

審査の結果の要旨

氏名 宗實悠佳

近年、骨格筋に由来する CLAC-P/collagen type XXV が、運動ニューロンの骨格筋内における軸索伸長・分枝過程にとって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。本研究で申請者は、その分子機構を解き明かすために、2A 型受容体型チロシンホスファターゼである PTP $\sigma$ / $\delta$  が CLAC-P/collagen type 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い、下記の結果を得ている。

1. PTP $\sigma$ / $\delta$  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ところ、PTP $\sigma$ / $\delta$  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 $\sigma$  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なかった。これらの結果から、collagen XXV と PTP $\sigma$ / $\delta$  の細胞外ドメインが特異的に結合することを明らかにした。
2. Protein G ビーズに Fc タグ付加された PTP $\sigma$  及び PTP $\delta$  の細胞外ドメイン (ecto-PTP $\sigma$ / $\delta$ ) を吸着させ、ecto-ColXXV-FLAG を添加する実験を行ったところ、PTP $\sigma$ / $\delta$  依存的に ecto-ColXXV-FLAG が pull-down された。これより、collagen XXV と PTP $\sigma$ / $\delta$  の細胞外ドメインが直接結合することを示した。
3. PTP $\sigma$ / $\delta$  がいずれのドメインを介して collagen XXV と相互作用しているのかを明らかにするために、まず PTP $\sigma$  について、全ての Ig ドメインを欠く変異体 ( $\Delta$ Ig1-3)、FNIII ドメインの最初の 3 つを欠く変異体 ( $\Delta$ FN1-3)、そして、FNIII ドメインの最後の一つを欠く変異体 ( $\Delta$ 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、 $\Delta$ FN1-3 及び  $\Delta$ FN8 発現細胞表面には ecto-ColXXV シグナルの集積が認められたのに対し、 $\Delta$ Ig1-3 発現細胞表面には ecto-ColXXV のシグナルは全く認められず、collagen XXV は PTP $\sigma$  の Ig ドメインを介して結合していることを明らかにした。  
次に、Fc タグ付加された PTP $\delta$  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)、そして Ig1 と Ig2 のみをもつもの (Ig1-2)) を proteinG 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 と同等のレベルで 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 $\sigma/\delta$  と collagen XXV の相互作用には、PTP $\sigma/\delta$  の Ig ドメインが重要であることを示した。

4. 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 変異体について、PTP $\sigma$  発現細胞に対する ecto-ColXXV の添加実験、及び PTP $\sigma$  結合ピーズを用いた *in vitro* pull-down アッセイを行い、PTP $\sigma$  との結合能の有意な低下を示した。この事実は、collagen XXV と PTP $\sigma/\delta$  間相互作用がヒトの神経-筋発生過程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。
5. 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、培養運動ニューロン explant を用いた *ex vivo* アッセイを行った。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。
6. 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 を共培養した結果、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。次に、この現象が PTP $\sigma/\delta$  依存적であるかを確認するために、HEK293 細胞との共培養系に、PTP $\sigma$  或いは PTP $\delta$  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、ecto-PTP $\sigma$  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 $\delta$  FL、PTP $\delta$  Ig1-3、及び collagen XXV との相互作用が認められなかった PTP $\delta$  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 $\sigma/\delta$  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、本論文はこれまで未知となっていた「骨格筋内における運動ニューロン軸索の伸長・分枝過程」の分子メカニズムの一端を明らかにしたものであり、今後の神経-筋発生研究に貢献するものと考えられ、学位の授与に値すると考えられる。