

平成30年6月6日現在

機関番号：12601

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K18500

研究課題名(和文)ゲノムワイドスクリーニングに基づく神経筋シナプス形成メカニズムの包括的解析

研究課題名(英文)Elucidation of the mechanism underlying the formation of neuromuscular synapse

研究代表者

植田 亮(Ueta, Ryo)

東京大学・医科学研究所・助教

研究者番号：10445025

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：神経筋接合部(NMJ)は、運動神経と骨格筋の筋線維(筋管)を結ぶ個体の運動制御に必須のシナプスである。その形成には筋管に存在する受容体型チロシンキナーゼMuSKと、その活性化により惹起される「NMJ形成シグナル」の駆動が重要である。「NMJ形成シグナル」はNMJ異常に起因する先天性筋無力症候群に加え、筋萎縮性側索硬化症や加齢性筋萎縮等において観察される、NMJ形成不全の理解・治療法確立において重要な位置づけにある。本研究に置いては、独自のスクリーニング系を構築し、NMJ形成関連分子を探索した。その結果、新たなNMJ形成関連候補分子を単離することに成功した。

研究成果の概要(英文)：Neuromuscular Junction (NMJ) is an essential synapse between motor neuron and skeletal muscle. The NMJ formation requires muscle specific receptor kinase MuSK and "NMJ formation signal" that is driven by the activation of MuSK. To elucidate the molecular mechanisms underlying NMJ formation, we have constructed the high-throughput screening system and identified candidate molecules that are involved in "NMJ formation signal."

研究分野：分子生物学

キーワード：神経筋シナプス

## 1. 研究開始当初の背景

神経筋接合部 (NMJ) は運動神経の軸索末端と骨格筋の筋管 (筋繊維) を結ぶシナプスであり、個体の運動機能の制御に必須の役割を担う。NMJ においては、前シナプスから放出された神経伝達物質アセチルコリンが、後シナプスに高度に凝集したアセチルコリン受容体 (AChR) に結合することで、神経の興奮が筋肉に伝達される。図 1 に NMJ 形成メカニズムの概要を模式的に示した。AChR 凝集を始めとする NMJ の後シナプス形成において、筋特異的受容体型チロシンキナーゼ MuSK が必須の役割を担っている。MuSK は共受容体 Lrp4 を介して運動神経由来の分泌タンパク質 Agrin によって活性化される。さらに当研究室では、筋管内の Dok-7 が MuSK 活性化、ひいては NMJ 形成に必要であることを明らかにした。

NMJ の機能・形成不全は、筋力低下や易疲労性、重篤な場合は呼吸困難を伴う先天性筋無力症候群 (CMS、遺伝子変異に起因) や重症筋無力症 (MG、自己抗体に起因) を引き起こす。加えて、NMJ 形成不全は NMJ 疾患である筋無力症を越え、筋ジストロフィー、筋萎縮性側索硬化症 (ALS) や加齢性筋力減弱症 (サルコペニア) など、種々の神経・筋疾患にも認められる。このことから、NMJ 形成メカニズムの理解は、幅広い神経・筋疾患の病態解明・治療法確立において重要な命題であることが示唆される。NMJ 形成においては、その経路で中核を担うと考えられている MuSK 活性化のメカニズム、および AChR が結合タンパク質である Rapsyn 等の関与により凝集するメカニズムについての解析は進められているが、その間を繋ぐ「NMJ 形成シグナル」の実体については未だブラックボックスとされているのが現状であった。

## 2. 研究の目的

以上の背景を踏まえ、本研究は Dok-7 による MuSK 活性化の分子メカニズムを明らかにするとともに、独自のハイスループットスクリーニング系を構築し、NMJ 形成関連分子を網羅的に探索する。さらに同定された個々の NMJ 形成関連分子の NMJ 形成における機能を、in vitro、培養細胞、in vivo の解析系を用いて明らかにする。以上の研究から、NMJ 形成の分子メカニズムの包括的理解の端緒を拓く。

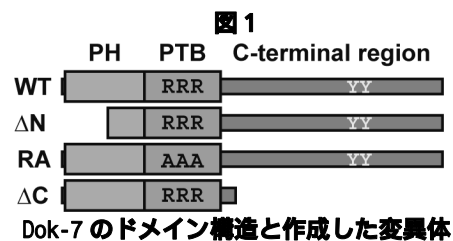
## 3. 研究の方法

精製タンパク質、培養細胞、遺伝子改変マウスを用いた MuSK 活性評価系を用いて、Dok-7 およびその種々の変異体による MuSK 活性化を解析する。

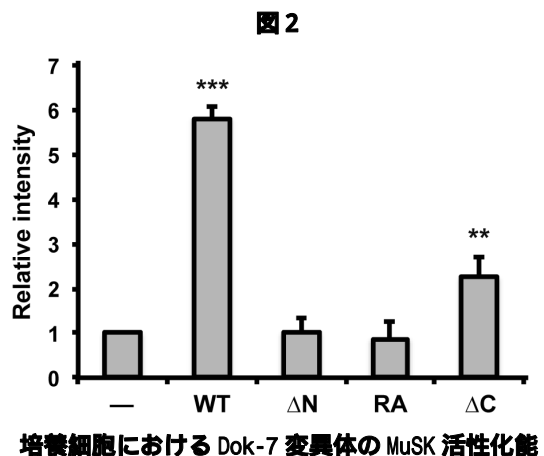
また、NMJ 形成関連分子を探索するために遺伝学的及び化学遺伝学的なハイスループットスクリーニング系を構築・実施する。同定された NMJ 形成関連分子候補をもとに、遺伝子ネットワーク解析、パスウェイ解析等を実施して、新たな候補因子、候補パスウェイを探索する。さらに、対象分子の NMJ 形成における機能の詳細について、in vitro、培養細胞、マウスを用いた解析を実施する。

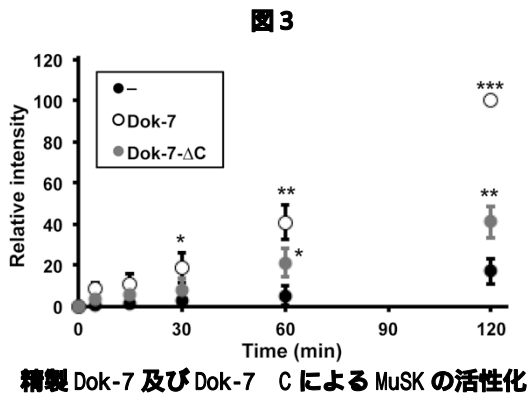
## 4. 研究成果

Dok-7 は N 末端側の PH ドメイン、及び PTB ドメイン、および既知のドメイン構造を持たない C 末端側領域からなる (図 1)。Dok-7 による MuSK 活性化機構については、Dok-7 の PTB ドメインを含む N 末端側領域と MuSK の PTB 結合配列を含むチロシンリン酸化ペプチドとの共結晶の構造が解かれ、両者の相互作用が Dok-7 の二量体化、ひいては Dok-7 と会合する MuSK の二量体化による活性化を誘導するモデルが Hubbard らにより提唱されている。しかしながら、当分野では Dok-7 の PTB ドメインと MuSK の PTB 結合配列の相互作用は MuSK 活性化に必ずしも必要とは言えないことを見出しており、提唱されたモデルのみでは MuSK 活性化メカニズムの理解には及ばない。

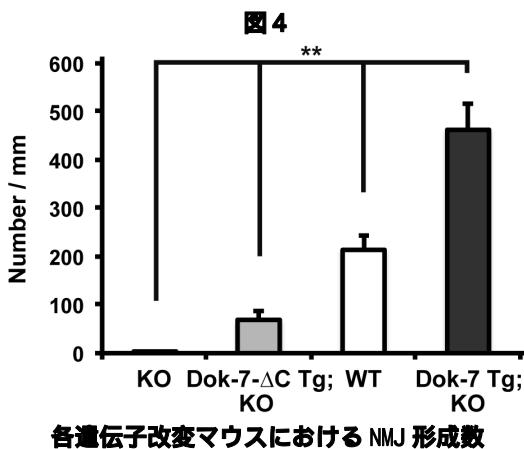


本研究では、培養筋管細胞を用いた解析系と (図 2) 精製蛋白質を用いた in vitro リン酸化反応系において (図 3) Dok-7 の N 末端側領域 (Dok-7- C) が MuSK 活性化能を有し、また、その活性化能が Dok-7 全長と比較して低下していることを見出した。

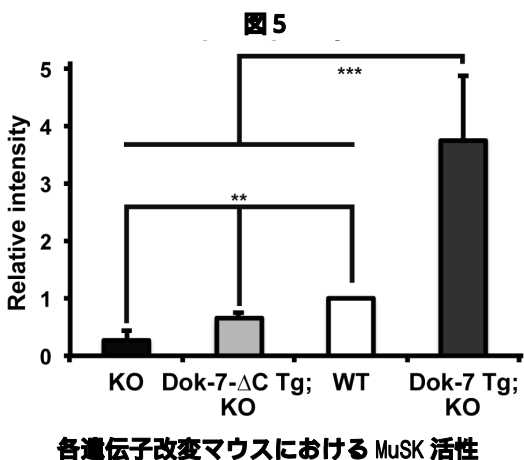




さらに、筋管特異的に Dok-7- C を過剰発現するトランスジーンを Dok-7 欠損マウスに導入したところ (Dok-7- C Tg; Dok-7 KO) Dok-7 全長の過剰発現 (Dok-7 Tg; Dok-7 KO) と異なり、Dok-7 欠損 (Dok-7 KO) による NMJ の無形成は部分的な改善にとどまり (図4) その延命効果も出生後3週間程度で消失した。同様に、Dok-7- C の過剰発現マウスにおける MuSK 活性も、Dok-7 全長の過剰発現マウスや正常個体に比して減弱していた (図5)。



以上の結果より、Dok-7 の C 末端領域は MuSK 活性化に必須ではないが極めて重要な役割を担うことが明らかとなった。



また、NMJ 形成関連因子探索のためのハイスループットスクリーニングを実施し、その遺伝子発現抑制により、「NMJ 形成シグナル」が減弱、または増強される、NMJ 形成関連因子の候補を複数単離することに成功した。その内の少なくとも1因子については、マウス個体における遺伝子発現抑制が NMJ 形態異常を惹起することを見出した。

#### 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1件)

(1)

Ueta R, Tezuka T, Izawa Y, Miyoshi S, Nagatoishi S, Tsumoto K, Yamanashi Y.  
The carboxyl-terminal region of Dok-7 plays a key, but not essential, role in activation of muscle-specific receptor kinase MuSK and neuromuscular synapse formation.

J Biochem. 161:269-277.(2017)

doi: 10.1093/jb/mvw073.

〔学会発表〕(計1件)

(1)

植田 亮, 手塚 徹, 井澤 洋介, 三好 貞徳, 長門石 暁, 津本 浩平, 山梨 裕司  
神経筋接部の形成に必要な受容体型キナーゼ MuSK の Dok-7 による活性化機構の解明  
第3回日本筋学会学術集会、2017年8月

〔その他〕(計1件)

(1)

Ueta R, Yamanashi Y.

Molecular signaling and its pathogenic alterations in neuromuscular junction formation.

Clin Calcium. 28:360-366.(2018)

doi: CliCa1803360366.

#### 6. 研究組織

(1)研究代表者

植田 亮 (UETA, Ryo)  
東京大学・医科学研究所・助教  
研究者番号:10445025

(2)研究分担者

なし ( )

研究者番号:

(3)連携研究者

なし ( )

研究者番号：

(4)研究協力者

長門石 暁 (NAGATOISHI Satoru)

東京大学・医科学研究所・特任准教授

研究者番号：30550248