

令和 4 年 5 月 18 日現在

機関番号：13901

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2021

課題番号：18K06483

研究課題名(和文) 神経筋接合部における細胞外分泌因子の同定

研究課題名(英文) Identification of secreted proteins in neuromuscular junction

研究代表者

大河原 美静 (Ohkawara, Bisei)

名古屋大学・医学系研究科・准教授

研究者番号：80589606

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)とは、脊髄運動神経と骨格筋を結ぶシナプスである。未だNMJ形態形成、成熟に関わる因子の全容が明らかでない。本研究では、NMJ形成に細胞外分泌因子を同定するため胎生期においてNMJ近傍で発現しているmRNAとたんぱく質に注目し、実験を行った。その結果、細胞外分泌因子AgrinとCTGFがそれぞれ特徴的なたんぱく質ドメインを持つことでNMJの形態形成に機能することがわかった。加えて、協調して働くいくつかの因子やそれを制御する薬剤を同定した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

NMJで機能する細胞外分泌因子の全用途そのメカニズムを知ることで、神経シナプス形成における細胞外分泌因子の役割を知るための基盤となる知識が得られる。アセチルコリン受容体などNMJで機能する分子の先天的な遺伝子変異によってもたらされる先天性筋無力症候群の病態研究にもつながる。

研究成果の概要(英文)：Neuromuscular junctions (NMJ) is a synapse between spinal motor neuron and skeletal muscle. Whole factors and those mechanism, which are involved in NMJ formation and maturation, remain elusive. In this project, in order to identify extracellular secretory factors for NMJ formation and maturation, I have focused on mRNA and proteins, which are expressed in the NMJ during embryonic stages, and performed with muscle cell line, C2C12 myotubes. As a result, it was found that the extracellular secretory factors, Agrin and CTGF, have a roles in the NMJ morphogenesis with those characteristic domains, respectively. In addition, several factors and drugs that function together them were identified in the project.

研究分野：神経筋接合部

キーワード：神経筋接合部 運動神経細胞 筋肉細胞 シナプス形成

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

## 1. 研究開始当初の背景

神経筋接合部(Neuromuscular Junction, NMJ)は運動神経細胞と筋肉細胞を結ぶシナプスで、運動神経の神経終末が筋肉側の終板につながっている。NMJシナプスでは神経終末から分泌される神経伝達物質であるアセチルコリン(acetylcholine, ACh)が、筋肉側の終板に集積をしたアセチルコリン受容体(acetylcholine receptor, AChR)に結合することで骨格筋収縮が誘発される。そのため、AChRやその集積に機能する因子の機能不全はNMJシナプスの信号伝達の欠損を引き起こす。しかし、未だNMJ形成に関わる因子の全容が明らかでなく、既知の因子の作用機序も十分に解明されていない為、原因が同定できないNMJ病態が数多く存在する。

2017年に、AChRが集積するNMJ細胞外領域に存在するたんぱく質の網羅的研究はなかった。我々の研究室含むいくつかの研究室では、現在もレーザーマイクロダイセクション法やその他の方法でNMJの筋肉側終板もしくは運動神経細胞で特異的に発現するmRNAの網羅的解析を行っている。しかし、NMJに集積するたんぱく質の解析は行われていなかった。

## 2. 研究の目的

本研究では、既存の知識であるmRNAの網羅的解析の結果を元に、今回のたんぱく質の解析を行うことで、mRNAもしくはたんぱく質の発現量が多くFalse positiveとして検出されてしまう因子をできるだけ排除し、マウス生体内NMJのAChR近傍に局在する細胞外分泌因子(Rspo2、FGF18、CTGF、Shh)と一緒に機能している細胞外分泌因子を同定したい。

海外ではコンディショナルノックアウトマウスなどのマウスを作製することによりNMJで機能する因子の同定を行っている研究室もある。しかし、マウスの作製には時間がかかり、複数の因子を同定し、機能解析することは困難である。そこで、本研究では筋肉の培養細胞を用い、Selective Proteomic Proximity Labeling using Tyramide (SPPLAT)という人工的な分泌因子を外から処理する方法で、短期間に効率よくたんぱく質の同定を行いたい。一方、培養条件を様々にすることで各データを比較し、単に局在するたんぱく質ではなく、その局在に意味のある、機能するたんぱく質の同定を行いたい。

## 3. 研究の方法

本研究の前段階として、研究代表者はすでに筋肉細胞を用いて、AChRが集積する領域の細胞外に準備されるたんぱく質を単離・特定する方法を新たに確立している。この実験ではAChRが集積する領域に存在するたんぱく質をAChRに結合する $\alpha$ -Btx-HRPを用いてbiotinラベルして回収すると、AChR $\alpha$ サブユニットに加え、Agrinの受容体であるMuSKが検出されることがわかった。この実験から、AChRが集積する領域にはAChR集積に関わるMuSKが集積している(または集積してきた)ことがわかる。研究代表者の所属研究室では、マウスの筋肉組織のNMJ領域で特異的に発現しているmRNAのデータセットを保持している。このデータセットで上位に位置するmRNAから発現されるたんぱく質が、NMJシナプスにおいてどのように局在するのかをウェスタンブロット法で検討する。既知の因子の局在を検討することで、実験の有効性を確認し、ウェスタンブロット法で未知の因子の特定も行う。また、Agrinが誘導するAChR集積を増強する細胞外分泌因子Rspo2、FGF18、CTGF、Shhを添加し、またはその受容体をノックダウンすることで、AChRが集積する領域に存在するたんぱく質の種類や量がどのように変化するかをウェスタンブロット法で確認する。

## 4. 研究成果

## (1)AChR が集積する領域に準備されるたんぱく質を特定

[平成30年度]

現在までに、マウスの筋肉組織の NMJ 領域で特異的に発現している mRNA のデータセットなどから AChR 集積に重要な機能をもつ細胞外分泌因子が 20 個弱知られているものの、未知のたんぱく質はそれ以上あることが想像されている。そこで、研究代表者はマウスの筋肉組織の NMJ 領域で特異的に発現している mRNA のデータセットで特異性が高い順に選び、その mRNA から発現されるたんぱく質が、培養条件化で分化した筋肉細胞において AChR と共局在しているのかを確認・検討した。既知のタンパク質である AChR のサブユニットのほかに、MuSK や LRP4 などのいくつかのタンパク質が共局在している事が明らかとなった。しかし、一方で、同定されたたんぱく質の多くが膜たんぱく質や細胞外分泌因子の中でも分子量の大きいたんぱく質であることがわかった。これは、分子量の大きいたんぱく質はラベルされるアミノ基が多いためではないかと考え、確立した実験の精度(タンパク質の量や純度)を上げるため実験のプロトコールを見直し、更新も行った。

[平成31年度]

実施計画においては、成体マウスの筋肉組織の NMJ 領域で特異的に発現している細胞外分泌因子をコードした mRNA のデータセットより AChR と共局在するたんぱく質を同定する予定であった。しかし、「培養条件下で分化した筋肉細胞」と「成体マウスの筋肉組織の NMJ 領域」で共通に発現している細胞外分泌因子は少ないことがわかった。そこで、成体マウスの筋肉組織ではなく、胎生期の筋肉組織の NMJ 領域で特異的に発現している細胞外分泌因子のデータセットを新たに作り直す作業を行った。具体的には、先進ゲノム支援を用いて、マウス胎生期 Embryonic day (E)15.5 もしくは E18.5 の横隔膜筋肉より筋繊維を分離し用いた。筋繊維は多核の細長い細胞であることから、10 μm 以下の細胞を取り除くことで筋繊維を濃縮した後、細胞膜を溶解して、単核 RNA シークエンス(single-nucleus RNA-seq と言われる手法)を行い、各発生段階において NMJ 近傍にある核より発現している遺伝子の同定を行った。

[令和2 - 3年度]

引き続き各発生段階において NMJ 近傍にある核より発現している遺伝子を解析した。その結果、細胞外分泌因子の mRNA 量が少ないことが理由で、発現量の詳細があいまいであった。そこで、マウス胎生期 Embryonic day (E)12.5 もしくは生後直後 Postnatal day (P)1.5 の横隔膜筋肉を用いて前年度と同様に単核 RNA シークエンスを行い、さらに各発生段階の結果を統合し、NMJ 領域に必要な既知の mRNA を発現している核の発生過程を追うことで、その核での細胞外分泌因子の発現量を細かく検討した。

## (2)細胞外分泌因子 Rspo2、FGF18、CTGF、Shh の AChR が集積する領域における役割を確認

[平成31年度]

SPPLAT 法を用いた結果培養条件化で分化した筋肉細胞において AChR と共局在しているのかを確認・検討し、MuSK や LRP4 などのいくつかのタンパク質と共に、機知であるが分子量が大きくドメイン構造を多く持ちその機能の一部が不明であった Agrin が検出されることがわかった。このことから、Agrin の特に LG1-3、もしくは SEA と呼ばれる 4 つのドメインに注目して検討を行った。この結果、Agrin がその受容体である LRP4 だけでなくヘパリンやヘパラン硫酸に結合し、またその分解を細かく制御されることで、NMJ の形成に関与していることがわかった。

加えて、CTGF がその結合パートナーとして考えられていた BMP 受容体やヘパラン硫酸を介さずに LRP4 に直接結合することで、LRP4 の細胞膜における量を調節して、NMJ の形成に関与して

いることも明らかにした。

[令和2年度]

単に局在するたんぱく質ではなく、その局在に意味のある、機能するたんぱく質の同定を行うという目的で、NMJを作製する培養条件を様々に工夫する方法を検討した。その結果、運動神経細胞由来のNMS34株細胞と筋肉細胞由来のC2C12株細胞を用いることでin vitro下でNMJ形成することに成功した。この方法より作製されたNMJは生体内NMJに近いmRNAやたんぱく質が集積していると考えられ、今後の研究につなげたいと考えている。

引用文献

Congenital myasthenic syndrome-associated agrin variants affect clustering of acetylcholine receptors in a domain-specific manner.

Ohkawara B, Shen X, Selcen D, Nazim M, Bril V, Tarnopolsky MA, Brady L, Fukami S, Amato AA, Yis U, Ohno K, Engel AG. *JCI Insight*. 2020 Apr 9;5(7):e132023. doi: 10.1172/jci.insight.132023. PMID: 32271162 Free PMC article.

CTGF/CCN2 facilitates LRP4-mediated formation of the embryonic neuromuscular junction.

Ohkawara B, Kobayakawa A, Kanbara S, Hattori T, Kubota S, Ito M, Masuda A, Takigawa M, Lyons KM, Ishiguro N, Ohno K. *EMBO Rep*. 2020 Aug 5;21(8):e48462. doi: 10.15252/embr.201948462. Epub 2020 Jun 17. PMID: 32558157 Free PMC article.

Zonisamide upregulates neuregulin-1 expression and enhances acetylcholine receptor clustering at the in vitro neuromuscular junction.

Inoue T, Ohkawara B, Bushra S, Kanbara S, Nakashima H, Koshimizu H, Tomita H, Ito M, Masuda A, Ishiguro N, Imagama S, Ohno K. *Neuropharmacology*. 2021 Sep 1;195:108637. doi: 10.1016/j.neuropharm.2021.108637. Epub 2021 Jun 5. PMID: 34097946

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計9件（うち査読付論文 7件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Ohkawara Bisei, Shen XinMing, Selcen Duygu, Nazim Mohammad, Brill Vera, Tarnopolsky Mark A., Brady Lauren, Fukami Sae, Amato Anthony A., Yis Uluc, Ohno Kinji, Engel Andrew G.	4. 巻 5
2. 論文標題 Congenital myasthenic syndrome-associated agrin variants affect clustering of acetylcholine receptors in a domain-specific manner	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 JCI Insight	6. 最初と最後の頁 e132023
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1172/jci.insight.132023	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Ohkawara Bisei, Kobayakawa Akinori, Kanbara Shunsuke, Hattori Takako, Kubota Satoshi, Ito Mikako, Masuda Akio, Takigawa Masaharu, Lyons Karen M, Ishiguro Naoki, Ohno Kinji	4. 巻 21
2. 論文標題 CTGF/CCN2 facilitates LRP4 mediated formation of the embryonic neuromuscular junction	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 EMBO reports	6. 最初と最後の頁 e48462
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.15252/embr.201948462	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Kanbara Shunsuke, Ohkawara Bisei, Nakashima Hiroaki, Ohta Kyotaro, Koshimizu Hiroyuki, Inoue Taro, Tomita Hiroyuki, Ito Mikako, Masuda Akio, Ishiguro Naoki, Imagama Shiro, Ohno Kinji	4. 巻 10
2. 論文標題 Zonisamide ameliorates progression of cervical spondylotic myelopathy in a rat model	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 13138
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-020-70068-0	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Koshimizu Hiroyuki, Ohkawara Bisei, Nakashima Hiroaki, Ota Kyotaro, Kanbara Shunsuke, Inoue Taro, Tomita Hiroyuki, Sayo Akira, Kiryu-Seo Sumiko, Konishi Hiroyuki, Ito Mikako, Masuda Akio, Ishiguro Naoki, Imagama Shiro, Kiyama Hiroshi, Ohno Kinji	4. 巻 263
2. 論文標題 Zonisamide ameliorates neuropathic pain partly by suppressing microglial activation in the spinal cord in a mouse model	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Life Sciences	6. 最初と最後の頁 118577 ~ 118577
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.lfs.2020.118577	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Huang Kun, Li Jin, Ito Mikako, Takeda Jun-Ichi, Ohkawara Bisei, Ogi Tomoo, Masuda Akio, Ohno Kinji	4. 巻 13
2. 論文標題 Gene Expression Profile at the Motor Endplate of the Neuromuscular Junction of Fast-Twitch Muscle	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Frontiers in Molecular Neuroscience	6. 最初と最後の頁 154
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/fnmol.2020.00154	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Ohkawara Bisei, Ito Mikako, Ohno Kinji	4. 巻 22
2. 論文標題 Secreted Signaling Molecules at the Neuromuscular Junction in Physiology and Pathology	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences	6. 最初と最後の頁 2455 ~ 2455
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/ijms22052455	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Masuda A, Kawachi T, Takeda JI, Ohkawara B, Ito M, Ohno K.	4. 巻 e49890
2. 論文標題 tRIP-seq reveals repression of premature polyadenylation by co-transcriptional FUS-U1 snRNP assembly.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 EMBO Rep.	6. 最初と最後の頁 e49890
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.15252/embr.201949890	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Kawamura Yusuke, Hida Tetsuro, Ohkawara Bisei, Matsushita Masaki, Kobayashi Takeshi, Ishizuka Shinya, Hiraiwa Hideki, Tanaka Satoshi, Tsushima Mikito, Nakashima Hiroaki, Ito Kenyu, Imagama Shiro, Ito Mikako, Masuda Akio, Ishiguro Naoki, Ohno Kinji	4. 巻 592
2. 論文標題 Meclozine ameliorates skeletal muscle pathology and increases muscle forces in mdx mice	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Biochemical and Biophysical Research Communications	6. 最初と最後の頁 87 ~ 92
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbrc.2022.01.003	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Inoue Taro, Ohkawara Bisei, Bushra Samira, Kanbara Shunsuke, Nakashima Hiroaki, Koshimizu Hiroyuki, Tomita Hiroyuki, Ito Mikako, Masuda Akio, Ishiguro Naoki, Imagama Shiro, Ohno Kinji	4. 巻 195
2. 論文標題 Zonisamide upregulates neuregulin-1 expression and enhances acetylcholine receptor clustering at the in vitro neuromuscular junction	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Neuropharmacology	6. 最初と最後の頁 108637 ~ 108637
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.neuropharm.2021.108637	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計1件 (うち招待講演 1件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 大河原美静
2. 発表標題 神経筋接合部形成における細胞外分泌因子の役割
3. 学会等名 第6回日本筋学会学術集会 (招待講演)
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------