

学位論文

Lrp4 の翻訳後制御機構の解析

(The role of post-translational regulation of Lrp4.)

平成 26 年 12 月博士（理学）申請

東京大学大学院理学系研究科

生物化学専攻

星 太輔

学位論文

Lrp4 の翻訳後制御機構の解析

(The role of post-translational regulation of Lrp4.)

平成 26 年 12 月博士（理学）申請

東京大学大学院理学系研究科

生物化学専攻

星 太輔

Abstract

Lrp4 は、low-density lipoprotein receptor-related protein (Lrp) ファミリーに属する 1 回膜貫通型タンパク質である。その生理機能としては、運動神経による骨格筋収縮の制御を担うシナプスである神経筋接合部 (Neuromuscular junction : NMJ) の形成・維持や Wnt シグナルを介した手足の発生や骨形成などに重要な役割を果たすことが知られている。しかし、これらの生理機能を果たすためには Lrp4 が細胞表面に発現することが重要であると考えられるにもかかわらず、これまでに Lrp4 自身の機能や発現制御機構に関しては、ほとんど未解明であった。そこで、本研究では Lrp4 の機能や発現を制御する新規の結合分子をプロテオミクスの手法により探索し、新たな Lrp4 結合分子として Mesdc2 を同定した。培養細胞を利用した解析により、Mesdc2 が Lrp4 の機能の場である細胞表面における発現に必須の役割を担っていること、更に、Mesdc2 は NMJ 形成に必須な Lrp4 の下流シグナルの活性化において重要であることを明らかにした。また、この解析を通して、Lrp4 が糖鎖修飾を受けることも明らかになった。最近、タンパク質の Asn 結合型糖鎖修飾を担う酵素遺伝子の病原性変異が易疲労性の筋力低下を特徴とする先天性筋無力症候群の原因となり、当該遺伝子変異を有する患者には NMJ の形態異常が認められることが報告された。これは、NMJ の形成や維持に Asn 結合型の糖鎖修飾が重要な役割を持つことを示唆している。そこで、Lrp4 に付加される糖鎖修飾、特に Asn 結合型の糖鎖修飾が、NMJ の形成や維持において重要な糖鎖修飾の 1 つである可能性に思い至り、その修飾部位の特定と機能解析を進めた。その結果、Lrp4 は複数の部位で Asn 結合型の糖鎖修飾を受けると、またそれらの糖鎖修飾が Lrp4 の細胞表面における発現に重要な役割を果たすことが判明した。本研究により、Lrp4 の細胞表面の発現を制御する翻訳後制御機構の存在とその重要性が明らかになった。

Abstract

Low-density lipoprotein receptor-related protein 4 (Lrp4) plays essential roles in the formation and maintenance of the neuromuscular junction (NMJ), a synapse indispensable for the neural control of muscle contraction. It is also reported that Lrp4 plays a role in limb development and bone formation by regulating Wnt signaling. To exert these activities essential for the formation and maintenance of NMJs and these other developmental events, Lrp4 must be expressed on the cell-surface membrane. However, in contrast to the depth of our understanding of Lrp4 functions, it remains largely unknown how its function and sub-cellular localization are regulated. To gain insights into regulatory mechanisms controlling Lrp4-mediated signaling, we searched for Lrp4-binding proteins. I found that Mesdc2 binds to the intracellular form of Lrp4 and promotes its glycosylation and cell-surface expression. I also demonstrated that Mesdc2 plays a key role in Lrp4-dependent postsynaptic specialization in cultured myotubes. These results suggest that Mesdc2 plays an essential role in the formation and maintenance of NMJs by promoting Lrp4 maturation. Interestingly, several genes that encode key enzymes for Asn-linked (N-linked) glycosylation have been identified as the causative genes for certain types of congenital myasthenic syndromes (CMSs), a group of inherited NMJ disorders. Patients with CMS-associated mutations in these genes show abnormal NMJ morphology, suggesting that key elements of NMJ formation and maintenance are critical targets of these N-linked glycosylation-related enzymes. Thus, I further analyzed Lrp4 glycosylation and identified multiple N-linked glycosylation sites on Lrp4. I also showed that N-linked glycosylations of Lrp4 are critical for its cell-surface expression. Here, I showed that cell-surface expression of Lrp4 is regulated by Mesdc2- and N-linked glycosylation- dependent mechanisms.

目次

第 1 章. 序論

- 1-1 神経筋接合部 (Neuromuscular junction : NMJ) 1
- 1-2 タンパク質の糖鎖修飾と NMJ 5
- 1-3 Lrp ファミリータンパク質の構造・機能・発現制御機構 7

第 2 章. Lrp4 結合分子 Mesdc2 の同定と筋管細胞における機能解析

- 2-1 結果 10
- 2-2 考察 20

第 3 章. Lrp4 の糖鎖修飾による機能制御機構の解析

- 3-1 結果 23
- 3-2 考察 28

第 4 章. 結論 31

第 5 章. 材料と実験方法 33

第 6 章. 引用文献 40

略語一覧 48

謝辞 50

第 1 章

序論

1-1 神経筋接合部 (Neuromuscular junction : NMJ)

ほとんどの骨格筋は我々の骨格を動かすための筋肉であり、大脳皮質や末梢からの刺激が運動神経を介して伝達され、骨格筋が収縮することで運動が引き起こされる。骨格筋は多数の筋管細胞（筋繊維）から構成されており、それぞれの筋管細胞は多数の筋芽細胞の融合によって形成された多核の細胞である。筋管細胞の内部には、主にミオシンフィラメントとアクチンフィラメントから構成される筋原繊維が非常に多く含まれており、これらが筋管細胞の収縮を担っている (Greisingm *et al.* 2012)。この骨格筋の収縮は脊髄の中に細胞体を持つ運動神経によって非常に厳密に制御されており、運動神経軸索末端と筋管細胞を結ぶ唯一のシナプスである神経筋接合部 (neuromuscular junction : NMJ) を介して制御される (図 1)。脊椎動物の NMJ においては、神経伝達物質としてアセチルコリン (acetylcholine : ACh) が使用されており、運動神経の軸索末端から ACh が放出され、後シナプス部位に存在するニコチン性の ACh 受容体 (ACh receptor : AChR) に結合することによって骨格筋の収縮が誘導される (図 1)。運動神経による筋収縮の効率的な制御には、後シナプス領域における AChR の高度な凝集が必須であり (Sanes *et al.* 2001)、NMJ の形成や維

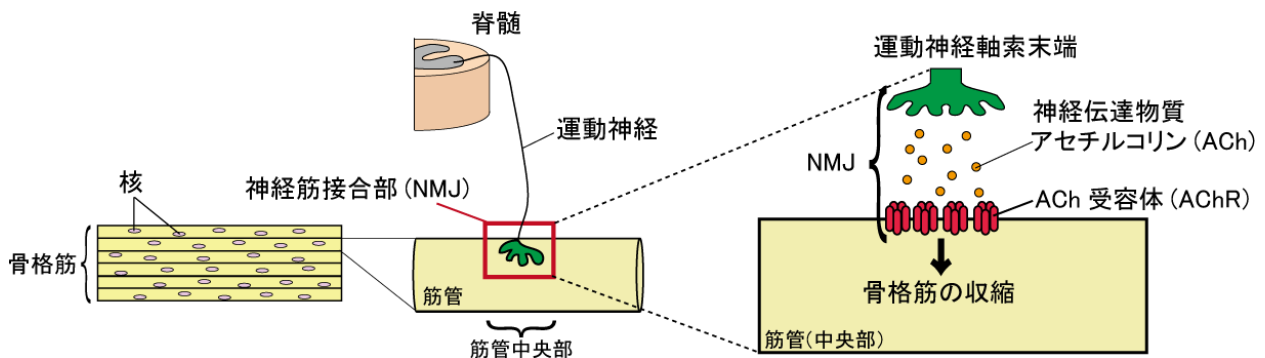


図 1. 神経筋接合部の模式図

骨格筋はその基本単位である筋管が束になって形成されており、各々の筋管に対して脊髄の前角に細胞体を持つ運動神経が神経筋接合部 (neuromuscular junction : NMJ) と呼ばれるシナプスを形成している。ほ乳類の NMJ ではアセチルコリン (ACh) が神経伝達物質として働き、運動神経の興奮によって NMJ のシナプス間隙に放出された ACh が筋管の膜上に発現している ACh 受容体 (AChR) に結合することにより骨格筋の収縮が惹起される。

持に關与する遺伝子群の変異や、NMJ の維持に必須なタンパク質に対する自己抗体の産生によって引き起こされる AChR の凝集異常は、易疲労性の筋力低下を特徴とする筋無力症を引き起こす原因となる (Engel *et al.* 2003, Vincent *et al.* 2003)。

この高度なAChRの凝集化などを特徴としたNMJの形成には、筋特異的に発現する受容体型チロシンキナーゼであるMuSK (muscle-specific receptor tyrosine kinase) が必須の役割を担っている。すなわち、MuSKの遺伝子欠損マウスではNMJの形成がおこらず、出生直後に呼吸不全により死亡する (DeChiara *et al.* 1996)。このMuSKの活性化には、運動神経から分泌される糖タンパク質Agrinが重要であることが古くから知られていた (Gautam *et al.* 1996, Glass *et al.* 1996)。しかし、NMJの形成においては、まず胚発生中期にMuSK依存のかつ運動神経やAgrinに非依存的な後シナプス構造の形成 (pre-patterning) が起こり、続いて胚発生後期に、筋管中央部に存在する後シナプス領域に運動神経の軸索が到達して、NMJが形成されることがMuSKやAgrinの欠損マウス、そして運動神経を欠如するマウスの解析から明らかにされた (Lin *et al.* 2001, Yang *et al.* 2001)。そのため、胚発生中期の運動神経到達前には、後シナプス構造の形成を担う筋自律的なMuSKの活性化機構の存在が示唆されていたが、その分子基盤は長い間未解明であった。そのような状況の中、所属研究室において、独自に単離された細胞質タンパク質Dok-7 (downstream of kinases-7) がMuSKを活性化することが、MuSK依存的な後シナプス構造の形成とそれに続くNMJの形成に重要であることが明らかにされた (図 2A, Okada *et al.* 2006, Inoue *et al.* 2009)。また、Dok-7欠損マウスの初代培養筋管細胞を用いた実験により、Dok-7がAgrinによるMuSKの活性化に必要であることも判明した (Inoue *et al.* 2009)。さらに、所属研究室によって、易疲労性の筋力低下を特徴としたNMJの遺伝性疾患である先天性筋無力症候群 (congenital myasthenic syndromes : CMSs) の中でもNMJの形成不全を伴う症例の中にDOK7遺伝子の劣性変異を原因とするCMS (DOK7型CMS) が発見され (Beeson *et al.* 2006)、DOK7型CMSのモデルマウスではDok-7によるMuSK活性化能の低下に伴うNMJの形成不全が認められた (Arimura *et al.* 2014)。以上の結果から、まずDok-7依存的なMuSKの活性化が後シナプス構造の形成を筋管自律的に誘導し、その後、運動

神経軸索末端由来のAgrinによるMuSKの活性化が加わることによってNMJが形成・維持されると考えられている。

一方で、前述の通りAgrinによりMuSKが活性化されることは以前から知られていたが、AgrinとMuSKの結合が認められないことから、Agrinの直接の受容体となりMuSKを活性化する未同定のタンパク質の存在が予見されていた。近年、Lrp4 (low-density lipoprotein receptor-related protein) ファミリータンパク質 (序論1-3にて詳述する) の一員であるLrp4の欠損マウスにおいてNMJが全く形成されないことが報告され (Weatherbee *et al.* 2006)、Lrp4がNMJ形成におけるAgrinの受容体である可能性が示唆された。その後、Lrp4がMuSKと複合体を形成し、Agrinの直接の受容体として機能することで、MuSKを活性化することが示された (図 2B, Kim *et al.* 2008, Zhang *et al.* 2008)。他方、最近、所属研究室によって、Dok-7依存的なMuSKの活性化にもLrp4が重要な役割を果たすことが示されている (Tezuka *et al.* 2014)。

胚発生後期のNMJ形成においては、運動神経の軸索末端と筋管の後シナプス部位との相互作用により、運動神経終末の前シナプス分化が誘導される。興味深いことに、

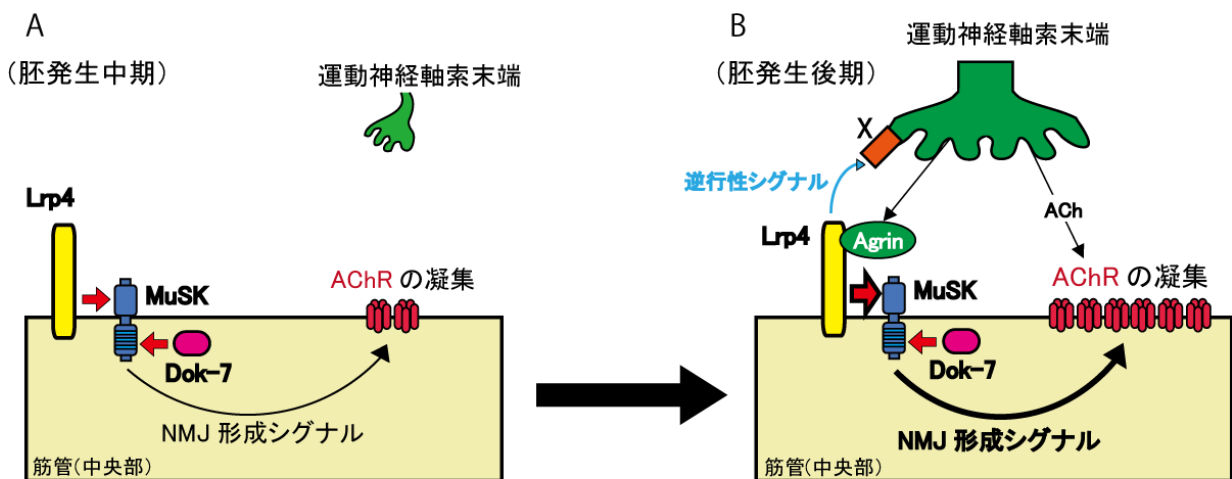


図 2. NMJ 形成シグナルの模式図

(A) 胚発生中期の筋管中央部において、運動神経非依存的な後シナプス分化が誘導され、AChR の凝集が形成される。この後シナプス分化には MuSK が必要であり、その活性化には Dok-7 と Lrp4 が必須の役割を果たすと考えられている。(B) 胚発生後期に運動神経と筋管との相互作用が起こり NMJ の形成が誘導される。運動神経の軸索末端から分泌される Agrin は、MuSK と複合体を形成している共受容体 Lrp4 に直接結合することにより更に MuSK を活性化し、後シナプス領域を安定化する。この Agrin/Lrp4 による MuSK の活性化においても Dok-7 は重要な役割を果たす。他方、Lrp4 は MuSK の活性化とは別に、運動神経軸索と直接相互作用することによって前シナプス分化を誘導する (X は、その存在が予想されている運動神経軸索上の Lrp4 結合タンパク質)。

MuSKやDok-7、Lrp4の欠損マウスにおいては、本来NMJが形成される筋管中央部での運動神経の前シナプス分化が起こらず、運動神経軸索が伸長し続けることから (DeChiara *et al.* 1996, Weatherbee *et al.* 2006, Okada *et al.* 2006)、MuSKの活性化に依存した運動神経の前シナプス分化を誘導する逆行性シグナルの存在が示唆されていた。しかし、最近、Lrp4がMuSKの活性化とは別に、運動神経軸索に直接作用することにより、運動神経の前シナプス分化を誘導することが報告され、Lrp4自身が筋側から運動神経に伝達される逆行性シグナルの1つであることが明らかにされた (図 2B, Wu *et al.* 2012, Yumoto *et al.* 2012)。

上記の様にNMJ形成におけるLrp4の必須の役割はまずマウスを用いた遺伝学的・細胞生物学的な解析により明らかにされたが、近年、ヒトの筋無力症においてもLRP4が深く関与することが示されている。まず、所属研究室によって、易疲労性の筋力低下を特徴とする自己免疫疾患であり、NMJの後シナプス分子に対する自己抗体によって発症する重症筋無力症 (Myasthenia Gravis : MG) において、病原性自己抗体が不明であった本邦の症例からLrp4に対する自己抗体を持つ症例が発見された (Higuchi *et al.* 2011)。現在、Lrp4抗体陽性のMG症例は、米国やギリシャ、ドイツにおいても報告されている (Tsivgoulis *et al.* 2014)。さらに、最近、NMJの形成不全を伴うCMS症例においてAgrinやMuSKとの相互作用が減弱するようなLRP4の変異が発見された (Ohkawara *et al.* 2014)。

以上のように、NMJの形成や維持におけるLrp4の役割や、その破綻による筋無力症については多くの知見が得られてきた。しかしながら、Lrp4が上記のNMJ形成・維持に必須の役割を果たすためには、Lrp4が筋管の細胞膜表面に存在する必要があると予見されるものの、これまでにLrp4自身の発現制御機構に関しては不明であった。そこで、本研究では、Lrp4に対する制御機構を解明することを目的とした。

1-2 タンパク質の糖鎖修飾と NMJ

タンパク質の糖鎖修飾は様々な生理現象を担う重要な翻訳後修飾の1つであり、構成要素である単糖の多様性から非常に多様な機能を持つことが予測されている

(Ohtsubo *et al.* 2006)。近年注目されている Ser/Thr 残基への β -N-アセチルグルコサミンの付加 (O-GlcNAc 修飾) という細胞質や核で起こる糖鎖修飾に対し、タンパク質の細胞外領域に付加される糖鎖修飾は、主に Asn 結合型 (N 結合型) と Ser/Thr 結合型 (O 結合型) という 2 種類に分類される (Kobata. 2007)。中でも、N 結合型の糖鎖修飾は、大部分の膜タンパク質や分泌タンパク質に付加されると予測されており、糖タンパク質の溶解性や安定性などの物理化学的な性質だけでなく、生理機能にも影響を与えることが知られている (Moremen *et al.* 2012)。N 結合型糖鎖修飾が制御する機能の例としては、タンパク質が適切な構造を形成する際の補助や細胞表面における発現制御、受容体-リガンド間相互作用の制御などが知られている (Sano *et al.* 2012)。このように N 結合型糖鎖修飾は、様々なタンパク質にとって重要な翻訳後修飾であることが分かっており、事実、N 結合型糖鎖修飾酵素をコードする遺伝子の病原性変異は全身性に種々の異常を引き起こす劣性遺伝病である先天性グリコシル化異常症 (Congenital disorders of glycosylation : CDG) の原因となる (Cylwik *et al.* 2013)。最近、興味深いことに、CDG の原因遺伝子としても報告されているいくつかの酵素をコードしている遺伝子の病原性変異が CMSs の原因となることが明らかになった (Senderek *et al.* 2011, Belaya *et al.* 2012, Cossins *et al.* 2013)。当該患者の NMJ では、後シナプス部位における AChR の減少や NMJ の構造異常が報告されており、この知見は NMJ の形成や維持に糖鎖修飾が重要であることを示唆している

(Belaya *et al.* 2012, Zoltowska *et al.* 2013)。更に、当該 CMSs の原因遺伝子として同定された 4 つの糖鎖修飾酵素 (GFPT1、DPAGT1、ALG2、ALG14) はいずれも N 結合型糖鎖修飾に関連した酵素であり、当該 CMSs においては種々の N 結合型糖鎖修飾に異常が生じていることが予測されていた。実際、*GFPT1* に変異を持つ CMS 患者由来の初代培養筋管細胞では AChR の細胞表面の発現が減少していた

(Zoltowska *et al.* 2013)。この結果は、AChR のサブユニットに付加される N 結合型糖鎖修飾の阻害が、5 量体である AChR 複合体の集合と細胞表面の発現を阻害する

という知見と一致しており、(Wanamaker *et al.* 2005)、当該 CMS 患者の骨格筋では N 結合型修飾に異常が生じている可能性を支持している。しかし、これまでに NMJ の形成や維持に必須な分子の N 結合型糖鎖修飾の重要性についてはあまり明らかにされていなかった。本研究では、独自に見出した Lrp4 の N 結合型糖鎖修飾について、その重要性を検討した。

1-3 Lrp ファミリータンパク質の構造・機能・発現制御機構

上述のように、Lrp4 は Lrp ファミリーに属する 1 回膜貫通タンパク質である。Lrp ファミリータンパク質は 9 つのファミリー分子から構成され (図 3, Andersen *et al.* 2013)、lipoprotein 受容体 (LDLR) や Wnt 受容体 (Lrp5 および Lrp6) などとして機能することで多様な生理機能を担っている (Dieckmann *et al.* 2010)。Lrp 分子には細胞外領域に共通に保存された 3 つの特徴的な構造、すなわち、LDL-a リポートドメイン (LA ドメイン)、EGF-like モチーフ、および YWTD- β -プロペラ構造が存在する (図 3)。Lrp 分子が受容体として機能する際には、主に LA ドメインに含まれる酸性のアミノ酸を介して、塩基性アミノ酸を持つリガンドタンパク質と相互作用することで受容体として機能することが古くから知られていた (Gent *et al.* 2004, Dieckmann *et al.* 2010)。最近、LA ドメイン以外にも、Lrp 分子の Lrp5/6 などが YWTD- β -プロペラ構造を介してリガンドである Wnt と相互作用することも示された (Andersen *et al.* 2013)。本研究の研究対象である Lrp4 についても同様に、Lrp4 のリガンドである Agrin や共受容体の MuSK との相互作用には、LA ドメインや YWTD- β -プロペラ構造が必須の役割を担っている (図 3, Zhang *et al.* 2011)。

Lrp 分子が受容体として上述の様な役割を果たすためには、適切な 3 次元構造の形成と細胞表面における発現が必須であると考えられる。興味深いことに、Lrp 分子のフォールディングや膜輸送には、Lrpap1 (Lrp-associated protein 1) と Mesdc2 (Mesoderm development candidate 2) という 2 つのシャペロン分子の関与が知られている (Herz *et al.* 2003)。Lrpap1 は小胞体 (endoplasmic reticulum、ER) に局在し、合成直後の、未だ適切な構造を形成していない Lrp 分子の LA ドメインに結合し、リガンドと

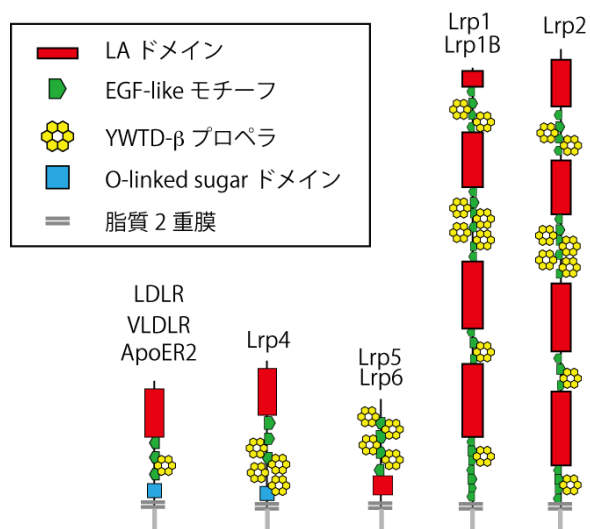


図 3. Lrp ファミリータンパク質の模式図

Lrp ファミリータンパク質は巨大な 1 回膜貫通型分子である。このファミリーは細胞外領域に 3 つの共通した特徴的な構造を持つことが知られている。更に LDLR、VLDLR、ApoER2、そして Lrp4 には、O-linked sugar ドメインという Ser/Thr-rich な配列が膜近傍に存在する。

の相互作用を阻害することによって、受容体が ER に滞留することを防ぐと考えられている (Herz *et al.* 2006)。実際、Lrpap1 欠損マウスでは Lrp1、Lrp2、VLDLR の ER からの輸送が減少しており、Lrpap1 が複数の Lrp 分子の発現を制御することが予想されている (Willnow *et al.* 1996)。しかしながら、Lrpap1 が LDLR の発現には必須でないことも報告されている (Willnow *et al.* 1996)。Mesdc2 も ER に局在するシャペロンであり、Lrp 分子の未成熟な YWTD- β -プロペラ構造に結合することにより、適切な構造の形成に重要な役割を果たすと考えられている。しかしながら、これまでの知見は専ら強制発現系での解析によるものであり、内在性の Lrp 分子に対する Mesdc2 の作用に関する分子基盤は未解明である (Koduri *et al.* 2007, Chen *et al.* 2011)。例えば、Mesdc2 欠損マウスは Wnt シグナル系の破綻と思われる胎仔期の異常を呈するが、当該マウスにおける Lrp5/6 の細胞表面での発現レベルについては報告されていない (Hsieh *et al.* 2003)。このように、Lrp 分子のフォールディングや細胞表面への輸送には Lrpap1 や Mesdc2 が重要な役割を果たすことが予想されているが、その意義と分子機構については未解明の部分が多い。

他方、Lrp 分子の細胞外領域には、LA ドメインや YWTD- β プロペラなどの 3 次元構造に加え、N 結合型の糖鎖修飾を受けるコンセンサス配列 (Asn-X-Ser/Thr, X は Pro 以外の任意のアミノ酸残基) が多数存在する。事実、いくつかの Lrp 分子は N 結合型糖鎖修飾を受けることが知られており、当該修飾が細胞表面における発現に重要な役割を担っていることが示唆されている (McCormick *et al.* 2005, Khan *et al.* 2007)。また、LDLR、VLDLR、ApoER2 などの Lrp 分子は Ser/Thr-rich な O-linked sugar ドメインという O 結合型の糖鎖修飾を受けることが予測されるドメインを持ち、実際にその領域で O 結合型糖鎖修飾を受けることも知られている (Gent *et al.* 2004)。興味深いことに、本研究の研究対象である Lrp4 も上記の Lrp 分子との配列類似性から O-linked sugar ドメインと予測される領域をもつことが示唆されている (図 3, May *et al.* 2003)。しかしながら、Lrp4 については、その糖鎖修飾の実体も生理機能も未解明であった。

第 2 章

Lrp4 結合分子 Mesdc2 の同定と筋管細胞における機能解析

2-1 結果

(はじめに)

序論で述べたように、近年、NMJ の形成や維持において、Lrp4 が運動神経由来の MuSK 活性化因子 Agrin に対する受容体としての機能や、運動神経軸索との相互作用を介して運動神経の前シナプス分化を誘導する機能を持つことが明らかにされてきた。これらの役割を Lrp4 が果たすためには、Lrp4 が筋管の細胞表面に発現することが必須と考えられるが、これまでに Lrp4 の機能や発現を制御する分子機構に関しては、ほとんど解明されていなかった。そこで、NMJ 形成における Lrp4 の機能や発現制御機構の解明を目的として、Lrp4 が既知の酵素活性ドメインを持たない受容体型分子であり、その機能が他分子との会合に大きく依存する可能性に着目し、Lrp4 会合分子の探索を起点とする本研究を実施した。

1) Lrp4 結合候補分子の探索

まず、産業総合研究所の夏目 徹博士、家村 俊一郎博士らとの共同研究により、Lrp4 と結合するタンパク質の同定を行った (Iemura *et al.* 2012, Honma *et al.* 2006)。具体的には、Flag タグを C 末端に付加した Lrp4 (Lrp4-Flag) を HEK293T 細胞に過剰発現させ、抗 Flag タグ抗体を用いた免疫沈降により HEK293T 細胞中の Lrp4 結合分子を共沈降させた。その後、免疫沈降物を大量の Flag ペプチドによって溶出し、溶出タンパク質の Lysyl endopeptidase 消化により得られたペプチド断片を質量分析装置により解析したところ、他の数種のペプチドに加え、Lrp ファミリータンパク質のフォールディングや輸送への関与が報告されている Mesdc2 由来のペプチドが 4 回の実験で 4 回とも検出された (表 1)。そこで、本章では Mesdc2 に的を絞った解析を進めた。

2) Mesdc2 は低分子量型 Lrp4 と特異的に結合する

前項の知見を踏まえ、まず、Mesdc2 と Lrp4 の結合を検証するために、マウス Mesdc2 cDNA を単離し、その発現ベクターを作製した。発現の確認や免疫沈降を行うための Flag タグは、Mesdc2 が N 末端にシグナルペプチドを、C 末端に ER 滞留シグナルである KDEL 様配列 (REDL) を持つことを考慮し、それらの機能を阻害しないよう Mesdc2 のシグナルペプチドの C 末端部分に連結させた (Flag-Mesdc2)。HEK293T 細胞に Lrp4 と Flag-Mesdc2 を強制発現後に免疫沈降実験を実施した結果、Lrp4 と Flag-Mesdc2 の両者を発現する細胞においてのみ、抗 Flag 抗体での免疫沈降物中に Lrp4 が検出された (図 4A)。この際、Lrp4 を発現する細胞溶解液 (Whole cell lysates: WCL) に対して抗 Lrp4 抗体を用いたウエスタンブロットを実施すると、265kDa と 233kDa の 2 種類の Lrp4 (以後、265kDa の高分子量型 Lrp4 を Upper Lrp4、233kDa の低分子量型 Lrp4 を Lower Lrp4 とする) が検出されたが、Mesdc2 の免疫沈降物中に認められた Lrp4 は 1 種類のみであった (図 4A)。そこで、Mesdc2 がどちらの Lrp4 と結合しているかを検討するために、SDS-PAGE 上の泳動度を比較したところ、Mesdc2 と共沈降された Lrp4 は SDS-PAGE 上で Lower Lrp4 と同じ泳動度を示したことから、Mesdc2 は Lower Lrp4 と結合していることが示唆された (図 4B)。Lower Lrp4 と Upper Lrp4 の 2 種類の Lrp4 が存在することについて、序論で述べた通り Lrp4 が複数の N 結合型糖鎖修飾を受けるコンセンサス配列

(Asn-X-Ser/Thr, X は Pro 以外の任意のアミノ酸残基) や O 結合型の糖鎖修飾を受けるドメインを持つことから、両者の違いが糖鎖修飾による可能性に注目した (図 3, May *et al.* 2003)。そこで、Lrp4 の糖鎖修飾を検討するために、殆ど全ての N 結合

タンパク名	質量電荷比 (m/z)	電荷数	ペプチド配列	該当領域
Mesdc2	504.55	3	DDDIEEGDLPEHK	73 – 85
	794.39	3	DIRDYNDADMARLLEQWEK	54 – 72
	552.28	2	RPSAPVDFSK	86 – 95
	814.41	2	TLMMFVTVSGSPTEK	113 – 127

表 1. Lrp4 結合候補分子 Mesdc2 の同定

Lrp4-Flag とその結合分子を抗 Flag 抗体での免疫沈降により精製し、プロテアーゼ処理後に質量分析によってペプチド配列を解析した。同定されたペプチド断片のうち、ヒト Mesdc2 由来の断片の質量電荷比(m/z)、電荷数、ペプチド配列、及び検出されたペプチドに対応するヒト Mesdc2 の該当領域を示す。

型糖鎖修飾を除去する N-glycosidase F、特定のタイプの O 結合型糖鎖修飾を除去するために O-glycosidase と Neuraminidase の併用、または 3 者の組み合わせによる酵素的な糖鎖修飾の除去を行った。その結果、Lower Lrp4 は N 結合型糖鎖修飾を受けているのに対し Upper Lrp4 は N 結合型に加えて、O 結合型の両者の糖鎖修飾を受けていることが明らかになった (図 4C)。しかし、N 及び O 結合型糖鎖修飾を共に除去した場合にも SDS-PAGE で泳動度の異なる 2 種類の Lrp4 が認められたことから、使用した酵素で除去できない糖鎖修飾、もしくは、糖鎖修飾以外の翻訳後修飾の存在が示唆された。これらの結果は、Mesdc2 が N 結合型糖鎖修飾のみを受けている Lower Lrp4 に結合することを示している。

3) Mesdc2 は Lrp4 の細胞表面における発現を促進する

Mesdc2 と Lrp4 との相互作用を検討した際、Mesdc2 依存的な Upper Lrp4 の増加が観察され (図 4A)、Mesdc2 が Upper Lrp4 の発現を促進する可能性が考えられた。そこで、HEK293T 細胞に両者を発現させ、Lrp4 の総量に対する Upper Lrp4 の割合を検討したところ、Lrp4 を単独で発現させた場合と比較して Upper Lrp4 の

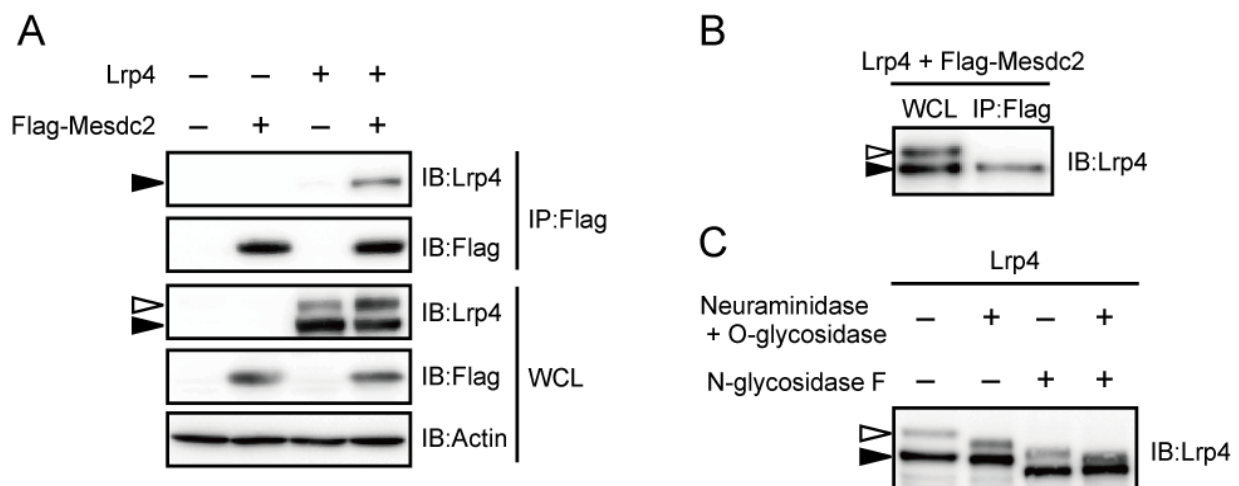


図 4. Mesdc2 は Lrp4 と結合する

(A, B) HEK293T 細胞に Lrp4 及び、シグナルペプチドの C 末端部分に Flag タグを連結した Mesdc2 (Flag-Mesdc2) を発現させ、その細胞溶解液 (Whole cell lysates : WCL) から抗 Flag 抗体を用いた免疫沈降 (Immunoprecipitation : IP) を行った。その後、抗 Flag 抗体免疫沈降物及び WCL について、表記の抗体を用いたウエスタンブロット (Immunoblot : IB) を行った。「▷」と「▶」は、それぞれ Upper Lrp4 と Lower Lrp4 の位置を示す。(C) Lrp4 を過剰発現させた HEK293T 細胞の膜画分に対して、N-glycosidase F 処理、Neuraminidase と O-glycosidase の併用処理、もしくは 3 者の処理を行った試料について、抗 Lrp4 抗体を用いたウエスタンブロットを行った。

割合が有意に増加することが明らかになった (図 5A)。通常、Lrp4 のような細胞表面で機能するタンパク質は ER で適切な構造をとった後に、O 結合型糖鎖修飾のあるゴルジ体に輸送され、さらに細胞表面へと輸送される (Moremen *et al.* 2012)。Mesdc2 との共発現により増加した Upper Lrp4 が O 結合型糖鎖修飾を受けるという上記の知見に加え (図 4C)、同様の強制発現系において、Mesdc2 が Lrp ファミリーに属する Lrp5/6 と結合し、その細胞表面の発現を促進することから (Hsieh *et al.* 2003)、細胞表面における Lrp4 の発現が Mesdc2 によって増強されている可能性が考えられた。そこで、Mesdc2 と Lrp4 を共発現させた際の細胞表面における Lrp4 の発現量を検討したところ、Lrp4 のみを発現させた場合と比較して、有意に増加していることが明らかになった (図 5B)。さらに、細胞表面の Lrp4 と Upper Lrp4 が SDS-PAGE 上で同様の泳動度を示したことから、Upper Lrp4 の一部、または全てが細胞表面の Lrp4 であることが示唆された (図 5C)。この際、細胞表面の Lrp4 において、より低分子量側に非常に弱いシグナルが認められた。これは細胞表面 Lrp4 の

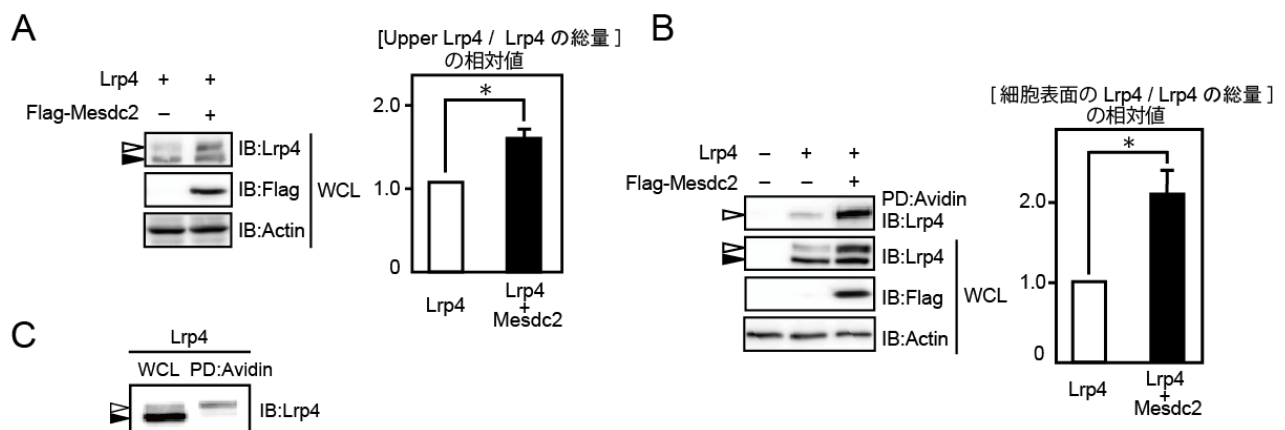


図 5. Mesdc2 は Lrp4 の細胞表面の発現を促進する

(A) HEK293T 細胞に Lrp4 及び Flag-Mesdc2 を発現させ、その WCL について表記の抗体を用いたウエスタンブロットを行った。「▷」と「▶」は、それぞれ Upper Lrp4 と Lower Lrp4 の位置を示す。グラフは、WCL 中の Upper Lrp4 と Lower Lrp4 の総和 (Lrp4 の総量) に対する Upper Lrp4 の比率について、Lrp4 のみを発現させた細胞での比率を 1.0 とした場合の、Lrp4 と Mesdc2 の共発現細胞での平均値 (相対値) と標準誤差を示している (n=3、* : p<0.05)。(B) HEK293T 細胞に Lrp4 及び Flag-Mesdc2 を発現させ、細胞表面タンパク質を膜非透過性ビオチン化試薬によりビオチン化し、WCL 中のビオチン化されたタンパク質を NeutrAvidin agarose を用いてプルダウン (pull-down : PD) した。その後プルダウン試料及び WCL について、表記の抗体を用いたウエスタンブロットを行った。グラフは、WCL 中の Lrp4 の総量に対する細胞表面の Lrp4 の比率について、Lrp4 のみを発現させた時の値を 1.0 とした場合の、Lrp4 と Mesdc2 の共発現細胞での平均値 (相対値) と標準誤差を示している (n=6、* : p<0.05)。(C) HEK293T 細胞に Lrp4 を発現させ、(B)と同様の方法により細胞表面の Lrp4 の PD を行った。その後、プルダウン試料及び WCL について、抗 Lrp4 抗体を用いたウエスタンブロットを行った。

分解物や異なる修飾を受けた Lrp4 などである可能性があるが、それについては詳細な解析が未だ出来ておらず、今後検討していく。これまでの結果から、Mesdc2 は細胞内に存在する Lower Lrp4 に結合し、Lrp4 の糖鎖修飾と細胞表面の発現を促進することが示された。

4) N 結合型糖鎖修飾は Lrp4 の細胞表面の発現に重要な役割を果たす

N 結合型糖鎖修飾は膜タンパク質のフォールディングや、その後の翻訳後修飾、細胞表面への輸送などに重要な役割を果たすことが知られている (Moremen *et al.* 2012)。そこで、Lrp4 に付加された N 結合型糖鎖修飾が細胞表面での発現に必要であるか否かを検討するために、N 結合型糖鎖修飾の阻害剤として広く使われている Tunicamycin (TM, Belaya *et al.* 2012) を処理した際の細胞表面における Lrp4 の発現量を検討した。その結果、TM 処理によって、細胞表面の Lrp4 の発現量が顕著に減少し、Lrp4 の N 結合型糖鎖修飾が細胞表面での発現に重要な役割を担っていることが示唆された (図 6A)。次に、N 結合型糖鎖修飾の有無が Lrp4 と Mesdc2 との相互作用に影響する可能性を検討したが、TM 処理による Lrp4 と Mesdc2 の結合レベルの変化は認められなかった (図 6B) この結果は、Mesdc2 と Lrp4 との相互作用に Lrp4 の N 結合型糖鎖修飾が必要無いことを示唆している。

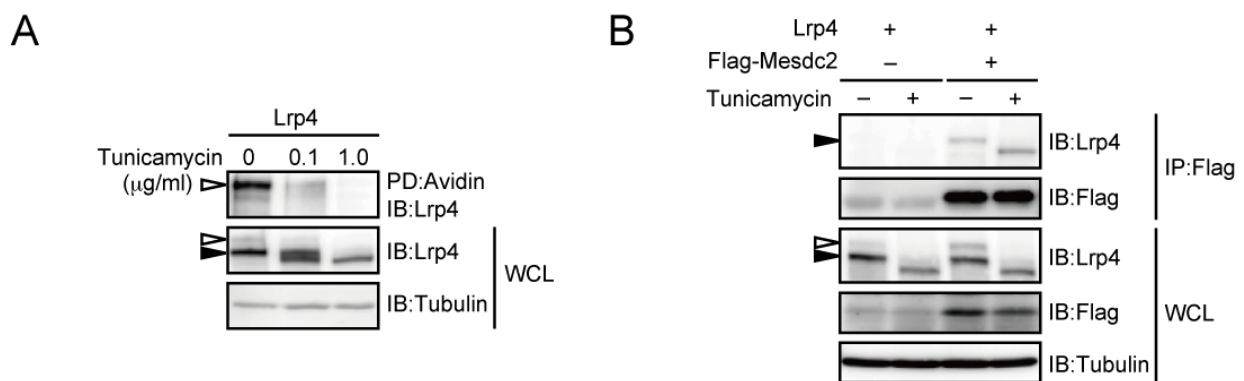


図 6. Tunicamycin は細胞表面の Lrp4 の発現を抑制する

(A) Lrp4 を過剰発現させた HEK293T 細胞に対して、Tunicamycin (0.1mg/ml または 1.0mg/ml) を 16 時間処理し、図 5B と同様の方法で細胞表面の Lrp4 の発現量について検討した。「▷」と「▶」は、それぞれ Upper Lrp4 と Lower Lrp4 の位置を示す。(B) Lrp4 及び Flag-Mesdc2 を共発現させた HEK293T 細胞に対して、Tunicamycin (1.0mg/ml) を 16 時間処理し、WCL から抗 Flag 抗体を用いた IP を行った。その後、抗 Flag 抗体免疫沈降物及び WCL について、表記の抗体を用いたウエスタンブロットを行った。

5) 培養筋管細胞において Mesdc2 は Lrp4 の細胞表面の発現に必須の役割を果たす

序論で述べたように Lrp4 は胚発生中期に筋内在性タンパク質である Dok-7 と共に MuSK 活性化に必須の役割を担うと考えられている (Weatherbee *et al.* 2006, Okada *et al.* 2006, Tezuka *et al.* 2014)。更に運動神経が筋肉に到達した後は、運動神経の軸索末端から分泌される Agrin の直接の受容体として機能することで MuSK を更に活性化し、NMJ の後シナプス分化に必須の役割を担っている (Zhang *et al.* 2008, Kim *et al.* 2008)。そこで、NMJ 形成過程において Mesdc2 が Lrp4 と相互作用し、細胞表面の発現を促進することによって、MuSK の活性化ひいては NMJ の後シナプス分化を制御している可能性が考えられた。この可能性を検討するため、C2C12 細胞という培養筋芽細胞を用いて Mesdc2 の後シナプス分化における重要性を検討した。培養筋芽細胞 C2C12 は低血清中で高密度に培養することによって筋管細胞に分化する細胞株であり、筋管の分化後には Lrp4-MuSK 依存的に後シナプス分化の特徴である AChR の凝集部を形成することから、NMJ 形成の後シナプス分化モデルとして広く使われている。まず、抗 Mesdc2 抗体を用いた共沈降実験により内在性の Mesdc2 と Lrp4 の相互作用を調べたところ、Mesdc2 の免疫沈降物中に Lrp4 が特異的に検出された (図 7A)。上述の HEK293T 細胞を用いた再構成系での結果

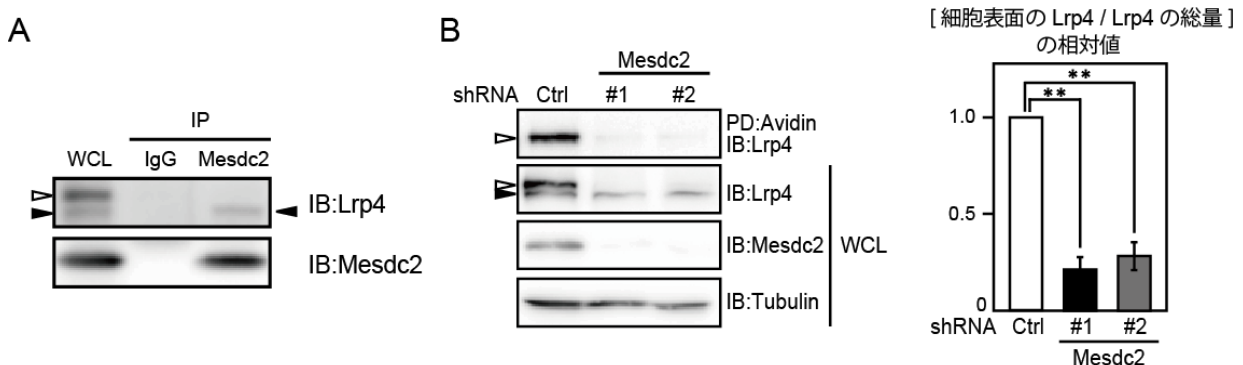


図 7. Mesdc2 は培養筋管細胞において Lrp4 の細胞表面の発現を促進する

(A) C2C12 筋管細胞の WCL からコントロール IgG もしくは抗 Mesdc2 抗体を使用して IP を行った。その後、免疫沈降物及び WCL について、表記の抗体を用いたウエスタンブロットを行った。「▷」と「▶」は、それぞれ Upper Lrp4 と Lower Lrp4 の位置を示す。(B) コントロールの shRNA (Ctrl)、または Mesdc2 に対する shRNA を安定に発現する C2C12 筋芽細胞を C2C12 筋管細胞に分化させ、図 5B と同様の方法で細胞表面の Lrp4 の発現量について検討した。グラフは、WCL 中の Lrp4 の総量に対する細胞表面の Lrp4 の比率について、コントロール shRNA を発現する C2C12 細胞の値を 1.0 とした場合の、Mesdc2 に対する shRNA を発現する C2C12 細胞での平均値 (相対値) と標準誤差を示している (n=4、** : p<0.01)。

(図 4A)と同様に、Mesdc2 と結合する Lrp4 は Lower Lrp4 であった。次に、Mesdc2 による Lrp4 の細胞表面における発現や、後シナプス分化への影響を検討するために、Mesdc2 に対して相異なる塩基配列を標的とした 2 種類の shRNA を発現するレトロウイルスベクターを作製し、各々のベクターを C2C12 細胞に感染させることで Mesdc2 の発現が抑制された C2C12 細胞株を 2 系統樹立した。樹立した培養筋管細胞株における細胞表面の Lrp4 の発現量を検討したところ、コントロール shRNA を発現させた細胞と比較して、いずれの Mesdc2 発現抑制細胞においても顕著に細胞表面 Lrp4 が減少していた (図 7B)。またこの際、Lrp4 総量に対する Upper Lrp4 の発現量も顕著に減少しており、これは Upper Lrp4 の一部、または全てが細胞表面の Lrp4 である可能性を支持している。これらの結果は、Mesdc2 が培養筋管細胞においても Lower Lrp4 と結合し、細胞表面における Lrp4 の発現を促進していることを示している。

6) Mesdc2 は培養筋管細胞における MuSK の活性化と後シナプス分化に重要な役割を持つ

次に、Mesdc2 が Lrp4 に制御される MuSK の活性化や、Lrp4-MuSK 依存的な AChR の凝集部の形成を特徴とした、培養筋管細胞上の後シナプス分化に与える影響について検討した。まず、Lrp4 のリガンドである Agrin の存在下、または非存在下における MuSK の活性化状態について MuSK の自己リン酸化を指標として検討した。その結果、Mesdc2 の発現を抑制した細胞においては、Agrin 存在下における MuSK の活性化が顕著に低下していた (図 8A)。しかし、Agrin 非存在下での MuSK の自己リン酸化は、Mesdc2 の発現量に関わらず検出できなかった。そこで、MuSK の活性化に伴い亢進することが知られている AChR のリン酸化 (Fuhrer *et al.* 1997) を指標に MuSK の活性化状態を検討したところ、Agrin の有無に関わらず AChR のリン酸化は Mesdc2 の発現抑制によって有意に低下することが明らかになった (図 8B)。この際 Mesdc2 発現抑制は、細胞表面における MuSK の発現量に影響しなかったことから、Mesdc2 は MuSK の細胞表面における発現には関与していないことが示唆される (図 9A)。これらの結果は、Mesdc2 が細胞表面の Lrp4 の発現を制御すること

で、MuSKの活性化に必須の役割を果たすことを示唆している。最後に、AChRの凝集部の形成を指標として、培養筋管細胞上の後シナプス分化におけるMesdc2の重要性を検討した。その結果、Mesdc2の発現抑制により、Agrin刺激の有無にかかわらずAChRの凝集部の形成は有意に抑制された(図8C)。この際、細胞表面におけるAChRの発現量についてはMesdc2の発現抑制による有意な変化は認められなかった(図9B)。これらの結果をまとめると、Mesdc2はLrp4の培養筋管細胞表面での発現を特異的に促進することによって、Lrp4-MuSK依存的な後シナプス分化に重要な役割を果たすことを示している。

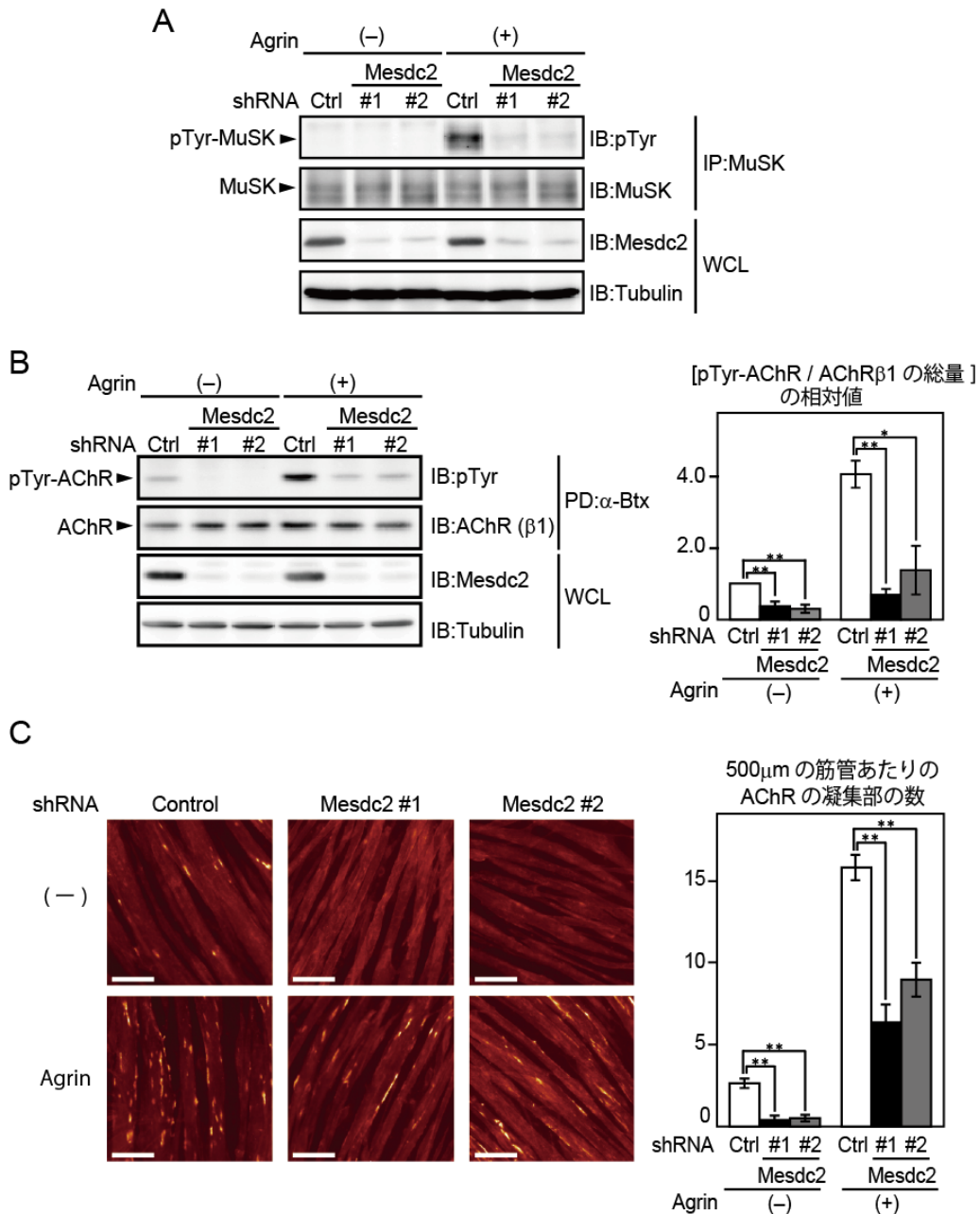


図 8. Mesdc2 は MuSK の活性化と培養筋管細胞の後シナプス分化に重要である

コントロールの shRNA、または Mesdc2 に対する shRNA を発現する C2C12 筋管細胞を Agrin で刺激した。(A) C2C12 筋管細胞の WCL から抗 MuSK 抗体を使用して IP を行った。抗 MuSK 抗体免疫沈降物及び WCL について、表記の抗体を用いたウエスタンブロットを行った。pTyr はリン酸化チロシンを示す。「▶」はそれぞれ pTyr-MuSK と MuSK の位置を示す。(B) ニコチン性 AChR α サブユニットと強固に結合するヘビ毒 α -Bungarotoxin(α -Btx)を sepharose に共有結合させた α -Btx-sepharose を用いて、C2C12 筋管細胞の WCL から AChR を PD した。その後、プルダウン試料及び WCL について、表記の抗体を用いたウエスタンブロットを行った。「▶」はそれぞれ pTyr-AChR と AChR (β 1) の位置を示す。グラフは AChR (β 1)の総量に対するリン酸化された AChR の比率について、Agrin 刺激なしのコントロール shRNA を発現する C2C12 細胞の値を 1.0 とした場合の、他の試料における平均値 (相対値) と標準誤差を示す ($n \geq 5$)。(C) 蛍光色素 Alexa 594 が結合した α -Btx を C2C12 細胞に処理することにより、AChR を蛍光標識し、AChR の凝集部を計数した。各実験において、20 本以上の筋管を調べ、各々の筋管の 500 μ m に存在する AChR の凝集部を計数した。グラフは、3 回以上の独立した実験から得られたデータの平均値と標準誤差を示す。統計学的な有意性は Student-t 検定で検討した (* : $p < 0.05$, ** : $p < 0.01$)。スケールバーは 100 μ m を示す。

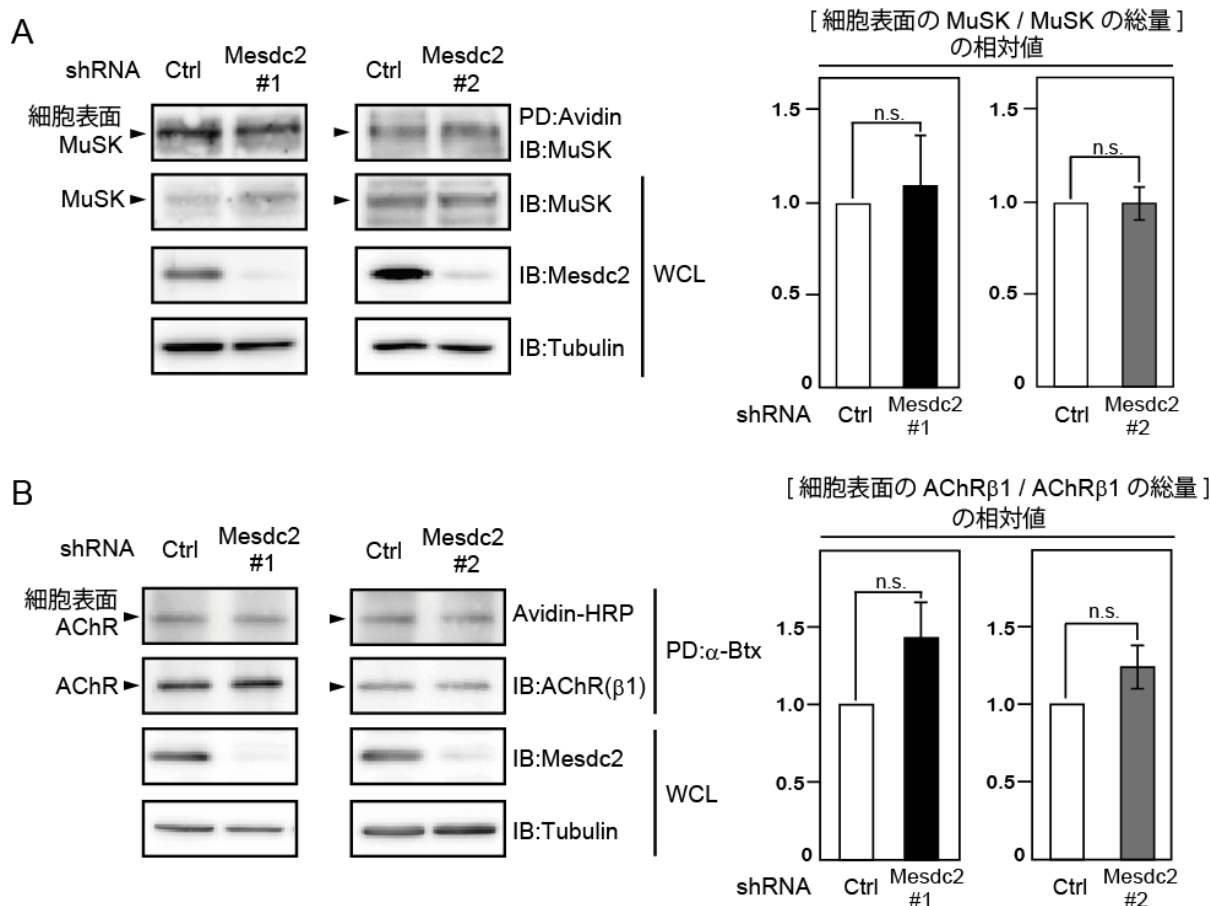


図 9. Mesdc2 の発現抑制は細胞表面の MuSK や AChR の発現に有意な影響を与えない

コントロールの shRNA、または Mesdc2 に対する shRNA を発現する C2C12 筋管細胞に対し、図 5B と同様の方法で細胞表面のタンパク質をビオチン化した。(A) WCL 中のビオチン化されたタンパク質を NeutrAvidin agarose を用いて PD した。その後、プルダウン試料及び WCL について表記の抗体を用いたウエスタンブロットを行った。「▶」はそれぞれ細胞表面上の MuSK と細胞表面に限定されない MuSK の位置を示す。グラフは WCL 中の MuSK の総量に対する細胞表面の MuSK の比率について、コントロール shRNA を発現する C2C12 細胞の値を 1.0 とした場合の、Mesdc2 に対する shRNA を発現する C2C12 細胞での平均値 (相対値) と標準誤差を示している。(n=4) 「n.s. (non-significant)」は有意差がないことを示す。(B) WCL から α-Btx-sepharose を用いて AChR を PD した。プルダウン試料及び WCL について表記の抗体を用いたウエスタンブロットを行った。更に、細胞表面の AChR (β1) については Avidin-HRP を用いて検出した。「▶」はそれぞれ細胞表面の AChR (β1) と細胞表面に限定されない AChR (β1) の位置を示す。グラフは α-Btx-sepharose を用いて PD した AChR (β1) の総量に対する細胞表面の AChR (β1) の比率について、コントロール shRNA を発現する C2C12 細胞の値を 1.0 とした場合の、Mesdc2 に対する shRNA を発現する C2C12 細胞での平均値 (相対値) と標準誤差を示している。(n≧5)

2-2 考察

Lrp4 は MuSK と複合体を形成し、運動神経から分泌される糖タンパク質である Agrin の直接の受容体として働くことにより、MuSK を活性化する (Kim *et al.* 2008, Zhang *et al.* 2008)。また、最近、Lrp4 が Agrin による MuSK の活性化とは別に、運動神経の前シナプス分化にも重要な役割を果たすことが明らかにされ、Lrp4 と運動神経上の何らかの分子との結合が予想されている (図 2, Wu *et al.* 2012, Yumoto *et al.* 2012)。これらの生理的な役割を Lrp4 が果たすためには、Lrp4 が筋管の細胞表面に発現していることが必須と考えられる。従って、本研究で発見した Mesdc2 と Lrp4 との相互作用は、個体においても、Lrp4 の筋管細胞表面における発現を促進することによって NMJ の形成や維持に重要な役割を担っていると考えられる。それ故に、NMJ の形成不全を伴う、原因遺伝子が不明な CMSs に、細胞表面での Lrp4 の発現低下を誘導するような *MESDC2* の変異を持つ症例が存在する可能性も考えられる。このように、NMJ の形成や維持における Mesdc2 機能の解明は今後の重要な課題であるが、Mesdc2 欠損マウスは胎生早期での致死性を呈するため (Hsieh *et al.* 2003)、NMJ における重要性の検討は不可能である。そのため、骨格筋特異的な Mesdc2 欠損マウスやウイルスベクターによる骨格筋特異的な Mesdc2 の発現抑制を用いた検討が必要である。

また、本研究において、私は N 結合型糖鎖修飾酵素の阻害が Mesdc2 と Lrp4 との結合に影響することなく Lrp4 の細胞表面の発現を抑制することを見出した (図 6)。これらの結果は、Lrp4 の細胞表面における発現には少なくとも、Mesdc2 と N 結合型糖鎖修飾の 2 つが重要な役割を果たすことを示唆している。そこで、私は本章での研究を発展させ、Lrp4 の N 結合型糖鎖修飾部位の同定とその機能解析を行うことにした (次章)。また、本研究では Mesdc2 がどのように Lrp4 の糖鎖修飾や細胞表面における発現を制御しているかを明らかにしていないが、序論で述べたように、Mesdc2 が YWTD- β -プロペラ構造のシャペロンとして機能するという報告や、Lrp6 の多量体形成を阻害するという知見から (Hsieh *et al.* 2003, Chen *et al.* 2011)、Lrp4 に対す

る同様の機能を想定している。

Lrp4 は NMJ の形成・維持以外に、Wnt シグナルの制御を介して骨形成や組織発生などの生理機能にも関与することが知られている (Li *et al.* 2010, Leupin *et al.* 2011)。事実、ヒトにおいて *LRP4* の病原性変異は、変異部位の違いにより CMSs でなく、腎形成不全を伴う手指の発生に異常を呈する Cenani-Lenz 症候群や、過剰な骨形成がおこる硬結性骨化症などの原因遺伝子となることが報告されている (Choi *et al.* 2009, Li *et al.* 2010 and Leupin *et al.* 2011)。これらの Lrp4 による Wnt シグナルの制御機構は骨代謝の過程においてよく解析されており、Lrp4 が Sclerostin という Wnt シグナルを負に制御するリガンドの受容体として機能することで、Wnt シグナルや骨形成を負に制御することが培養細胞を利用した解析から明らかにされてきた (Leupin *et al.* 2011)。更に、最近、Lrp4 と Sclerostin の相互作用を阻害する抗 Lrp4 抗体の投与によって骨形成が増強されることが報告され、生理的にも Lrp4 が Sclerostin の受容体として骨形成に関与することが示唆されている (Chang *et al.* 2014)。それ故に、本研究において明らかになった *Mesdc2* による Lrp4 の細胞表面の発現制御機構は、Lrp4 が関わる Wnt シグナル依存性の組織形成においても重要である可能性が高く、Cenani-Lenz 症候群や硬結性骨化症の発症の分子基盤を解明する上でも今後検討すべき課題であろう。

第 3 章

Lrp4 の糖鎖修飾による機能制御機構の解析

3-1 結果

(はじめに)

前章で述べたように、最近、原因遺伝子が不明とされた CMSs において、糖鎖修飾に関連する複数の酵素に病原性の変異が発見された。当該症例の NMJ では、後シナプス領域における AChR の発現減少と NMJ の形態異常が認められており、正常な NMJ の形成や維持には糖鎖修飾が必須の役割を持つことが予見されている。しかしながら、NMJ にて重要な役割を果たす糖鎖修飾については不明な点が多い。そこで、自身が発見した Lrp4 の糖鎖修飾が、Lrp4 による NMJ 形成シグナルの伝達に重要な役割を持つ可能性に思い至り、本章ではこの解析を実施した。

1) Lrp4 は複数の N 結合型糖鎖修飾を受ける

CMSs の原因遺伝子として新たに報告された遺伝子群の中でも *DPAGT1*、*ALG2*、*ALG14* の3つは、N 結合型糖鎖修飾に関する酵素である (Cruz *et al.* 2014)。そこで、本研究では Lrp4 に付加される N 結合型糖鎖修飾と O 結合型糖鎖修飾のうち、前者に注目し、N 結合型糖鎖修飾を受ける Asn 残基の同定を行った。通常、N 結合型糖鎖修飾を受ける Asn 残基は、Asn-X-Ser/Thr (X は Pro 以外の任意のアミノ酸残基) というコンセンサス配列中の Asn 残基であることが知られている (Moremen *et al.* 2012)。まず、重要な N 結合型糖鎖修飾のコンセンサス配列は種間で保存されていると考え、Uniprot (<http://www.uniprot.org/>) からアミノ酸配列を収集し、ClustalW2 (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2/>) を用いてヒト (Data ID : UPI0000D625E9)、マウス (Data ID : UPI0000192F98)、ラット (Data ID : UPI000035B210) の Lrp4 の細胞外領域のアラインメント解析を行った結果、Lrp4 の細胞外領域には7つのコンセンサス配列が保存されていることが分かった (図 10)。次に、これらの糖鎖修飾候補部位の Asn を Gln に置換した変異体 (NQ 変異体) を作製

し、SDS-PAGE上の泳動度の差により糖鎖修飾の有無を検討することにした。その際、日本糖鎖科学統合データベースのGlycoProtDB

(<http://jcggdb.jp/rcmg/gpdb/index.action>) において、マウス肺組織の網羅的な糖ペプチド解析によってLrp4の1415番目のAsn (Asn¹⁴¹⁵) が糖鎖修飾を受けることを示すデータが報告されていたため (Data ID: GPMMU00000630)、糖鎖修飾を評価する際のポジティブコントロールとしてAsn¹⁴¹⁵に変異を導入したLrp4を使用することにした。しかし、Lrp4全長の野生型と糖鎖修飾候補部位変異体Asn¹⁴¹⁵との

SDS-PAGE上での泳動度の差異を区別することは困難であったため、分割したLrp4

			Asn264				
hLrp4	241	GLCINAGWRC	DGADDCDDQSDER	NCT	TSMCTAEQFRCHSGRCVRLSWRC	DGEDDCADNSD	300
mLrp4	241	GLCINSWRC	DGADDCDDQSDER	NCT	TSMCTAEQFRCSRGRVRLSWRC	DGEDDCADNSD	300
rLrp4	241	GLCVNAGWRC	DGADDCDDQSDER	NCT	TSMCTAEQFRCSRGRVRLSWRC	DGEDDCADNSD	300
		.*:**:*****					
			Asn498				
hLrp4	491	RILRANL	NGS	NVEEVVSTGLES	PGGLAVDWVHDKLYWTD	SGTSRIEVANLDGAHRK	VLLW 550
mLrp4	491	RILRANL	NGS	NVEEVVSTGLES	PGGLAVDWVHDKLYWTD	SGTSRIEVANLDGAHRK	VLLW 550
rLrp4	491	RILRANL	NGS	NVEEVVSTGLES	PGGLAVDWVHDKLYWTD	SGTSRIEVANLDGAHRK	VLLW 550

			Asn719				
hLrp4	691	HPQRQPAGKNRC	GDNNGGCTHLCLPSGQ	NYT	CACPTGFRKISSHACAQSLDK	FLLFARM	750
mLrp4	691	HPQRQPAGKNRC	GDNNGGCTHLCLPSGQ	NYT	CACPTGFRKINSHACAQSLDK	FLLFARM	750
rLrp4	691	HPQRQPAGKNRC	GDNNGGCTHLCLPSGQ	NYT	CACPTGFRKINSHACAQSLDK	FLLFARM	750

			Asn901				
hLrp4	891	ASGRQVI	ISS NLT	WPNGLAIDYGSQRL	YWADAGMKTIEFAGLDGSKR	KVLI	IGSQLPHFPF 950
mLrp4	891	ASSRQVI	ISS NLT	WPNGLAIDYGSQRL	YWADAGMKTIEFAGLDGSKR	KVLI	IGSQLPHFPF 950
rLrp4	891	ASNRQVI	ISS NLT	WPNGLAIDYGSQRL	YWADAGMKTIEFAGLDGSKR	KVLI	IGSQLPHFPF 950
		.****					
			Asn1077				
hLrp4	1041	KTCSPGMNSFLIF	FARRIDIRMVSLDIPYFADVVVPI	NIT	MKNTIAIGVDPQEGKVY	WSDS	1100
mLrp4	1041	KTCSPGMNSFLIF	FARRIDVRMVSLDIPYFADVVVPI	NMT	MKNTIAIGVDPLEGKVY	WSDS	1100
rLrp4	1041	KTCSPGMNSFLIF	FARRIDVRMVSLDIPYFADVVVPI	NMT	MKNTIAIGVDPLEGKVY	WSDS	1100
		*****.******					
			Asn1415			Asn1467	
hLrp4	1411	RADL	NGS	NMETVIGRGLKTTDGLAVDWVARNLYWTD	TGRNTIEASRLDGSCRK	VLI	NNS L 1470
mLrp4	1411	RADL	NGS	NMETVIGHGLKTTDGLAVDWVARNLYWTD	TGRNTIEASRLDGSCRK	VLI	NNS L 1470
rLrp4	1411	RADL	NGS	NMETVIGHGLKTTDGLAVDWVARNLYWTD	TGRNTIEASRLDGSCRK	VLI	NNS L 1470
		*****.******					

図 10. ヒト、マウス、ラット Lrp4 は 7 つの N 結合型糖鎖修飾のコンセンサ配列を共有する。

ヒト L(h)、マウス(m)、ラット(r) Lrp4 のアミノ酸配列をデータベースより取得し、ClustalW2 を用いてアラインメント解析を行い、Asn 結合型糖鎖修飾を受ける 7 ヶ所のコンセンサ配列[Asn-X-Ser/Thr (X は Pro 以外)]を示した。数字は N 末端からのアミノ酸数を示している。「*」、「:」、「.」はそれぞれ 3 つの配列において保存されている部位、類似性の高いアミノ酸への置換が生じている部位、類似性のやや低いアミノ酸への置換が生じている部位を示す。

の細胞外領域と、Lrp4のC末端側配列（膜貫通領域近傍から細胞内領域まで）とを融合させた4種類のShort form Lrp4の発現プラスミドを作製した（図 11A）。それぞれの野生型及び糖鎖修飾候補部位の変異体をHEK293T細胞に強制発現させ、変異導入によるSDS-PAGE上の泳動度の変化によって糖鎖修飾の有無を検討した。その結果、Asn⁷¹⁹とAsn⁹⁰¹のNQ変異体、及びAsn¹⁴¹⁵とAsn¹⁴⁶⁷のNQ変異体が野生型と比較してSDS-PAGE上で早い泳動度を示したことから（図 11C, E）、少なくとも上記の4つの

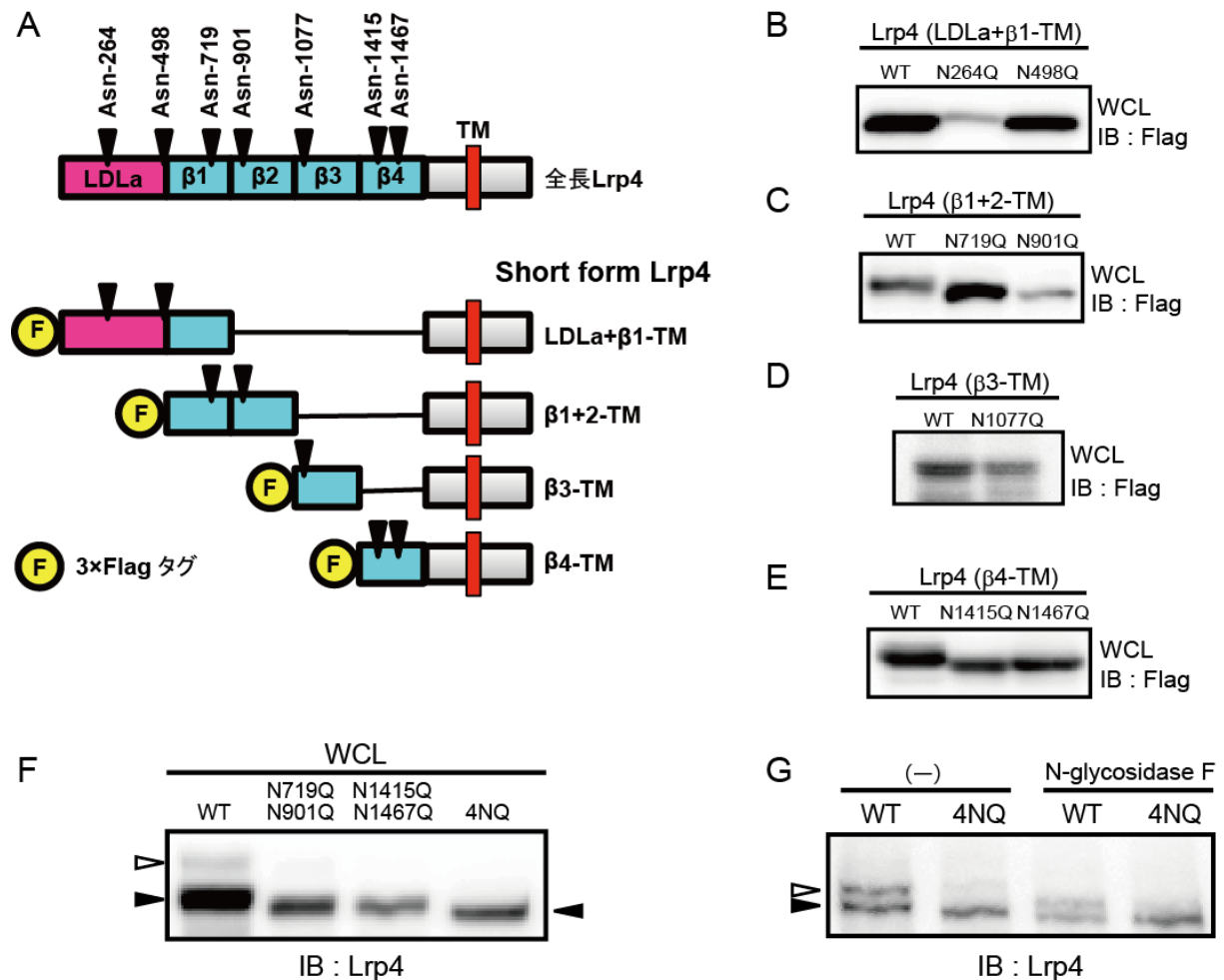


図 11. Lrp4 は少なくとも 4 箇所の N 結合型糖鎖修飾部位を持つ

(A) 全長の Lrp4 における N 結合型糖鎖修飾のコンセンサス配列中の Asn 残基の位置と、Lrp4 の部分断片の N 末側にプレプロトリプシン由来のシグナルペプチドと 3×Flag ペプチドを付加したコンストラクト (short form Lrp4)。 (LDLa : Lrp ファミリータンパク質に保存された LDL-a リピート、β1-4 : Lrp ファミリータンパク質に保存された YWTD-β プロペラ構造、TM : 膜貫通領域)。 (B-E) HEK293T 細胞に表記の short form Lrp4 の野生型及び糖鎖修飾候補部位変異体を発現させ、その WCL について抗 Flag 抗体を用いたウエスタンブロットを行った。 (F) HEK293T 細胞に全長 Lrp4 の野生型及び、多重糖鎖修飾候補部位変異体を発現させ、その WCL について抗 Lrp4 抗体を用いたウエスタンブロットを行った。「▷」と「▶」は、それぞれ Upper Lrp4 と Lower Lrp4 の位置を示す。 (G) 全長 Lrp4 の野生型及び、4 重糖鎖修飾候補部位変異体(4NQ)を過剰発現させた HEK293T 細胞の膜画分に対して N-glycosidase F の処理または未処理の試料について抗 Lrp4 抗体を用いたウエスタンブロットを行った。

Asn残基においてLrp4が糖鎖修飾を受けていることが示唆された。この結果は、上述のデータベースに報告されているAsn¹⁴¹⁵の糖鎖修飾を同定できたことから、他の糖鎖修飾候補部位も含めてLrp4の糖鎖修飾の有無を評価できていると考えられる。一方でAsn²⁶⁴、Asn⁴⁹⁸、そしてAsn¹⁰⁷⁷の3つのNQ変異体はそれぞれの野生型と同様の泳動度を示したことから、糖鎖修飾を受けていないAsn残基であることが示唆された (図 11B, D)。上述のように、全長のLrp4においては、野生型と比較して1箇所の糖鎖修飾候補部位のNQ変異体のSDS-PAGE上の泳動度の変化は非常に小さかったため、多重NQ変異体を作製して野生型との泳動度の変化を検討した。その結果、Asn^{719/901}、Asn^{1415/1467}の2種類の2重変異体及び、4箇所全てのAsnをGlnに置換した4重変異体 (4NQ) は野生型よりも早い泳動度を示した (図 11F)。更に、上記の泳動度の変化がアミノ酸置換による変化である可能性を検討するために、N結合型糖鎖修飾を除去するN-glycosidase Fを野生型と4重変異体に処理した際の泳動度を比較したが、糖鎖修飾を除去した際に、野生型と4重変異体の泳動度の差は認められなかった (図 11G)。この結果は、野生型と4重変異体の泳動度の差はN結合型の糖鎖修飾によるものであることを支持している。これらの結果をまとめると、Lrp4は719、901、1415、1467番目のAsn残基においてN結合型糖鎖修飾を受けていることが示された。

2) Lrp4 の N 結合型糖鎖修飾は Lrp4 の細胞表面における発現を促進する

前章の図 6 において、N 結合型糖鎖修飾の阻害剤である TM の処理によって、Lrp4 の細胞表面における発現が顕著に減少したことから、N 結合型糖鎖修飾が Lrp4 の細胞表面における発現に重要な役割を果たすことが示唆された。そこで、同定した4つの Asn 残基の糖鎖修飾が Lrp4 の細胞表面の発現に果たす役割を検討するために、Lrp4 の野生型及び糖鎖修飾部位変異体を HEK293T 細胞に発現させ、細胞表面の発現量を検討した。その結果、Asn⁷¹⁹、Asn¹⁴¹⁵、Asn¹⁴⁶⁷ 番目の Asn の変異体は野生型と比較して細胞表面の発現が有意に減少した (図 12A)。この結果は、複数の Asn 残基に付加される糖鎖修飾が Lrp4 の細胞表面の発現に重要な糖鎖修飾であることを示唆している。次に、多重変異体の細胞表面における発現量を検討したところ、Asn^{719/901}、Asn^{1415/1467} の 2 重変異体、そして 4 つの Asn 残基全てに変異を導入した 4 重変異体

の全ての変異体が野生型と比較して有意に細胞表面の発現量が減少した (図 12B)。これらの結果をまとめると、全ての Lrp4 の N 結合型糖鎖修飾がその細胞表面の発現に重要な役割を持つことが示された。

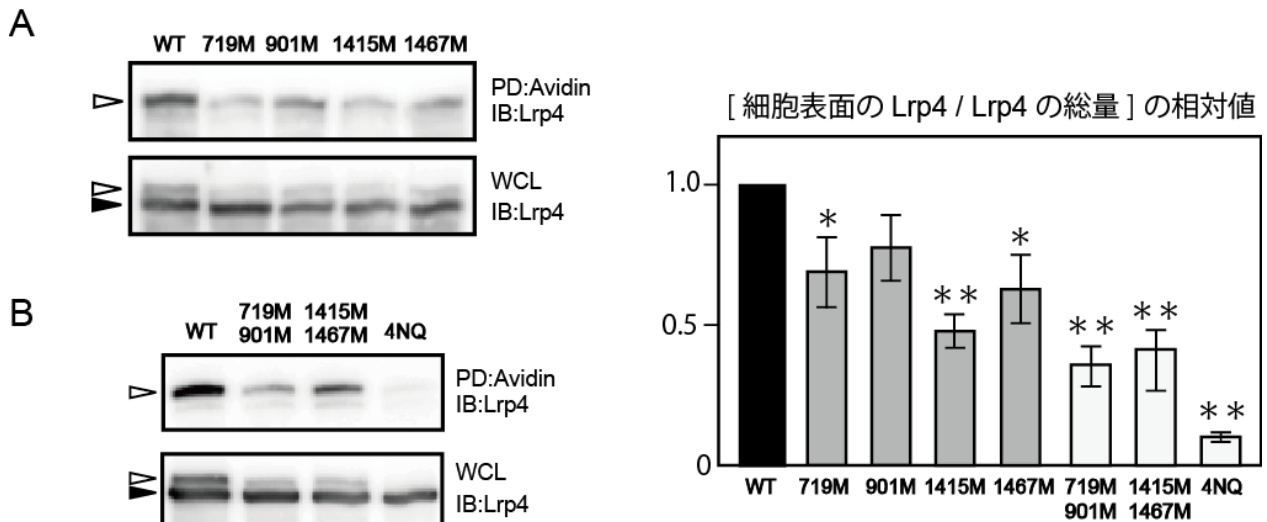


図 12. Lrp4 の糖鎖修飾は細胞表面の発現に重要である

(A、B) HEK293T 細胞に全長 Lrp4 の野生型及び、糖鎖修飾部位変異体を過剰発現させ、図 5B と同様の方法で細胞表面の Lrp4 の発現量について検討した。(A)野生型と糖鎖修飾部位個別変異体。(B)野生型と糖鎖修飾部位多重変異体。「▷」と「▶」は、それぞれ Upper Lrp4 と Lower Lrp4 の位置を示す。グラフは、WCL 中の Lrp4 の総量に対する細胞表面の Lrp4 の比率について、野生型 Lrp4 の比率を 1.0 とした場合の、糖鎖修飾部位変異体 Lrp4 での平均値 (相対値) と標準誤差を示している (n≧3、* : p<0.05、** : p<0.01)。

3-2 考察

NMJにおける糖鎖修飾については、培養筋管細胞 C2C12 に対してシアル酸を除去する酵素 Neuraminidase を処理すると、MuSK 活性化の指標である自己リン酸化及び AChR の凝集部の形成が促進されることが知られていた (Grow *et al.* 1999)。これはシアル酸が持つ負電荷の消失により、筋管細胞表面に存在するタンパク質の性質や構造の変化が起こるためであると考えられており、細胞レベルでは MuSK 依存的な NMJ 形成シグナルの伝達に糖鎖修飾が重要な役割を持つことが示唆されていた。しかし、NMJ における糖鎖修飾の生理的な意義は、その有無も含め、長い間未解明であった。そのような状況の中、近年、CMSs の中でも NMJ の形態異常を呈する複数の症例において糖鎖修飾酵素をコードする遺伝子に病原性の変異が発見され (Senderek *et al.* 2011, Belaya *et al.* 2012, Cossins *et al.* 2013)、NMJ の機能や形成・維持に重要な糖鎖修飾の解明が重要な課題となってきた。興味深いことに、当該 CMSs 患者の NMJ の後シナプス領域では、AChR の発現が減少することが報告されていることから (Belaya *et al.* 2012, Guergueltcheva *et al.* 2012)、糖鎖修飾酵素の変異によって AChR のサブユニット自身の発現、もしくは NMJ の後シナプス領域における AChR の凝集などを制御する分子が影響を受ける可能性が考えられる。実際に、AChR のサブユニットに付加される糖鎖修飾は、サブユニットの集合を制御することで AChR 複合体が細胞表面に発現する際に重要な役割を果たすことが知られている (Wanamaker *et al.* 2005)。一方で、後シナプス領域における AChR の発現や凝集の制御に重要な分子の糖鎖修飾についてはほとんど明らかになっていない。しかし、MuSK の活性化が AChR サブユニットの発現を制御することを踏まえると (Lacazette *et al.* 2003, Moore *et al.* 2001)、MuSK の活性化に必須な Lrp4 の N 結合型糖鎖修飾が、当該 CMSs の発症の一因である可能性が予測された。

本研究によって、HEK293T 細胞を用いた強制発現系ではあるものの、Lrp4 の N 結合型糖鎖修飾が Lrp4 の細胞表面における発現に重要な役割を果たすことが明らかになった。この結果は、見出した糖鎖修飾が前章で述べた Mesdc2 と同様に Lrp4

の細胞表面の発現を制御することによって NMJ の形成や維持に重要な役割を持つ可能性を示唆している。今後、Lrp4 の発現を抑制した C2C12 筋管細胞に野生型や糖鎖修飾部位変異体の Lrp4 を発現させる実験により、Lrp4 の糖鎖修飾が後シナプス分化に果たす機能について検討していく。また、本章の解析によって、前章図 6 で行った N 結合型糖鎖修飾の阻害剤 TM の処理による細胞表面の Lrp4 の発現抑制は、Lrp4 の N 結合型糖鎖修飾の欠失が一因であると予想された (図 12)。実際、WCL 中の Lrp4 は TM の濃度増加に伴い SDS-PAGE 上の泳動度が増加しており (図 6A)、TM によって Lrp4 への N 結合型糖鎖修飾の付加が阻害されていることを示している。興味深いことに、TM の標的分子は CMS の原因遺伝子である *DPAGT1* がコードするタンパク質であることが知られている (Belaya *et al.* 2012)。従って、*DPGAT1* に変異を持つ CMS 症例においては、*Dpagt1* タンパク質の発現や機能異常による Lrp4 の N 結合型糖鎖修飾の減少と細胞表面の発現低下によって、NMJ の形成や維持に必要なシグナル伝達が障害されることが当該 CMS の発症に寄与する可能性が考えられる。

N 結合型糖鎖修飾は、ER において複数の糖タンパク質とその糖タンパク質の適切なフォールディングに重要なレクチンシャペロンである Calnexin (CNX) や Calreticulin (CRT) との相互作用に重要な役割を果たすことが知られている

(Moremen *et al.* 2012 and Rudd *et al.* 2004)。興味深いことに、*Mesdc2* を同定した Lrp4 結合タンパク質の質量分析においても CNX 由来のペプチドが同定されており (Hoshi *et al.* 2013)、Lrp4 のフォールディングと CNX の関連が予想される。今後、Lrp4 の野生型や糖鎖修飾変異体と CNX、CRT との相互作用や CNX や CRT の強制発現・発現抑制が Lrp4 の細胞表面での発現に及ぼす影響について検討することにより、Lrp4 の発現制御における両シャペロンの重要性を明らかにしたい。

N 結合型糖鎖修飾にはタンパク質のフォールディングや細胞表面発現における役割だけでなく、受容体-リガンド間相互作用における役割も多く知られている (Sano *et al.* 2012)。事実、Lrp4 と結合する MuSK や Agrin はあるタイプの糖鎖修飾と相互作用するという報告も存在する (Parkhomovskiy *et al.* 2000)。NMJ の形成・維持における MuSK 活性化の必要性を踏まえると、Lrp4 の糖鎖修飾が Lrp4 と Agrin

や MuSK との相互作用に及ぼす影響を精査することは、当該糖鎖修飾の生理機能を解明する上で極めて重要な課題であろう。

第 4 章 結論

本研究により得られた結果をまとめると、以下の通りである。

- Mesdc2 は Lrp4 と結合する。
- Mesdc2 は Lrp4 の糖鎖修飾と細胞表面における発現を促進する。
- Mesdc2 は培養筋管細胞において MuSK 活性化及び後シナプス分化を促進する
- Lrp4 の N 結合型糖鎖修飾は、Lrp4 の細胞表面における発現を促進する。

本研究により、Lrp4 の細胞表面での発現を制御する機構が見出され、その制御機構が培養筋管細胞の後シナプス分化に重要であることが示された。当該制御機構は個体における Lrp4 の生理機能にも寄与することが示唆される（図 13）。

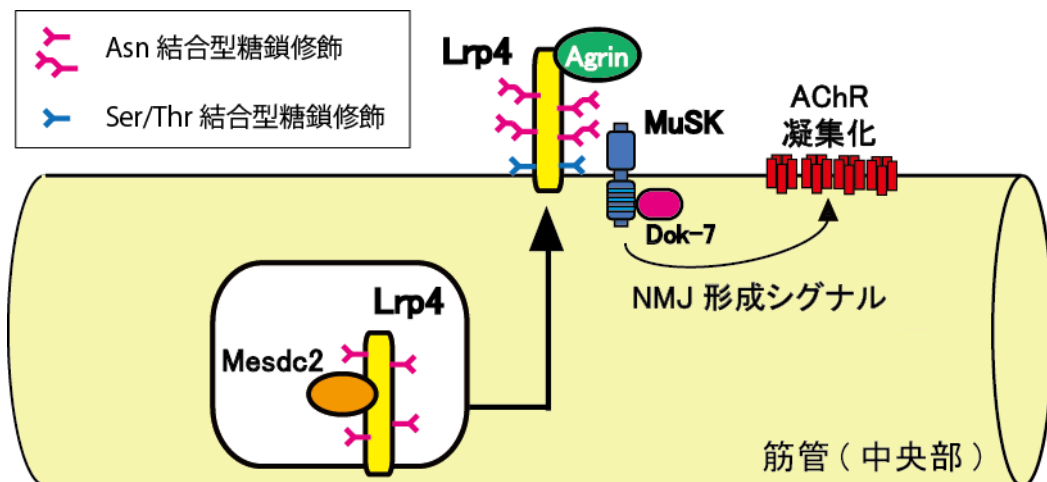


図 13. Lrp4 の細胞表面における発現制御機構の概念図

細胞表面における Lrp4 の発現は、Mesdc2 と Lrp4 に付加される N 結合型糖鎖修飾によって制御される。Mesdc2 は低分子量型の Lrp4 と相互作用し、その糖鎖修飾と細胞表面の発現を促進する。他方、Lrp4 に付加される N 結合型糖鎖修飾は、CNX や CRT などの ER に存在するレクチンシャペロン分子との相互作用を介して Lrp4 のフォールディングを制御する可能性が考えられる。Lrp4 が NMJ の形成や維持に必須の役割を果たすには、Lrp4 が筋管の細胞表面に存在することが重要であると考えられており、それ故に、本研究で見出された Lrp4 の発現制御機構は、NMJ の形成・維持に重要なシグナル伝達を制御する新たな分子基盤であることが示唆される。

第 5 章

材料と実験方法

1) 発現プラスミド DNA の構築

マウス Lrp4 タンパク質をコードする全長 cDNA は、当研究室が以前に報告したものを使用した (Higuchi *et al.* 2011)。また、Lrp4 の C 末端に Flag タグ (DYKDDDDK) を付加するために、まず pcDNA3.1-myc/His ベクター (Invitrogen 社) に Flag タグをコードする 24bp の DNA 断片を挿入した改変ベクター (pcDNA3.1-Flag) を作製し、これに上述の stop コドンを除去したマウス Lrp4 全長 cDNA を、Flag タグ配列とアミノ酸のフレームが合うようにサブクローニングした。野生型及び N/Q 糖鎖修飾部異変異体の Short form Lrp4 は pcDNA3.1-Lrp4 を鋳型として、標的とするアミノ酸配列の欠失や変異を PCR 法により導入し、p3×Flag-CMV-8 ベクター (Sigma-Aldrich 社) にサブクローニングした。用いた p3×Flag-CMV-8 ベクターは Preprotrypsin 由来のシグナルペプチドと 3 つタンデムに並んだ Flag 配列が N 末端側に融合されたタンパク質を発現させるためのベクターである。全長の Lrp4 の N/Q 糖鎖修飾部位変異体は標的とする変異を PCR 法にて導入し、pcDNA3.1-myc/His ベクターにサブクローニングした。

マウス Mesdc2 タンパク質をコードする全長 cDNA は、培養筋芽細胞 C2C12 を後述の方法により筋管へと分化させた細胞から抽出した RNA を、SuperscriptIII により逆転写して得た cDNA プールを鋳型として PCR 法により増幅し、pcDNA3.1-myc/His ベクターにクローニングした。次に、シグナルペプチドの C 末端部分に Flag タグを導入するために、上記の Mesdc2 全長 cDNA を鋳型として、PCR 法により Mesdc2 のシグナルペプチドの C 末端部分に Flag タグをコードする DNA 断片を導入し、pcDNA3.1-myc/His ベクターにサブクローニングした。Mesdc2 遺伝子発現抑制用レトロウィルスベクターは以下に示した各配列を標的とするオリゴヌクレオチドをアニーリングさせ、Puromycin 耐性遺伝子を持つ pSIREN-RetroQ (クロンテック社) に挿入して構築した。

Control shRNA : 5'-TTCTCCGAACGTGTCACGT-3'

Mesdc2 shRNA#1 : 5'-GCCTGTTGTATCTGTGTATTA-3'

Mesdc2 shRNA#2 : 5'-TTGTTTCAGTGAGTGAAGATAA-3'

2) 抗体と試薬

抗Lrp4抗体はEpitomics社で作製された、Lrp4の細胞内領域に対するウサギモノクローナル抗体を使用した。

以下の抗体は市販されている物を使用した。抗Mesdc2抗体（C22F5、ウエスタンブロットに使用、Cell Signaling Technology社；AF4545、免疫沈降に使用、R&D Systems社）、抗Flag抗体（1E6、ウエスタンブロット、及び免疫沈降に使用、和光純薬工業；M2、免疫沈降したFlag-Mesdc2のウエスタンブロット、及びLrp4結合タンパク質の質量分析用免疫沈降に使用、Sigma-Aldrich社）、抗リン酸化チロシン抗体（4G10、Millipore社）、抗 α -Tubulin抗体（DM1A、Santa Cruz社）、抗Actin抗体（I-19、Santa Cruz社）、抗MuSK抗体（AF562、ウエスタンブロットに使用、R&D Systems社；N-19・C-19、等量混合液を免疫沈降に使用、Santa Cruz社）、抗AChR β 1抗体（H-101、Santa Cruz社）、コントロールマウス IgG（Santa Cruz社）。

Tunicamycin（TM）は和光純薬工業から購入した。C2C12筋管細胞の刺激に使用したAgrinは、Lrp4への結合やMuSKの活性化に必要なC末端領域を含む約90kDaの組換えタンパク質Rat agrinをR&D Systems社から購入した。

3) 細胞培養、細胞への遺伝子導入及びレトロウイルスの感染

ヒト胎児腎細胞 HEK293T、マウス筋芽細胞 C2C12 は ATCC から購入した。レトロウイルスベクターの産生に使用したパッケージング細胞 Plat-E は東京大学・医科学研究所の北村俊雄教授から分与して頂いた（Morita *et al.* 2000）。HEK293T 及び Plat-E 細胞は、10%ウシ胎児血清（Fetal Bovine Serum：FBS）を添加したダルベッコ変法イーグル培地（Dulbecco's Modified Eagle Medium：DMEM、和光純薬工業）を用いて培養した。また、C2C12 細胞については、20%FBS を添加した DMEM で培養することにより筋芽細胞として継代維持し、低血清培地（2%ウマ血清-DMEM）中で高密度培養することにより筋管へと分化させた。具体的には、コラーゲンコートされたシャーレ上に C2C12 細胞を継代して、コンフルエントに達したことを確認した後に、低血清培地に交換し、さらに 3-5 日間培養することにより筋管細胞へ分化させた。筋管細胞への分化は細胞融合した管状の細胞形態をシャーレ全体で観察することにより確認した（Okada *et al.* 2006）。

HEK293T 細胞への遺伝子導入については、細胞を継代して一晩培養し、細胞がシャーレに接着したことを確認した後に、各種の発現プラスミドを FuGENE6 Transfection Reagent (Roche 社)、Polyethylenimine Max (Polysciences 社)、Lipofectamine 2000 (Sigma-Aldrich 社) またはリン酸カルシウム法を用いて導入した。発現プラスミドの導入後 48 時間培養した細胞を用いて、以後の解析を実施した。LC-MS/MS の際には、HEK293T 細胞に Lrp4-Flag の発現プラスミドを導入後、24 時間培養した細胞を用いて以後の解析を実施した。TM 処理の際には、発現プラスミドを導入した細胞に対して本文に記載の時間、37°C で刺激した。またレトロウィルスベクターの C2C12 細胞への感染の際には、pSIREN-RetroQ shRNA 発現ベクターを Plat-E に導入し、48 時間培養した後に培養上清を回収した。その遠心後の上清を 0.22 μ m の filter (Millipore 社) を通して、細胞の残滓を除去した後に標的細胞に加えて感染させた。8 時間の感染処理後、ウィルス溶液を除去して新鮮な培地に交換して更に一晩培養した。その後 shRNA 安定発現細胞を作製するために、1.0 μ g/ml の Puromycin を含む培地で 6 日間以上培養することで、非感染細胞を除去した。MuSK および AChR のリン酸化について検討する際には、筋管に分化させた C2C12 細胞を 100pM agrin の存在下、または非存在下で 30 分間培養した。

4) Lrp4 結合タンパク質の同定

Lrp4 結合タンパク質の同定は産業総合研究所の家村、夏目らにより確立された方法にて実施した (Iemura *et al.* 2012, Honma *et al.* 2006)。具体的には、HEK293T 細胞に Lrp4-Flag の発現プラスミドを導入し、20-24 時間後に LysisP buffer (20mM HEPES (pH 7.5), 150mM NaCl, 50mM NaF, 1mM Na₃VO₄, 0.5% digitonin 1mM MgCl₂, 5 μ g/mL aprotinin, 1mM phenylmethylsulfonyl fluoride, 5 μ g/mL leupeptin, 3 μ g/mL pepstatin A, 50mM NaF) を用いて細胞を溶解した。遠心分離により細胞の残滓を除去した細胞溶解液と、抗 Flag 抗体 (M2) を共有結合させた磁気ビーズとを 4°C で 1 時間反応させて免疫沈降を行った。磁気ビーズを洗浄後、大量の Flag ペプチドを添加することにより Lrp4-Flag と Lrp4 結合タンパク質を溶出した。溶出したタンパク質溶液を trichloroacetic acid (TCA) を用いて沈殿、濃縮し、Protease 反応液 (0.1M Tris-HCl (pH 8.8), 0.005% n-octylglucopyranoside) 中で Lysyl endopeptidase (Lys-C、和光純薬工業) を用いて 37°C で一晩切断した。上記のプロテアーゼ処理により断片化したペプチドを LC-MS/MS システムにより解析した。

5) 免疫沈降、プルダウン及びウエスタンブロット

それぞれの細胞を回収した後に、HEK293T 細胞に対しては TNE buffer [50mM Tris-HCl (pH 7.5), 150mM NaCl, 1% Nonidet P-40, 5mM EDTA, 1mM Na₃VO₄, 10mM NaF] を、C2C12 細胞に対しては Alkaline-lysis buffer [50mM Tris-HCl (pH 9.5), 1mM Na₃VO₄, 50mM NaF, 1% sodium deoxycholate, 1% Triton X-100] を用いて溶解し、遠心分離にて細胞の残滓を除去したものを細胞溶解液 (Whole cell lysates : WCL) とした。免疫沈降の際には、WCL に適切な抗体を加え、4°C で 1 時間反応させた。その後、protein-G-sepharose (GE Healthcare 社) を添加して 4°C で 1 時間反応させ、遠心分離により免疫沈降物を回収・洗浄した。また、AChR 複合体の回収には、ニコチン性 AChR α サブユニットと強固に結合するへビ毒 α -Bungarotoxin (α -Btx) を共有結合させた sepharose (α -Btx-sepharose) を使用した。具体的には、C2C12 筋管細胞の WCL と α -Btx-sepharose とを 4°C で 2 時間反応させ、免疫沈降と同様に AChR 複合体をプルダウンした。免疫沈降物、プルダウン試料、及び WCL 内のタンパク質成分は sample buffer [125mM Tris-HCl (pH 6.8), 10% 2-mercaptoethanol, 4% SDS, 10% sucrose, 0.01% bromophenol blue] にて、100°C、5 分間加熱した後に SDS-PAGE により分離し、PVDF メンブレン (Millipore 社) に転写した。そのメンブレンをブロッキング液 (1% BSA, 0.02% Triton X-100 / PBS(-)) 中で室温にて 30 分間ブロッキングした後に、適切な一次抗体を加えて、4°C で一晩反応させた。洗浄溶液 (0.02% Triton X-100 / PBS(-)) で洗浄後、一次抗体に応じた HRP 標識二次抗体を加え、室温で 1 時間反応させた。洗浄溶液で再度洗浄した後、ECL Prime (GE Healthcare 社) という HRP の基質と反応させ、酵素反応により代謝された基質の化学発光シグナルを、ImageQuant LAS 4000 mini (GE Healthcare 社) を用いて検出した。ウエスタンブロットの結果は、イメージ解析ソフト ImageQuant TL (GE Healthcare 社) を使用して定量解析した。定量データは平均値 \pm 標準誤差の形式で記載した。

6) 細胞表面タンパク質の標識と回収

シャーレ上の各種培養細胞を PBS (++) (0.5mM CaCl₂, 2mM MgCl₂ / PBS(-)) で洗浄後、アミノ基反応性の活性基を持つ細胞膜非透過性ビオチン化試薬である EZ-link Sulfo-NHS-LC-Biotin (Thermo Scientific Pierce 社) を PBS (++) 中で細

胞と反応させることにより細胞表面のタンパク質をビオチン化した。細胞をブロッキング液 (100mM Glycine / PBS (++)) で洗浄することにより、ビオチン化試薬を不活化した後に、HEK293T 細胞に対しては TNE buffer を、C2C12 細胞に対しては Alkaline-lysis buffer を用いて細胞を溶解した。得られた WCL と NeutrAvidin-agarose (Thermo Scientific Pierce 社) とを反応させることでビオチン化された細胞表面タンパク質をプルダウンし、以後の実験に使用した。

7) 膜画分の精製及び糖鎖修飾の除去

Lrp4 タンパク質の Asn 結合型及び Ser/Thr 結合型糖鎖修飾の除去は、当該酵素の製造会社である New England Biolabs 社のプロトコールに従った。具体的には、Lrp4 の発現プラスミドを導入した HEK293T 細胞の膜画分を超遠心分離により精製し (Tezuka *et al.* 1999)、TNE buffer で溶解後にタンパク質を酵素に添付の Glycoprotein Denaturing buffer (New England Biolabs 社) 中で 100°C、10 分間処理することでタンパク質の立体構造を破壊した。次に、タンパク質溶液を G7 Reaction buffer (New England Biolabs 社) 中で N-Glycosidase F、Neuraminidase 及び O-glycosidase と 37°C で 1 時間反応させて糖鎖除去試料とし、以後の実験に使用した。

8) AChR の凝集部形成アッセイ

AChR の凝集部の検出は葉室らの方法に従った (Hamuro *et al.* 2008)。具体的には、筋管に分化させた C2C12 細胞を 10pM agrin の存在下、または非存在下で 16 時間培養した。その後、Alexa 594 で標識された α -Btx (Invitrogen 社) を加え、37°C で 1 時間培養した後に 4%パラホルムアルデヒド / PBS 中で 30 分間固定した。固定したサンプルは蛍光顕微鏡 DM6000B (Leica 社) を用いて観察し、筋管 500 μ m 当たりに存在する長軸が 5 μ m 以上の AChR の凝集部を計数した (Zhang *et al.* 2008, Wang *et al.* 2010)。

9) 統計学的解析

全ての実験は独立して 3 回以上実施した。定量データは平均値 \pm 標準誤差の形式で記載し、特別な記載がない限り、paired-t test により有意性を検定した。

DNA組み換え実験の実施について

DNA組み換え実験においては関係法令を遵守し、部局（医科学研究所）の組換えDNA実験安全委員会による実験計画の事前承認のもとに行った。

第 6 章

引用文献

Andersen, O.M., Dagil, R. and Kragelund, B.B. New horizons for lipoprotein receptors: communication by β -propellers. *J. Lipid Res.* 2013;54(10):2763-2774.

Arimura, S., Okada, T., Tezuka, T., et al. Neuromuscular disease. DOK7 gene therapy benefits mouse models of diseases characterized by defects in the neuromuscular junction. *Science* 2014;345(6203):1505-1508.

Beeson, D., Higuchi, O., Palace, J., et al. Dok-7 mutations underlie a neuromuscular junction synaptopathy. *Science* 2006;313(5795):1975-1978.

Belaya, K., Finlayson, S., Cossins, J., et al. Identification of DPAGT1 as a new gene in which mutations cause a congenital myasthenic syndrome. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 2012; 1275:29-35.

Chang, M.K., Kramer, I., Huber, T., et al. Disruption of Lrp4 function by genetic deletion or pharmacological blockade increases bone mass and serum sclerostin levels. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2014;111(48):E5187-5195.

Chen, J., Liu, C.C., Li, Q., et al. Two structural and functional domains of MESD required for proper folding and trafficking of LRP5/6. *Structure* 2011;19(3):313-323.

Choi, H.Y., Dieckmann, M., Herz, J., et al. Lrp4, a novel receptor for Dickkopf 1 and sclerostin, is expressed by osteoblasts and regulates bone growth and turnover in vivo. *PLoS ONE* 2009;4(11): e7930.

Cossins, J., Belaya, K., Hicks, D., et al. Congenital myasthenic syndromes due to mutations in ALG2 and ALG14. *Brain* 2013;136(Pt 3); 944-956.

Cruz, P.M., Palace, J. and Beeson, D. Congenital myasthenic syndromes and the neuromuscular junction. *Curr. Opin. Neurol.* 2014;27(5):566-575.

Cylwik, B., Naklicki, M., Chrostek, L., et al. Congenital disorders of glycosylation.

Part I. Defects of Protein N-glycosylation. Acta. Biochem. Pol. 2013;60(2):151-161.
DeChiara, T.M., Bowen, D.C., Valenzuela, D.M., et al. The receptor tyrosine kinase MuSK is required for neuromuscular junction formation in vivo. Cell 1996;85:501-512.

Dieckmann, M., Dietrich, M.F. and Herz, J. Lipoprotein receptors--an evolutionarily ancient multifunctional receptor family. Biol.Chem. 2010;391(11):1341-1363.

Engel, A.G., Ohno, K. and Sine, S.M. Sleuthing molecular targets for neurological diseases at the neuromuscular junction. Nat. Rev. Neurosci. 2003;4:339-352.

Fuhrer, C., Sugiyama, J.E., Taylor, R.G., et al. Association of muscle specific kinase MuSK with the acetylcholine receptor in mammalian muscle. EMBO J. 1997;16(16):4951-4960.

Gautam, M., Noakes, P.G., Moscoso, L., et al. Defective neuromuscular synaptogenesis in agrin-deficient mutant mice. Cell 1996;85(4):525-535.

Gent, J. and Braakman, I. Low-density lipoprotein receptor structure and folding. Cell Mol. Life Sci. 2004;61(19-20):2461-2470.

Glass, D.J., Bowen, D.C., Stitt, T.N., et al. Agrin acts via a MuSK receptor complex. Cell 1996;85(4):513-523.

Greisingm, SM., Gransee, HM., Mantilla, CB., et al. Systems biology of skeletal muscle: fiber type as an organizing principle. Wiley Interdiscip. Rev. Syst. Biol. Med. 2012;4(5):457-73.

Grow, W.A., Ferns, M. and Gordon, H. Agrin-independent activation of the agrin signal transduction pathway. J. Neurobiol. 1999;40(3):356-365.

Guerguelcheva, V., Muller, J.S., Dusl, M., et al. Congenital myasthenic syndrome with tubular aggregates caused by GFPT1 mutations. J. Neurol. 2012;259(5):838-850.

Hamuro, J., Higuchi, O., Okada, K., et al. Mutations causing *DOK7* congenital myasthenia ablate functional motifs in Dok-7. J. Biol. Chem. 2008;283(9):5518-5524.

Hang, Q., Zhou, Y., Hou, S., et al. Asparagine-linked glycosylation of bone morphogenetic protein-2 is required for secretion and osteoblast differentiation. *Glycobiology* 2014;24(3):292-304.

Herz, J. and Marschang, P. Coaxing the LDL receptor family into the fold. *Cell* 2003;112(3):289-292.

Herz, J. The Switch on the RAPper's Necklace.... *Mol. Cell* 2006;23(4):451-455.

Higuchi, O., Hamuro, J., Motomura, M., et al. Autoantibodies to low-density lipoprotein receptor-related protein 4 in myasthenia gravis. *Ann. Neurol.* 2011;69(2):418-422.

Honma, M., Higuchi, O., Shirakata, M., et al. Dok-3 sequesters Grb2 and inhibits the Ras-Erk pathway downstream of protein-tyrosine kinases. *Genes Cells* 2006;11(2):143-151.

Hsieh, J.C., Lee, L., Zhang, L., et al. Mesd encodes an LRP5/6 chaperone essential for specification of mouse embryonic polarity. *Cell* 2003;112(3):355-367.

Iemura, S. and Natsume, T. One-by-One Sample Preparation Method for Protein Network Analysis. *Protein Interactions, InTech* 2012;15:293-310.

Inoue, A., Setoguchi, K., Matsubara, Y., et al. Dok-7 activates the muscle receptor kinase MuSK and shapes synapse formation. *Sci. Signal.* 2009;2(59):ra7.

Khan, Z., Vijayakumar, S., de la Torre, T.V., et al. Analysis of Endogenous LRP6 Function Reveals a Novel Feedback Mechanism by Which Wnt Negatively Regulates Its Receptor. *Mol. Cell Biol.* 2007;27(20):7291-7301.

Kim, N., Stiegler, A.L., Cameron, T.O., et al. Lrp4 is a receptor for Agrin and forms a complex with MuSK. *Cell* 2008;135:334-342.

Kobata, A. Glycoprotein Glycan Structures. *Comprehensive Glycoscience, From chemistry to systems Biology* 2007;1:39-72.

Koduri, V. and Blacklow, S.C. Requirement for natively unstructured regions of

mesoderm development candidate 2 in promoting low-density lipoprotein receptor-related protein 6 maturation. *Biochemistry* 2007;46(22):6570-6577.

Lacazette, E., Le Calvez, S., Gajendran, N., et al. A novel pathway for MuSK to induce key genes in neuromuscular synapse formation. *J. Cell Biol.* 2003;161(4):727–736.

Leupin, O., PETERS, E., Halleux, C., et al. Bone overgrowth-associated mutations in the LRP4 gene impair sclerostin facilitator function. *J. Biol. Chem.* 2011;286(22):19489–19500.

Li, Y., Pawlik, B., Elcioglu, N., et al. LRP4 mutations alter Wnt/betacatenin signaling and cause limb and kidney malformations in Cenani-Lenz syndrome. *Am. J. Hum. Genet.* 2010;86(5):696–706.

Lin, W., Burgess, R.W., Dominguez, B., et al. Distinct roles of nerve and muscle in postsynaptic differentiation of the neuromuscular synapse. *Nature* 2001;410(6832):1057-64.

May, P., Bock, H.H., Nimpf, J., et al. Differential glycosylation regulates processing of lipoprotein receptors by gamma-secretase. *J. Biol. Chem.* 2003;278(39):37386-37392.

McCormick, L.M., Urade, R., Arakaki, Y., et al. Independent and Cooperative Roles of N-Glycans and Molecular Chaperones in the Folding and Disulfide Bond Formation of the Low-Density Lipoprotein (LDL) Receptor-Related Protein. *Biochemistry* 2005;44(15):5794-5803.

Moore, C., Leu, M., Muller, U., et al. Induction of multiple signaling loops by MuSK during neuromuscular synapse formation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2001;98(25):14655–14660.

Moremen, K.W., Tiemeyer, M. and Nairn, A.V. (2012) Vertebrate protein glycosylation: diversity, synthesis and function. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2012;13(7):448–462.

Morita, S., Kojima, T. and Kitamura, T. Plat-E: an efficient and stable system for transient packaging of retroviruses. *Gene Ther.* 2000;7(12):1063-1066.

Ohkawara, B., Cabrera-Serrano, M., Nakata, T., et al. LRP4 third β -propeller domain mutations cause novel congenital myasthenia by compromising agrin-mediated MuSK signaling in a position-specific manner. *Hum. Mol. Genet.* 2014;23(7):1856-1868.

Ohtsubo, K. and Marth, J.D. Glycosylation in cellular mechanisms of health and disease. *Cell* 2006;126(5):855-867.

Okada, K., Inoue, A., Okada, M., et al. The muscle protein Dok-7 is essential for neuromuscular synaptogenesis. *Science* 2006;312:1802-1805.

Parkhomovskiy, N., Kammesheidt, A. and Martin, P.T. N-acetyllactosamine and the CT carbohydrate antigen mediate agrin-dependent activation of MuSK and acetylcholine receptor clustering in skeletal muscle. *Mol. Cell Neurosci.* 2000;15(4):380-397.

Rudd, P.M., Wormald, M.R. and Dwek, R.A. Sugar-mediated ligand-receptor interactions in the immune system. *Trends Biotechnol.* 2004;22(10):524–530.

Sanes, J.R. and Lichtman, J.W. Induction, assembly, maturation and maintenance of a postsynaptic apparatus. *Nat. Rev. Neurosci.* 2001;2(11):791-805.

Sano, M., Korekane, H., Ohtsubo, K., et al. N-glycans of SREC-I (scavenger receptor expressed by endothelial cells): essential role for ligand binding, trafficking and stability. *Glycobiology* 2012;22(5):714-724.

Senderek, J., Müller, J.S., Dusl, M., et al. Hexosamine biosynthetic pathway mutations cause neuromuscular transmission defect. *Am. J. Hum. Genet.* 2011;88(2):162-172.

Tezuka, T., Umemori, H., Akiyama, T., et al. PSD-95 promotes Fyn-mediated tyrosine phosphorylation of the N-methyl-D-aspartate receptor subunit NR2A. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1999;96(2):435–440.

Tezuka, T., Inoue, A., Hoshi, T., et al. The MuSK activator agrin plays an essential role for postnatal maintenance of neuromuscular synapses separately from MuSK activation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2014;111(46):16556-16561.

- Tsivgoulis, G., Dervenoulas, G., Tzartos, S.J., et al. Double seropositive myasthenia gravis with acetylcholine receptor and lipoprotein receptor-related protein 4 antibodies. *Muscle Nerve* 2014;49(6):930-931.
- Vincent, A., Bowen, J., Newsom-Davis, J., et al. Seronegative generalised myasthenia gravis: clinical features, antibodies, and their targets. *Lancet Neurol.* 2003;2:99-106.
- Wanamaker, C.P. and Green, W.N. N-linked glycosylation is required for nicotinic receptor assembly but not for subunit associations with calnexin. *J. Biol. Chem.* 2005;280(40):33800-33810.
- Wang, J., Fu, X.Q., Lei, W.L., et al. Nuclear factor kappaB controls acetylcholine receptor clustering at the neuromuscular junction. *J. Neurosci.* 2010;30(33):11104-11113.
- Weatherbee, S.D., Anderson, K.V., Niswander, L.A., et al. LDL-receptor-related protein 4 is crucial for formation of the neuromuscular junction. *Development* 2006;133(24):4993-5000.
- Willnow, T.E., Rohlmann, A., Horton, J., et al. RAP, a specialized chaperone, prevents ligand-induced ER retention and degradation of LDL receptor-related endocytic receptors. *EMBO J.* 1996;15(11):2632-2639.
- Wu, H., Lu, Y., Shen, C., et al. Distinct roles of muscle and motoneuron LRP4 in neuromuscular junction formation. *Neuron* 2012;75(1):94-107.
- Yang, X., Arber, S., William, C., et al. Patterning of muscle acetylcholine receptor gene expression in the absence of motor innervation. *Neuron.* 2001;30(2):399-410.
- Yumoto, N., Kim, N. and Burden, S.J. Lrp4 is a retrograde signal for presynaptic differentiation at neuromuscular synapses. *Nature* 2012;489(7416):438-442.
- Zhang, B., Luo, S., Wang, Q., et al. LRP4 serves as a coreceptor of agrin. *Neuron* 2008;60:285-297.
- Zhang, W., Coldefy, A.S., Hubbard, S.R., et al. Agrin binds to the N-terminal

region of Lrp4 protein and stimulates association between Lrp4 and the first immunoglobulin-like domain in muscle-specific kinase (MuSK). *J. Biol. Chem.* 2011;286(47):40624-40630.

Zoltowska, K., Webster, R., Finlayson, S., et al. Mutations in GFPT1 that underlie limb-girdle congenital myasthenic syndrome result in reduced cell-surface expression of muscle AChR. *Hum. Mol. Genet.* 2013;22(14):2905-2913.

第 2 章は以下の論文として公表した。

Taisuke Hoshi, Tohru Tezuka, Kazumasa Yokoyama, Shun-ichiro Iemura, Tohru Natsume, Yuji Yamanashi. Mesdc2 plays a key role in cell-surface expression of Lrp4 and postsynaptic specialization in myotubes. *FEBS Lett.* 2013;587(23):3749-54.

略語一覽

ACh : acetylcholine

AChR : ACh receptor

ALG2 : asparagine-linked glycosylation 2 homolog
(alpha-1,3/1,6-mannosyltransferase)

ALG14 : asparagine-linked glycosylation 14 homolog
(UDP-N-acetylglucosaminyltransferase subunit)

α -Btx : α -bungarotoxin

CDG : congenital disorders of glycosylation

CMSs : congenital myasthenic syndromes

CNX : calnexin

CRT : calreticulin

Dok-7 : downstream of tyrosine kinases-7

DPAGT1 : dolichyl-phosphate (UDP-N-acetylglucosamine)

N-acetylglucosaminephosphotransferase 1

ER : endoplasmic reticulum

GFPT1 : glutamine–fructose-6-phosphate transaminase 1

IB : Immunoblot

IP : Immunoprecipitation

LC–MS/MS : liquid chromatography–tandem mass spectrometry

Lrp : low-density lipoprotein receptor-related protein

Lrpap1 :Lrp-associated protein 1

Mesdc2 : mesoderm development candidate 2

MG : myasthenia gravis

MuSK : muscle-specific kinase

NMJ : neuromuscular junction

PD : Pull-down

TM : tunicamycin;

WCL : Whole cell lysates

謝辞

本研究を進めるにあたり、本当に多くの方々に御世話になりました。ここに深く感謝の意を表します。

本研究活動全般にわたり格別なる御指導と御高配を賜りました指導教官である東京大学医科学研究所 腫瘍抑制分野 教授 山梨 裕司先生に深く感謝しております。私の成長に辛抱強く付き合ってくれ、本当にありがとうございました。先生のご指導を糧に今後も努力を続けて参ります。

本論文の主査 本学分子細胞情報分野 教授 斎藤 春雄先生、及び副査発生・再生研究分野 教授 宮島 篤先生、飯野研究室 教授 飯野 雄一先生、分子シグナル制御分野 教授 武川 睦寛先生には博士論文審査会におきまして多大なるご助言を賜りました、深く感謝申し上げます。

本研究の Lrp4 結合分子の探索におきましては、多大なる御支援と御指導を賜りました産業総合研究所細胞システム制御解析チーム（当時）の夏目 徹先生、家村 俊一郎先生には深く感謝しております。

本研究の進行にわたり、多大なる御支援、御指導を賜りました腫瘍抑制分野 助教 手塚 徹先生には深く感謝しております。約 4 年間にわたり日々の研究を御指導頂き、先生の懇親なご支援に何度も助けていただきました、心より感謝申し上げます。研究の基礎から心構えまでを直接御指導頂きました、腫瘍抑制分野 元准教授（現：国立病院機構長崎川棚医療センター臨床研究部免疫ゲノム医化学研究室）樋口 理先生、腫瘍抑制分野 元助教（現：武田薬品工業）横山 一剛先生、菱田 幸宏博士に深く感謝しております。研究だけでなく多岐に渡り、多くの御助言を賜りました腫瘍抑制分野 助教 有村 純暢先生、植田 亮先生に深く感謝しております。

学生生活におきましては、幸いにも多数の友人、後輩たちとの出会いに恵まれ、大いなる刺激を頂きました。特に、腫瘍抑制分野での博士課程の3年間、共に過ごし、多くの面で励まし合い、研究を通じての活発な議論や切磋琢磨し合った早稲田 真澄氏、梶川 修平氏、三好 貞徳君には深く感謝しております。また、博士課程在学中、江口 貴大君、本田 充君、佐々木 優貴さん、井澤 洋介君、菅野 達央君、鬼頭 美早さん、如澤 浩樹君、行村 隆志君達の存在が、研究を進めていく上で大きな励みになったことをここに記すと共に、心より感謝申し上げます。そして、修士課程進学時から現在まで温かく見守っていただきました腫瘍抑制分野 秘書 横田 奈美様、技術補佐員 銭林 美香様には心より感謝申し上げます。共に過ごした日々が有意義であったと、将来語り合えることを楽しみにしております。

最後に、博士課程に進学する機会を与えてくださり、これまでありとあらゆる場面で私を温かく見守り続けてくれた両親、妹、祖父母に心より感謝いたします。