

審査の結果の要旨

氏名 江口 貴大

本論文は「序論」(第一章)、「実験材料と実験方法」(第二章)、「出生後の NMJ 維持における Dok-7 の重要性の解明」(第三章)、「NMJ の形成・維持に重要な MuSK 下流遺伝子の同定」(第四章)、並びに「結語」(第五章)により構成される。

第一章では骨格筋の収縮機構と神経筋接合部 (NMJ) の形成・成熟・維持に関する学術的な背景が述べられた後、筋特異的な受容体型キナーゼ MuSK の活性化を中心とする NMJ の形成・維持機構が紹介されている。NMJ は骨格筋の構成単位である筋管 (筋繊維) の中央部に形成される後シナプス領域と運動神経の軸索末端 (前シナプス) を連結する唯一のシナプスであり、骨格筋の収縮、ひいては呼吸や運動機能に必須の役割を果たす。哺乳類の NMJ は、神経伝達物質アセチルコリン (ACh) と後シナプス領域に高度に凝集するニコチン性の ACh 受容体 (AChR) による神経筋伝達を介して骨格筋収縮を制御する。また、NMJ の形成・維持の異常は易疲労性の筋力低下を特徴とする、遺伝性の先天性筋無力症候群や自己免疫性の重症筋無力症などを惹起する。胎生期の NMJ 形成と出生後の NMJ の維持は上記の受容体型キナーゼ MuSK と運動神経由来の MuSK 活性化因子 agrin により制御されることが知られていたが、論文提出者の所属研究室は筋内在の Dok-7 タンパク質を単離し、それが MuSK に必須の活性化因子として胎生期の NMJ 形成に不可欠であることを発見していた。しかし、出生後の NMJ 維持における Dok-7 の重要性や Dok-7/MuSK 下流のシグナル伝達機構は未解明であった。

第二章(「実験材料と実験方法」)に続き、第三章では出生後の NMJ 維持における dok-7 遺伝子の重要性に関する研究の詳細が述べられている。まず、dok-7 遺伝子の発現を抑制する shRNA 発現アデノ随伴ウイルスベクター (AAV-shD7) を作出し、当該ベクターを 2 週齢マウスの腹腔に投与することにより、全身の骨格筋における発現抑制を試みた。その結果、AAV-shD7 投与群では骨格筋での dok-7 遺伝子の発現が減少し、運動機能の低下や体重減少を含む筋無力症様の病態と NMJ の縮小が認められた。さらに、当該マウスでは、MuSK シグナルの減弱を示唆する結果も得られている。以上の知見から、出生後の dok-7 遺伝子の正常な発現レベルが NMJ の維持に必要であると結論づけている。

第四章では MuSK 下流の、NMJ の形成・維持・機能に重要な因子 (NMJ 制御因子) の同定を目指した研究の詳細が述べられている。興味深いことに、多核の単一細胞である筋管では既知の NMJ 制御因子をコードする遺伝子の多くが、MuSK 依存的、かつ、

筋管中央部の核選択的な発現制御を受けている。そこで、この特殊な遺伝子発現制御に着目した遺伝子発現解析が行われてきたが、MuSK 下流の NMJ 制御遺伝子の同定はほとんど進んでいなかった。今回、論文提出者は Dok-7 を骨格筋特異的に過剰発現させたマウス (Dok-7 Tg マウス) において、MuSK の活性化と NMJ 制御遺伝子の筋管中央部の核選択的な遺伝子発現が亢進することに着目し、当該マウスを用いることで新規 NMJ 制御遺伝子候補を効率的に絞り込むことが可能と考え、比較発現解析を実施した。その結果、既知の NMJ 制御遺伝子と同様の発現様式を示す新規 NMJ 制御遺伝子候補を抽出することに成功した。さらに、本研究の対象とした遺伝子 Z については、その発現様式の詳細を定量 RT-PCR と *in situ* ハイブリダイゼーション法により明らかにしている。その上で、遺伝子 Z の発現を抑制する shRNA 発現 AAV ベクターをマウスの後肢筋に投与したところ、後肢筋内の長趾伸筋における NMJ 後シナプス構造の異常が認められた。また、同様の異常が *dok-7* 遺伝子の発現抑制 AAV ベクターを投与した場合にも認められたことから、遺伝子 Z も NMJ の形成・維持に重要な役割を担っていることが示唆された。

以上の通り、本論文では、出生後の NMJ 維持における *dok-7* 遺伝子発現の重要性が示され、胎生期の NMJ 形成のみならず、出生後の NMJ 維持においても Dok-7 による MuSK 活性化の重要性が示唆された。さらに、MuSK 下流の新たな NMJ 制御遺伝子候補も示されており、本研究で得られた知見は NMJ の形成・維持メカニズムの解明に貢献するものと言える。なお、本論文は手塚徹、三好貞徳、山梨裕司との共同研究であるが、論文提出者が主体となって分析および検証を行ったものであり、論文提出者の寄与が十分であると判断する。

したがって、論文提出者に対して、博士 (科学) の学位を授与できるものと認める。

以上 1947 字