

論文の内容の要旨

発生期骨格筋への運動ニューロン軸索伸長に CLAC-P/collagen type XXV と 2A 型 RPTP の相互作用が果たす役割

宗實 悠佳

【背景】

神経-筋支配の発生に関する研究は、これまで、神経発生の一般原理を解き明かすにあたって、多大な貢献をしてきた。従来の神経-筋発生研究では、運動ニューロンが前駆細胞から分化する機構、脊髄から標的骨格筋に向けて軸索を伸ばすメカニズム、また運動ニューロンと筋線維とが神経筋接合部 (Neuromuscular Junction; NMJ) と呼ばれる特殊なシナプスを形成する過程が集中的に研究されてきた。しかし、脊髄前角から標的骨格筋へ到達した運動ニューロン軸索が NMJ 形成に至るには、骨格筋内部で運動ニューロン軸索が伸長・分枝し、NMJ 形成が起きる end plate 領域まで軸索を伸ばすという過程が必要となるが、「骨格筋内における運動ニューロン軸索の伸長・分枝メカニズム」に関しては、ほとんど知見が得られていない。

COL25A1 遺伝子によってコードされる CLAC-P (collagenous Alzheimer amyloid plaque component)/collagen type XXV (以下、collagen XXV) は、申請者の所属する研究室において、アルツハイマー病脳老人斑より同定された膜貫通型コラーゲンである。Collagen XXV の生理機能解明を目的として *Col25a1* KO マウスが作出され、詳細な解析が行われた結果、*Col25a1* KO マウスでは、運動ニューロン軸索束が骨格筋内部への進入部付近で伸長を停止し、骨格筋内部への投射を欠損することが示された。更に、Cre-loxP システムを用いた組織特異的な *Col25a1* KO マウスの解析から、発生期の骨格筋に由来する collagen XXV が、骨格筋内における運動ニューロンの軸索伸長・分枝過程に重要な分子であることが明らかとなった。また近年、*COL25A1* の変異が、ヒトの先天性脳神経支配異常症 (Congenital Cranial Dysinnervation Disorders; CCDDs) の原因となることが報告された。CCDD 患者の主な症状は、眼球運動障害、眼瞼下垂、顔面麻痺などであり、原因としては、脳神経核の非形成や形成不全、それに伴う標的骨格筋への投射不全 (dysinnervation) や、誤投射 (missinnervation) が挙げられる。このことから、collagen XXV がヒトの神経-筋発生においても重要な機能を担う可能性が示唆された。

このように、collagen XXV が神経-筋発生過程において、「骨格筋内における運動ニューロン軸索の伸長・分枝」という未だブラックボックスとなっている過程に必須の分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不明であった。

【仮説】

2A 型受容体型チロシンホスファターゼ (2A 型 RPTP) である PTP σ 、PTP δ のダブル遺伝子欠損マウス (*Ptprs*, *Ptprd* dKO) は、*Col25a1* KO マウスと酷似した表現型を示す唯一のモデルマウスである。PTP σ/δ は、細胞外領域に 3 つの immunoglobulin-like (Ig) ドメインと、4 つの fibronectin III (FNIII) ドメインをもち、神経系において軸索伸長・再生、更にはシナプス形成など多岐に渡る機能を発揮している。本研究において申請者は、遺伝子欠損マウスが示す表現型の類似性から、PTP σ/δ が、骨格筋内における運動ニューロン軸索の伸長・分枝過程において collagen XXV の重要な相互作用分子であるという仮説を立て検証を行った。

【結果・考察】

この仮説を検証するためにまず、PTP σ/δ を一過性に発現させた HEK293 細胞に対し、カルボキシ末端に FLAG タグ付加された分泌型 collagen XXV (ecto-ColXXV-FLAG) を添加する実験を行った。その結果、PTP σ/δ 発現細胞表面に、ecto-ColXXV のシグナルが確認され、対照となる EGFP や Neurexin を発現させた細胞表面には、ecto-ColXXV のシグナルは認められなかった。また、PTP σ 発現細胞に対し、ecto-ColXIII-FLAG を添加しても、細胞表面に ecto-ColXIII のシグナルは認められず、これらの結果から、collagen XXV と PTP σ/δ の細胞外ドメインが特異的に結合することが明らかとなった。また、Protein G ビーズに Fc タグ付加された PTP σ 及び PTP δ の細胞外ドメイン (ecto-PTP σ/δ) を吸着させ、ecto-ColXXV-FLAG を添加する実験を行ったところ、PTP σ/δ 依存的に ecto-ColXXV-FLAG が pull-down された。これより、collagen XXV と PTP σ/δ の細胞外ドメインが直接結合することが示された。

次に、PTP σ/δ がいずれのドメインを介して collagen XXV と結合しているのかを検証するために、まず PTP σ について、全ての Ig ドメインを欠く変異体 (Δ Ig1-3)、FNIII ドメインの最初の 3 つを欠く変異体 (Δ FN1-3)、そして、FNIII ドメインの最後の一つを欠く変異体 (Δ FN8) を作製し、これらを HEK293 細胞に一過性に発現させ、ecto-ColXXV-FLAG を添加する実験を行った。その結果、 Δ FN1-3 及び Δ FN8 発現細胞表面には ecto-ColXXV のシグナルが認められたのに対し、 Δ Ig1-3 発現細胞表面には ecto-ColXXV のシグナルは認められず、collagen XXV は PTP σ の Ig ドメインを介して結合していることが示唆された。更に、Fc タグ付加された PTP δ の各種ドメイン変異体 (全長型 (FL)、Ig1 から FN1 までを含むもの (Ig1-FN1)、Ig1 から Ig3 までを含むもの (Ig1-3)、Ig1 と Ig2 のみをもつもの (Ig1-2)) を protein G ビーズに吸着させ、ecto-ColXXV-FLAG を反応させた。その結果、Ig1-FN1 及び Ig1-3 では、FL と同等のレベルに ecto-ColXXV と結合したのに対し、ecto-ColXXV と Ig1-2 との結合はほぼ消失した。一連の結果より、PTP σ/δ と collagen XXV の相互作用には、PTP σ/δ の Ig ドメインが重要であること及び、Ig3 ドメインを含む周辺領域が必須のドメインである可能性が示唆された。

近年、*COL25A1* の変異が、ヒトの先天性脳神経支配異常症 (Congenital Cranial Dysinnervation Disorders; CCDDs) の原因であると報告され、collagen XXV がヒトの神経-筋発生においても重要な機能を担う可能性が示唆された。申請者は、報告された G382R 変異体及び G497Ter 変異体を用いて、PTP σ 発現細胞に対する ecto-ColXXV-FLAG の添加実験、及び ecto-PTP σ 結合ビーズを用いた *in vitro* pull-down アッセイを行い、CCDD 変異型 collagen XXV では、PTP σ との結合が有意に低下、或いは消失していることを見出した。これらの結果は、PTP σ/δ が神経-筋発生過程において、collagen XXV の相互作用分子であるという仮説を支持すると同時に、collagen XXV と PTP σ/δ 間相互作用がヒトの神経-筋発生においても重要な機能を果たしていることを示唆するものであった。

最後に、collagen XXV が運動ニューロンの軸索伸長に与える影響を調べるために、運動ニューロン特異的に GFP を発現する Hb9-GFP マウスの E12.5 胎児より摘出した運動ニューロン explant を用いた *ex vivo* アッセイを行った。まず、運動ニューロン explant を、精製 ecto-ColXXV-FLAG でコートしたカバースリップ上で培養したところ、対照と比較して、有意に軸索の専有面積が増加した。これより、collagen XXV が運動ニューロン軸索の伸長を促す効果を有することが示唆された。次に、細胞に発現した collagen XXV が運動ニューロン軸索に与える影響を明らかにするために、collagen XXV を恒常的に発現する HEK293 細胞と運動ニューロン explant の共培養実験を行った。その結果、collagen XXV を発現した HEK293 細胞周囲に伸長した運動ニューロンは、細胞表面に引き寄せられるような走行形態を示した。HEK293 細胞と接触した軸索の長さを HEK293 細胞の面積で規格化し定量した結果、対照と比較して、その値が平均値にして、collagen XXV 発現細胞で 2 倍ほど有意に上昇していた。この現象が PTP σ/δ 依存的であるかを確かめるために、HEK293 細胞との共培養系に、PTP σ 或いは PTP δ の細胞外領域の精製タンパク質を添加する実験を行った。まず、共培養系に ecto-PTP σ を添加したところ、対照と比較して、有意に軸索の誘引効果が阻害された。更に、先の結合実験で collagen XXV との相互作用が認められた PTP δ FL、PTP δ Ig1-3、及び collagen XXV との相互作用が認められなかった PTP δ Ig1-2 を用いて、定量的な解析を行ったところ、FL と Ig1-3 では軸索誘引効果の有意な阻害が確認されたのに対し、Ig1-2 では、軸索誘引効果は阻害されないことが明らかとなった。一連の結果は、細胞に発現した collagen XXV が運動ニューロンに発現する PTP σ/δ を介して運動ニューロン軸索を誘引している可能性を示唆するものであった。

以上の結果から、骨格筋表面に到達した運動ニューロン軸索の先端に発現する PTP σ/δ が、発生期の骨格筋に由来する collagen XXV を受容することで、標的骨格筋内において、NMJ 形成の場となる endplate 領域に向けて運動ニューロンが軸索を伸ばすことを可能にしているというモデルが考えられた。本研究は、神経-筋発生における未知の分子メカニズムに示唆を与えるものであると思われる。