

神経筋シナプスの形成・維持に必須の Dok-7/MuSK:Lrp4 シグナルの解明

東京大学 医科学研究所 腫瘍抑制分野
山梨 裕司

1. 緒言

神経筋シナプスは神経筋接合部 (NMJ: Neuromuscular Junction) としても知られており、運動神経の軸索末端と筋管 (筋繊維) の中央部に位置する後シナプス構造を連結する唯一のシナプスである。哺乳動物のNMJはアセチルコリン (ACh) を伝達物質とするシナプスであり、骨格筋収縮の運動神経支配に必須の役割を担っている。NMJにおける神経伝達機能には後シナプス構造におけるACh受容体 (AChR) の高密度の凝集が必要とされ、その異常は易疲労性の筋力低下を伴う筋無力症の原因となる。このAChRの凝集を含めた後シナプス構造やNMJそのものの形成・維持は筋特異的な受容体型チロシナーゼMuSKによって制御されている。NMJの形成・維持に不可欠の運動神経由来蛋白質であるAgrinはMuSKの共受容体であるLrp4に結合することでMuSKを活性化する。しかしながら、マウス胚の発生過程において、MuSK依存적でありながら運動神経を必要としない後シナプス構造の形成が進み、その後、後シナプス部位への運動神経軸索の進展によってNMJが形成されることが分かり、筋管自律的なMuSK活性化機構の存在と重要性が予見されていた。

本研究では独自に単離した骨格筋のアダプター様分子であるDok-7がMuSKの細胞内領域に直接作用し、活性化することがMuSK依存的な後シナプス構造の形成、ひいてはNMJの形成と維持に必須であることを解明した^{1), 2)}。さらに、ヒトDOK7遺伝子の異常による遺伝性疾患 (DOK7型筋無力症) を発見し、同疾患ではDok-7のMuSK活性化能の低下によるNMJの形成不全が認められることを明らかにした^{3), 4)}。加えて、Dok-7がAgrinによる細胞外からのMuSK活性化にも不可欠であることを示し²⁾、Dok-7による筋管細胞内からのMuSKの活性化が筋自律的な後シナプス構造の形成を筋管中央部にて誘導し、その後、運動神経由来のAgrinによるLrp4を介したさらなるMuSKの活性化によってNMJが形成・維持されることを明らかにした。また、最近、既知の病因性自己抗体である抗AChR抗体や抗MuSK抗体が陰性の重症筋無力症例の一部において、Lrp4機能の阻害能をもつ抗Lrp4抗体陽性例を発見することにも成功している⁵⁾。以上の経緯を踏まえ、本研究においては、Dok-7/MuSK:Lrp4シグナルに関する解析を以下のように実施した。

2. 方法

1) Dok-7/MuSK:Lrp4シグナルの解析

NMJの形成には、Wntシグナル経路などの、MuSKによるチロシンリン酸化シグナル以外のシグナル経路の関与が示唆されている。また、運動神経非依存のかつDok-7、MuSK依存的な後シナプス構造の形成がLrp4欠損マウスには認められないことから、Lrp4には神経由来のAgrinによるMuSK活性化の仲介以外の機能も示唆される。他方、本研究では独自に樹立したDok-7の過剰発現マウスにおいて、正常部位 (筋管中央部) でのNMJ形成シグナルの亢進を発見している。そこで、多様なNMJ形成シグナルの理解を目指し、当該過剰発現マウスとNMJを全く作ることができないDok-7欠損マウスとの比較によってNMJ関連分子の核酸およびタンパク質レベルでの網羅的な解析を進めている。本研究では、核酸レ

ベルの解析によってNMJでの特異的な発現が認められたWnt関連遺伝子の機能解析を行うと共に、NMJ形成シグナルの駆動時にそのリン酸化状態が変化するタンパク質の網羅的な解析を行った。

2) Dok-7のアダプター機能に関する解析

MuSKによってDok-7がチロシンリン酸化されることから、Dok-7のアダプターとしての機能の意義も問われている。本研究者らはMuSKによるDok-7の主要なチロシンリン酸化部位を同定し、それが、Crkタンパク質のSH2ドメインとリン酸化依存的に結合することを明らかにしている⁴⁾。さらに、本研究者らはそのチロシンリン酸化部位の欠失がDok-7のMuSK活性化能や後シナプス構造の形成誘導能を減弱はさせるものの失わせはしないことを明らかにしている。しかしながら、その様な変異体でもMuSKによるチロシンリン酸化を受けることから、他のチロシンリン酸化部位を介したアダプター機能の重要性は否定できない。そこで、本研究では、MuSKによるチロシンリン酸化部位を欠失する変異体の作成とその変異体を骨格筋特異的に発現するトランスジェニックマウスの樹立を進めた。

3. 結果

1) Dok-7/MuSK:Lrp4シグナルの解析

「方法」の項目に記載のWnt関連遺伝子の機能解析についてはその遺伝子欠損マウスにおけるNMJの異常の有無を検討した。その結果、NMJサイズの異常が確認されWntシグナル経路とNMJ形成機構との関連が示唆された。また、NMJ形成シグナルの駆動時にリン酸化状態が変化するタンパク質として後シナプス構造の制御因子や細胞骨格制御因子を同定した。

2) Dok-7のアダプター機能に関する解析

筋管内でのDok-7によるMuSKの活性化にアミノ末端側のPHドメインとPTBドメインが必要とされることを踏まえ、MuSKによるチロシンリン酸化が検出されないC末端領域の欠失変異体を探索し、ほぼ全てのC末端領域を欠失した変異体ではチロシンリン酸化が検出されないことを見出した。既に、当該変異体を骨格筋特異的に発現するトランスジェニックマウスの樹立に成功しており、現在、Dok-7欠損マウスへの当該トランスジーンを導入を進めている。

4. まとめ

本研究により、新たなWnt関連分子とNMJ形成機構との関連が明らかになった。しかしながら、本研究に供した遺伝子欠損マウスは特定の細胞種に特異的な遺伝子欠損マウスではないために、当該分子の機能の場が骨格筋であるのか、それとも運動神経であるのかについては明らかではない。今後は、組織特異的な遺伝子欠損マウスの樹立を含め、当該分子の機能の場の特定とその作用機構の解析を進める必要がある。また、NMJ形成シグナルの駆動時にリン酸化状態が変化するタンパク質として後シナプス構造の制御因子や細胞骨格制御因子を同定したことは本研究の成果ではあるが、そのNMJ形成における役割については、今後の注意深い検討が必要である。同様に、Dok-7のチロシンリン酸化に依存したアダプター機能の役割についても、Dok-7欠損マウスに本研究にて作出した非チロシンリン酸化変異体を骨格筋特異的に発現するトランスジーンを導入したマウスの解析を待つ必要がある。

以上の通り、本研究においては設定した目標の達成に向けた重要な知見を得ると共に必要な解析系の作出を進めることに成功した。

5. 発表論文、参考文献

- 1) Okada, K., Inoue, A., Okada, M., Murata, Y., Kakuta, S., Jigami, T., Kubo, S., Shiraishi, H., Eguchi, K., Motomura, M., Akiyama, T., Iwakura, Y., Higuchi, O., & Yamanashi, Y.: The muscle protein Dok-7 is essential for neuromuscular synaptogenesis. *Science*, **212**: 1802-1805, 2006.
- 2) Inoue, A., Setoguchi, K., Matsubara, Y., Okada, K., Sato, N., Iwakura, Y., Higuchi, O., & Yamanashi, Y.: Dok-7 activates the muscle receptor kinase MuSK and shapes synapse formation. *Science Signaling*, **ra7**, 2009.
- 3) Beeson, D., Higuchi, O., Palace, J., Cossins, J., Spearman, H., Maxwell, S., Newsom-Davis, J., Burke, G., Fawcett, P., Motomura, M., Muller, J., Lochmuller, H., Slater, C., Vincent, A., & Yamanashi, Y.: Dok-7 mutations underlie a neuromuscular junction synaptopathy. *Science*, **213**: 1975-1978, 2006.
- 4) Hamuro, J., Higuchi, O., Okada, K., Ueno, M., Iemura, S., Natsume, T., Spearman, H., Beeson, D., & Yamanashi, Y.: Mutations causing DOK7 congenital myasthenia ablate functional motifs in Dok-7. *J. Biol. Chem.*, **283**: 5518-5524, 2008.
- 5) Higuchi, O., Hamuro, J., Motomura, M., & Yamanashi, Y.: Autoantibodies to low-density lipoprotein receptor-related protein 4 in myasthenia gravis. *Annals of Neurology*, **69**: 418-422, 2011