

平成 26 年 5 月 23 日現在

機関番号：13901

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2013～2013

課題番号：25670164

研究課題名(和文)神経筋接合部分子LRP4の分子構築解明

研究課題名(英文)Molecular dissection of LRP4, a molecule expressed at the neuromuscular junction

研究代表者

大野 欽司(Kinji, Ohno)

名古屋大学・医学(系)研究科(研究院)・教授

研究者番号：80397455

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円、(間接経費) 900,000円

研究成果の概要(和文)：神経筋接合部のアセチルコリン受容体のクラスターリングに重要な分子LRP4の遺伝子変異は合指症や異常骨化症など骨軟骨疾患で同定をされてきたが、本研究により先天性筋無力症候群も惹き起こすことを明らかにした。骨軟骨疾患のLRP4遺伝子変異はLRP4第3プロペラドメイン中央部に位置し、この部位はWnt-カテニンシグナル抑制作用に重要であることを明らかにした。一方、先天性筋無力症候群のLRP4遺伝子変異はLRP4第3プロペラドメインの外周部に位置し、この部位はagrin/LRP4/MuSKの活性化によるアセチルコリン受容体クラスターリングに重要であることを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：LRP4 is essential for formation and maintenance of the acetylcholine receptor clusters. Mutations in LRP4 have been reported in bone and cartilage diseases representing syndactyly and hyperostosis. We have identified that LRP4 mutations also cause a congenital myasthenic syndrome. LRP4 mutations in bone and cartilage diseases are located in the central cavity of the third beta propeller domain of LRP4, and the central cavity is essential for suppression of Wnt beta-catenin signaling. On the other hand, LRP4 mutations in a congenital myasthenic syndrome are located at the periphery of the third beta propeller domain of LRP4, and the periphery is essential for activation of agrin/LRP4/MuSK signaling leading to clustering of the acetylcholine receptor.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・病態医化学

キーワード：先天性筋無力症候群 LRP4 Wnt MuSK

## 1. 研究開始当初の背景

研究代表者は、神経筋接合部の病態研究を行ってきており、AChE をシナプス基底膜に係留する ColQ、神経終末のコリンアセチルトランスフェラーゼ、AChR を終板に集積させる rapsyn と plectin、骨格筋電位依存性ナトリウムチャンネル、AChR 集積シグナルを伝える MuSK の研究を行うとともに、RNA 代謝病態の研究を行ってきた。研究分担者は、Wnt シグナル解析を専門に研究を行ってきた。

先天性筋無力症候群 (congenital myasthenic syndrome, CMS) は研究代表者らの研究成果を含めて 18 種類の分子において遺伝子変異が同定をされてきている。今回、研究代表者は CMS において agrin 受容体である LRP4<sup>5,6</sup> に E1233K と R1277H のミスセンス変異を同定した。運動神経終末から放出される agrin は終板筋膜の LRP4 2 量体に結合をする。LRP4 2 量体は MuSK 2 量体と結合し、agrin の LRP4 への結合により MuSK のリン酸化を促進する。このリン酸化を細胞内分子 Dok-7 は増強する。リン酸化された MuSK は AChR  $\beta$  サブユニットのリン酸化を促し、細胞膜直下構造タンパク rapsyn をバックボーンにした AChR の筋終板への集積を促進する。E1233K と R1277H はこの agrin シグナル系を阻害すると予想をされた。一方、LRP4 は Wnt 阻害分子として骨形成にも関与しており、ヒトにおいて 12 種類のミスセンス変異が骨形成障害を主徴とする (1) Cenani-Lenz syndactyly syndrome (CLSS), (2) low-trauma fracture (LTF), (3) Richter syndrome (RS) と骨過形成を主徴とする (4) sclerosteosis-2 (SOST2) の原因であることが報告をされてきた。

## 2. 研究の目的

本研究の目的は、神経筋接合部において agrin 受容体を形成するとともに、骨形成において Wnt 阻害分子として作用をする LRP4 の分子構築を明らかにし、LRP4 変異の genotype-phenotype correlation を解明することである。我々は CMS の exome capture resequencing 解析にて LRP4 遺伝子のミスセンス変異を世界で初めて同定した。従来、各種骨系統疾患において LRP4 ミスセンス変異が同定をされてきている。本研究は、agrin/Wnt シグナル解析、タンパク間相互作用解析、分

子モデリング解析により、LRP4 変異が神経筋接合部異常と骨異常 (骨形成障害・骨過形成) の 2 表現型を示す分子基盤を解明する。

## 3. 研究の方法

LRP4 分子の 3 番目の LDLRB (LDLR type B repeat) ドメインには、今回我々が CMS 症例において同定をした E1233K 変異と R1277H 変異に加えて、2 型骨硬化症 (SOST2) を惹き起こす R1170W 変異と W1186S 変異、LTF を惹き起こす A1203V 変異の合計 5 つのミスセンス変異が報告されている。本研究ではこれら 5 つの変異が sclerostin-LRP4-Wnt シグナル系と agrin-LRP4-MuSK シグナル系に与える影響を、(1) agrin シグナル系分析、(2) Wnt-カテニンシグナル系分析、(3) 細胞表面 MuSK 結合アッセイ、(4) 細胞表面 agrin 結合アッセイ、(5) MuSK-LRP4 *in vitro* plate-binding assay、(6) agrin-LRP4 *in vitro* plate-binding assay、(7) 分子モデリングによる LRP4 の MuSK 機能ドメインと Wnt 機能ドメインの検証により明らかにし、LRP4 の分子構築を解明する。

## 4. 研究成果

LRP4 分子が有する 4 つの LDLRB (LDLR type B repeat) ドメインのうち 3 番目の LDLRB ドメインに E1233K と R1277H の 2 つのミスセンス変異を CMS において同定した。

HEK293 細胞に MuSK、LRP4 を発現させ agrin を培地に付加し ATF2-luciferase 活性を測定することにより MuSK 活性化を定量化する系を立ち上げた。CMS ミスセンス変異を持つ LRP4 は MuSK 活性化能が有意に低下していた。同時に Western blotting にて MuSK リン酸化が誘導をされないことを確認した。一方、Wnt signaling 活性を測定する TOPFLASH reporter の HEK293 細胞への導入では、これらの変異 LRP4 は正常 LRP4 と同様に Wnt-カテニンシグナル経路を抑制できることを示した。さらに、Lentivirus により C2C12 筋芽細胞に LRP4-shRNA を導入し LRP4 のノックダウンを行い、C2C12 細胞を筋管細胞に分化誘導させた後に electroporation により正常 LRP4 を導入したところ、正常 LRP4 は MuSK リン酸化を促進しアセチルコリン受容体 (AChR) の集積を誘導した。一方、変異 LRP4 はこの活性を喪失していた。次に、HKE293

細胞に正常 LRP4 ならびに変異 LRP4 を発現させ、alkaline phosphatase (AP)と agrin の fusion タンパク (agrin-AP)を発現させた conditioned medium を overlay し AP 活性を測定した。正常 LRP4 を発現させた HEK293 細胞には agrin-AP が agrin-AP 濃度依存的に結合をしたのに対して、変異 LRP4 を発現させた HEK293 細胞に対する濃度依存的結合能は低下していた。同様の実験を AP と MuSK 細胞外ドメインを結合させたタンパク (MuSK-AP)で行ったところ、同様に正常 LRP4 を発現させた HEK293 細胞には MusK-AP が濃度依存的に結合したのに対して、変異 LRP4 を発現させた HEK293 細胞に対する MuSK-AP の結合能は減弱していた。

骨過形成を特徴とする 2 型骨硬化症 (SOST2)において第 3 LDLRB ドメインに R1170W 変異と W1186S 変異の 2 種類のミスセンス変異が報告をされている。これら SOST2 変異を用いて CMS 変異と同様の解析を行った。SOST2 変異は ATF2-luciferase 活性を正常に増強させ、agrin/LRP4/MuSK シグナル系を正常に機能させた。一方、TOPFLASH assay では正常 LRP4 で認められる Wnt- カテニンシグナル抑制効果を SOST2 変異 LRP4 では認めなかった。また、SOST2 変異 LRP4 は agrin-AP, MuSK-AP を正常に結合させることができた。つまり SOST2 変異は CMS 変異とは逆に Wnt- カテニンシグナル系を阻害する一方、agrin/LRP4/MuSK シグナル系には影響を与えなかった。

次に、分子モデリング解析を行った。CMS 変異は第 3 LDLRB ドメインの外周部に位置し、SOST2 変異は中央部に位置することが予想された。第 3 LDLRB ドメイン外周部に 2 種類の人工的なミスセンス変異と中央部に 2 種類の人工的なミスセンス変異を導入し機能解析を行った。外周部の 2 変異は CMS 変異と同様に agrin/LRP4/MuSK シグナル系を阻害したが、正常 LRP4 と同様に Wnt- カテニンシグナル抑制作用を示した。一方、中央部の 2 変異は SOST2 変異と同様に agrin/LRP4/MuSK シグナル系に影響を与えず、Wnt- カテニンシグナル抑制作用の障害を示した。これらの解析により第 3 LDLRB ドメインの外周部は agrin/LRP4/MuSK シグナル系に重要であり、一方、中央部は Wnt- カテニンシグナル抑制に重要な役割を担うことを明らかにした。

## 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7件)

1. Ohkawara B, Cabrera-Serrano M, Nakata T, Milone M, Asai N, Ito K, Ito M, Masuda A, Ito Y, Engel AG, Ohno K. LRP4 third beta-propeller domain mutations cause novel congenital myasthenia by compromising agrin-mediated MuSK signaling in a position-specific manner. *Hum Mol Genet* 2014, 23: 1856-1868. DOI:10.1093/hmg/ddt578 (査読有)
2. Ohno K, Ito M, Kawakami Y. Collagen Q is a key player for developing rational therapy for congenital myasthenia and for dissecting the mechanisms of anti-MuSK myasthenia gravis. *J Mol Neurosci*, 2013, Epub ahead of print. DOI 10.1007/s12031-013-0170-x (査読有)
3. Nakata T, Ito M, Azuma Y, Otsuka K, Noguchi Y, Komaki H, Okumura A, Shiraishi K, Masuda A, Natsume J, Kojima S, Ohno K. Mutations in the C-terminal domain of ColQ in endplate acetylcholinesterase deficiency compromise ColQ-MuSK interaction. *Hum Mutat* 2013, 34: 997-1004. DOI:10.1002/humu.22325 (査読有)
4. Selcen D, Shen XM, Milone M, Brengman J, Ohno K, Deymeer F, Finkel R, Rowin J, Engel AG. Gfpt1-myasthenia: Clinical, structural, and electrophysiologic heterogeneity. *Neurology* 2013, 81: 370-378. DOI:10.1212/WNL.0b013e31829c5e9c (査読有)
5. Rahman MA, Masuda A, Ohe K, Ito M, Hutchinson DO, Mayeda A, Engel AG, Ohno K. HnRNP L and hnRNP LL antagonistically modulate PTB-mediated splicing suppression of

*CHRNA1* pre-mRNA. *Sci Rep* 2013, 3: 2931.

DOI:10.1038/srep02931

( 査読有 )

6. Ohno K, Ito M, Kawakami Y, Krejci E, Engel AG. Specific binding of collagen Q to the neuromuscular junction is exploited to cure congenital myasthenia and to explore bases of myasthenia gravis. *Chem Biol Interact.* 2013, 203(1): 335-340.

DOI: 10.1016/j.cbi.2012.08.020

( 査読有 )

7. Tanisawa K, Mikami E, Fuku N, Honda Y, Honda S, Ohsawa I, Ito M, Endo S, Ihara K, Ohno K, Kishimoto Y, Ishigami A, Maruyama N, Sawabe M, Iseki H, Okazaki Y, Hasegawa-Ishii S, Takei S, Shimada A, Hosokawa M, Mori M, Higuchi K, Takeda T, Higuchi M, Tanaka M. Exome sequencing of senescence-accelerated mice (sam) reveals deleterious mutations in degenerative disease-causing genes. *BMC Genomics* 2013, 14: 248.

DOI: 10.1186/1471-2164-14-248

( 査読有 )

[ 学会発表 ] ( 計 3 件 )

1. Ohkawara B, Cabrera M, Nakata T, Shen X, Ito Y, Engel AG, Ohno K Mutations in LRP4 in congenital myasthenia reveal position-specific regulations of agrin and Wnt signaling of LPR4  
43rd Annual Meeting, Society for Neuroscience (Poster), San Diego, USA  
Nov 13, 2013
2. Ohkawara B, Cabrera M, Nakata T, Milone M, Ito Y, Engel AG, Ohno K Mutations in the third  $\beta$ -propeller domain of LRP4 in congenital myasthenia compromise agrin-mediated MuSK signaling in a position-specific manner  
36th Annual Meeting of the Japan Neuroscience Society (Poster), 国立京都国際会館(京都市)

Jun 22, 2013

3. Ohno K, Ito M, Kawakami Y, Ohtsuka K, Krejci E.

Collagen Q is a key player for developing rational therapy for congenital myasthenia and for causing anti-MuSK myasthenia gravis  
XIV International Symposium on Cholinergic Mechanisms (Invited Platform), Hangzhou, China  
May 5-9, 2013

[ 図書 ] ( 計 1 件 )

1. Ohno K, Ohkawara B, Ito M, Engel AG. Molecular Genetics of Congenital Myasthenic Syndromes. *eLS*. John Wiley & Sons, Inc., Hoboken, Manuscript ID: A24314.R1, 2014, in press.

[ その他 ]

該当なし

## 6 . 研究組織

### (1)研究代表者

大野 欽司 ( OHNO KINJI )

名古屋大学・大学院医学系研究科・教授  
研究者番号 : 80397455

### (2)研究分担者

大河原 美静 ( OHKAWARA BISEI )

名古屋大学・高等研究院・特任講師  
研究者番号 : 80589606