

論文内容の要旨

論文題目

Lrp4 の翻訳後制御機構の解析

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

氏名 星 太輔

[序論]

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に必須のシナプスである神経筋接合部 (neuromuscular junction : NMJ) の形成や維持に重要な役割を果たすことがよく知られており、他方、Wnt シグナルを介して骨や手指などの適切な組織形成においても重要な役割を果たすことが知られている。

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 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惹起される。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、こ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ことが知られている。この 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 MuSK が必須であり、Lrp4 は MuSK と複合体を形成することによって、MuSK の活性化に必須な役割を果たすことが知られている。更に、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、NMJ 形成における Lrp4 の重要な機能が明らかにされてきた。しかしながら、これらの生理機能を果たすためには 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 自身の機能や発現を制御する分子機構に関してはほとんど明らかにされてこなかった。そこで、本研究では、Lrp4 が酵素活性を持たない受容体型分子で、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、NMJ 形成における Lrp4 の機能制御機構の解明を目的とした。まず、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、Mesdc2 という新規の Lrp4 結合分子を同定した。そして、Mesdc2 と Lrp4 の相互作用の意義の解析と、その解析を通して新たに発見した Lrp4 の糖鎖修飾が Lrp4 の発現や機能に与える影響について解析を行い、以下の知見を得た。

[方法・結果]

1. Mesdc2 は Lrp4 の細胞表面における発現を促進する

Lrp4 は約 250kDa の非常に巨大な受容体型分子であるが、既知の酵素活性ドメインを持たないこと、更に既知の Lrp4 の機能は他タンパク質との相互作用を介して発揮されていることから、Lrp4 の機能や発現を制御するような新規の Lrp4 結合分子をプロテオミクスの手法により探索し、新規 Lrp4 結合分子 Mesdc2 を同定した。まず、Lrp4 と Mesdc2 との相互作用について確認する実験を行った結果、Mesdc2 は Asn 結合型 (N 結合型) 糖鎖修飾を受けている低分子量型 Lrp4 (Lower Lrp4) と、N 結合型と Ser/Thr 結合型 (O 結合型) の両者の糖鎖修飾を受けている高分子量型 Lrp4 (Upper Lrp4) のうち、Lower Lrp4 と特異的に結合し、Upper Lrp4 を増加することが明らかになった。その後の解析により、Upper Lrp4 の一部または全部が細胞表面の Lrp4 であることが示唆されたため、Mesdc2 による Lrp4 の HEK293T 細胞表面での発現に及ぼす影響を検討したところ、Mesdc2 は有意にその発現を促進することが明らかになった。

2. 培養筋管細胞において Mesdc2 は Lrp4 の細胞表面での発現を促進し、Lrp4 の下流シグナル活性化に重要な役割を果たす

序論で述べたように Lrp4 は MuSK と複合体を形成することにより、MuSK の活性化、ひいては MuSK 依存的な NMJ の後シナプス分化に必須の役割を担っている。そこで、NMJ 形成過程において Mesdc2 が Lrp4 と相互作用し、細胞表面での発現を促進することによって、MuSK の活性化及び MuSK 依存的な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、分化誘導後には MuSK の活性化により AChR の凝集が促進されることから、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、NMJの後シナプス分化における Mesdc2 の役割を検討するために、C2C12筋管細胞において Mesdc2 の発現を抑制したところ、顕著に細胞表面の Lrp4 の発現量が減少した。次に、Mesdc2 の発現抑制による Lrp4 の機能への影響を検討するために、MuSK の活性化状態を Mesdc2 の発現抑制細胞において検討した。その結果、Mesdc2 の発現抑制細胞において、MuSK の自己リン酸化及び、MuSK の活性化に伴いリン酸化されることが知られている AChR のリン酸化レベルが減少していた。さらに、MuSK 依存的に起こる後シナプス分化（AChR の凝集）についても Mesdc2 の発現抑制によって有意に低下した。これらの結果は、Mesdc2 が細胞表面 Lrp4 の発現を制御することによって、MuSK の活性化については MuSK 依存的な後シナプス分化を制御することを示している。

3. Lrp4 の糖鎖修飾は、Lrp4 の細胞表面の発現に重要な役割を担う

興味深いことに、最近、NMJ の遺伝性疾患である先天性筋無力症候群（CMS）の中でも、NMJ の形態異常を呈する複数の症例において、糖鎖修飾に関する酵素をコードする遺伝子に病原性の変異が発見された。この知見は、NMJ の形成・維持やその機能に糖鎖修飾が重要であることを示唆しているが、その分子基盤はほとんど分かっていなかった。そこで、自身が発見した Lrp4 の糖鎖修飾が、Lrp4 の機能については NMJ の形成・維持や機能に重要な役割を果たし、その欠損が上記の CMS 発症の一因である可能性に思い至り、当該糖鎖修飾の解析を進めてきた。その結果、糖鎖修飾候補部位変異体の強制発現実験により、Lrp4 が複数の糖鎖修飾部位を持ち、その糖鎖修飾が Lrp4 の細胞表面における発現を制御することを見出した。

[結論]

本研究では、これまでに NMJ における機能解析が進められてきたものの、それ自身の機能を発揮するために重要と考えられる細胞表面での発現制御機構については解明されてこなかった Lrp4 に着目し、その細胞表面における発現に Mesdc2 と糖鎖修飾が重要な役割を果たすことを発見した。更に、本研究で見出された Lrp4 の細胞表面への発現を制御する機構は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、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た。