

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 26 日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26430064

研究課題名(和文) 神経筋発生およびシナプス形成における膜結合型コラーゲンCLAC-Pの機能の解明

研究課題名(英文) The elucidation of functions of CLAC-P/collagen XXV in neuromuscular development and synapse formation

研究代表者

若林 朋子 (Wakabayashi, Tomoko)

東京大学・大学院医学系研究科(医学部)・助教

研究者番号：20530330

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：CLAC-P/collagen XXVは発生期の運動ニューロンの骨格筋内での伸長に必須の役割を果たす、膜結合型コラーゲンである。本研究では、組織特異的Col25a1ノックアウトマウスを作製し、発生期の骨格筋に一過性に発現するcollagen XXVが軸索の伸長に必須であることを明らかにした。またcollagen XXVの発現は、神経支配により持続的に抑制される可能性を見出した。更に、collagen XXVの相互作用分子として、軸索伸長ならびにシナプス形成に働くことが知られるIIa型RPTPを同定した。

研究成果の概要(英文)：We previously identified that CLAC-P/collagen XXV is essential for intramuscular innervation of motor neurons during development. In this study, we generated tissue-specific Col25a1 knockout mice and revealed that collagen XXV expressed in developing skeletal muscle but not in motor neuron is indispensable for neuromuscular development. mRNA expression of collagen XXV in skeletal muscle is downregulated by muscle electrical activity arising from motor innervation. We also identified type IIa RPTPs, which are known to be involved in synapse formation in the CNS and motor axon elongation/regeneration, as possible interactors.

研究分野：神経病理学

キーワード：運動ニューロン 神経発生

1. 研究開始当初の背景

CLAC-P/ collagen XXV は、アルツハイマー病脳のアミロイド構成タンパク質として見出された膜貫通型コラーゲンである。CLAC-P/ collagen XXV の生理機能を解明する目的でノックアウトマウスを作成した結果、運動ニューロンの発生異常により出生時致死となる類例のない重篤な表現型を見出し、原因として骨格筋内での運動ニューロン軸索の伸長障害を示唆する結果を得た。このことから、collagen XXV は運動ニューロン軸索の骨格筋との相互作用とその伸長を担う必須の因子であることが明らかとなったが、その分子メカニズムは未解明であった。

Collagen XXV の相互作用分子の候補として、運動ニューロン軸索再生や脳のシナプス接着に重要な役割を果たすことが知られる受容体チロシンフォスファターゼ (RPTP) との *in vitro* における結合を見出しており、RPTP との相互作用を通し、神経筋発生ならびに中枢神経系で collagen XXV が重要な機能を担う可能性が想定されていた。

2. 研究の目的

Collagen XXV KO マウスで見られた骨格筋内での軸索伸長不全のメカニズムの解明のため、本研究においては、組織特異的ノックアウトマウスの作製と解析、遺伝子発現解析、および培養運動ニューロンを用いた *in vitro/ex vivo* 両面からの解析を行い、運動ニューロンと骨格筋との相互作用における collagen XXV の機能を分子レベルで明らかにすることを目的とした。また、collagen XXV の結合分子の候補として見出された RPTP との相互作用メカニズムの解析ならびに、神経筋発生や中枢のシナプスにおける機能に關与する可能性を明らかにすることを旨とした。

CLAC-P の機能解明を通じ、神経発生やシナプス機能における新規分子機構の解明に寄与するとともに、AD 発症メカニズムにも示唆を与えることが期待される。

3. 研究の方法

本研究においては、我々が既に作成した Col25a1 KO マウス、既にラインの樹立が進んでいる組織・時期特異的 cKO マウスを用い、末梢神経系および中枢神経系の発生と機能維持の観点から解析を行う。これらの遺伝子改変マウスを用い、筋障害や軸索損傷などの介入実験を行い、組織再生過程における collagen XXV の機能を解析する。また、運動ニューロンと筋細胞の共培養や、培養神経細胞を用いたシナプス誘導などの *in vitro* 実験系を樹立し、collagen XXV と RPTP との相互作用やプロテオグリカン (HSPG、CSPG) を介した結合調節メカニズムを検討する。更に、collagen XXV の新規結合分子のプロテオミクス解析を行う。これらの研究により、collagen XXV による神経-筋あるいはシナプ

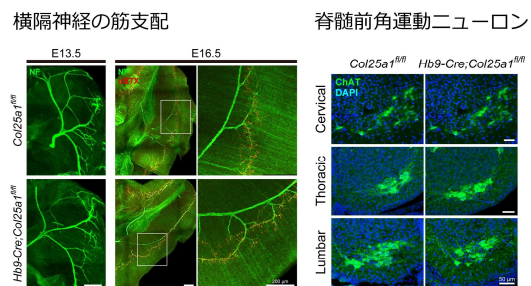
ス間相互作用に必須のパートナー分子の探索と機能制御メカニズムを明らかにする。

4. 研究成果

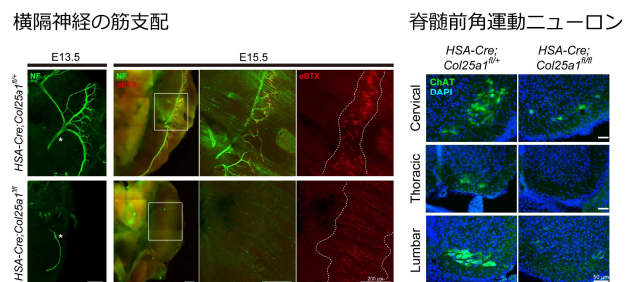
(1) Col25a1 cKO マウスの作出と解析

Col25a1 flox マウスと Hb9-Cre Tg および HSA-Cre Tg マウスを交配し、各々、運動ニューロン特異的、骨格筋特異的ノックアウトマウスを作成した。これらのマウスについて、発生期の日齢を追って、横隔膜 whole mount 免疫染色による横隔神経の軸索伸長と、神経筋接合部形成を検討すると同時に、脊髄前角の運動ニューロン数を定量解析した。運動ニューロン特異的欠損マウスは、正常な発生を示して出生し、成体まで顕著な表現型なく成育した。同様に、神経系特異的 (Nestin-Cre) KO マウスについても正常に出生・発育し、運動機能異常を認めなかった。一方、骨格筋特異的欠損マウスは全身性の KO と同じく、標的骨格筋内の運動ニューロン軸索伸長障害と、脊髄全レベルにおける 9 割程度の運動ニューロンの脱落が認められた。以上の結果から、発生期の骨格筋に発現する collagen XXV が、軸索伸長、神経支配に必須の役割を果たすことが明らかになった。

運動ニューロン特異的 Col25a1 KO マウス



骨格筋特異的 Col25a1 KO マウス



(2) Collagen XXV の運動ニューロン軸索伸長における機能の解析

運動ニューロン軸索発達に対する collagenXXV の機能を評価するため、Hb9-GFP マウス胎児の脊髄前角より採取した explant と HEK293 細胞との共培養実験系を確立した。この HEK293 細胞に対し、一過性に collagen XXV を発現した結果、GFP 陽性の運動ニューロン軸索が collagen

XXV 発現細胞周囲に誘因され、結合することが明らかとなった。また collagen XXV の furin 切断認識配列をアラニン残基に置換し細胞外領域切断が生じない変異体を発現する細胞では、運動ニューロンの軸索誘因効果が顕著に低下することを見出し、furin による切断の機能的な重要性を明らかにした。

Collagen XXV と RPTP との結合および機能的関連について、HEK293 細胞とリコンビナント sCLAC (ecto-collagen XXV) を用いた結合アッセイを行った。RPTP α , δ の各種バリエーションを発現させた細胞にのみ、リコンビナント sCLAC の結合が認められ、一方でシナプスオーガナイザーとして知られる複数の分子との相互作用は認められなかった。また RPTP のドメイン欠損変異体を用いた検討では、collagen XXV が Ig-like domain を介して RPTP に結合する可能性を示唆するデータを得た。RPTP α , δ のシナプス誘導における複数のリガンドは、Ig2-3 領域内のミニエクソン A, B のスプライスバリエーション依存的に結合することが知られるが、collagen XXV はこれらエクソンのいずれのバリエーションとも結合を示した。一方で、グリコサミノグリカンとの結合部位である RPTP の Ig1 領域内に存在する塩基性アミノ酸クラスターについて、4 つのリジン残基をアラニンに置換しプロテオグリカンとの結合能を喪失した変異体では、collagen XXV との結合が有意に低下した。更に collagen XXV 側の結合領域として、COL3 領域、NC4 領域を含む C 末端側を欠損する変異体を用いた検討では、コラーゲンとしての物理的性質は保持するものの、RPTP との結合が消失することを見出した。以上より、RPTP と collagen XXV の相互作用に関わる領域の同定ならびにプロテオグリカンの関与を示唆する結果を得た。

これらの知見を基に、脊髄前角 explant と HEK293 細胞の共培養実験へのリコンビナント RPTP α 細胞外領域の添加を行った結果、collagen XXV 依存的な軸索誘因・集積が競合的に阻害された。このことから、collagen XXV による軸索集積効果に RPTP が関与している可能性を示した。この脊髄前角 explant 培養を用いた軸索誘因のアッセイに応用する目的で、マウス骨格筋よりセルソーターを用いて筋衛星細胞を精製し、培養により myotube への分化誘導を行った。これらの細胞では、myotube への分化依存的に collagen XXV の mRNA の発現の顕著な増加が認められた。引き続き、脊髄 explant との共培養実験を行う。

(3) Collagen XXV の骨格筋における機能の解析

Collagen XXV の発現制御メカニズム解明のため、スプライシングバリエーションの解析を行った。その結果、成体脳および胎児脊髄では同様のバリエーションが見られたのに対し、胎

生期の骨格筋では特異的なエクソンをもつアイソフォームの発現が多数認められ、骨格筋特異的な機能の重要性を裏付けた。更に、成体マウスの前脛骨筋に cardiotoxin を注入して筋損傷を誘発し、筋再生過程における mRNA 発現を検討した結果、通常 collagen XXV の発現がほぼ認められない成体の筋肉において、損傷後一過性に collagen XXV の発現が上昇することを明らかにした。

Collagen XXV の発生期骨格筋における一過性発現の分子メカニズムについて、成体マウスの坐骨神経切断後の骨格筋における mRNA 発現レベルを定量した結果、脱神経により発現上昇することが知られるアセチルコリン受容体や myogenin 同様、collagen XXV の mRNA も顕著に上昇することを明らかにした。

以上の結果から、collagen XXV は myotube 形成に伴って発現が上昇するが、その後の神経支配による筋の興奮により、持続的に抑制されること、成体においても神経支配の消失により発現が再度上昇することが示された。

(4) Collagen XXV のシナプスにおける機能の解析

CLAC-P のシナプスにおける機能を探索する目的で、昨年度より作出を行ってきた Nestin-Cre;Col25a1 flox マウスの解析を行ったが、成体の脳において形態学的に顕著な変化は認められなかった。

次にシナプスにおける相互作用分子の解析を行うため、リコンビナント sCLAC-Fc をコートしたビーズを初代培養神経細胞に置きこみ、ケミカルクロスリンクの後に細胞を可溶化、プロテイン A 結合ビーズにより sCLAC-Fc を濃縮し、酵素消化したペプチド断片を MS 解析に供した。Fc 領域ペプチドのみの対照サンプルとの比較解析の結果、8 つの collagen XXV 結合候補分子が見出された。これらの分子について、HEK293 細胞への collagen XXV との共発現による免疫共沈降によるアッセイを行ったが、いずれの候補分子でも有意な結合は認められなかった。

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)

[学会発表](計7件)

Munezane H, Oizumi H, Yoshida T, Wakabayashi T, Iwastubo T, Identification of the interactor of CLAC-P/Collagen type XXV in motor nerve innervation of skeletal muscles, Neuroscience 2016, 2016-11-12 – 2016-11-16, San Diego (U.S.A.)

Munezane H, Oizumi H, Yoshida T, Wakabayashi T, Iwastubo T, The elucidation of the physiological function of CLAC-P/collagen XXV in

neuromuscular development, The 47th NIPS International Symposium, 2016-10-27, 岡崎コンファレンスセンター (愛知県岡崎市)

Munezane H, Oizumi H, Yoshida T, Wakabayashi T, Iwastubo T, The elucidation of molecular mechanism of CLAC-P/Collagen type XXV in motor innervation of skeletal muscle, BMB2015, 2015-12-01 – 2015-12-04, 神戸ポートアイランド (兵庫県神戸市)

西尾 周、大泉 寛明、宗実 悠佳、若林 朋子、岩坪 威、Collagen XXV/CLAC-P の骨格筋における発現制御に関する研究、第 34 回 日本認知症学会 学術集会、2015-10-02 – 2015-10-04、リンクステーションホール青森 (青森県青森市)

Wakabayashi T, Roles in Neuromuscular Development of CLAC-P/Collagen Type XXV: A Molecule Originally Identified in Alzheimer Brains, Gordon Research Conference: Collagen, 2015-07-12 – 2015-07-17, New London (U.S.A.)

宗実悠佳、吉田知之、若林朋子、岩坪威、アルツハイマー病脳老人斑構成成分 CLAC-P/CollagenXXV の中枢神経系における生理機能の解明、第 33 回日本認知症学会学術集会、2014-11-29 – 2014-12-01、パシフィコ横浜 (神奈川県横浜市)

Oizumi H, Tanaka T, Nishio S, Munezane H, Hashimoto T, Harada A, Wakabayashi T, Iwastubo T, CLAC-P/collagen type XXV in muscle, but not in motor neurons, is required for intramuscular development of motor axons, Neuroscience 2014, 2014-11-15 – 2014-11-19, Washington DC (U.S.A.)

6 . 研究組織

(1)研究代表者

若林 朋子 (WAKABAYASHI, Tomoko)
東京大学・大学院医学系研究科・助教
研究者番号：20530330