in depression-related behaviour. EMBO J. 査読有、28(23):3717-3729, 2009.
- (3) Mashima R, Hishida Y, Tezuka T, Yamanashi Y. The roles of Dok family adapters in immunoreceptor signaling. Immunol Rev. 査読有、232(1):273-285, 2009.

[学会発表] (計 2 件)

- (1) 中澤 敬信、谷口 幸子、谷村 あさみ、城山 優治、手塚 徹、狩野 方伸、真鍋 俊也、山本 雅、Involvement of NMDAR2A tyrosine phosphorylation in depression-related behavior.、第 32 回日本分子生物学会年会、2009 年 12 月 12 日、

横浜

(2)横山 一剛、手塚 徹、小谷 政晴、中澤 敬信、星名 直祐、井上 毅、霜田 靖、角田 茂、須藤 カツ子、渡邊 和忠、岩倉 洋一郎、山本 雅、The Novel NYAP phosphoprotein family couples activation of phosphoinositide 3-kinase (PI3K) p85 with the cytoskeletal WAVE signaling pathway in the brain.、第32回日本分子生物学会年会、2009年12月11日、横浜

〔図書〕(計1件)

(1)手塚 徹、山梨 裕司、先天性筋無力症の分子基盤、医学書院、生体の科学、Vol. 62 No. 2, 106-111, 2011

〔産業財産権〕

○出願状況(計0件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
国内外の別：

○取得状況(計0件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年月日：  
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

研究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

研究者番号：

(3)連携研究者  
なし

