

# 博士論文

運動ニューロンによる骨格筋支配における  
CLAC-P/Collagen type XXVの機能解明

大泉 寛明

# 目次

---

## 第 I 章 序論

I-1 アルツハイマー病と老人斑	5
I-2 CLAC-P/Collagen type XXV の同定	6
I-3 CLAC-P が AD 病態に与える影響	7
I-4 MACIT ファミリーの生理機能	8
I-5 CLAC-P の生理機能	9
I-5-1 <i>In vitro</i> における CLAC-P/sCLAC と細胞外マトリックス分子との相互作用	9
I-5-2 <i>Col25a1</i> KO マウスの表現型	10
I-5-3 ヒト神経筋支配における CLAC-P の機能	12
I-6 標的骨格筋内における運動ニューロン軸索発達のメカニズム	13
I-7 本研究の目的	15

## 第 II 章 結果

II-1 CLAC-P mRNA の発現解析	16
II-2 <i>Col25a1<sup>fllox</sup></i> マウスの作製	16
II-3 Cre リコンビナーゼの発現確認	17
II-4 <i>Hb9-Cre; Col25a1<sup>fllox/fllox</sup></i> マウスの表現型解析	18
II-5 <i>HSA-Cre; Col25a1<sup>fllox/fllox</sup></i> マウスの表現型解析	19
II-6 リコンビナント sCLAC が運動ニューロンの生存と軸索発達に与える影響の解析	19
II-6-1 sCLAC が培養運動ニューロンの生存性に与える影響の解析	20
II-6-2 sCLAC が培養運動ニューロンの神経突起伸長に与える影響の解析	20
II-7 CLAC-P 発現 HEK293 細胞と運動ニューロン軸索との相互作用の解析	20
II-8 CLAC-P RAmT 発現細胞と運動ニューロン軸索との相互作用の解析	21
II-9 ゼブラフィッシュを用いた CLAC-P の機能解明	22
II-9-1 ゼブラフィッシュにおける CLAC-P mRNA の発現解析	22
II-9-2 モルフォリノによるゼブラフィッシュ <i>Col25a1</i> 遺伝子ノックダウン実験	23

### 第 III 章 考察

III-1 運動ニューロン軸索の投射過程における軸索-標的組織間の相互作用と、CLAC-P 機能の位置づけ	25
III-2 CLAC-P が運動ニューロンの軸索発達ならびに生存に果たす役割	28
III-3 CLAC-P/sCLAC の相互作用分子	31
III-4 CLAC-P の furin 切断の意義	33
III-5 ゼブラフィッシュの運動ニューロン軸索発達における CLAC-P の機能	34
III-6 今後の展望	35

### 第 IV 章 方法

IV-1 実験動物	37
IV-2 マウスの遺伝子型の決定	38
IV-3 C2C12 細胞の培養と分化誘導	39
IV-4 C2C12 細胞における <i>in situ</i> hybridization	39
IV-5 Col25a1 flox マウス targeting construct の作製	40
IV-6 ES 細胞からのゲノム DNA 抽出	42
IV-7 サザンブロッティング	42
IV-8 PCR 法による ES 細胞の遺伝子型決定	42
IV-9 横隔膜の whole mount 蛍光染色	43
IV-10 凍結切片の作製	44
IV-11 抗 Islet1/2 抗体および抗 GFP 抗体による共免疫染色	44
IV-12 抗 MyHC 抗体と抗 GFP 抗体による共免疫染色、および抗 ChAT 抗体による免疫 染色	44
IV-13 脊髄前角運動ニューロン細胞体数の計測	45
IV-14 運動ニューロンの初代培養	45
IV-15 リコンビナント sCLAC-FLAG の精製	45
IV-16 精製 sCLAC 添加時の運動ニューロン生存率の測定	46
IV-17 精製 sCLAC コーティング時の運動ニューロン軸索長の測定	46
IV-18 脊髄前角 explant と HEK293 細胞との共培養	47
IV-19 脊髄前角 explant-HEK293 細胞共培養の免疫染色と軸索集簇の定量	47
IV-20 HEK293 細胞における表面ビオチン化実験とウエスタンブロッティング	48
IV-21 CLAC-P および CLAC-P RAmt 発現 HEK293 細胞の免疫染色	49
IV-22 ゼブラフィッシュにおける whole mount <i>in situ</i> hybridization	49
IV-23 ゼブラフィッシュのパラフィン切片作製	50

IV-24	モルフォリノを用いたノックダウン実験と運動ニューロン軸索伸長の観察	50
IV-25	ゼブラフィッシュ胚からの mRNA 抽出と定量	51
第 V 章 参考文献		53
第 VI 章 図表		

## 本論文中における主な略語

AD: Alzheimer's disease

A $\beta$ : amyloid  $\beta$

CLAC: collagenous Alzheimer amyloid plaque component

CLAC-P: CLAC-precursor

sCLAC: soluble CLAC

CSPG: chondroitin sulfate proteoglycan

HSPG: heparan sulfate proteoglycan

RPTP: receptor protein tyrosine phosphatase

# I 序論

---

## I-1 アルツハイマー病と老人斑

アルツハイマー病 (Alzheimer's disease : AD) は高齢者の認知症の原因として最も頻度が高く、記憶障害、見当識障害、判断力の低下を主症状とする進行性の神経変性疾患である。AD 患者脳では大脳皮質を中心に神経細胞の広汎な脱落が認められ、病理学的特徴として、細胞外の老人斑と神経細胞内の神経原線維変化と呼ばれる 2 種類の異常構造物が蓄積することが知られている。老人斑はアミロイド $\beta$  (Amyloid  $\beta$ : A $\beta$ ) と呼ばれる 4 kDa のタンパク質を主成分としたアミロイド線維からなる。一方、神経原線維変化は高度にリン酸化された tau タンパク質を主成分とした細胞内封入体である。

このうち、老人斑は AD 患者において最初期に認められ、かつ AD に特異性の高い病理学的特徴である点、家族性 AD 患者の遺伝子変異がいずれも A $\beta$ の質的あるいは量的な変化を引き起こして A $\beta$ の凝集性を促進する点から、A $\beta$ が線維化し、アミロイドとして蓄積することが AD 発症メカニズムの最上流に位置すると考える「アミロイド仮説」が提唱され、広く支持されている (Selkoe, 1991; Hardy and Higgins, 1992; Hardy and Selkoe, 2002)。

一方、老人斑には A $\beta$ 以外に様々な非アミロイド成分が蓄積し、それらの構成分子も A $\beta$ と相互作用することでアミロイド蓄積と AD 発症に関与する可能性が示されている。特に、AD 患者脳老人斑に蓄積し、高い親和性で A $\beta$ と結合する apoE の例が代表的である。ヒト apoE には $\epsilon$ 2、3、4 の 3 種の遺伝子多型が存在するが、このうち $\epsilon$ 4 のアレル頻度は健常者では約 15%にとどまるのに対し、AD 患者においては $\epsilon$ 4 アレルの保有率が約 50%にのぼることが分かり、apoE  $\epsilon$ 4 アレルは AD の強力な遺伝的危険因子であると考えられている (Namba *et al.*, 1991; Strittmatter *et al.*, 1993)。ApoE  $\epsilon$ 4 アレルが AD 発症のリスクを上昇するメカニズムについては現在までに統一の見解は得られていないが、AD モデルマウスにおいて apoE 遺伝子をノックアウト (KO) するとアミロイド斑が減少し、さらに同マウスにヒト apoE  $\epsilon$ 2、3、4 をそれぞれ発現させると $\epsilon$ 4 アレルの発現下にて最も多くのアミロイド斑が認められることから (Holtzman *et al.*, 2000; Fagan *et al.*, 2002)、apoE  $\epsilon$ 4 アレルはアミロイド蓄積に対して促進的に働くと考えられている。このように、老人斑に蓄積する非 A $\beta$ 成分が AD 病態形成に強く関与する例が見出されたことから、当研究室においてアルツハイマー病患者脳に蓄積する老人斑の

構成因子として、A $\beta$ の線維化、蓄積に影響を与えうる新規の非 A $\beta$ 老人斑構成成分の探索がなされた。

## I-2 CLAC-P/Collagen type XXV の同定

当研究室においてAD脳のアミロイド画分を抗原としてマウスモノクローナル抗体が作出され、AD脳老人斑を認識するクローンのスクリーニングにより9D2抗体が得られた。9D2抗体は老人斑を特異的に染色し(図表1)、AD脳のアミロイド画分に対するウェスタンブロットでおよそ50 kDaと100 kDaの付近に2本のバンドを検出した。続いて、9D2抗原タンパク質の精製・アミノ酸配列の解析が行われるとともに、抗原タンパク質の全長cDNAがクローニングされた。9D2抗体が認識する老人斑構成タンパク質はCLAC (Collagenous Alzheimer amyloid plaque component)、全長cDNAによりコードされるCLACの前駆体タンパク質はCLAC-P (CLAC precursor)と命名された (Hashimoto *et al.*, 2002)。ヒトCLAC-Pは654アミノ酸からなるII型の細胞膜1回貫通型タンパク質であり、3残基おきにグリシン残基が繰り返されるG-X-Yリピート配列からなるコラーゲン領域を3か所(COL1-3)、それらを分断する非コラーゲン領域を4か所持つ(NC1-4)(図表2)。ヒトにおいては総長468アミノ酸に及ぶコラーゲン領域を有し、プロテアーゼに対して安定な3重らせんを形成する構造上の特徴から、CLAC-Pはコラーゲン分子に分類され、Collagen type XXVとも呼ばれる。CLAC-Pはコラーゲンファミリーの中でも細胞膜貫通型というユニークな構造を有しており、membrane associated collagen with interrupted triple helices (MACIT)ファミリーに分類される。MACITファミリーにはCLAC-Pの他に、Collagen XIII、Collagen XVIIおよびCollagen XXIIIが属する(後述)。CLAC-Pは細胞膜近傍にfurin認識配列を有し、ヒトでは112番のアルギニンと113番のグルタミン酸の間で切断を受け、細胞外領域がsoluble CLAC (sCLAC)として分泌されることが培養細胞系で確認されている (Hashimoto *et al.*, 2002)。また、AD脳老人斑に蓄積するCLACも113番のグルタミン酸で開始しており、CLAC-Pのfurin切断産物であると考えられ、*in vivo*においてもCLAC-Pはfurinによる切断を受けて分泌されることが分かっている。CLAC-Pの発現パターンについては、CLAC-P mRNAは成体マウスでは神経系に特異的に発現し、マウス胎児脳由来の初代培養細胞を用いた発現解析により神経細胞に特異的な発現が確認されている (Hashimoto *et al.*, 2002)。

### I-3 CLAC-P が AD 病態に与える影響

CLAC の老人斑への蓄積パターンについては、線維性の低い老人斑であるびまん性老人斑とは CLAC は共局在しないものの (図表 1)、老人斑の成熟に伴い老人斑への CLAC 蓄積が観察されることが明らかとなっている (Kowa *et al.*, 2004)。さらに、CLAC は A $\beta$ 陽性斑のおよそ 60%の領域で陽性であるが、 $\beta$ シート構造に富み線維性の高いである Thioflavin S (ThioS) 陽性のアミロイドや、脳血管アミロイドとはほとんど共局在しないことが分かっている。このように、CLAC は AD 病理の比較的早い段階から老人斑への蓄積を開始し、その蓄積はある一定程度の線維性をもつアミロイドに局限するという、特徴的な蓄積パターンを示す。

*In vitro* においては、sCLAC は線維化した A $\beta$ に特異的に結合すること (Hashimoto *et al.*, 2002)、sCLAC と A $\beta$ 線維との結合には sCLAC が 3 重らせん構造を取ることが必須であること、その結合は COL1 領域の塩基性アミノ酸クラスターを介した静電相互作用であること、結合により A $\beta$ の線維形成過程のうち A $\beta$ 線維の伸長過程を阻害することが明らかとなっている (Osada *et al.*, 2005)

さらに、CLAC が A $\beta$ 蓄積に与える影響を *in vivo* において評価するため、当研究室において *Thy1.2* プロモーターにより神経細胞特異的に CLAC-P を過剰発現する *Thy1-CLAC-P* トランスジェニック (Tg) マウスが作出された。AD モデルマウスと *Thy1-CLAC-P* Tg マウスを交配したマウスでは、通常の AD モデルマウスに比してアミロイド斑の出現時期は変わらないものの個々のアミロイド斑面積が小さく、びまん性のアミロイド斑が減少し、ThioS 陽性のコアを持った線維性の高い斑が増加した (藤井大資修士論文)。このことから、CLAC は *in vivo* においてアミロイド斑の成熟と線維性の上昇を促進する可能性が示唆された。sCLAC が *in vitro* においては A $\beta$ の線維化に抑制的に機能する事実とこれらの *in vivo* の結果を考え合わせると、CLAC は A $\beta$ 線維に結合してその線維性を直接的に促進するのではなく、CLAC の結合により A $\beta$ 線維の解離あるいは分解が抑制され、結果的に *in vivo* におけるアミロイド斑の成熟が促進する可能性が考えられる。



#### I-4 MACIT ファミリーの生理機能

前述のとおり、MACIT ファミリーに属するコラーゲンとして CLAC-P のほかに Collagen XIII、XVII、XXIII が同定されているが、現在までにもっとも詳細な研究が行われているのは水疱性皮膚障害をきたす自己免疫疾患である水疱性類天疱瘡 (Bullous pemphigoid: BP) 関連分子として同定された Collagen type XVII (Col XVII) である。BP は基底膜と表皮基底膜細胞層との細胞接着装置であるヘミデスモソームが自己抗体により障害されることが原因で発症するが、Col XVII/BP180 はこの自己抗体の主要な抗原タンパク質の1つとして同定された。(Diaz *et al.*, 1990; Diaz *et al.*, 1991; Giudice *et al.*, 1992)。Col XVII は細胞外で laminin 332 や Collagen IV などの細胞外マトリックス分子と、細胞内外で  $\alpha_6\beta_4$  integrin と *in cis* に結合することでヘミデスモソームを構成して細胞接着分子として機能することが知られており (Hopkinson *et al.*, 1995; Koster *et al.*, 2003; Tasanen *et al.*, 2004; Nishie *et al.*, 2011; Nishie 2014)、Col XVII に対する自己抗体は補体を介した炎症を惹起して Col XVII の分解を引き起こすことで BP を発症すると考えられている (Nishie 2014)。また Col XVII の遺伝子変異により先天性表皮水疱症を発症することも知られる (Floeth *et al.*, 1998)。他の MACIT ファミリー分子と同様に Col XVII は細胞膜近傍 (NC16 内部) で切断されることが知られており、その切断は主として ADAM9/10 によることが明らかになっているが、切断の機能的意義については統一的な見解は得られていない (Franzke *et al.*, 2009; Nishie 2014)。

Collagen type XIII (Col XIII) は CLAC-P と最も構造が類似しており、NC 領域におけるアミノ酸レベルの相同性が NC3 領域で 55%、NC4 領域で 72% と高い (図表 3)。Col XIII は眼組織や神経細胞、筋などを含む様々な組織で発現が認められており (Sandberg-Lall *et al.*, 2000; Sund *et al.*, 2001; Hagg *et al.*, 2001)、細胞間あるいは細胞と細胞外マトリックスの接着部分に局在が見られることから、細胞間接着分子として機能する可能性が示唆されている (Peltonen *et al.*, 1999)。COL2 領域の一部を欠損した Col XIII を過剰発現したマウスでは心筋と胎盤における接着結合の異常や血管形成不全をきたし、胎生致死となる (Sund *et al.*, 2001)。さらに Col XIII は NMJ の synaptic cleft にも存在し、内因性 Col XIII を欠損したマウスでは出生後の NMJ のプレシナプスおよびポストシナプスの成熟不全をきたした (Latvanlehto *et al.*, 2010)。これらの結果から、Col XIII は特に心筋や骨格筋に発現し、細胞接着分子として機能すると考えられる。

Collagen type XXIII (Col XXIII) も CLAC-P と相同性が高く、Col XXIII の NC2 領域と NC4 領域は CLAC-P NC3 領域、NC4 領域とアミノ酸レベルでそれぞれ 43%、72% の相同性を有する (図表 3)。Col XXIII はラット転移性前立腺癌細胞において mRNA 発現が上昇している分子として同定され (Banyard *et al.*, 2003)、正常組織では肺、角膜、脳、皮膚、腱、腎臓に mRNA が発現し (Koch *et al.*, 2006)、*in vitro* において  $\alpha_2\beta_1$  integrin と結合することが示されているが (Veit *et al.*, 2011)、その詳しい生理機能については不明である。

## I-5 CLAC-P の生理機能

### I-5-1 *In vitro* における CLAC-P/sCLAC と細胞外マトリックス分子との相互作用

コラーゲンファミリーに属する CLAC-P と相互作用する分子として、コラーゲンの受容体として知られる integrin  $\alpha_1\beta_1$ 、 $\alpha_2\beta_1$ 、 $\alpha_{11}\beta_1$  が想定され、リコンビナントタンパク質を用いた結合アッセイが行われた。インテグリンは基質認識を担う  $\alpha$  サブユニットと下流のシグナル伝達を担う  $\beta$  サブユニットからなるヘテロ 2 量体である。各  $\alpha$  サブユニットの I (inserted) ドメインの GST 融合リコンビナントタンパク質と精製 sCLAC との結合を比較したところ、いずれの  $\alpha$  サブユニットにおいても結合が認められ、中でも  $\alpha_{11}$  で最も強い結合が確認された (若林朋子博士論文)。また、sCLAC は細胞外マトリックスに豊富に存在するグリコサミノグリカンとも相互作用することが分かっている。*in vitro* における結合評価実験の結果、ヘパラン硫酸とコンドロイチン硫酸、ヒアルロン酸のうち、sCLAC はヘパラン硫酸およびコンドロイチン硫酸と結合し、特にヘパラン硫酸と最も強く結合することが明らかとなっている (若林朋子博士論文)。これらの *in vitro* の実験から、CLAC-P/sCLAC が細胞外マトリックス分子や細胞外マトリックスの受容体であるインテグリンと相互作用することが示されており、これらの結合が CLAC-P の生理機能発揮に必要である可能性がある。

### I-5-2 Col25a1 KO マウスの表現型

CLAC-P の生理機能解明のため当研究室において CLAC-P をコードする *Col25a1* 遺伝子のノックアウト (KO) マウスが作出され、詳細な表現型解析がなされた。CLAC-P をヘテロに欠損する *Col25a1*<sup>+/−</sup> マウスはメンデル則に従い出生し、正常に発育した一方で、CLAC-P をホモに欠損する *Col25a1* KO マウスは自発的な運動を示さず出生時に死亡した (図表 4A)。出生後 0 日齢 (P0) マウスの肺胞には拡張が見られなかったことから、*Col25a1* KO マウスは呼吸不全により死亡すると考えられた。これらの表現型は神経筋接合部 (neuromuscular junction: NMJ) の形成不全を生じるマウスに典型的な特徴を有することから、*Col25a1* KO マウスが NMJ 形成不全をきたした可能性が検討された。胎生 18.5 日齢 (E18.5) 時点の *Col25a1* KO 胎児において脊髄前角の運動ニューロン細胞体が広汎な消失を示し (図表 4B)、運動ニューロンの投射先である筋組織は P0 時点で菲薄化し中心核が顕著で未熟な筋細胞が多くみられた (図表 4C)。一方、脳神経系には明らかな形態的異常は認められず、大脳皮質の層構造の形成も正常であった。さらに末梢神経系の神経細胞に注目したところ、後根神経節に存在する感覚ニューロンおよび交感神経節に存在する交感神経節後ニューロンについても野生型 (wild type: WT) と比較して顕著な脱落は認められなかった。これらのことから、*Col25a1* KO マウスでは神経系の細胞の中でも運動ニューロンが特異的かつ広汎な消失をきたすことがわかった (Tanaka *et al.*, 2014)。

*Col25a1* KO 胎児における運動ニューロンの分化・発生と消失について発生段階を追って検討するため、分化直後の運動ニューロンにて特異的に GFP を発現する *Hb9-GFP*<sup>tg</sup> マウスと *Col25a1* KO マウスとを交配し、GFP 標識された脊髄前角の運動ニューロン細胞体が免疫組織化学的に解析された。マウス脊髄前角の運動ニューロンは E9.5 以降に分化することが知られているが、E11.5 の胎児における脊髄前角の運動ニューロン数について、WT と KO の間で差は見られなかった (図表 5A, B)。ところが E13.5 の KO 胎児では WT に比して運動ニューロン数が約 70% 消失しており、さらに E14.5 以降の KO 胎児においては運動ニューロンの大部分が消失していた (図表 5A)。また、E13.5 において WT に比して KO の脊髄前角において TUNEL 染色陽性細胞数が多いことから、運動ニューロン細胞体の消失はアポトーシスによるものであることがわかった。

これらのことから、KO 胎児では WT 同様運動ニューロンは脊髄前角にて正常に分化するが、進行性に広汎なアポトーシスを呈することがわかった (Tanaka *et al.*, 2014)。

*Col25a1* KO 胎児において運動ニューロン細胞体は神経筋発生期に一致して脱落したことから、骨格筋の神経支配について免疫組織学的検討がなされた。横隔膜の whole mount 蛍光免疫染色の結果、E12.5 時点で WT においては運動ニューロン軸索束が分枝して軸索進入部位からより遠位へと伸長していた一方で、KO 胎児においては運動ニューロン軸索束が横隔膜筋に到達しているにもかかわらず、その分枝・伸長を欠如していた (図表 6A)。さらに E13.5 時点の KO 胎児においては軸索束内部に retraction bulb 様の構造物が多く観察され (図表 6B)、E14.5 以降、KO 胎児では横隔膜骨格筋付近の運動ニューロン軸索はほぼ全て消失していた。これらのことから、*Col25a1* KO 胎児においては運動ニューロン軸索が標的骨格筋に到達するが、骨格筋内における軸索束の分枝・伸長を欠損して、細胞体のアポトーシスと同時に軸索も退縮することがわかった (Tanaka *et al.*, 2014、図表 7)。

発生期においてマウス筋芽細胞は E9.5 以降に融合して多数の筋管 (myotube) を形成する。続いて運動ニューロンによる神経支配に先立ち、個々の筋管表面上に NMJ における神経伝達物質受容体であるアセチルコリン受容体 (Acetylcholine receptor: AChR) が集積し、骨格筋組織の中央部分に多数のクラスターを形成する AChR の prepatterning と呼ばれる現象が認められる。*Col25a1* KO 胎児において、E12.5 横隔膜筋の中央部に AChR クラスターの集積化すなわち prepatterning が WT と同程度に認められ、また E13 時点で横隔膜筋の筋層の厚みが WT と KO とで差異が認められないことから、KO 胎児の骨格筋は運動ニューロンによる神経支配前の時点では形態学的に異常がないと考えられる (田中智弘修士論文)。ところが、神経支配依存的な筋細胞の成熟が顕著になる E15.5 以降、KO 胎児において中心核が顕著で未熟な筋細胞を多く含む未成熟な筋組織が確認されることから、KO 胎児では神経支配非依存的な骨格筋の発達は正常であるが、運動ニューロン軸索の発達不全と脱落により、神経支配依存的な骨格筋の成熟が障害されると考えられる (田中智弘修士論文、Tanaka *et al.*, 2014)。

CLAC-P の欠損により、運動ニューロンは骨格筋内部における軸索の分枝・伸長不全と同時に細胞体のアポトーシスをきたしたことから、CLAC-P は軸索の発達と細胞体の生存のいずれに必須の役割を果たすかが注目された。これを検討するため、

pro-apoptotic gene である *Bax* 遺伝子 KO マウスと *Col25a1* KO マウスとを交配し、運動ニューロンのアポトーシス抑制下における骨格筋の神経支配について解析がなされた。*Bax* KO マウスにおいては既報通り運動ニューロンのアポトーシスがほぼ完全に抑制されており (Sun *et al.*, 2003)、*Col25a1; Bax* ダブル KO マウスにおいても運動ニューロン細胞体は同様にアポトーシスが抑制された。ところが、*Col25a1; Bax* ダブル KO マウスの横隔膜においては E14.5 時点で運動ニューロン軸索が骨格筋内での分枝・伸長を欠損しており、NMJ の形成が認められなかった。*Col25a1* KO マウスにおいて運動ニューロンのアポトーシスを抑制しても軸索発達を欠損したことから、CLAC-P は軸索束の分枝・伸長を促進する機能を有すると考えられるが、CLAC-P/sCLAC が運動ニューロンの生存を促進する可能性については未だ排除できていない (Tanaka *et al.*, 2014)。

発生期における CLAC-P 発現の分布を検討するため、*in situ* hybridization (ISH) により、CLAC-P mRNA の局在解析がなされ、E11.5 から P3 個体までの発生期を通して運動ニューロンを含む脊髄神経細胞には恒常的に発現が認められた。一方、成体骨格筋には CLAC-P mRNA 発現が認められなかったが (図表 8B)、E11.5-P3 までの発生期には骨格筋にも CLAC-P mRNA シグナルが認められた。このことから、運動ニューロンと骨格筋のいずれにおける CLAC-P 発現が運動ニューロン軸索の伸長・分枝に必要なかが重要な問題として残った (Tanaka *et al.*, 2014)。

### I-5-3 ヒト神経筋支配における CLAC-P の機能

前述の通り *Col25a1* KO マウスを用いた解析の結果、CLAC-P は運動ニューロン軸索の標的骨格筋内部における伸長・分枝に必須の役割を果たすことが明らかとなったが、近年、*Col25a1* が先天性脳神経支配異常症 (congenital cranial dysinnervation disorder: CCDD) の原因遺伝子として同定され、ヒトにおいても CLAC-P が神経筋支配に必要であることが示された (Shinwari *et al.*, 2015)。CCDD は眼球運動障害を主症状とする先天性疾患であり、これまでに神経発生や軸索伸長・誘導に関わる *TUBB3*、*KIF21A*、*PHOX2A*、*ROBO3* などが原因遺伝子として同定されていること、筋電図検査および病理学的特徴から、CCDD は胎生期における脳神経の発生異常に起因すると考えられている (Oystreck *et al.*, 2011; Assaf 2011)。

Shinwari らは動眼神経による眼瞼挙筋と内側直筋の神経支配異常、および外転神経による外側直筋の神経支配異常など家族性に CCDD 症状を呈するサウジアラビアの 1 家

系について連鎖解析を行ったところ、CLAC-P COL2 領域内の 382 番グリシン残基がアルギニンに置換したミスセンス変異 (G382R) が劣性遺伝性に CCDD を発症することを発見した。HEK 細胞由来の G382R 変異型リコンビナント sCLAC は WT に比して熱抵抗性が減少していたことから、G382R 変異により CLAC-P/sCLAC の 3 量体の安定性が低下すると考えられた (Shinwari *et al.*, 2015)。さらに、Shinwari らは孤発性 CCDD 患者の candidate gene screening および exome sequencing を行った結果、CLAC-P の 497 番のグリシンのナンセンス変異 (G497Ter) と 124 番から 236 番に相当する領域を欠損した copy number deletion 変異 (CNV Deletion) を新たに同定した。両遺伝子変異が CCDD 発症にどのように寄与するかは不明であるが、G497Ter のヘテロ接合体は CCDD を発症せず、G497Ter と CNV Deletion とを同時に保有することで CCDD を発症することから、G497Ter および CNV Deletion はともに CLAC-P の loss of function をきてして劣性遺伝性に CCDD を発症する可能性が考えられる (Shinwari *et al.*, 2015)。以上のことから、CLAC-P の loss of function は外眼筋の神経支配異常の発症を引き起こすと考えられ、CLAC-P がヒトにおいても運動ニューロンによる骨格筋支配に必要であることが明らかとなった。

#### I-6 標的骨格筋内における運動ニューロン軸索発達のメカニズム

運動ニューロン軸索が標的骨格筋内部で分枝・伸長する分子メカニズムについては不明であるが、*Col25a1* KO マウスの他に標的骨格筋内部における運動ニューロン軸索発達を完全に欠損する唯一の例として、受容体型チロシンホスファターゼ (Receptor protein tyrosine phosphatase: RPTP) の一種である *RPTP $\sigma$*  および *RPTP $\delta$*  のダブル KO マウスが知られている (Uetani *et al.*, 2006)。

*RPTP $\sigma$*  および *RPTP $\delta$*  は細胞外に 3 つの immunoglobulin ドメインと fibronectin type III モチーフを、細胞内に 2 つのホスファターゼドメインを有し、同様の構造を持つ LAR (leukocyte common antigen-related receptor) とともに Type IIa RPTP ファミリーに分類される。ショウジョウバエにおける type IIa RPTP である PTP69D や *Drosophila* LAR (DLAR) は神経細胞に特異的に発現し、その loss-of-function 変異体では intersegmental nerve b (ISNb) と呼ばれる運動ニューロン軸索が標的である筋線維を迂回する、あるいは標的筋線維到達以前の他の筋繊維に投射するなどの軸索誘導異常をきたす (Desai *et al.*, 1994; Krueger *et al.*, 1996)。また、PTP69D や DLAR の変異ショウジョウバエでは光受容体細胞の一部においても軸索誘導異常を生じる (Garrity *et al.*, 1999; Clandinin *et al.*, 2001)。ニワトリ胚においても、*RPTP $\sigma$*  や *RPTP $\delta$*  が運動ニュー

ロンに発現することが知られており、両者に対する shRNA を用いて腰髄にてそれぞれノックダウンすると、運動ニューロン軸索束の分枝・伸長が部分的に減少する (Stepanek *et al.*, 2005)。これらのことから、type IIa RPTP は無脊椎動物と脊椎動物の両方で神経細胞の軸索誘導に関与すると考えられている。マウス発生期の神経系においては、Type II RPTP ファミリーの中でも LAR は胎生期において皮質の脳室帯や膝神経節、後根神経節 (DRG) などに限局して発現しており (Schaapveld *et al.*, 1998)、LAR KO マウスは前脳基底部に位置し海馬に投射するブローカ対角帯核のコリン作動性ニューロンがわずかに減少するなど、神経系における表現型は軽微である (Yeo *et al.*, 1997; Van Lieshout *et al.*, 2001)。一方で、RPTP $\delta$ はオリブ核や嗅球、脊髄などに発現しており、RPTP $\sigma$ は終脳、間脳、脊髄、DRG など神経系に広範に発現が認められる (Schaapveld *et al.*, 1998)。RPTP $\delta$ のホスファターゼ活性ドメインを欠損したマウスは空間学習・記憶障害と運動機能障害をきたし、paired-pulse facilitation の増強を認めた (Uetani *et al.*, 2000)。さらに、RPTP $\sigma$  KO マウスは約 60%が出生後 48 時間以内に死亡し、生存した個体も形態学的に嗅球の萎縮と下垂体の形成不全、黄体形成ホルモン放出ホルモン産生細胞の消失、内側中隔や線条体のコリン作動性ニューロンの脱落、ミエリン形成不全などを呈し、痙攣と四肢の屈曲、嗅覚障害、生殖能力の低下など神経系を中心に重篤な表現型を示した (Elchebly *et al.*, 1999; Wallace *et al.*, 1999)。さらに、RPTP $\sigma$  KO マウスの海馬では樹状突起スパイン形成数の増加、微小興奮性シナプス後電流 (mEPSC) の frequency の増加、海馬長期増強 (LTP) の減弱などを認めた (Horn *et al.*, 2012)。これらのことから、哺乳類においても type IIa RPTP ファミリーが神経系発生に重要な役割を果たすことが知られているが、各遺伝子欠損個体の表現型が生じる分子メカニズムについては不明である。

マウス RPTP $\sigma/\delta$ の発現パターンの重複性から、Uetani らは両者の代償関係を想定し、両者を同時に欠損したダブルノックアウトマウス (DKO) を作成した。その結果 RPTP $\sigma/\delta$ DKO マウスは E13.5 時点で横隔筋内部における運動ニューロン軸索の分枝・伸長を完全に欠損し、細胞体が進行性に広汎な消失をきたした。一方で、後根神経節に存在する感覚ニューロンおよび交感神経節に存在する交感神経節後ニューロンの細胞体に脱落は認められず、神経細胞の中でも運動ニューロンが特異的に脱落することが確認されている (Uetani *et al.*, 2006)。これらの表現型は Col25a1 KO マウスと酷似しており、RPTP $\sigma/\delta$ が CLAC-P 同様に運動ニューロンの骨格筋内軸索発達に必須の役割を果たすことが分かっているが、その分子メカニズムは現在までに明らかとなっていない。

## I-7 本研究の目的

前述の通り、CLAC-P をコードする *Col25a1* 遺伝子 KO マウスは発生期に骨格筋内における運動ニューロン軸索の分枝・伸長を完全に欠損することから、CLAC-P が骨格筋内軸索発達において必須の役割を果たすことが分かっている。一方、神経筋発生の初期段階である E11.5 時点で、CLAC-P mRNA は脊髓前角の運動ニューロンおよび骨格筋の両者に発現することが確認され、両組織に発現した CLAC-P が、運動ニューロン軸索の発達にそれぞれどのように寄与しているのかは不明であった。さらに、CLAC-P が運動ニューロン軸索発達に対してどのような影響を与えるのか、またその分子メカニズムはいかなるものであるかは一切不明であった。

本研究において私は、*Col25a1* 遺伝子の組織特異的 KO マウスを作製してその表現型を解析することにより、運動ニューロンと骨格筋のいずれにおける CLAC-P 発現が運動ニューロン軸索発達に必須であるのかを検討した。さらにマウス胎児脊髓前角 explant を用いた *in vitro* 共培養実験系を樹立して解析を行い、CLAC-P タンパク質が運動ニューロン軸索発達に果たす役割の解明を試みた。



## II 結果

---

### II-1 CLAC-P mRNA の発現解析

成体において CLAC-P mRNA は神経細胞に特異的に発現することが知られていたが、発生期における発現パターンは未知であったため、運動ニューロン軸索が骨格筋内部に進入する時期である E12.5 胎児に対して *in situ hybridization* 解析を行った。その結果、脊髓前角の運動ニューロンのみならず骨格筋においても CLAC-P mRNA の発現を認めた (図表 8A)。ところが、同時期における骨格筋では筋芽細胞 (myoblast) が盛んに細胞分裂と細胞融合を繰り返して筋管 (myotube) への分化を進行中であり、骨格筋における CLAC-P mRNA シグナルは筋芽細胞と筋管のいずれに由来するのかが不明であった。私は本学修士課程において、マウス筋芽細胞株である C2C12 細胞 (Yaffe and Saxel 1977) を用いた CLAC-P mRNA の発現解析により C2C12 細胞の分化に伴い CLAC-P mRNA 発現量が著しく上昇すること定量的 PCR 法により示した (大泉寛明修士論文、Tanaka *et al.*, 2014、図表 9A)。ところが、C2C12 分化条件下においては筋芽細胞と筋管が混在するため、両者のうちいずれが CLAC-P mRNA を発現するのかは断定できなかった。そこで、私は C2C12 細胞の分化条件下で *in situ hybridization* を行い、筋芽細胞と筋管のいずれに CLAC-P mRNA 発現が見られるかを検討した。C2C12 筋芽細胞を低栄養条件下で培養することで分化を誘導し、誘導 5 日目において細胞を固定して *Col25a1* 遺伝子エキソン 1 配列に対するアンチセンスプローブを用いて *in situ hybridization* を行ったところ、すべての筋管において CLAC-P mRNA シグナルが認められたのに対し、筋芽細胞にはシグナルは認められなかった (図表 9B)。このことから、CLAC-P mRNA は筋芽細胞ではなく筋管に発現することが分かった。

### II-2 *Col25a1*<sup>fllox</sup> マウスの作製

神経筋発生期においては CLAC-P mRNA は脊髓前角運動ニューロンおよび骨格筋の筋管の両者に発現することから、標的骨格筋内における運動ニューロン軸索の発達に際して、神経側、筋肉側のいずれにおける CLAC-P 発現が必須であるのかが問題となった。そこで、Cre-loxP システムを用いた組織特異的 *Col25a1* KO マウスを作出すること

でこの問題の解決を試みた。マウス *Col25a1* 遺伝子のエキソン 2 はその欠失によりフレームシフトをきたすことが知られており、実際に *Col25a1* KO マウスにおいてエキソン 2 欠失により CLAC-P 機能の欠損による表現型が認められた (Tanaka *et al.*, 2014)。そこでエキソン 2 の両端に loxP 配列を配置したターゲティングコンストラクト (図表 10) を作製して、ES 細胞への導入と相同組み換えのスクリーニングを行った。ターゲティングコンストラクトを遺伝子導入した ES 細胞からゲノム DNA を抽出して、ザンブロットイングにより相同組み換えによりターゲティングコンストラクトが導入されたクローンを確認した (図表 11)。さらに、これらのクローンについて PCR 法を用いて再度相同組み換えを確認し、同時に 3'側 loxP を保有していることを PCR により確認した (図表 12)。得られた *Col25a1 flox-βgeo* ES 細胞にエレクトロポレーション法により flippase を遺伝子導入してモノクローン化し、PCR 法によりゲノム DNA を genotyping して βgeo カセットの除去を確認し、*Col25a1 flox* クローンを得た (図表 13)。これらの *Col25a1 flox* ES 細胞をマウス胚盤胞に注入して、*Col25a1 flox* キメラマウスを作出した。キメラマウスを交配して *Col25a1<sup>flox/wt</sup>* マウスを作出し、さらにそれらを交配することで *Col25a1<sup>flox/flox</sup>* マウスを得た。

### II-3 Cre リコンビナーゼの発現確認

本研究では運動ニューロンで特異的に *Col25a1* 遺伝子をノックアウトするため、分化直後の運動ニューロンで特異的に発現する転写因子である motor neuron and pancreas homeobox 1 (*Mnx1/Hb9*) 遺伝子の内因性プロモーターの下流に Cre を発現するノックインマウスである *Hb9-Cre* マウスを用いた (Arber *et al.*, 1999)。また、骨格筋特異的 *Col25a1* KO マウス作出のため、成体骨格筋の筋線維および胎児期の筋管で特異的に Cre を発現する human α-skeletal actin-Cre (*HSA-Cre*) tg マウスを用いた (Miniou *et al.*, 1999)。これらの Cre 発現マウスを Cre の発現依存的に EYFP を発現するレポーターマウスである *Rosa26-stop-EYFP* マウスと交配して EYFP の発現を確認した。

まず *Hb9-Cre* マウスと *Rosa26-stop-EYFP* とを交配し、E12.5 胎児の凍結切片を作製して EYFP および運動ニューロンマーカーである転写因子 *Islet1/2* を抗 GFP 抗体および抗 *Islet1/2* 抗体を用いてそれぞれ蛍光免疫染色したところ、脊髄の下部頸髄から上部胸髄にあたる brachial level においてほぼすべての *Islet1/2* 陽性運動ニューロン細胞体に EYFP 発現を確認した (図表 14A)。さらに、マウス脊髄前角の運動ニューロンの分化は E9 から E11 にかけて進行するが (Nornes and Carry 1978)、運動ニューロン分化

の後期にあたる E10.75 時点の brachial level においても約 70%の Islet1/2 陽性運動ニューロンが EYFP 陽性であった (図表 14A)。これらのことから、運動ニューロン軸索と骨格筋の相互作用が始まり、*Col25a1* KO マウスにおいて軸索発達不全が認められる時期である E12.5 においてはほぼすべての運動ニューロンにおいて Cre が発現することが確認された。

次に、*HSA-Cre* マウスと *Rosa26-stop-EYFP* マウスとを交配し、E12.5 胎児の凍結切片を作製して EYFP および胎生期には筋管マーカーとなる Myosin heavy chain (MyHC) 抗体を用いて免疫染色を行った結果、MyHC 陽性の筋管に特異的に EYFP 発現が確認された (図表 14B)。

#### II-4 *Hb9-Cre; Col25a1<sup>flox/flox</sup>* マウスの表現型解析

まず、*Col25a1<sup>flox</sup>* マウスを *Hb9-Cre* マウスと交配して、運動ニューロン特異的 *Col25a1* KO マウスを作成してその表現型解析を行った。E13.5 における横隔膜を摘出して軸索マーカーである抗ニューロフィラメント抗体を用いて whole mount 蛍光染色を行い、横隔膜筋内における運動ニューロン軸索の走行を解析したところ、*Hb9-Cre; Col25a1<sup>flox/flox</sup>* 胎児の運動ニューロンの軸索束は横隔膜筋内で 3 方向に分かれて伸長し、secondary branch のより遠位への分枝・伸長が認められた (図表 15A)。これらの軸索束の発達は、コントロールとなる同腹の *Col25a1<sup>flox/flox</sup>* マウスと比較して、差異は認められなかった (図表 15A)。さらに、E16.5 胎児の横隔膜を抗ニューロフィラメント抗体およびニコチン型アセチルコリン受容体 (AChR) に特異的に結合する  $\alpha$ -Bungarotoxin ( $\alpha$ BTX) を用いて蛍光 2 重染色したところ、*Hb9-Cre; Col25a1<sup>flox/flox</sup>* マウスの横隔膜において、運動ニューロン軸索末端と神経筋接合部のポストシナプスマーカーである AChR のクラスターが近接して存在する神経筋接合部の形成が確認され、*Col25a1<sup>flox/flox</sup>* と比較して差異は認められなかった (図表 15B)。また、E18.5 胎児脊髄の凍結切片を作製し、運動ニューロンマーカーであるコリンアセチルトランスフェラーゼ (choline-acetyltransferase: ChAT) に対して免疫染色を行い、運動ニューロン細胞体を観察したところ、*Hb9-Cre; Col25a1<sup>flox/flox</sup>* 胎児においても脊髄前角の運動ニューロンプールが存在することが確認された (図表 16)。定量的評価のため、頸髄 C3-5 までの連続切片を作製して免疫染色を行い ChAT 陽性細胞数について計測したところ、*Col25a1<sup>flox/flox</sup>* と *Hb9-Cre; Col25a1<sup>flox/flox</sup>* とで運動ニューロン細胞体が同程度に生存していることが確認された (図表 16)。さらに *Hb9-Cre; Col25a1<sup>flox/flox</sup>* マウスは出生後も正常に成長し、繁殖能力を有した。これらの結果から、運動ニューロンにおける CLAC-P

発現は、骨格筋内における運動ニューロン軸索の発達および運動ニューロン生存に必要なではないと結論した。

#### II-5 HSA-Cre; Col25a1<sup>flox/flox</sup> マウスの表現型解析

次に、HSA-Cre マウスと Col25a1<sup>flox</sup> マウスを交配し、骨格筋特異的 Col25a1 KO マウスを作出して表現型解析を行った。抗ニューロフィラメント抗体を用いて横隔膜を whole mount 免疫染色したところ、E13.5 時点で、HSA-Cre; Col25a1<sup>flox/flox</sup> マウスの横隔膜では、運動ニューロン軸索束が骨格筋進入部位付近に認められたが、その後の分枝・伸長が完全に障害されていることが確認された (図表 17A)。さらに、E15.5 横隔膜を抗ニューロフィラメント抗体と  $\alpha$ -Bungarotoxin を用いて蛍光 2 重染色したところ、HSA-Cre; Col25a1<sup>flox/flox</sup> 胎児においては運動ニューロン軸索が退縮し、完全に消失していた (図表 17B)。運動ニューロンの支配を受けた骨格筋表面の AChR は、骨格筋の成熟とともに横隔膜中央部に限局して endplate band を形成することが知られているが、Col25a1<sup>flox/flox</sup> 胎児においては径の小さい未成熟な AChR クラスターが幅広く分散して存在し、この所見は運動ニューロン軸索による神経支配を欠如した骨格筋の特徴に一致していた (図表 17B)。さらに、E18.5 胎児の凍結切片を作製して抗 ChAT 抗体による免疫染色を行った結果、頸髄の ChAT 陽性運動ニューロン細胞体の大部分が脱落していた (図表 18A)。運動ニューロン細胞体の脱落の程度を定量的に評価するため、頸髄の C3-5 にかけて連続切片を作製して ChAT 陽性細胞数を計測したところ、HSA-Cre; Col25a1<sup>flox/flox</sup> 胎児は同腹のコントロールである HSA-Cre; Col25a1<sup>flox/wt</sup> に比して運動ニューロン細胞体数が約 85% 消失していた (図表 18C)。また、胸髄においても HSA-Cre; Col25a1<sup>flox/flox</sup> 胎児は運動ニューロン細胞体の広範な脱落をみとめた (図表 18B)。以上の表現型は、Col25a1 KO マウスのそれと一致していた。これらの結果から、発生期の骨格筋に発現した CLAC-P が、運動ニューロン軸索束の骨格筋内での分枝・伸長に必須であることが分かった。

#### II-6 リコンビナント sCLAC が運動ニューロンの生存と軸索発達に与える影響の解析

組織特異的 Col25a1 KO マウスの表現型解析の結果から、運動ニューロンでなく骨格筋に発現した CLAC-P が、運動ニューロン軸索の発達および運動ニューロンの生存に必須であることが明らかになった。そのため、CLAC-P が運動ニューロンの生存および

軸索発達を促進する可能性を想定し、初代培養運動ニューロンに対してリコンビナント sCLAC を添加し、運動ニューロンの生存性および軸索長について定量的に評価した。

#### II-6-1 sCLAC が培養運動ニューロンの生存性に与える影響の解析

発生期の運動ニューロンは標的骨格筋やシュワン細胞、グリア細胞などから神経栄養因子を受容することが生存に必須であることが知られている。Col25a1 KO マウスで運動ニューロンの広汎な細胞死を認めたことから、骨格筋由来の CLAC-P あるいは sCLAC が神経栄養因子として機能し、運動ニューロンの生存性を向上する可能性を検証した。運動ニューロン特異的に GFP を発現する Hb9-GFP 陽性胎児由来の初代培養運動ニューロンを培養 0 日目 (0 day in vitro: 0 DIV) から 3 DIV まで HEK293 細胞由来の精製 sCLAC-FLAG タンパク質を含む培地中で培養し、0 DIV および 3 DIV において GFP 蛍光陽性細胞数を計測して生存率を算出した。Positive control である神経栄養因子 (0.1 ng/ml GDNF, 1 ng/ml BDNF, 10 ng/ml CNTF) 添加群において生存率の優位な上昇が認められたのに対して、精製 sCLAC-FLAG を 1-100 ng/ml の濃度で添加した群においてはいずれの濃度でも運動ニューロンの生存率向上は認められなかった (図表 19)。

#### II-6-2 sCLAC が培養運動ニューロンの神経突起伸長に与える影響の解析

続いて、CLAC-P が運動ニューロン軸索の伸長を促進する可能性を検証するため、sCLAC-FLAG をコーティングしたガラスカバースリップ上にて Hb9-GFP 陽性胎児由来の初代運動ニューロンを分散培養し、培養開始から 24 時間後に免疫染色を行って GFP 陽性神経細胞の突起長を測定した。Positive control であるラミニン (3 µg/ml) をコーティングした群では、negative control である BSA (3 µg/ml) コーティング群に比して突起伸長の程度が約 5 倍上昇した (図表 20)。一方、精製 sCLAC-FLAG (3 µg/ml) をコーティングした群では BSA コーティング群に比して運動ニューロン神経突起長に有意な差は認められなかった (図表 20)。このことから、固相に吸着された精製 sCLAC-FLAG は分散運動ニューロンの神経突起の伸長を促進しないことが分かった。

#### II-7 CLAC-P 発現 HEK293 細胞と運動ニューロン軸索との相互作用の解析

骨格筋と運動ニューロン軸索間の相互作用において、軸索-骨格筋間の細胞接着に関

わると考えられる分子の阻害により軸索束の分枝・伸長が部分的に障害される例が知られている (Landmesser *et al.*, 1988; Landmesser *et al.*, 1990)。そこで、CLAC-P 発現 HEK293 細胞と脊髄前角の explant (Wang and Marquardt 2012) を共培養し、軸索の遠位部分と CLAC-P 発現細胞との相互作用を検証した。Hb9-GFP 陽性胎児由来の脊髄前角 explant を mCherry と CLAC-P を共発現する HEK293 細胞と 2 日間共培養を行った (図表 21A)。その後、免疫染色を行い HEK293 細胞周囲に伸長した運動ニューロン軸索の走行を観察したところ、脊髄前角から GFP 陽性の運動ニューロン軸索が放射状に伸長し、その一部は mCherry 陽性の HEK293 細胞との接触が認められた (図表 21B)。mCherry 陽性細胞の周囲に伸長した運動ニューロン軸索の走行を観察したところ、CLAC-P 発現細胞には mock コントロールに比してより多くの運動ニューロン軸索の集簇を認めた (図表 22)。軸索集簇の程度を定量的に評価するため、運動ニューロン軸索が mCherry 陽性 HEK293 細胞と接触・マージする部分の長さを計測して比較したところ、CLAC-P 発現細胞は mock コントロールおよび MACIT ファミリーに属する Collagen XIII、Collagen XXIII を発現する細胞と比較して有意に軸索集簇の程度が大きかった (図表 22)。以上より、CLAC-P 発現 HEK293 細胞が運動ニューロン軸索を誘引する機能を有することが分かった。

## II-8 CLAC-P RAmt 発現細胞と運動ニューロン軸索との相互作用の解析

CLAC-P 発現細胞は運動ニューロン軸索の誘引機能を示したが、CLAC-P は furin による切断を受けて分泌型としても存在しうることが知られているため (Hashimoto *et al.*, 2002)、全長型の CLAC-P と切断型の sCLAC のいずれが運動ニューロン軸索の誘引効果を有するのかが不明であった。そこで CLAC-P の furin 認識配列である 107KIRIAR112 配列中のアルギニン残基をアラニンに置換することで furin による切断に耐性とした CLAC-P RAmt を用いて (Hashimoto *et al.*, 2002、図表 24A)、脊髄前角 explant と HEK293 細胞との共培養実験を行った。2 日間の共培養の後に免疫染色を行った結果、CLAC-P RAmt 発現細胞は mock コントロールに比して軸索集簇の程度の有意な上昇を認めた (図表 23)。一方、CLAC-P 発現細胞と比較すると軸索集簇の程度は有意に小さかった (図表 23)。

CLAC-P 発現細胞と CLAC-P RAmt 発現細胞の細胞表面における CLAC-P 発現量を検討するため、両細胞表面に存在するタンパク質をビオチン化試薬にて標識した。これをアビジンビーズにてプルダウンし、抗 CLAC-P NC3 抗体によるウエスタンブロットにて両者の細胞表面 CLAC-P 量を比較した結果、CLAC-P 発現細胞と CLAC-P RAmt 発現

細胞において、細胞表面における CLAC-P 発現は同程度であった (図表 24B)。さらに、CLAC-P 発現細胞と CLAC-P RAmt 発現細胞とを抗 CLAC-P NC4 抗体により免疫染色を行ったところ、CLAC-P 発現細胞の周囲には sCLAC の蓄積が認められたのに対して、CLAC-P RAmt 発現細胞の周囲には sCLAC 蓄積が認められなかった (図表 24C)。

これらの結果から、細胞表面の CLAC-P 発現量は同等であるにもかかわらず、CLAC-P 発現細胞において CLAC-P RAmt に比して有意に運動ニューロン軸索集簇の程度が大きかったことは、HEK293 細胞の周囲に蓄積する sCLAC の有無に起因する可能性が考えられた。すなわち、全長型 CLAC-P のみならず sCLAC にも運動ニューロン軸索の誘引機能を有すると考えられた。

## II-9 ゼブラフィッシュを用いた CLAC-P の機能解明

*Col25a1* 遺伝子は脊椎動物において保存されており、ゼブラフィッシュにおいてもアミノ酸レベルで約 63% の相同性を有しており、特に NC2 領域で 100 %、NC3 領域で 83 %、NC4 領域で 100 % と高い相同性をもって保存されている。ゼブラフィッシュはゲノム配列が解析済みであり、人工核酸や mRNA などを受精卵にインジェクションすることで容易に遺伝子ノックダウンあるいは過剰発現が可能であることから、遺伝学実験に適したモデル動物である。さらに、ゼブラフィッシュ胚は体が透明であることから、運動ニューロン軸索の伸長を直接観察することが可能である (Asakawa *et al.*, 2012)。これらのことから、ゼブラフィッシュにおいても CLAC-P が運動ニューロン軸索の伸長に必須の役割を担っていた場合、遺伝学的相互作用分子の探索により CLAC-P の相互作用分子の同定が期待される。そこで、本実験ではゼブラフィッシュの神経筋発生期における CLAC-P mRNA の発現パターンの解析と、ゼブラフィッシュ *Col25a1* 遺伝子ノックダウンが運動ニューロン軸索伸長に及ぼす影響についての表現型解析を行った。

### II-9-1 ゼブラフィッシュにおける CLAC-P mRNA の発現解析

ゼブラフィッシュ胚においては、受精後 14 時間 (14 hours post fertilization: 14 hpf) 頃までに運動ニューロンが脊髄前角にて分化し、16 hpf 以降 1 次運動ニューロンと呼ばれる運動ニューロンの軸索が体節筋上を伸長する (Panzer *et al.*, 2005; Flanagan-Steet *et al.*, 2005)。運動ニューロン軸索伸長の発生段階は頭側の体節ほど早く、尾側の体側ほど遅れて進行する。1 次運動ニューロンは伸長方向により Caudal primary motoneuron (CaP)、Middle primary motoneuron (MiP)、Rostral primary motoneuron (RoP) の 3

種類に分類され、CaP は腹側正中方向に、MiP は背側正中方向に、RoP は側方にそれぞれ伸長して体節筋を支配する (Eisen *et al.*, 1986; Myers *et al.*, 1986, 図表)。16-24 hpf にかけて、それぞれの 1 次運動ニューロンは体節筋上を共通の進路を伸長して choice point と呼ばれる地点まで到達したのち、20-28 hpf にかけてそれぞれの伸長方向に分岐していく (図表 25A)。さらに、この時期に最初の NMJ が choice point 付近で形成されることが知られている (Panzer *et al.*, 2005)。以上のことから、ゼブラフィッシュにおいて運動ニューロン軸索束の分枝が生じ、NMJ 形成が開始する時点である 20-28 hpf が、*Col25a1* KO マウスで運動ニューロン軸索の発達不全をきたす E12.5-E13.5 に一致すると考えられる。

そこでまず、ゼブラフィッシュにおいて CLAC-P の発現パターンを解明するため、ゼブラフィッシュ CLAC-P cDNA 全長をテンプレートに合成したジゴキシゲニン (Digoxigenin: DIG) 標識アンチセンスプローブを用いて、24 hpf のゼブラフィッシュ胚に対して *in situ* hybridization を行った。その結果、運動ニューロン細胞体を含め脊髄に CLAC-P mRNA シグナルが見られなかった一方で、体節筋および脊索においてシグナルを認めた (図表 25B)。以上のことから、ゼブラフィッシュの神経筋発生期においてもマウスと同様に筋側に CLAC-P mRNA が発現することが分かった。

#### II-9-2 モルフォリノによるゼブラフィッシュ *Col25a1* 遺伝子ノックダウン実験

ゼブラフィッシュにおける遺伝子ノックダウンにはモルフォリノ (morpholino: MO) と呼ばれる人工核酸が汎用されている (Summerton and Weller 1997)。MO はヌクレアーゼに耐性であり、MO アンチセンスには標的 mRNA の 5'キャップ-開始コドン領域を標的としてハイブリダイズして mRNA の翻訳を阻害するタイプと、スプライシングアクセプターあるいはスプライシングドナー部位に結合してスプライシングを阻害するタイプが存在する (Eisen and Smith 2008)。ゼブラフィッシュ *Col25a1* 遺伝子のエキソン 2 はその欠失によりフレームシフトをきたすことから、エキソン 2 のスプライシングドナー部位を標的に MO を作製した (図表 26A)。受精卵 1-2 細胞期に *Col25a1* MO をインジェクションし、そのノックダウン効率を検討するため 22 hpf 時点で胚から mRNA を抽出して CLAC-P mRNA 量の定量を行った。エキソン 1 の 3'末端とエキソン 2 の 5'末端部分にプライマーを設計してリアルタイム PCR を用いて mRNA の定量を行った結果、MO インジェクションを行わなかったコントロールに比して、*Col25a1* MO インジェクション群では PCR 産物量が約 90% の低下を認めた (図表 26C)。このことから、*Col25a1* MO によりエキソン 2-3 間のスプライシングが阻害されてエキソン 1-エキソン 3 が結合するエキソンスキッピングが生じていると考えられ (Eisen and Smith



2008、図表 26A)、Col25a1 MO 注入により 22 hpf 時点で Col25a1 遺伝子の十分なノックダウン効果が得られると判断した。

次に、Gal4-UAS システムを用いて運動ニューロン特異的に GFP を発現する *mnr2b-GAL4; UAS-GFP* ゼブラフィッシュ胚 (Asakawa *et al.*, 2013) に Col25a1 MO をインジェクションして表現型観察を行った。30 hpf 時点の Col25a1 MO 注入群はコントロールと比較して外表形態の顕著な異常を認めなかった (図表 26B)。さらに、胚をアガロース内に包埋して蛍光顕微鏡下 GFP 陽性軸索の走行を観察したところ、Col25a1 MO 群においても 26 hpf 時点で CaP 軸索は choice point より先の腹側方向への伸長を認め、コントロールとの間に差異は認められなかった (図表 27A)。また、32 hpf 時点においても Col25a1 MO 群において CaP 軸索の腹側への伸長および RoP 軸索の背側への伸長を認め、コントロールとの間に差異は認められなかった (図表 27B)。さらに、48 hpf までに Col25a1 MO 群は自発的な運動により孵化して正常に遊泳した (data not shown)。これらのことから、ゼブラフィッシュにおいては CLAC-P 欠損により運動ニューロン軸索発達の異常および神経筋接合部の欠如は生じないと結論した。

### III 考察

---

本研究において私は以下のことを明らかにした。

- CLAC-P mRNA は発生期において、筋芽細胞ではなく筋管に発現した。
- 運動ニューロン特異的に CLAC-P を欠損するマウスは正常な神経筋支配を示した。
- 骨格筋特異的に CLAC-P を欠損するマウスは運動ニューロン軸索束の骨格筋内発達を完全に欠損し、運動ニューロン細胞体の広汎な消失をきたした。
- 精製 sCLAC-FLAG タンパク質は初代培養運動ニューロンの生存性および軸索伸長を促進しなかった。
- CLAC-P 発現 HEK293 細胞は脊髄前角 explant から伸長した運動ニューロン軸索の集簇を引き起こした。
- 細胞外領域の分泌が起こらない CLAC-P RAmt 発現細胞は運動ニューロン軸索の集簇を引き起こしたが、その程度は CLAC-P 発現細胞と比較して有意に小さかった。
- 神経筋発生期のゼブラフィッシュにおいて CLAC-P mRNA は体節筋に発現が見られたが、*Col25a1* 遺伝子をノックダウンしても運動ニューロン軸索発達は障害されなかった。

これらの結果から、CLAC-P が運動ニューロン軸索に対して、骨格筋側から retrograde に作用し、その発達および生存に必須の役割を果たすと考えるのが最も妥当であると結論した。本章では CLAC-P がいかなる分子メカニズムにより運動ニューロン発達に寄与するかを中心に考察する。

#### III-1 運動ニューロン軸索の投射過程における軸索-標的組織間の相互作用と、CLAC-P 機能の位置づけ

運動ニューロン軸索が標的骨格筋での神経筋接合部 (NMJ) 形成開始に至るまでの過程は、「脊髄からの軸索束の伸長」、「標的組織の選択」、「標的骨格筋内における軸索発達」、という大きく 3 つの段階に分けて考えることができる。以下に、各ステップについて既知の知見をまとめてみる。

「脊髄からの軸索束の伸長」：脊髄内部および脊髄周囲の間充織由来で軸索束の伸長に関わる分子として、脊髄腹側の floor plate 由来の因子である netrin、ephrin-B、

semaphorin や、脊髄周囲の間充織由来の分泌因子である Cxcl12 などが知られている (Bonanomi and Pfaff, 2010)。ケモカインである Cxcl12 は運動ニューロンにおける G タンパク質共役型受容体 Cxcr4 と結合する。Cxcl12 や Cxcr4 の欠損マウスでは一部の運動ニューロン軸索束が脊髄前根から出発せず脊髄内部の後角に向かって投射し、また一部は前角から出発するものの、標的組織への投射の段階で DRG に投射することが知られている (Lieberam *et al.*, 2005)。これらのことから脊髄周囲に存在する Cxcl12 が液性の軸索誘引因子として機能し、運動ニューロン軸索束の脊髄からの伸長を方向付け、促進する可能性が考えられる。一方 floor plate に発現する netrin、ephrin-B、semaphorin3F は反発性の軸索誘導分子として機能し、運動ニューロン軸索束の腹外側方向への伸長に寄与している (Bonanomi and Pfaff, 2010)。以上のように、運動ニューロン軸索束の脊髄からの伸長には周辺組織に発現する誘引性・反発性の軸索誘導因子によって制御されている。

「標的組織の選択」：脊髄前角に存在する運動ニューロンは axial muscle に投射する medial motor column (MMC) ニューロンと、limb に投射する lateral motor column (LMC) ニューロンに大別され、両者は分化の過程において異なる遺伝子発現パターンをとることから、異なるポピュレーションであると考えられる (Bonanomi and Pfaff, 2010)。MMC ニューロン軸索は脊髄を出発した後、背側の axial muscle に向かうが、このとき axial muscle から誘因性の因子として FGF4/8 が分泌され (Shirasaki *et al.*, 2006)、DRG や間充織には反発性の因子として ephrin-A が発現していることが知られている (Gallarda *et al.*, 2008)。MMC ニューロンにおいては FGF の受容体として FGFR1 が、ephrin-A の受容体として EphA3/4 が発現しており、これらのシグナルの欠損マウスにおいて一部の MMC ニューロンが DRG に投射するなど標的組織の選択異常が生じる (Shirasaki *et al.*, 2006; Gallarda *et al.*, 2008、Bonanomi and Pfaff, 2010)。LMC ニューロンは limb 中の腹側の骨格筋 (ventral limb) に投射する LMCm ニューロンと、背側の骨格筋 (dorsal limb) に投射する LMCI ニューロンの 2 種類にさらに分類される。Ventral limb 間充織に特異的に発現する因子として ephrin-A が、dorsal limb 間充織に特異的に発現する因子として GDNF および EphA4 がある。前者は EphA4 を高発現する LMCI ニューロンに対して反発性因子として機能し、後者は GDNF および EphA4 の coreceptor である Ret を高発現する LMCI に対して誘引性因子として機能していると考えられている。これらのシグナルの欠損により LMCI ニューロンの一部が ventral limb に投射するミスマターゲティングが生じる (Kramer *et al.*, 2006、Bonanomi and Pfaff, 2010、Bonanomi *et al.*, 2012)。Dorsal limb 間充織においては Sema3F や ephrin-B が特異的に発現しており、Neuropilin-2 および EphB1 を特異的に発現する LMCm ニューロンに対して反発性因子として機能しており、これらのシグナルの異常により LMCm

ニューロンの一部が *dorsal limb* に投射する軸索誘導異常が生じる (Huber *et al.*, 2005; Luria *et al.*, 2008、Bonanomi and Pfaff, 2010)。以上のように、標的組織および運動ニューロンはそれぞれに特異的な軸索誘導因子およびその受容体を発現しており、各々のリガンド-受容体のマッチングにより適切な標的骨格筋へのターゲティングが可能となる。

「骨格筋内における軸索発達」運動ニューロン軸索が標的骨格筋に投射した後の、骨格筋内の軸索分枝・伸長、および適切な *subregion* までの誘導が生じるメカニズムについては現在までほとんど解明されていないが、骨格筋内における軸索発達に障害をきたす遺伝子組み換えマウスの例がいくつか知られている。骨格筋に発現する *ephrin-A* を骨格筋特異的に過剰発現あるいは欠損することで、骨格筋組織内における NMJ 形成のトポロジーに異常が生じることが知られているため、*ephrin-A/EphA* シグナルが骨格筋内の適切な位置への軸索誘導にも関与すると考えられている (Feng *et al.*, 2000; Lampa *et al.*, 2004)。また、細胞接着分子である *L1* や *NCAM* はニワトリ胚神経筋発生期の運動ニューロン軸索間あるいは運動ニューロン軸索と骨格筋との接着に関与し、軸索間の細胞接着の亢進あるいは軸索-骨格筋間の細胞接着の阻害により軸索束の分枝・伸長が部分的に障害される (Landmesser *et al.*, 1988; Landmesser *et al.*, 1990)。さらに、序論にて述べた通り、軸索誘導分子である *RPTP $\alpha/\delta$*  の *DKO* マウスにおいては運動ニューロン軸索が標的骨格筋まで一時的に到達するものの、骨格筋内部における分枝と伸長を完全に欠損し、軸索の退縮をきたすことが知られている。その他の例として、膜結合型のメタロプロテアーゼである *DINE KO* マウスは発生期運動ニューロン軸索束の骨格筋内を伸長して NMJ を形成するものの、軸索束の分枝のみを完全に欠損する (Nagata *et al.*, 2010)。以上のように、骨格筋内における軸索発達が障害されるマウスやニワトリでの例が知られているが、それらの分子メカニズムについては多くが未解明である。

以上の既知の知見と *Col25a1 KO* マウスおよび骨格筋特異的 *Col25a1 KO* マウスの表現型を考え合わせ、運動ニューロン軸索投射過程における *CLAC-P* の機能について考察する。*Col25a1 KO* マウスにおいて、運動ニューロン軸索は *C5-T1* までの神経叢を正常に形成し、MMC 運動ニューロンの標的である横隔筋や肋間筋、LMC 運動ニューロンの標的である *limb bud muscle* の各筋組織に運動ニューロン軸索が到達したこと (Tanaka *et al.*, 2014、田中智弘博士論文)、および骨格筋特異的 *Col25a1 KO* マウスが運動ニューロン軸索発達不全の表現型を示したことから、*CLAC-P* は運動ニューロンの脊髄からの軸索伸長および標的組織の選択については関与せず、骨格筋内における軸索発達においてその機能を発揮すると考えられる。さらに、*Col25a1 KO* マウスおよび骨格筋特異的 *Col25a1 KO* マウスは頸髄、胸髄、腰髄の LMC/MMC の異なるポピュレーションのいずれにおいても運動ニューロンに障害をきたしたことから、*CLAC-P* は運動

ニューロン-骨格筋間において普遍的に機能すると考えられる。以上のことから、CLAC-P は骨格筋内軸索発達に対して、既知の Eph-ephrin シグナルや GDNF-Ret シグナル等の軸索誘導メカニズムとは異なる分子メカニズムを介して機能する可能性が想定される。

### III-2 CLAC-P が運動ニューロンの軸索発達ならびに生存に果たす役割

#### 1. CLAC-P/sCLAC が神経栄養因子として運動ニューロンの生存率を向上する可能性

運動ニューロンをはじめ、末梢に投射する感覚ニューロンや交感神経節後ニューロンは発生期に標的組織由来の神経栄養因子をめぐって競合し、これを受容できた神経細胞のみが生存することが知られている。運動ニューロンにおいてはニワトリ胚を用いた実験で、肢芽を移植することにより運動ニューロンのアポトーシスは抑制され、逆に肢芽を除去することで運動ニューロンのアポトーシスが過剰に生じることから、標的骨格筋由来の因子により運動ニューロンの生存が制御されていると考えられている (Hamburger 1934)。野生型マウスにおける運動ニューロンのアポトーシスは E11.5 の頸髄から始まり、E13.5 にピークをむかえて脊髄のほぼ全域でアポトーシスが確認され、E18.5 までに脊髄全体でおよそ 50% の運動ニューロンが消失する (Oppenheim *et al.*, 1986; Yamamoto and Henderson, 1999)。マウス運動ニューロンにおいては BDNF、NT-3、NT-4/5、GDNF、CNTF、IGF-I/II、HGF などが *in vitro* において運動ニューロンの生存性を向上することが知られているが、BDNF、NT-3、NT-4/5 およびそれらの受容体についてはその欠損により *in vivo* における運動ニューロンの消失を認めず、GDNF、CNTF、IGF-I/II、HGF およびそれらの受容体の欠損により野生型に比して最大 40 % 程度の過剰な運動ニューロンの脱落をきたす (Gould and Oppenheim 2011)。

WT において運動ニューロンの細胞死が生じる時期に一致して、*Col25a1* KO マウスおよび骨格筋特異的 *Col25a1* KO マウスにおいて運動ニューロンの過剰な細胞死が生じたことから、骨格筋由来の CLAC-P/sCLAC が神経栄養因子として運動ニューロンの生存性を向上する可能性が想定された。本研究においてこの可能性を検証するため、初代培養運動ニューロンに対して精製 sCLAC を添加して生存率を計測したところ、既知の神経栄養因子である BDNF、CNTF、GDNF 添加により初代培養運動ニューロンの生存性が向上したのに対して、精製 sCLAC-FLAG 添加群では運動ニューロンの生存率が変化しなかった。このことから、CLAC-P/sCLAC は神経栄養因子として運動ニューロン軸索の生存性を直接高める機能を有しないと考えられた。本実験で

得られた事実と、*Col25a1; Bax* DKO マウスが運動ニューロンの細胞死が抑制されているにもかかわらず、骨格筋内部の運動ニューロン軸索発達を欠如したこと (Tanaka *et al.*, 2014) とを考え合わせると、骨格筋に発現する CLAC-P/sCLAC は運動ニューロンの生存ではなく、骨格筋内部における軸索発達に一義的に必要であると結論できる。

それでは、運動ニューロン軸索発達に必須である CLAC-P の欠損により、なぜ運動ニューロンの細胞死をきたすのだろうか。神経筋発生期において運動ニューロンは標的由来の神経栄養因子をめぐって競合するが、*agrin* や *rapsyn*、*MuSK* など NMJ 形成のオーガナイザーとして知られる分子を欠損することで NMJ 形成不全となるマウスや (Gautam *et al.*, 1995; DeChiara *et al.*, 1996; Terrado *et al.*, 2001)、ニコチン型 AChR のアンタゴニストである d-ツボクラリンを投与したニワトリ胚やアセチルコリンの合成酵素である ChAT を欠損するマウスなど (Pittman and Oppenheim 1978; Dahm and Landmesser, 1988; Brandon *et al.*, 2003)、神経筋伝達を欠損する動物においては、運動ニューロン軸索は過剰に分枝・伸長するとともに運動ニューロン細胞死の大幅な抑制が生じることが知られている。これらの例で運動ニューロンの生存性が向上した原因として、神経栄養因子の量が増加した、あるいは軸索の伸長により神経栄養因子への **access** が増加した、という大きく 2 つの可能性が考えられた。ところが、神経伝達を阻害したニワトリ胚由来の骨格筋抽出物はコントロールに比して運動ニューロン生存性の向上が認められなかったことから (Tanaka 1987)、前者の可能性は低いと考えられ、運動ニューロン軸索の分枝・伸長の程度が運動ニューロンの生存性を規定するという **access hypothesis** が提唱されている (Oppenheim 1989)。Access hypothesis を支持する例として、ニワトリ胚において、運動ニューロン軸索と骨格筋間の接着の阻害により、運動ニューロン軸索の分枝・伸長の抑制に一致して、運動ニューロンの生存率も低下することが知られている (Tang and Landmesser 1993) また、先に述べた通り、*RPTP $\alpha$ / $\delta$*  DKO マウスは運動ニューロン軸索発達の欠損と運動ニューロンの広汎な消失をきたすが、*RPTP $\alpha$ <sup>-/-</sup>/ $\delta$ <sup>-/-</sup>* マウスは運動ニューロン軸索分枝・伸長の部分的な障害と運動ニューロン細胞体の部分的な脱落をきたすことから、軸索分枝・伸長の程度と運動ニューロン生存性は正の相関を示すことが知られている (Uetani *et al.*, 2006)。これらの知見から、CLAC-P 欠損により運動ニューロンの広汎な消失をきたしたのは、軸索発達の不全により運動ニューロンが神経栄養因子の受容を欠損したために生じた二次的な現象であると考えられる。

さらに、近年報告された膜結合型のメタロプロテアーゼである *DINE KO* マウスは骨格筋内における運動ニューロン軸索束の分枝のみを完全に欠損するが、同マウスの軸索束は筋層内を伸長するとともに、運動ニューロンの脱落を生じないことが知られ

ている (Nagata *et al.*, 2010)。このことから、運動ニューロン軸索束の分枝ではなく筋層内の「伸長」が運動ニューロンの生存に必要であると考えられ、CLAC-P は運動ニューロン軸索発達の中でも伸長に必須の役割を果たす可能性が高いと考えられる。

## 2. CLAC-P/sCLAC が運動ニューロンの軸索発達を促進するメカニズム

本研究において、CLAC-P/sCLAC が軸索発達を促進するメカニズムを検証するため、①sCLAC コーティング時の分散培養運動ニューロンの神経突起長の計測、および②CLAC-P 発現 HEK293 細胞と運動ニューロン軸索との相互作用の検討を行った。その結果、①の実験において培養 24 時間時点で sCLAC コーティングによる神経突起長の増大は認められず、②の実験において CLAC-P 発現 HEK293 細胞は運動ニューロン軸索の集簇を増大した。これらのことから、CLAC-P/sCLAC は運動ニューロン軸索に直接的に作用しシグナル伝達を惹起して伸長を促進する機能を有さず、細胞接着分子として運動ニューロン軸索と CLAC-P 発現細胞との接着を引き起こすことで、シグナル伝達を伴う他の因子の授受を促進する可能性が考えられる。前述の通り、運動ニューロン軸索と骨格筋間の細胞接着を担う分子としてはこれまでに NCAM の例が知られている。NCAM はニワトリ胚の神経筋発生期の運動ニューロン軸索並びに骨格筋の筋管に高発現しており、抗 NCAM 抗体の投与により両者の結合を阻害することにより、骨格筋内部における運動ニューロン軸索の分枝・伸長が障害されることが知られている (Landmesser *et al.*, 1988; Landmesser *et al.*, 1990)。そのため、CLAC-P/sCLAC が NCAM などの細胞間接着分子と結合することで細胞接着を促進し、成長因子等の他の分子による運動ニューロン軸索の伸長作用の足掛かりとなっている可能性が考えられる。

他のメカニズムとしては、CLAC-P/sCLAC は運動ニューロン軸索の伸長を直接的には促進しなかったが、軸索伸長を促進する他の分子と結合することで、間接的に運動ニューロン軸索の伸長に影響を及ぼす可能性も考えられる。このように、リガンド-受容体結合を仲介する分子の例として FGF シグナルにおけるヘパラン硫酸プロテオグリカンの例が知られている。FGF の塩基性アミノ酸部分が細胞表面のヘパラン硫酸プロテオグリカン (HSPG) と結合して安定化されることが FGF 受容体との結合および下流のシグナル伝達に必須であることが知られていることから (Yayon *et al.*, 1991; Rapraeger *et al.*, 1991)、CLAC-P/sCLAC が成長因子や神経栄養因子と結合することで、間接的に軸索伸長を促進する可能性も考えられる。また、CLAC-P/sCLAC と *in vitro* において結合することが知られている HSPG を後根神経節 (DRG) の培養ニューロンに添加することで軸索伸長が促進することが知られている (Coles *et al.*, 2011)。そのため、筋管に発現した CLAC-P/sCLAC が HSPG を細胞表面に係留し、HSPG による軸索

伸長を仲介している可能性も想定される。

以上、CLAC-P/sCLAC が他の分子を仲介して運動ニューロン軸索の伸長を促進する可能性について述べたが、CLAC-P/sCLAC が直接的に運動ニューロン軸索発達を促進する可能性について考察する。分散培養条件下の神経細胞は複数の神経突起を有し、それらの中で最も長い1本が軸索へと分化することが知られているが (Craig and Banker 1994; Arimura and Kaibuchi 2007)、本研究における分散培養時の初代培養運動ニューロンの神経突起は短小であり、それぞれの突起は軸索あるいは樹状突起への分化は不十分であると考えられる。そのため、発達した軸索に対しては CLAC-P/sCLAC が直接的に軸索伸長を促進する可能性については否定できない。これを支持する例として、運動ニューロンの標的組織の選択に関わる EphA4 はニワトリ胚において軸索束が脊髄を出発する時期には運動ニューロンにおける発現は非常に低レベルであるが、標的組織選択の時期にその発現レベルが大きく上昇することが知られている (Soans *et al.*, 1994; Ohta *et al.*, 1996)。以上のことから、十分に分化・発達した運動ニューロン軸索に対しては CLAC-P/sCLAC が直接作用して軸索伸長を促進する可能性も除外はできない。

### III-3 CLAC-P/sCLAC の相互作用分子

CLAC-P/sCLAC が運動ニューロン軸索-骨格筋間の細胞接着に関与する場合、既知の分子である NCAM が結合分子の候補の1つとして考えられる。前述の通り、NCAM は運動ニューロンと筋管の両者に発現が見られ、ニワトリ胚においてはその結合阻害により軸索分枝・伸長の部分的な欠損が生じるが、NCAM 遺伝子 KO マウスは NMJ 形態と神経筋伝達の軽微な異常を認めるものの、神経筋支配は完全には障害されることなく出生後は成体まで成長する (Rafuse *et al.*, 2000; Polo-Parada *et al.*, 2001)。以上のことから、NCAM が CLAC-P/sCLAC の結合分子として軸索-骨格筋間の接着を促進する可能性は否定できないものの、その場合は運動ニューロン側の他の分子が機能を代償していると考えられる。

CLAC-P/sCLAC の生理的結合分子として現在までに最も可能性が高いと考えられるのが RPTP $\sigma/\delta$ である。先に述べた通り、RPTP $\sigma/\delta$ DKO マウスは Col25a1 KO マウスと同様に、骨格筋内部における運動ニューロン軸索発達を完全に欠損し、運動ニューロン細胞体の広汎な消失を示すなど、その表現型が酷似していることから、両者が神経筋発達において同一の pathway で機能する可能性が高いと考えられる。実際に、近年、富山大学吉田らにより行われた RPTP $\sigma$ の結合分子スクリーニングにおいて CLAC-P が結合分子として同定されている (私信)。さらに、当研究室宗實修士により、RPTP $\sigma/\delta$ 発



現HEK293細胞に対して精製sCLAC-FLAGを添加するとRPTP発現細胞表面にsCLACの蓄積が認められることが示されている（宗實悠佳修士論文）。以上のことから、RPTP $\sigma/\delta$ がCLAC-P/sCLACの直接あるいは間接の結合分子であると考えられ、CLAC-P/sCLACがRPTPと結合することで骨格筋内における運動ニューロン軸索発達を促進する可能性が非常に高いと考えている。

RPTP $\sigma/\delta$ が運動ニューロン軸索発達を促進するメカニズムは未知であるが、近年、HSPGやコンドロイチン硫酸プロテオグリカン（CSPG）がRPTP $\sigma/\delta$ のリガンドとして軸索伸長を制御することが明らかとなっている（Shen *et al.*, 2009; Coles *et al.*, 2011）。HSPGおよびCSPGのグリコサミノグリカン鎖はともにRPTP $\sigma$ と結合するが、前者は神経細胞に対して軸索伸長を促進し、後者は軸索伸長を抑制することが知られている（Shen *et al.*, 2009; Coles *et al.*, 2011）。さらに興味深いことに、HSPGとCSPGはともにRPTPのIgドメインに結合して結合部位を共有するが、結合のstoichiometryの違いにより、前者はRPTPのオリゴマー化を促進し、後者はオリゴマー化を阻害する。これらの分子会合状態の違いにより、growth coneにおけるRPTPの局在が変化することで軸索伸長が制御されると考えられている（Coles *et al.*, 2011）。CLAC-P/sCLACは*in vitro*においてHSPGやCSPGのグリコサミノグリカンと結合することが知られていることから、CLAC-P/sCLACがHSPG/CSPGとRPTPの結合の特異性や親和性に関与して、プロテオグリカンを介したRPTP pathwayに必須の役割を果たしている可能性が考えられる。

さらに、近年、プロテオグリカンに非依存的な機能としてRPTP $\sigma/\delta$ が中枢神経系においてシナプス間接着分子として働くことが明らかとなっている。RPTP $\sigma/\delta$ と結合することが判明している分子としてNGL-3、Slitrkファミリー、TrkC、IL1RAcP、IL1RAPL1などがあるが、これらはいずれも中枢神経系で樹状突起あるいは細胞体に局在し、軸索に存在するRPTP $\sigma/\delta$ との結合によりシナプス形成を誘導することが知られている（Kwon *et al.*, 2010; Takahashi *et al.*, 2011; Yoshida *et al.*, 2011; Takahashi *et al.*, 2012; Yoshida *et al.*, 2012）。これらの分子の多くがtype IIa RPTPと直接結合し（Kwon *et al.*, 2010; Yoshida *et al.*, 2011; Yoshida *et al.*, 2012）、両者を発現する細胞どうしのcell aggregation assayにより細胞間接着を促進することが知られていることから、骨格筋に発現するCLAC-P/sCLACと運動ニューロン軸索に発現するRPTP $\sigma/\delta$ とが結合して細胞接着を引き起こし、運動ニューロンの軸索発達を促進する可能性も考えられる。

以上のように、遺伝子ノックアウトマウスの表現型の類似性とCLAC-P/sCLACとRPTP $\sigma/\delta$ が結合関係にあることから、CLAC-PがRPTPを介して運動ニューロン軸索発達を促進する可能性が高い。今後、この可能性を検証するため、両者の結合が直接結合であるのか、もしくはプロテオグリカンを介した間接的な結合であるかを決定し、両者

の結合阻害が運動ニューロンの軸索発達に与える影響を検討する必要がある。特に、本研究において、脊髄前角 explant と CLAC-P 発現 HEK293 細胞との共培養により、CLAC-P 発現細胞に対する運動ニューロン軸索の集簇が認められたが、この現象が RPTP $\sigma/\delta$  と CLAC-P との結合に依存的であるかが最も注目される。

#### III-4 CLAC-P の furin 切断の意義

本研究において、脊髄前角 explant と CLAC-P 発現細胞および CLAC-P RAmt との共培養実験により、CLAC-P RAmt 発現細胞は運動ニューロン軸索を集簇させるものの、その程度は CLAC-P 発現細胞に比して有意に小さかった。さらに、両細胞でタンパク質の発現を確認すると、両者の細胞表面発現量は同程度であったが、CLAC-P 発現細胞の周囲には sCLAC の蓄積が認められ、一方 CLAC-P RAmt 発現細胞の周囲には sCLAC 蓄積が認められなかった。以上の結果から、全長型の CLAC-P は運動ニューロン軸索の集簇を促進し軸索を誘引する機能を有するが、CLAC-P 発現細胞の周囲に蓄積する sCLAC も同様の機能を有すると考えられた。このため、CLAC-P 発現細胞ではより広範囲から軸索を誘引し、RAmt 発現細胞に比して軸索集簇の程度が有意に上昇したと考えられる。

これまでに、CLAC-P の NC 領域を抗原に複数の抗体が当研究室において作製されたが、恐らくは内因性のタンパク発現量が低いために、免疫組織化学的にも生化学的にも内在性レベルでの CLAC-P/sCLAC タンパク質の検出には成功していない。このため、神経筋発生期において CLAC-P と sCLAC のいずれが優位に発現しているかは不明である。一方で、CLAC-P と同様に MACIT ファミリーに属し CLAC-P と相同性が高い Collagen XIII は筋管において全長型と分泌型の両者を発現し、膜貫通領域を欠損したノックインマウスが筋腱結合部の基底膜の形態異常と進行性のミオパチーを呈したことから、少なくとも Collagen XIII についてはその全長型は機能的であると考えられる (Kvist *et al.*, 2001; Latvanlehto *et al.*, 2010)。さらに、Collagen XIII は NMJ の形成に関与することが知られているが、Collagen XIII の furin 切断を欠損したノックインマウスは NMJ の成熟を形態的・機能的に促進したことから、神経筋発達における機能にも Collagen XIII の全長型が機能的であると考えられる (Latvanlehto personal communication)。ただし、これらの例は分泌型 Collagen が機能する可能性を除外するものではない。以上のことを踏まえると、少なくとも CLAC-P の全長型は機能的である可能性が高いと考えるが、全長型と分泌型のいずれが運動ニューロン軸索の発達に機能するかを *in vivo* において検証するためには、Col25a1 KO マウスに対して CLAC-P

RAmt 発現および sCLAC 発現によるレスキュー実験が期待される。

### III-5 ゼブラフィッシュの運動ニューロン軸索発達における CLAC-P の機能

本研究において、ゼブラフィッシュ *Col25a1* 遺伝子はマウス *Col25a1* 遺伝子と高い相同性を有し、CLAC-P mRNA は神経筋発生期の体節筋に発現することが明らかとなった。ところが、ゼブラフィッシュ *Col25a1* 遺伝子のスプライシング阻害モルフォリノを用いてこれをノックダウンしたところ、胚は正常に発生し、運動ニューロン軸索も正常に伸長して神経筋支配を認めた。以上のことからゼブラフィッシュの神経筋発生においては CLAC-P は必要でないと考えられる。

ゼブラフィッシュとマウスの運動ニューロン軸索発達のメカニズムを比較するに当たり、ゼブラフィッシュ運動ニューロン軸索発達における RPTP $\sigma/\delta$ の機能が注目される。ゼブラフィッシュにおいては RPTP $\sigma/\delta$ はゲノム重複により *RPTP $\sigma a$* 、*RPTP $\sigma b$* 、*RPTP $\delta a$* 、*RPTP $\delta b$*  の 4 遺伝子を持ち、このうち RPTP $\sigma a$  および RPTP $\delta b$  mRNA は 24 hpf 時点で脊髄に発現が認められる (van Eekelen *et al.*, 2010)。しかし、RPTP $\sigma a$  の単独ノックダウンにより olfactory sensory neuron 軸索末端のシナプス小胞が過剰に蓄積することが知られているが (Chen *et al.*, 2011)、RPTP $\sigma/\delta$ の両者の欠損例は報告されておらず、ゼブラフィッシュにおいて RPTP $\sigma/\delta$ 欠損が運動ニューロン軸索伸長を障害する直接の例は現在までに報告されていない。

ところが、RPTP $\sigma/\delta$ と同じく type IIa RPTP ファミリーに属する LAR が HSPG との結合を介して感覚ニューロンの軸索伸長を促進することから、ゼブラフィッシュにおいても type IIa RPTP がプロテオグリカンを介した軸索発達を制御することが明らかになっている (Wang *et al.*, 2012)。さらに、RPTP $\sigma$ との結合が示されている HSPG である Collagen XVIII はゼブラフィッシュの体節筋に発現しており、そのノックダウンにより一部の運動ニューロン軸索が choice point で伸長を停止することが知られ、ゼブラフィッシュ運動ニューロンにおいても HSPG-RPTP $\sigma$ を介した軸索伸長の制御メカニズムが想定されている (Aricescu *et al.*, 2002 ;Schneider and Granato 2006)。

さらに、ゼブラフィッシュにおいて体節筋上の運動ニューロン軸索発達を完全に欠損する表現型として Collagen XIX のノックダウン例が知られている。Collagen XIX は神経筋発生時の体節筋に発現し、その loss of function により全ての運動ニューロン軸索が choice point で伸長を停止するが (Hilario *et al.*, 2010)、この表現型は *Col25a1* KO マウスにおける運動ニューロン軸索発達の欠損と類似する。さらに、Collagen XIX は CLAC-P/sCLAC と同様にヘパラン硫酸との結合性を有することが知られており (Myers

*et al.*, 2003)、ゼブラフィッシュ運動ニューロン軸索発達における機能はヘパラン硫酸を介する可能性が考えられる。

以上のことから、ゼブラフィッシュにおいても RPTP-HSPG を介した運動ニューロン軸索の制御機構の存在が想定されることと、CLAC-P 同様にグリコサミノグリカン結合性の他の体節筋由来コラーゲンの欠損により運動ニューロン軸索伸長異常が引き起こされたことを考え合わせると、ゼブラフィッシュにおいて CLAC-P 欠損により運動ニューロン軸索発達が障害されなかったことは Collagen XVIII および Collagen XIX による代償機構が働いたことに起因する可能性がある。

### III-6 今後の展望

本研究において私は、組織特異的 *Col25a1* KO マウスの表現型解析から、骨格筋由来の CLAC-P/Collagen XXV が、標的骨格筋内における運動ニューロン軸索の分枝・伸長に必須の役割を果たすことを明らかにした。これまでに、神経筋発生過程のうち、運動ニューロン軸索が標的骨格筋を選択するメカニズムや、神経筋接合部形成のメカニズムについては詳細な解明がなされてきた。ところが、両ステップの中間に位置する、骨格筋内における軸索発達についてはそのメカニズムがほとんど解明されていない。RPTP $\sigma/\delta$ の欠損マウスが骨格筋内軸索発達を欠損することは知られていたが、単一分子の欠損により運動ニューロン軸索の分枝・伸長が完全に欠損する変異マウスは類例がなく、特に骨格筋に由来する必須因子としては CLAC-P が初めてのものである。

ノックアウトマウスの表現型の類似性と、CLAC-P と RPTP $\sigma/\delta$ が直接あるいはプロテオグリカンを介した間接的な結合関係にあることを考え合わせると、CLAC-P は RPTP を介して運動ニューロン軸索発達を促進する可能性が高い。今後は、両者の結合が実際に運動ニューロン軸索発達に対して機能的意義を有するかを検証することにより、骨格筋内における運動ニューロン軸索発達のメカニズム解明の糸口を見出したい。

これまでに、発生期において NMJ 形成オーガナイザーやアセチルコリン合成酵素を欠損することで神経筋伝達が抑制されることにより、運動ニューロンの軸索が過剰に発達することが古くから知られていた (Gautam *et al.*, 1995; DeChiara *et al.*, 1996; Terrado *et al.*, 2001; Brandon *et al.*, 2003)。また、筋側の AChR やリアノジン受容体の欠損により骨格筋の活動電位やカルシウムイオンの流入が抑制されると軸索発達が促進することから (Liu *et al.*, 2008; Chen *et al.*, 2011)、骨格筋に由来する軸索発達の促進因子が存在すると想定され、さらにその発現が骨格筋の活動電位依存的に抑制されると考えられてきたが、その分子メカニズムについては未解明であった。本研究において

CLAC-P が運動ニューロン軸索発達に対して骨格筋由来の必須因子として見出されたことから、これまで解明されなかった神経筋伝達依存的な軸索発達制御に CLAC-P が関与する可能性が注目される。実際に骨格筋における CLAC-P mRNA 発現は発生期の一過性のものであることから、神経筋伝達依存的な CLAC-P 発現調節機構が存在する可能性がある。今後、CLAC-P 発現・代謝機構の解明が神経筋伝達依存的な軸索発達制御メカニズムを解明する端緒となることが期待される。

## IV 方法

---

以下、特に断りがない場合、試薬は和光純薬、シグマ、関東化学の特級もしくはそれに準ずるものを用いた。用いたバッファの組成は phosphate buffered saline (PBS) : 8 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>、2 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>、131 mM NaCl (pH 7.6)、tris buffered saline (TS) : 150 mM NaCl、50 mM Tris-HCl (pH 7.6)、20 x SSC : 3 M NaCl、0.3 M Sodium (pH 7.0)、Tris-EDTA (TE) : 10 mM Tris、1 mM EDTA (pH 8.0) として用いた。また、培養細胞用の製品については、特に断りがない場合 Falcon、Nunc、Iwaki、BD Bioscience のものを使用した。培養細胞および脊髄前角 explant はいずれも 37°C 5% CO<sub>2</sub> 存在下の培養機中で培養した。

### IV-1 実験動物

本研究に用いた実験動物は東京大学動物実験実施規則を遵守し、東京大学大学院薬学系研究科 SPF 動物実験施設および東京大学大学院医学系研究科 SPF 動物実験施設、東京大学大学院薬学系研究科臨床薬学教室のコンベンショナル動物施設において、通常の飼育、繁殖方法により健康に飼育した。

#### Col25a1 KO マウス

Col25a1<sup>+/-</sup>マウスを交配して作出した。

#### Hb9-Cre マウス、HSA-Cre マウス、Rosa26<sup>stop-EYFP</sup> (Rosa<sup>EFYP</sup>) マウス

ジャクソン研究所より購入した。

#### Col25a1<sup>flox/flox</sup> マウス

Col25a1<sup>flox/wt</sup> マウスを交配して作出した。

#### Hb9-Cre; Col25a1<sup>flox/wt</sup> マウス

Hb9-Cre マウスを Col25a1<sup>flox/flox</sup> マウスあるいは Col25a1<sup>flox/wt</sup> マウスと交配して作出した。

#### Hb9-Cre; Col25a1<sup>flox/flox</sup> マウス

Hb9-Cre; Col25a1<sup>flox/wt</sup> マウスを Col25a1<sup>flox/wt</sup> マウスまたは Col25a1<sup>flox/flox</sup> マウスと交配して作出した。あるいは Hb9-Cre; Col25a1<sup>flox/flox</sup> マウスを Col25a1<sup>flox/flox</sup> マウスと交配して作出した。

#### HSA-Cre; Col25a1<sup>flox/wt</sup> マウス

HSA-Cre マウスを Col25a1<sup>flox/flox</sup> マウスあるいは Col25a1<sup>flox/wt</sup> マウスと交配して作出

した。

*HSA-Cre; Col25a1<sup>flox/flox</sup>* マウス

*HSA-Cre; Col25a1<sup>flox/wt</sup>* マウスと *Col25a1<sup>flox/flox</sup>* マウスとを交配して作出した。

*Hb9-Cre; Rosa<sup>EYFP/wt</sup>* マウス

*Hb9-Cre* マウスを *Rosa<sup>EYFP/wt</sup>* マウスと交配して作出した。

*HSA-Cre; Rosa<sup>EYFP/wt</sup>* マウス

*HSA-Cre* マウスを *Rosa<sup>EYFP/wt</sup>* マウスと交配して作出した。

#### IV-2 マウスの遺伝子型の決定

成体マウスおよび胎児の尾部組織を採取して、180  $\mu$ l の 0.1 N NaOH 水溶液中で 95°C 5 分間加熱して 20  $\mu$ l の 1 M Tris-HCl (pH 8.0) バッファーを添加して中和し、ゲノム DNA を抽出した。抽出した DNA を鋳型として PCR 反応を行い、アレル特異的なバンドを増幅した。PCR 反応には KOD FX Neo キット (TOYOBO) を用いた。0.1  $\mu$ L の KOD FX Neo、5  $\mu$ L の 2 x PCR buffer、1  $\mu$ L の 2 mM dNTP、0.1  $\mu$ L ずつの 50  $\mu$ M プライマー、2.6  $\mu$ L の水、1  $\mu$ L のゲノム DNA を混合して反応液を調製し、サーマルサイクラー (タカラ) を用いて PCR 反応を行った。反応サイクルは *Col25a1* KO マウス、*Col25a1<sup>flox</sup>* マウス、*Rosa26<sup>stop-EYFP</sup>* マウスの遺伝子型決定については 95°C プレヒート 5 分間の後、95°C 30 秒、60°C 30 秒、68°C 1 分を 40 サイクル繰り返した。*Hb9-Cre* マウスおよび *HSA-Cre* マウス遺伝子型決定については、94°C プレヒート 5 分間の後、94°C 30 秒、51.7°C 60 秒、68°C 1 分を 40 サイクル繰り返した。用いたプライマーペアと増幅されるバンドサイズを以下に記す。

*Col25a1* KO マウス

Forward primer : 5'-TTTACTTCCAATGGAGAGGC-3'

Reverse primer : 5'- ATATTTCCATATGGTGACG -3'

WT allele : 1965 bp

*Col25a1* null allele : 500 bp

*Col25a1<sup>flox</sup>* マウス

Forward primer : 5'-GTTGGTTAAGGATGCAGTGCAAG-3'

Reverse primer : 5'- ACACAGCCTCTCCATTGGAAG-3'

WT allele : 138 bp

*Col25a1* flox allele : 397 bp

#### *Hb9-Cre* マウスおよび *HSA-Cre* マウス

Forward primer : 5'- GCGGTCTGGCAGTAAAACTATC-3'

Reverse primer : 5'- GTGAAACAGCATTGCTGTCACTT-3'

Cre allele : 約 100 bp

およびインターナルコントロール

Forward primer : 5'- CTAGGCCACAGAATTGAAAGATCT-3'

Reverse primer : 5'- GTAGGTGGAAATTCTAGCATCATCC-3'

324 bp

#### *Rosa26<sup>stop-EYFP</sup>* マウス

Forward primer : 5'- AAAGTCGCTCTGAGTTGTTAT-3'

Reverse primer : 5'-AAGACCGCGAAGAGTTTGTC-3'

Reverse primer : 5'-GGAGCGGGAGAAATGGATATG-3'

WT allele : 600 bp

*Rosa26-stop-EYFP* allele : 320 bp

#### IV-3 C2C12 細胞の培養と分化誘導

コラーゲンIコート処理が施されたプラスチック製カバースリップ (住友ベークライト) に C2C12 筋芽細胞を播種し、細胞密度が 70-90%程度になるまで 10% 非働化ウシ胎児血清 (FBS、Biowest)、50 U/mL Penicillin・50 µg/mL Streptomycin (Life Technologies) 含有 Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) で培養した。その後 2% Horse serum (HS)、50 U/mL Penicillin・50 µg/mL Streptomycin 含有 DMEM に培地交換し、筋芽細胞から筋管への分化を誘導した。分化誘導後は 1 日おきに培地交換を行った。

#### IV-4 C2C12 細胞における *in situ* hybridization

センスおよびアンチセンスプローブにはマウス *Col25a1* 遺伝子エクソン 1 内-265 から+294 の領域をジゴキシゲニン (digoxigenin: DIG) 標識したものをを用いた (Hashimoto *et al.*, 2002)。pBlueScript KSII+ベクターに挿入された同領域を、MEGAscript (Ambion) T7 および T3 を用いて DIG RNA Labeling Mix (Roche) による DIG 標識 RNA プローブを合成した。分化誘導 5 日後の C2C12 細胞を PBS で 1 回洗浄したのち 4 %



paraformaldehyde (PFA、TAAB) /PBS にて室温で 10 分間固定した。PBS で 3 回洗浄して 1 x SSC にて 5 分間、次いで 0.2 N NaOH にて 10 分間インキュベートした。ハイブリダイゼーションバッファーにて室温で 5 時間インキュベートしたのち、DIG 標識したセンス/アンチセンスプローブを 0.8 µg/ml の濃度で添加して 51°C で一晩反応させた。0.2 x SSC にて 60°C、1 時間洗浄したのち、0.2 x SSC で室温、5 分間洗浄した。3% BSA 0.1 % Triton X-100 を含む PBS にて 1 時間ブロッキングしたのち、アルカリホスファターゼ標識抗 DIG 抗体 (Roche, 1: 2500) を 4°C で一晩反応させた。0.1 % Triton X-100/PBS にて 3 回洗浄したのち、NBT/BCIP 基質 (Roche) により 1 時間発色させた。用いたバッファーの組成を以下に記す。20 x SSC : 3 M NaCl, 0.3 M Sodium Citrate (pH 7.0)、ハイブリダイゼーションバッファー: 50 % ホルムアミド、5 x SSC、1 % SDS、50 µg/ml tRNA、0.005 % heparin、ハイブリダイゼーションバッファー : 50 % ホルムアミド、5 x SSC、1 % SDS、50 µg/ml tRNA。また、SSC および PBS は 0.1 % Diethylpyrocarbonate (DEPC) で一晩反応させて RNase を阻害し、オートクレーブしたのち使用した。

#### IV-5 Col25a1 flox マウス targeting construct の作製

マウス *Col25a1* 遺伝子のエキソン 2 (ex2) の 1508 bp 下流から 8965 bp 下流までのイントロン領域 7458 bp (int2-3) を pBluescript II KS+ に挿入し int2-3 ベクターを得た。NotI-Sall サイトを付加した forward primer を ex2 の上流に、ex2 下流の BamHI サイトより下流に reverse primer をそれぞれ設計し、Phagemid 17-1, clone 44 を鋳型として PCR を行い、ex2 周辺領域を増幅した。PCR 産物を NotI および BamHI にて制限酵素処理したのちアガロースゲルに電気泳動・精製して ex2 周辺配列を得た。Int2-3 ベクターを NotI および BamHI で制限酵素処理してアガロースゲル電気泳動・精製したのち ex2 周辺配列とのライゲーションを行い、ex2 周辺配列が挿入された int2-3 ベクター (Long arm) を得た。Long arm ベクターを BamHI で制限酵素処理後、SacII site-Scal site-loxP の合成 2 重鎖とライゲーションして ex2 の 3' 側に loxP 配列を挿入した。βgeo カセットが挿入された pBluescript II KS+ ベクター (大阪大学大学院医学系研究科、原田彰宏教授より拝受) を SacII および XhoI により制限酵素処理し、アガロースゲル電気泳動により精製して βgeo カセットを得た。Ex1 内部に NotI サイトを付加した forward primer と intron1-2 中に SacII サイトを付加した reverse primer をそれぞれ設計して、Phagemid 17-1, clone 44 を鋳型として PCR により増幅した。PCR 産物を SacII および NotI で制限酵素処理してアガロースゲルに電気泳動・精製して short arm を得た。Long arm ベクターを NotI および Sall で制限酵素処理後、アガロースゲル電気泳動にて精製

し、short arm および $\beta$ geo カセットとライゲーションし、short arm- $\beta$ geo カセット-long arm ベクターを得た。大阪大学大学院医学系研究科、原田彰宏教授より拝受したジフテリアトキシン (DTA) 発現 pMC1 ベクターを NotI にて制限酵素処理後、アガロースゲル泳動・精製して DTA 配列を得た。short arm- $\beta$ geo カセット-long arm ベクターを NotI にて制限酵素処理・アガロースゲル泳動・精製して DTA 配列とライゲーションして targeting construct を完成した。制限酵素処理はいずれもタカラの試薬を用い、ライゲーションには T4 DNA Ligase (タカラ) もしくは Ligation high (東洋紡) を用いた。PCR 反応には Platinum Pfx DNA polymerase (Life Technologies) を用いた。0.5  $\mu$ l の polymerase、5  $\mu$ l の 10 x buffer、1  $\mu$ l の 50 mM MgSO<sub>4</sub>、6  $\mu$ l の 2.5 mM sNTPs、2  $\mu$ l ずつの 10  $\mu$ M プライマーペア、100 ng の template DNA、蒸留水を混合して 50  $\mu$ l の反応液を調製した。サーマルサイクラーにて 95°C プレヒート 5 分間の後、95°C 30 秒、60°C 30 秒、68°C 2 分を 30 サイクル繰り返して PCR 反応を行った。合成 2 重鎖の調整には、1  $\mu$ l ずつの 200  $\mu$ M 合成オリゴヌクレオチド、1  $\mu$ l の 10 x kinase buffer、1  $\mu$ l の 1 mM ATP、0.25  $\mu$ l の T4 PNK (いずれもタカラ) と蒸留水を混合して 10  $\mu$ l の反応液を調製したのち、37°C で 30 分間反応してリン酸化を行った。リン酸化反応液に 10  $\mu$ l の TE バッファーを加えて 95°C で 5 分間変性処理したのち放置して冷却し、2 本鎖のアニーリングを行った。

Ex2 周辺配列の増幅に用いたプライマーペア

Forward: 5'-GGTAATAAGCGGCCGCTAGAGCTGTTGAAGTCGACAGTTATCTTC-3'

Reverse: 5'-CCATAGGGCCAGTGGGATGGCACTTGTC-3'

合成 2 重鎖

Forward:

5'-GATCACCGCGGAGTACTATAACTTCGTATAATGTATGCTATACGAAGTTAT-3'

Reverse:

5'-GATCATAACTTCGTATAGCATACATTATACGAAGTTATAGTACTCCGCGGT-3'

Short arm の増幅に用いたプライマーペア

Forward: 5'-TAGTTGTGCGGCCGCGAGGACTGAAC-3'

Reverse: 5'-TAACTCTCCGCGGCAACAGCTCTAC-3'

#### IV-6 ES 細胞からのゲノム DNA 抽出

ES 細胞に lysis buffer を加えて 37°C 1 時間インキュベートしたのち、55°Cで一晩インキュベートした。フェノール・クロロホルム溶液で 2 回抽出したのち、2-propanol で DNA ペレットを沈殿させ、70% エタノールで洗浄した。ペレットを風乾したのち TE+Rnase (Sigma, 10 µg/ml) バッファ-50 µl に溶解した。Lysis buffer : 50 mM Tris-HCl (pH 8.0)、1 % SDS、100 mM NaCl、20 mM ESTA、10 µg/ml Proteinase K (タカラ)。

#### IV-7 サザンブロッティング

2.5 µl Xbal (高濃度)、2.5 µl 10 x M buffer、2.5 µl 10 x BSA (いずれもタカラ)、7.5 µl 蒸留水、10 µl ゲノム DNA をまぜ消化反応液を調整して 37°Cで一晩反応させた。0.7 % アガロースゲル (ナカライ) にて 13-15 mA 定電流条件下で DNA 消化反応液を一晩泳動した。ゲルをアルカリ変性液 (0.5 M NaOH、1.5 M NaCl) 中にて 30 分間浸透したのち、中和液 (0.5 M Tris-HCl、pH 8.0、1.5 M NaCl) 中で 30 分間浸透して中和した。ゲル上に 3 MM Whatman ろ紙、Duralon-UV membrane (ストラタジーン) の順に乗せて 10 x SSC にてなじませたのち、さらにペーパータオル (大王製紙) を重ねて一晩転写した。転写後の Membrane を UV クロスリンカーにて 120,000 µJ/cm<sup>2</sup> で DNA をクロスリンクしたのち、乾燥させた。プローブのハイブリダイゼーションに先立ち、membrane を 0.2 x SSC に浸したのち、ハイブリダイゼーションバッファ-中 65°C でプレインキュベートした。マウス *Col25a1* 遺伝子エキソン 1 の約 3 kb 上流 357 bp の DIG 化プローブ (Tanaka *et al.*, 2014) を加えて 65°C、一晩ハイブリダイズした。DIG buffer 1 (100 mM Tris-HCl pH7.5、150 mM NaCl) にて 65°C、20 分洗浄後、0.5 % blocking reagent (Roche) /DIG buffer 1 (blocking buffer) 中にて室温で 30 分間浸透してブロッキングし、次いでアルカリホスファターゼ標識抗 DIG 抗体を blocking buffer にて 10000 倍に希釈して室温で 1 時間反応させた。DIG buffer 1 にて 15 分、2 回洗浄したのち、DIG buffer 3 (100 mM Tris-HCl pH 9.5、100 mM NaCl、50 mM MgCl<sub>2</sub>) に 5 分間浸し、CDP star substrate (TROPIX) を添加して 5 分間インキュベートした。DIG buffer 3 で 3 回洗浄したのち LAS 4000 mini (富士フイルム) にて検出した。

#### IV-8 PCR 法による ES 細胞の遺伝子型決定

PCR 反応には KOD FX Neo キット (TOYOBO) を用いた。0.1 µL の KOD FX Neo、

5  $\mu\text{L}$  の 2 x PCR buffer、1  $\mu\text{L}$  の 2 mM dNTP、0.1  $\mu\text{L}$  ずつの 50  $\mu\text{M}$  プライマーペア、2.6  $\mu\text{L}$  の水、1  $\mu\text{L}$  のゲノム DNA を混合して反応液を調製し、サーマルサイクラーを用いて PCR 反応を行った。反応サイクルは  $\Delta\text{cassette allele}$ 、 $\text{Cassette allele}$ 、 $3'$  loxP allele の遺伝子型決定については  $95^\circ\text{C}$  プレヒート 5 分間の後、 $95^\circ\text{C}$  30 秒、 $58^\circ\text{C}$  30 秒、 $68^\circ\text{C}$  1 分を 40 サイクル繰り返した。flox  $\beta\text{geo allele}$  の検出については  $95^\circ\text{C}$  プレヒート 5 分間の後、 $95^\circ\text{C}$  30 秒、 $62^\circ\text{C}$  30 秒、 $68^\circ\text{C}$  1 分を 40 サイクル繰り返した。

$\Delta\text{cassette allele}$  (147 bp)

Forward primer : 5'- AAGTTATCCCGGCCGCTCTAG-3'

Reverse primer : 5'- ACACAGCCTCTCCATTGGAAG-3'

Cassette allele (610 bp)

Forward primer : 5'- CTATTCGGCTATGACTGGGC-3'

Reverse primer : 5'- AATATCACGGGTAGCCAACG-3'

およびインターナルコントロール (324 bp)

Forward primer : 5'- CTAGGCCACAGAATTGAAAGATCT-3'

Reverse primer : 5'- GTAGGTGGAATTCTAGCATCATCC-3'

$3'$  loxP allele (246 bp) WT allele (212 bp)

Forward primer : 5'- GTATGGAAATCAGAGAGCAGC-3'

Reverse primer : 5'- CTGTCTTCTCAGTCAAAGCC-3'

flox  $\beta\text{geo allele}$  (1054 bp)

Forward primer : 5'- CTCTACCAACTAGTTGTGCAGC-3'

Reverse primer : 5'- GGCCGGGATAACTTCGTATAGC-3'

#### IV-9 横隔膜の whole mount 蛍光染色

実体顕微鏡下で胎児横隔膜を摘出し、4% PFA/PBS 中で 5-10 分間固定した。PBS で 3 回洗浄後、1% BSA、1% Triton X-100、0.1% sodium azide/PBS 中にて室温にて一晩から二晩インキュベートし、ブロッキング・浸透化を行った。抗ニューロフィラメント抗体 (2H3、DSHB) を 10% calf serum、0.1% sodium azide/PBS (ブロッキング液) にて 1000 倍に希釈し、 $4^\circ\text{C}$  で一晩から二晩反応させた。PBS で 1 時間 x 3 回洗浄

したのち Alexa 標識 2 次抗体 (Life Technologies) および Alexa 標識  $\alpha$ -Bungarotoxin (Life Technologies) をブロッキング液でそれぞれ 1000 倍希釈したものを 4°C で一晩反応させた。PBS で 1 時間 x 3 回洗浄したのち PermaFluor (フナコシ) にて封入した。

#### IV-10 凍結切片の作製

胎児を摘出後、4 % PFA にて E10.75 胎児については 30 分間、E12.5-E18.5 胎児については 2 時間いずれも 4°C で固定した。PBS にて 3 回洗浄し、12.5 % sucrose/PBS で 4°C 2 時間から一晩インキュベートし、さらに 25 % sucrose で 2 時間から一晩インキュベートし、O.C.T compound (サクラファインテック) を満たしたクリオモルドにサンプルを移した。これをドライアイスで冷却したヘキサン中にて凍結包埋し、凍結ブロックとして -80°C にて保存した。凍結ブロックを -20°C で 3 時間静置したのち、クリオスタット (Zeiss) にて E10.75-E12.5 胎児については 16  $\mu$ m、E18.5 胎児については 20  $\mu$ m の厚みでそれぞれ薄切した。薄切した切片は室温 1 時間以上の風乾後、-80°C にて保存した。

#### IV-11 抗 Islet1/2 抗体および抗 GFP 抗体による共免疫染色

凍結切片を室温にて 3 時間インキュベートしたのち、あらかじめ -20°C に冷却された 100 % メタノール中にて 20 分間インキュベートして固定した。PBS で 3 分間 x 3 回洗浄したのち、10 % calf serum (Gibco)、0.1 % sodium azide/PBS (ブロッキング液) にて室温、30 分間ブロッキングし、次いで抗 Islet1/2 抗体 (DSHB、1: 1000) および抗 GFP 抗体 (Life Technologies、1: 1000) を含むブロッキング液にて 4°C で一晩反応させた。PBS で 3 分間 x 3 回洗浄後、Alexa 標識 2 次抗体 (Life Technologies、1: 1000)、diamidino-2-phenylindole (DAPI、和光 1: 3000) を含むブロッキング液で室温で 1-2 時間反応させ、PBS で 3 分間 x 3 回洗浄したのち水溶性封入剤にて封入した。

#### IV-12 抗 MyHC 抗体と抗 GFP 抗体による共免疫染色、および抗 ChAT 抗体による免疫染色

凍結切片をメタノール固定後、1  $\mu$ g/ml Proteinase K を含む TE バッファー中にて室温 10 分間インキュベートし、PBS 中で 5 分間洗浄した。次いで、4 % PFA/PBS 中で室温、1 分間再固定し、PBS で 3 分間 x 3 回洗浄した。ブロッキング液にて 30 分間のブロッキングの後、抗 MyHC 抗体 (Sigma) および抗 GFP 抗体については 1000 倍、

抗 ChAT 抗体 (Millipore) については 200 倍にそれぞれブロッキング液にて希釈して、4°Cで一晩反応させた。PBS で 3 分間 x 3 回洗浄後、Alexa 標識 2 次抗体 (1: 1000)、DAPI (1: 3000) を含むブロッキング液で室温、1-2 時間反応させ、PBS で 3 分間 x 3 回洗浄したのち水溶性封入剤にて封入した。

#### IV-13 脊髄前角運動ニューロン細胞体数の計測

E18.5 胎児の頸髄 C3-5 にかけての領域の凍結連続切片を作成し、抗 ChAT 抗体による免疫染色をおこない、5 切片置きに計 7-9 切片の脊髄両側に存在する ChAT 陽性細胞数をカウントした。各個体の 1 切片あたりの脊髄片側の細胞数の平均値を算出し、Student's t-test により統計処理を行った。

#### IV-14 運動ニューロンの初代培養

*Hb9-GFP* マウスの交配により得られた妊娠マウスより E11.5-12.5 胎児を摘出し、脊髄を蛍光顕微鏡下で観察して *Hb9GFP* 陽性の胎児を選別した。*Hb9GFP* 陽性の胎児脊髄を実体顕微鏡下で摘出し、氷冷した Hank's Balanced Salt Solution (HBSS、Life Technologies) 中に 1 個体分ずつ回収し、0.02 % Trypsin (Life Technologies) を加えて 37°Cで 8 分間インキュベートした。インキュベート後上清を捨て、0.4 % ウシ血清アルブミン (BSA、シグマ) , 0.1 mg/mL DNase/Neurobasal (Life Technologies) を加えて脊髄を dissociate した。15 mL チューブ中の懸濁液の底面に 4% BSA/Neurobasal をパスツールピペットを用いて徐々に注入し、480 x g、5 分間遠心し細胞を沈殿させた。2 % HS、2% B-27 (Life Technologies)、0.5 mM L-Glutamine (Life Technologies)、21  $\mu$ M  $\beta$ メルカプトエタノール、50 U/mL Penicillin・50  $\mu$ g/mL Streptomycin (Life Technologies) / Neurobasal を complete medium として調製し、ペレットを complete medium に懸濁し、血球計算盤を用いてセルカウントを行い、各実験条件下で細胞を播種した。

#### IV-15 リコンビナント sCLAC-FLAG の精製

HEK293 細胞を 6 cm ディッシュに播種して 50% confluency となった時点で CLAC-P FLAG/pcDNA3.1hyg を Lipofectamine LTX (Life technologies) によりトランスフェクションした。1 日後に 500  $\mu$ g/ml の濃度で Hygromycin を培地に添加してポジティブセレクションにより CLAC-P FLAG 恒常発現細胞を得た。CLAC-P FLAG 恒常発現細胞を

限外希釈法にてクローニングしてモノクローン株を得た。CLAC-P FLAG 恒常発現モノクローン株を 15 cm ディッシュ 30 枚に培養し 100% confluency となった時点で無血清 DMEM に培地を置換して 6 日間培養した。得られた培養上清約 500 ml を Amicon Ultracolumn 30K (Millipore) にて 50 ml に濃縮し、M2-Agarose カラム (Life Technologies) に吸着した。TS に溶解した 50  $\mu\text{g/ml}$  の合成 FLAG ペプチドにより sCLAC-FLAG タンパク質を溶出して、溶出画分を TS に対して透析し、精製 sCLAC-FLAG タンパク質を得た。

#### IV-16 精製 sCLAC 添加時の運動ニューロン生存率の測定

500  $\mu\text{g/ml}$  poly-D,L-ornithine (sigma) および 10  $\mu\text{g/ml}$  laminin (Life Technologies) であらかじめコート処理を施した 24 well plate に  $2.0 \times 10^3$  cell/well の密度でそれぞれ細胞を播種した。24 well plate に播種した細胞は complete medium に精製 sCLAC-FLAG を 1-100 ng/ml の濃度で添加した培地あるいは、1.0 ng/ml BDNF、10 ng/ml CNTF、0.1 ng/ml GDNF (いずれも R&D) の 3 種カクテルを添加した培地 (+NTF) でそれぞれ培養し、運動ニューロン生存率の計測に用いた。すべての細胞について、1 DIV の時点で培地を半量交換し、培地は全て用時調製して用いた。*Hb9GFP* トランスジーンにより GFP 陽性の運動ニューロンを蛍光顕微鏡下 (x200) で観察し、well 底面に接着して intact な細胞体を持つものを生存細胞と判断し、生存細胞数を計測した。細胞数は培養開始 5 時間後 (0 DIV) および 3DIV の時点で計測し、毎回 well 中の同一の位置における細胞数を計測した。0 DIV における生存率を 100 % として 3 DIV における生存率をそれぞれの群で算出し、One way ANOVA および Tukey's multiple test にて統計学的処理を行った。

#### IV-17 精製 sCLAC コーティング時の運動ニューロン軸索長の測定

500  $\mu\text{g/ml}$  poly-D,L-ornithine コートしたガラスカバースリップ (MATSUNMI) に BSA、精製 sCLAC-FLAG およびラミニンを 3  $\mu\text{g/ml}$  の濃度でそれぞれ  $4^\circ\text{C}$  一晚コートした。運動ニューロンをそれぞれのウェルに  $3.0 \times 10^3$  cell/well の密度で播種し、24 時間培養した。培養後 PBS で 1 回洗浄し、4% PFA/PBS で 20 分間室温静置し、細胞を固定した。PBS で 2 回洗浄後、3 % BSA、0.2 % Triton X-100/PBS で室温、15 分間ブロッキングおよび浸透化した。PBS で 2 回洗浄後、3 % BSA/PBS で希釈した抗 GFP 抗体 (1: 1000) および抗 FLAG 抗体 (1: 2000) で  $4^\circ\text{C}$  一晚もしくは室温、3 時間反応させた。PBS で 3 回洗浄した後、3 % BSA/PBS で希釈した Alexa 標識 2 次抗体 (1: 1000) お

および DAPI (1: 3000) を室温で 1 時間または 4°C で一晩反応させた。PBS で 3 回洗浄後、PermaFluor (Immunon) を用いて封入し蛍光顕微鏡 (Zeiss) にて観察した。

細胞体の直径より長い神経突起を有する GFP 陽性神経細胞について、もっとも長い突起の長さを ImageJ にて計測した。各群における運動ニューロンの神経突起長を One way ANOVA および Tukey's multiple test にて統計学的検討を行った。

#### IV-18 脊髄前角 explant と HEK293 細胞との共培養

共培養の 1 日前に 24 well plate に培養した HEK293 細胞 (80 % confluency) に pcDNA3.1 空ベクター、CLAC-P、CLAC-P RAmt、Collagen XIII、Collagen XXIII (いずれも pcDNA3.1Hygro ベクター) と mCherry/pcDNA4 を共遺伝子導入した。トランスフェクションには Lipofectamine LTX (Life Technologies) を用いて、導入した DNA 量は各コラーゲン: mCherry = 0.1  $\mu$ g: 0.6  $\mu$ g の量比とした。500  $\mu$ g/mL poly-D,L-ornithine および 3  $\mu$ g/mL laminin であらかじめコート処理を施した 24 well plate 中ガラスカバースリップ上に  $2.0 \times 10^3$  cell/well の密度で HEK293 細胞を播種し、その 1.5-2 時間後に脊髄前角 explant を播種し、共培養を開始した。

*Hb9GFP* 陽性の E12.5 胎児脊髄を実体顕微鏡下で摘出し、氷冷した HBSS 中に 1 個体分ずつ回収した。脊髄の roof plate を裁断し、open book style にした脊髄をタングステンピン (室町機械) で固定し、実体顕微鏡下 GFP 陽性の脊髄前角部分を摘出した。脊髄前角を直径 200-500  $\mu$ m のサイズに切断し、HEK293 細胞との共培養に用いた。共培養時の培地組成は、Neurobasal medium をベースに 2% B-27、0.5 mM L-Glutamine、21  $\mu$ M  $\beta$ メルカプトエタノール、1.0 ng/mL BDNF、10 ng/mL CNTF、0.1 ng/mL GDNF、50 U/mL Penicillin・50  $\mu$ g/mL Streptomycin を加えた。

#### IV-19 脊髄前角 explant-HEK293 細胞共培養の免疫染色と軸索集簇の定量

培養 48 時間後に培地と等量の 2% PFA、12.5 % sucrose/PBS をウェルの底面に慎重に流し込み室温 30 分間固定したのち、上層を捨ててさらに 2% PFA、12.5 % sucrose/PBS を加えて室温で一晩固定した。PBS で 3 回洗浄したのち、3 % BSA、0.2 % Triton X-100/PBS で室温にて 15 分間ブロッキングおよび浸透化した。PBS で 2 回洗浄後、3 % BSA/PBS で希釈した抗 GFP 抗体 (1: 1000) で 4°C 一晩もしくは室温 3 時間反応させた。PBS で 3 回洗浄した後、3 % BSA/PBS で希釈した Alexa 標識 2 次抗体 (1: 1000) および DAPI (1: 3000)、DRAQ5 (Life Technologies、1: 3000) を室温で 1 時間または 4°C で一晩反応させた。PBS で 3 回洗浄後、PermaFluor (Immunon) を用い



て封入して共焦点レーザー顕微鏡 (Leica) にて観察した。

脊髄前角 explant から放射状に伸長した GFP 陽性軸索の先端と根本との中間地点より遠位の部分で、HEK293 細胞と接触する部分に着目し、画像を撮影した。mCherry 陽性 HEK293 細胞と運動ニューロン軸索が接触する部分の長さについて ImageJ を用いて計測し、さらにその値を接触する HEK293 細胞の面積で規格化した。この規格化した値を軸索集簇の指標として各群間で比較した。統計学的検討には One way ANOVA および Tukey's multiple test あるいは Bonferoni correction を採用した。

#### IV-20 HEK293 細胞における表面ビオチン化実験とウエスタンブロッティング

12 well plate に培養した HEK293 細胞 (80 % confluency) に、Lipofectamine LTX を用いて各コラーゲン発現ベクターを 1.2  $\mu\text{g}$  トランスフェクションした。トランスフェクション 24 時間後にプレートを氷上に置き、1 mM  $\text{MgCl}_2$ 、0.1 mM  $\text{CaCl}_2$ /PBS (PBS-CM) にて 1 回洗浄後、1 mg/ml EZ Link<sup>TM</sup> Sulfo-NHS-SS-Biotin (Thermo) /PBS-CM を加えて 30 分間インキュベートし、ビオチン化を行った。100 mM Glycine/PBS-CM にて 2 回慎重に洗浄・クエンチしたのち、PBS-CM で 1 回慎重に洗浄した。1 % SDS/PBS を加えて室温にて 30 分間振盪して細胞の可溶化を行い、可溶化液を 1.5 ml チューブに回収してソニケーション (BRANSON) にて細胞を破碎した。得られた可溶化液を Protein BCA Assay Reagent (Thermo) を用いて発色、プレートリーダー (モレキュラーデバイス) でタンパク定量を行った。少量を input として保存し、残りの可溶化液について各群間でタンパク量を均等化し、1 % SDS/PBS で平衡化した Streptavidin sepharose ビーズ (GE ヘルスケア) を添加して室温、12-16 時間 rotation してビオチン化タンパク質を結合させた。1 % SDS/PBS にて 4 回ビーズを洗浄し、ビーズには 50  $\mu\text{l}$  のサンプルバッファー (2 % SDS、10 % グリセロール、80 mM Tris-HCl、Brilliant green、CBB-G250) および終濃度 1 %  $\beta$ -メルカプトエタノールを加えて pull down 群とした。Input 群についても同様にサンプルバッファーおよび終濃度 1 %  $\beta$ -メルカプトエタノールを加えた。Pull down 群および Input 群をあらかじめ 100°C に温めたヒートブロック中にて 1 分間それぞれ boil し loading sample を得た。

Loading sample のうち Input 群については 3-5  $\mu\text{g}$  の範囲で同一タンパク量となるようにサンプルをアプライし、pull down 群については 10-15  $\mu\text{l}$  の範囲で同一量を 7.5 % Tris-Glycine ポリアクリルアミドゲルにアプライして電気泳動を行った。電気泳動後のゲル中のタンパク質を GVHP メンブレン (Millipore) に 220 mA、120 分間の定電流で転写した。5 % skim milk (BD) を懸濁した TS-Tween バッファー (0.1 % Tween 20/TS) 中にてメンブレンを室温で 30 分間振盪してブロッキングを行った。2.5 % skim

milk/TS-Tween にて 1000 倍に希釈した抗 CLAC-P NC3 抗体を 4°Cで一晩反応して TS-Tween にて 10 分間 x 3 回洗浄した。2.5 % skim milk/TS-Tween にて 10000 倍に希釈したペルオキシダーゼ標識抗ラビット IgG 抗体 (GE ヘルスケア) を 2 次抗体として室温、1 時間反応させた。TS-Tween にて 10 分間 x 3 回洗浄したのち Immunostar Super Signal (和光) にて発色し、LAS-4000 mini (富士フィルム) で検出した。

#### IV-21 CLAC-P および CLAC-P RAmt 発現 HEK293 細胞の免疫染色

「脊髄前角 explant と HEK293 細胞との共培養」にて述べた通りの手順にて HEK293 細胞に CLAC-P および CLAC-P RA mt を mCherry とともに遺伝子導入した。トランスフェクション 24 時間後、500 µg/mL poly-D,L-ornithine および 3 µg/mL laminin であらかじめコート処理を施した 24 well plate 中ガラスカバースリップ上に  $2.0 \times 10^3$  cell/well の密度で HEK293 細胞を播種し、Neurobasal medium をベースに 2% B-27、0.5 mM L-Glutamine、21 µM βメルカプトエタノール、50 U/mL Penicillin・50 µg/mL Streptomycin を加えた培地にて 48 時間培養した。培養後 PBS で 1 回洗浄し、4% PFA/PBS で 20 分間室温で静置し、細胞を固定した。PBS で 2 回洗浄後、3 % BSA、0.2 % Triton X-100/PBS で室温、15 分間ブロッキングおよび浸透化した。PBS で 2 回洗浄後、3 % BSA/PBS で希釈した抗 CLAC-P NC4 抗体 (1: 1000) と 4°C、一晩反応させた。PBS で 3 回洗浄した後、3 % BSA/PBS で希釈した Alexa 標識 2 次抗体 (1: 1000)、DRAQ5 (1: 3000) および DAPI (1: 3000) を室温で 1 時間または 4°Cで一晩反応させた。PBS で 3 回洗浄後、PermaFluor (Immunon) を用いて封入して共焦点レーザー顕微鏡にて観察した。

#### IV-22 ゼブラフィッシュにおける whole mount *in situ* hybridization

ゼブラフィッシュは国立遺伝学研究所、初期発生研究部門にて飼育・維持されている TU strain および筋特異的 GFP tg ライン (プロモーター未同定) を使用した。pTA2 ベクターに挿入されたゼブラフィッシュ Col25a1 cDNA 全長を鋳型として T7/T3 プロモーター下で DIG 標識したセンスおよびアンチセンスプローブを合成して用いた。GFP アンチセンスプローブは国立遺伝学研究所、浅川和秀助教より拝受した。受精後 24 時間の胚を 4 % PFA にて室温、2 時間固定し、100 %メタノールにて脱水して-20°Cにて保存した。脱水胚を室温にて 50% メタノール、30 % メタノール、0.5 % Triton X-100/PBS (PBST) により順次浸水化し、4 % PFA にて室温、20 分間再固定した。PBST にて 5 分間 x 2 回洗浄したのち 10 µg/ml Proteinase K にて室温、5 分間消化した。PBST にて 5 分間 x 2 回洗浄したのち、ハイブリダイゼーションバッファーで 65°C、

3 時間プレハイブリダイゼーションした。50 ng の DIG 標識プローブを添加して 65°C で振盪しながら一晩ハイブリダイゼーションした。66 %ハイブリダイゼーションバッファー、33% 2 x SSC にて 65 °C 30 分間洗浄し、次いで 33 %ハイブリダイゼーションバッファー、66 % 2 x SSC にて 65°C 、30 分間洗浄した。さらに、2 x SSC にて 65°C、15 分間洗浄し、次いで 0.2 x SSC にて 65°C 、30 分間 x 2 回洗浄した。マレイン酸バッファー (100 mM マレイン酸、150 mM NaCl、0.1 % Tween 20、pH 7.5) にて室温で 10 分間 x 2 回洗浄し、ブロッキングバッファーにて 4°C一晩ブロッキングした。アルカリホスファターゼ標識抗 DIG 抗体をブロッキングバッファーにて 4000 倍希釈し、4°C で 5 時間反応させた。100 mM Tris pH9.5、0.1 % Tween 20 にて 5 分間 x 3 回洗浄したのち、BM Purple AP Substrate (Roche) にて発色した。

#### IV-23 ゼブラフィッシュのパラフィン切片作製

発色後の胚を 4 % PFA にて 4°Cで一晩再固定し、PBS にて 3 分間 x 3 回洗浄した。70 %、80 %、90 %、95 %、100 %、100 %の順に各 1 時間ずつエタノール脱水を行い、キシレンで 30 分間 x 2 回透徹を行った。67°Cパラフィン中にて 3 時間浸透したのち、室温にてパラフィン包埋を行いパラフィンブロックを作製した。得られたパラフィンブロックを 4 μm の厚みでマイクロトームにより薄切し、37°Cの乾燥機中で一晩乾燥した。切片をキシレン中にて 5 分間 x 3 回パラフィンを洗浄し、HSR 液を用いて封入した。

#### IV-24 モルフォリノを用いたノックダウン実験と運動ニューロン軸索伸長の観察

ゼブラフィッシュ *Col25a1* 遺伝子をノックダウンするため、同遺伝子エクソン 2 のスプライシングドナーを標的にしたモルフォリノ (MO、オリゴ配列 5'-GCATAGCACAGAGCTGTTACCTGGT-3') を用いた。運動ニューロン特異的に GAL4 を発現する tg ゼブラフィッシュである *mnr2b-GAL4* ライン (Asakawa *et al.*, 2013) を *UAS-GFP* ラインと交配して運動ニューロン特異的 GFP 発現胚を得た。1 mM MO、0.05 % Phenol red (シグマ)、0.2 M KCl 溶液をインジヨクシオン液として、1-2 細胞期の受精卵に 5-10 ng の MO をインジェクションした。受精卵は 1 x E3 バッファー (5 mM NaCl、0.17 mM KCl、0.33 mM CaCl<sub>2</sub>、0.33 mM Mg SO<sub>4</sub>) 中で 28°Cインキュベーターにて飼育した。受精後 6 時間 (6 hpf) 時点で Phenylthiourea (PTU) を 30 μg/ml の濃度にて添加し、メラニン沈着を阻害した。

24 hpf 時点で胚の chorion を剥離し、0.25 mg/ml のトリカインで麻酔して低融点アガロースゲル (Life Technologies) 中に包埋した。26-32 hpf 時点での GFP 蛍光を共焦点

レーザー顕微鏡 (Olympus) にて観察し、運動ニューロン軸索の伸長を解析した。

#### IV-25 ゼブラフィッシュ胚からの mRNA 抽出と定量

上述の MO インジェクション胚約 60 個に対し 22 hpf 時点で Trizol (Life Technologies) を加えて可溶化したのち、クロロホルムを加えて激しく攪拌した。遠心後の上清に 2-propanol を加えて RNA ペレットを取得し、70 % エタノールで洗浄後、ペレットを超純水にて溶解した。

RNA 逆転写キット SuperScript®III First-Strand Synthesis System for RT-PCR (Life Technologies) を用いて RNA を逆転写した。1 µg の total RNA と 1 µL の 10 mM dNTP mix、1 µL の Oligo dT および 1 µL の Random Hexamers を混ぜ、DEPC 処理水で 10 µL にメスアップした混合液をサーマルサイクラー (Takara) で 65°C、5 分間処理し 4°C で 1 分間冷却した。続いて、混合液に 2 µL の 10 x Buffer と 4 µL の 25 mM MgCl<sub>2</sub>、2 µL の 0.1 M DTT および 1 µL の RNase OUT を加えて 42°C で 2 分間処理した。さらに、1 µL の SuperScript®III Reverse Transcriptase を加えて 42°C、15 分間、続いて 72°C、50 分間処理し、逆転写反応を行った。反応液に 1 µL の RNase H を加えて 37°C、20 分間処理して RNA の分解を行い、逆転写産物である single strand cDNA を得た。

得られた cDNA を用いてリアルタイム PCR (LightCycler 480、ロシュ) により定量した。PCR 反応液の調製には LightCycler 480 SYBR Green I Master キット (ロシュ) を使用した。7.5 µL の Master Mix と 5.4 µL の水、0.3 µL ずつの 10 µM primer ペア、1.5 µL の cDNA を混合して total 15 µL の反応液を 384 well plate (ロシュ) 中に調製し、リアルタイム PCR で反応させた。定量するサンプルのほか、各プライマーペアについて検量線用として、テンプレート cDNA を 3 倍、9 倍、27 倍、81 倍に希釈したスタンダードを同時に反応させた。反応サイクルは、95°C 5 分間のプレヒート後、95°C 10 秒、60°C 30 秒の伸長反応を 45 サイクル行った。反応後、Advanced Relative Quantification プログラムにより、internal control と比較して目的の mRNA 量を定量した。用いたプライマーペアは以下に記す。

ゼブラフィッシュ Col25a1 mRNA 検出用 (103 bp)

Forward primer : 5'- AATGATACAGCAACGAGTGG-3'

Reverse primer : 5'- GCAGTTGCATTCAGATGGTG-3'

ゼブラフィッシュ GAPDH (internal control、83 bp)

Forward primer : 5'- CGCTGGCATCTCCCTCAA-3'

Reverse primer : 5'- TCAGCAACACGATGGCTGTAG-3'

## V 参考文献

---

Arber S, Han B, Mendelsohn M, Smith M, Jessell TM, Sockanathan S. (1999). Requirement for the homeobox gene Hb9 in the consolidation of motor neuron identity. *Neuron*. 23(4):659-74.

Aricescu AR, McKinnell IW, Halfter W, Stoker AW. (2002). Heparan sulfate proteoglycans are ligands for receptor protein tyrosine phosphatase sigma. *Mol Cell Biol*. 22(6):1881-92.

Arimura N, Kaibuchi K. (2007). Neuronal polarity: from extracellular signals to intracellular mechanisms. *Nat Rev Neurosci*. 8(3):194-205.

Asakawa K, Abe G, Kawakami K. (2013). Cellular dissection of the spinal cord motor column by BAC transgenesis and gene trapping in zebrafish. *Front Neural Circuits*. 7:100.

Asakawa K, Higashijima S, Kawakami K. (2012). An *mnr2b/hlxb9lb* enhancer trap line that labels spinal and abducens motor neurons in zebrafish. *Dev Dyn*. 241(2):327-32.

Assaf AA. (2011). Congenital innervation dysgenesis syndrome (CID)/congenital cranial dysinnervation disorders (CCDDs). *Eye (Lond)*. 25(10):1251-61

Banyard J, Bao L, Zetter BR. (2003). Type XXIII collagen, a new transmembrane collagen identified in metastatic tumor cells. *J Biol Chem*. 278(23):20989-94.

Bonanomi D, Pfaff SL. (2010). Motor axon pathfinding. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 2(3):a001735.

Brandon EP, Lin W, D'Amour KA, Pizzo DP, Dominguez B, Sugiura Y, Thode S, Ko CP, Thal LJ, Gage FH, Lee KF. (2003). Aberrant patterning of neuromuscular synapses in choline acetyltransferase-deficient mice. *J Neurosci*. 23(2):539-49.

Chen F, Liu Y, Sugiura Y, Allen PD, Gregg RG, Lin W. (2011). Neuromuscular synaptic patterning requires the function of skeletal muscle dihydropyridine receptors. *Nat Neurosci.* 14(5):570-7.

Chen X, Yoshida T, Sagara H, Mikami Y, Mishina M. (2011). Protein tyrosine phosphatase  $\sigma$  regulates the synapse number of zebrafish olfactory sensory neurons. *J Neurochem.* 119(3):532-43.

Clandinin TR, Lee CH, Herman T, Lee RC, Yang AY, Ovasapyan S, Zipursky SL. (2001). *Drosophila* LAR regulates R1-R6 and R7 target specificity in the visual system. *Neuron.* 32(2):237-48.

Coles CH, Shen Y, Tenney AP, Siebold C, Sutton GC, Lu W, Gallagher JT, Jones EY, Flanagan JG, Aricescu AR. (2011). Proteoglycan-specific molecular switch for RPTP  $\sigma$  clustering and neuronal extension. *Science.* 332(6028):484-8

Craig AM, Banker G. (1994). Neuronal polarity. *Annu Rev Neurosci.* 17:267-310.

DeChiara TM, Bowen DC, Valenzuela DM, Simmons MV, Poueymirou WT, Thomas S, Kinetz E, Compton DL, Rojas E, Park JS, Smith C, DiStefano PS, Glass DJ, Burden SJ, Yancopoulos GD. (1996). The receptor tyrosine kinase MuSK is required for neuromuscular junction formation in vivo. *Cell.* 85(4):501-12.

Desai CJ, Gindhart JG Jr, Goldstein LS, Zinn K. (1996). Receptor tyrosine phosphatases are required for motor axon guidance in the *Drosophila* embryo. *Cell.* 84(4):599-609.

Diaz LA, Rattie H 3rd, Saunders WS, Futamura S, Squiquera HL, Anhalt GJ, Giudice GJ. (1990). Isolation of a human epidermal cDNA corresponding to the 180-kD autoantigen recognized by bullous pemphigoid and herpes gestationis sera. Immunolocalization of this protein to the hemidesmosome. *J Clin Invest.* 86(4):1088-94.

Eisen JS, Smith JC. (2008). Controlling morpholino experiments: don't stop making antisense. *Development.* 135(10):1735-43.

Eisen JS, Myers PZ, Westerfield M. (1986). Pathway selection by growth cones of identified motoneurons in live zebra fish embryos. *Nature*. 20-26;320(6059):269-71.

Elchebly M, Wagner J, Kennedy TE, Lanctôt C, Michaliszyn E, Itié A, Drouin J, Tremblay ML. (1999). Neuroendocrine dysplasia in mice lacking protein tyrosine phosphatase sigma. *Nat Genet*. 21(3):330-3.

Fagan AM, Watson M, Parsadanian M, Bales KR, Paul SM, Holtzman DM. (2002). Human and murine ApoE markedly alters A beta metabolism before and after plaque formation in a mouse model of Alzheimer's disease. *Neurobiol Dis*. 9(3):305-18.

Feng G, Laskowski MB, Feldheim DA, Wang H, Lewis R, Frisen J, Flanagan JG, Sanes JR. (2000). Roles for ephrins in positionally selective synaptogenesis between motor neurons and muscle fibers. *Neuron*. 25(2):295-306.

Flanagan-Steet H, Fox MA, Meyer D, Sanes JR. (2005). Neuromuscular synapses can form in vivo by incorporation of initially aneural postsynaptic specializations. *Development*. 132(20):4471-81.

Floeth M, Fiedorowicz J, Schäcke H, Hammami-Hausli N, Owaribe K, Trüeb RM, Bruckner-Tuderman L. (1998). Novel homozygous and compound heterozygous COL17A1 mutations associated with junctional epidermolysis bullosa. *J Invest Dermatol*. 111(3):528-33.

Franzke CW, Bruckner-Tuderman L, Blobel CP. (2009). Shedding of collagen XVII/BP180 in skin depends on both ADAM10 and ADAM9. *J Biol Chem*. 284(35):23386-96.

Gallarda BW, Bonanomi D, Müller D, Brown A, Alaynick WA, Andrews SE, Lemke G, Pfaff SL, Marquardt T. (2008). Segregation of axial motor and sensory pathways via heterotypic trans-axonal signaling. *Science*. 320(5873):233-6.



Garrity PA, Lee CH, Salecker I, Robertson HC, Desai CJ, Zinn K, Zipursky SL. (1999). Retinal axon target selection in *Drosophila* is regulated by a receptor protein tyrosine phosphatase. *Neuron*. 22(4):707-17.

Gautam M, Noakes PG, Mudd J, Nichol M, Chu GC, Sanes JR, Merlie JP. (1995). Failure of postsynaptic specialization to develop at neuromuscular junctions of rapsyn-deficient mice. *Nature*.377(6546):232-6.

Giudice GJ, Emery DJ, Diaz LA. (1992). Cloning and primary structural analysis of the bullous pemphigoid autoantigen BP180. *J Invest Dermatol*. 99(3):243-50.

Giudice GJ, Squiquera HL, Elias PM, Diaz LA. (1991). Identification of two collagen domains within the bullous pemphigoid autoantigen, BP180. *J Clin Invest*. 87(2):734-8.

Gould TW, Oppenheim RW. (2011). Motor neuron trophic factors: therapeutic use in ALS? *Brain Res Rev*. 67(1-2):1-39.

Hardy J, Selkoe DJ. (2002). The amyloid hypothesis of Alzheimer's disease: progress and problems on the road to therapeutics. *Science*. 297(5580):353-6.

Hardy JA, Higgins GA. (1992). Alzheimer's disease: the amyloid cascade hypothesis. *Science*. 256(5054):184-5.

Hashimoto T, Wakabayashi T, Watanabe A, Kowa H, Hosoda R, Nakamura A, Kanazawa I, Arai T, Takio K, Mann DM, Iwatsubo T. (2002). CLAC: a novel Alzheimer amyloid plaque component derived from a transmembrane precursor, CLAC-P/collagen type XXV. *EMBO J*. 21(7):1524-34.

Hilario JD, Wang C, Beattie CE. (2010). Collagen XIXa1 is crucial for motor axon navigation at intermediate targets. *Development*. 137(24):4261-9.

Holtzman DM, Bales KR, Tenkova T, Fagan AM, Parsadanian M, Sartorius LJ, Mackey B, Olney J, McKeel D, Wozniak D, Paul SM. (2000). Apolipoprotein E isoform-dependent amyloid deposition and neuritic degeneration in a mouse model of Alzheimer's disease. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 14;97(6):2892-7.

Hopkinson SB, Baker SE, Jones JC. (1995). Molecular genetic studies of a human epidermal autoantigen (the 180-kD bullous pemphigoid antigen/BP180): identification of functionally important sequences within the BP180 molecule and evidence for an interaction between BP180 and alpha 6 integrin. *J Cell Biol.* 130(1):117-25.

Horn KE, Xu B, Gobert D, Hamam BN, Thompson KM, Wu CL, Bouchard JF, Uetani N, Racine RJ, Tremblay ML, Ruthazer ES, Chapman CA, Kennedy TE. (2012). Receptor protein tyrosine phosphatase sigma regulates synapse structure, function and plasticity. *J Neurochem.* 122(1):147-61.

Huber AB, Kania A, Tran TS, Gu C, De Marco Garcia N, Lieberam I, Johnson D, Jessell TM, Ginty DD, Kolodkin AL. (2005). Distinct roles for secreted semaphorin signaling in spinal motor axon guidance. *Neuron.* 48(6):949-64.

Hägg P, Väisänen T, Tuomisto A, Rehn M, Tu H, Huhtala P, Eskelinen S, Pihlajaniemi T. (2001). Type XIII collagen: a novel cell adhesion component present in a range of cell-matrix adhesions and in the intercalated discs between cardiac muscle cells. *Matrix Biol.* 19(8):727-42.

Koch M, Veit G, Stricker S, Bhatt P, Kutsch S, Zhou P, Reinders E, Hahn RA, Song R, Burgeson RE, Gerecke DR, Mundlos S, Gordon MK. (2006). Expression of type XXIII collagen mRNA and protein. *J Biol Chem.* 281(30):21546-57.

Koster J, Geerts D, Favre B, Borradori L, Sonnenberg A. (2003). Analysis of the interactions between BP180, BP230, plectin and the integrin alpha6beta4 important for hemidesmosome assembly. *J Cell Sci.* 116(Pt 2):387-99.

Kowa H, Sakakura T, Matsuura Y, Wakabayashi T, Mann DM, Duff K, Tsuji S, Hashimoto T, Iwatsubo T. (2004). Mostly separate distributions of CLAC- versus Abeta40- or thioflavin S-reactivities in senile plaques reveal two distinct subpopulations of beta-amyloid deposits. *Am J Pathol.* 165(1):273-81.

Kramer ER, Knott L, Su F, Dessaud E, Krull CE, Helmbacher F, Klein R. (2006). Cooperation between GDNF/Ret and ephrinA/EphA4 signals for motor-axon pathway selection in the limb. *Neuron.* 50(1):35-47.

Krueger NX, Van Vactor D, Wan HI, Gelbart WM, Goodman CS, Saito H. (1996). The transmembrane tyrosine phosphatase DLAR controls motor axon guidance in *Drosophila*. *Cell.* 84(4):611-22.

Kvist AP, Latvanlehto A, Sund M, Eklund L, Väisänen T, Hägg P, Sormunen R, Komulainen J, Fässler R, Pihlajaniemi T. (2001). Lack of cytosolic and transmembrane domains of type XIII collagen results in progressive myopathy. *Am J Pathol.* 159(4):1581-92.

Kwon SK, Woo J, Kim SY, Kim H, Kim E. (2010). Trans-synaptic adhesions between netrin-G ligand-3 (NGL-3) and receptor tyrosine phosphatases LAR, protein-tyrosine phosphatase delta (PTPdelta), and PTPsigma via specific domains regulate excitatory synapse formation. *J Biol Chem.* 285(18):13966-78.

Lampa SJ, Potluri S, Norton AS, Fusco W, Laskowski MB. (2004). Ephrin-A5 overexpression degrades topographic specificity in the mouse gluteus maximus muscle. *Brain Res Dev Brain Res.* 153(2):271-4.

Landmesser L, Dahm L, Tang JC, Rutishauser U. (1990). Polysialic acid as a regulator of intramuscular nerve branching during embryonic development. *Neuron.* 4(5):655-67.

Landmesser L, Dahm L, Schultz K, Rutishauser U. (1988). Distinct roles for adhesion molecules during innervation of embryonic chick muscle. *Dev Biol.* 130(2):645-70.

Latvanlehto A, Fox MA, Sormunen R, Tu H, Oikarainen T, Koski A, Naumenko N, Shakirzyanova A, Kallio M, Ilves M, Giniatullin R, Sanes JR, Pihlajaniemi T. (2010). Muscle-derived collagen XIII regulates maturation of the skeletal neuromuscular junction. *J Neurosci.* 30(37):12230-41.

Lieberam I, Agalliu D, Nagasawa T, Ericson J, Jessell TM. (2005). A Cxcl12-CXCR4 chemokine signaling pathway defines the initial trajectory of mammalian motor axons. *Neuron.* 47(5):667-79.

Liu Y, Padgett D, Takahashi M, Li H, Sayeed A, Teichert RW, Olivera BM, McArdle JJ, Green WN, Lin W. (2008). Essential roles of the acetylcholine receptor gamma-subunit in neuromuscular synaptic patterning. *Development.* 135(11):1957-67.

Luria V, Krawchuk D, Jessell TM, Laufer E, Kania A. (2008). Specification of motor axon trajectory by ephrin-B:EphB signaling: symmetrical control of axonal patterning in the developing limb. *Neuron.* 60(6):1039-53.

Miniou P, Tiziano D, Frugier T, Roblot N, Le Meur M, Melki J. (1999). Gene targeting restricted to mouse striated muscle lineage. *Nucleic Acids Res.* 27(19):e27.

Myers JC, Li D, Amenta PS, Clark CC, Nagaswami C, Weisel JW. (2003). Type XIX collagen purified from human umbilical cord is characterized by multiple sharp kinks delineating collagenous subdomains and by intermolecular aggregates via globular, disulfide-linked, and heparin-binding amino termini. *J Biol Chem.* 278(34):32047-57.

Myers PZ, Eisen JS, Westerfield M. (1986). Development and axonal outgrowth of identified motoneurons in the zebrafish. *J Neurosci.* 6(8):2278-89.

Nagata K, Kiryu-Seo S, Maeda M, Yoshida K, Morita T, Kiyama H. (2010). Damage-induced neuronal endopeptidase is critical for presynaptic formation of neuromuscular junctions. *J Neurosci.* 30(20):6954-62.

Namba Y, Tomonaga M, Kawasaki H, Otomo E, Ikeda K. (1991). Apolipoprotein E immunoreactivity in cerebral amyloid deposits and neurofibrillary tangles in Alzheimer's disease and kuru plaque amyloid in Creutzfeldt-Jakob disease. *Brain Res.* 8;541(1):163-6.

Nishie W. (2014). Update on the pathogenesis of bullous pemphigoid: an autoantibody-mediated blistering disease targeting collagen XVII. *J Dermatol Sci.* 73(3):179-86.

Nishie W, Kiritsi D, Nyström A, Hofmann SC, Bruckner-Tuderman L. (2011). Dynamic interactions of epidermal collagen XVII with the extracellular matrix: laminin 332 as a major binding partner. *Am J Pathol.* 179(2):829-37.

Nornes HO, Carry M. (1978). Neurogenesis in spinal cord of mouse: an autoradiographic analysis. *Brain Res.* 159(1):1-6.

Ohta K, Nakamura M, Hirokawa K, Tanaka S, Iwama A, Suda T, Ando M, Tanaka H. (1996). The receptor tyrosine kinase, Cck8, is transiently expressed on subtypes of motoneurons in the spinal cord during development. *Mech Dev.* 54(1):59-69.

Oppenheim RW, Houenou L, Pincon-Raymond M, Powell JA, Rieger F, Standish LJ. (1986). The development of motoneurons in the embryonic spinal cord of the mouse mutant, muscular dysgenesis (mdg/mdg): survival, morphology, and biochemical differentiation. *Dev Biol.* 114(2):426-36.

Osada Y, Hashimoto T, Nishimura A, Matsuo Y, Wakabayashi T, Iwatsubo T. (2005). CLAC binds to amyloid beta peptides through the positively charged amino acid cluster within the collagenous domain 1 and inhibits formation of amyloid fibrils. *J Biol Chem.* 280(9):8596-605.

Oystreck DT, Engle EC, Bosley TM. (2011). Recent progress in understanding congenital cranial dysinnervation disorders. *J Neuroophthalmol.* 31(1):69-77.

Paardekooper Overman J, den Hertog J. (2014). Zebrafish as a model to study PTPs during development. *Methods*. 65(2):247-53.

Panzer JA, Gibbs SM, Dosch R, Wagner D, Mullins MC, Granato M, Balice-Gordon RJ. (2005). Neuromuscular synaptogenesis in wild-type and mutant zebrafish. *Dev Biol*. 285(2):340-57.

Peltonen S, Hentula M, Hägg P, Ylä-Outinen H, Tuukkanen J, Lakkakorpi J, Rehn M, Pihlajaniemi T, Peltonen J. (1999). A novel component of epidermal cell-matrix and cell-cell contacts: transmembrane protein type XIII collagen. *J Invest Dermatol*. 113(4):635-42.

Pittman RH, Oppenheim RW. (1978). Neuromuscular blockade increases motoneurone survival during normal cell death in the chick embryo. *Nature*. 271(5643):364-6.

Polo-Parada L, Bose CM, Landmesser LT. (2001). Alterations in transmission, vesicle dynamics, and transmitter release machinery at NCAM-deficient neuromuscular junctions. *Neuron*. 32(5):815-28.

Rafuse VF, Polo-Parada L, Landmesser LT. (2000). Structural and functional alterations of neuromuscular junctions in NCAM-deficient mice. *J Neurosci*. 20(17):6529-39.

Rapraeger AC, Krufka A, Olwin BB. (1991). Requirement of heparan sulfate for bFGF-mediated fibroblast growth and myoblast differentiation. *Science*. 252(5013):1705-8.

Sajnani-Perez G, Chilton JK, Aricescu AR, Haj F, Stoker AW. (2003). Isoform-specific binding of the tyrosine phosphatase PTPsigma to a ligand in developing muscle. *Mol Cell Neurosci*. 22(1):37-48.

Sandberg-Lall M, Hägg PO, Wahlström I, Pihlajaniemi T. (2000). Type XIII collagen is widely expressed in the adult and developing human eye and accentuated in the ciliary muscle, the optic nerve and the neural retina. *Exp Eye Res*. 70(4):401-10.

Schaapveld RQ, Schepens JT, Bächner D, Attema J, Wieringa B, Jap PH, Hendriks WJ. (1998). Developmental expression of the cell adhesion molecule-like protein tyrosine phosphatases LAR, RPTPdelta and RPTPsigma in the mouse. *Mech Dev.* 77(1):59-62.

Schneider VA, Granato M. (2006). The myotomal diwanka (lh3) glycosyltransferase and type XVIII collagen are critical for motor growth cone migration. *Neuron.* 50(5):683-95.

Selkoe DJ. (1991). The molecular pathology of Alzheimer's disease. *Neuron.* 6(4):487-98.

Shen Y, Tenney AP, Busch SA, Horn KP, Cuascut FX, Liu K, He Z, Silver J, Flanagan JG. (2009). PTPsigma is a receptor for chondroitin sulfate proteoglycan, an inhibitor of neural regeneration. *Science.* 326(5952):592-6.

Shinwari JM, Khan A, Awad S, Shinwari Z, Alaiya A, Alanazi M, Tahir A, Poizat C, Al Tassan N. (2015). Recessive Mutations in COL25A1 Are a Cause of Congenital Cranial Dysinnervation Disorder. *Am J Hum Genet.* 96(1):147-52.

Shirasaki R, Lewcock JW, Lettieri K, Pfaff SL. (2006). FGF as a target-derived chemoattractant for developing motor axons genetically programmed by the LIM code. *Neuron.* 50(6):841-53.

Soans C, Holash JA, Pasquale EB. (1994). Characterization of the expression of the Cck8 receptor-type tyrosine kinase during development and in tumor cell lines. *Oncogene.* 9(11):3353-61.

Stepanek L, Stoker AW, Stoeckli E, Bixby JL. (2005). Receptor tyrosine phosphatases guide vertebrate motor axons during development. *J Neurosci.* 25(15):3813-23.

Strittmatter WJ, Saunders AM, Schmechel D, Pericak-Vance M, Enghild J, Salvesen GS, Roses AD. (1993). Apolipoprotein E: high-avidity binding to beta-amyloid and increased frequency of type 4 allele in late-onset familial Alzheimer disease. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 90(5):1977-81.

Sun W, Gould TW, Vinsant S, Prevette D, Oppenheim RW. (2003). Neuromuscular development after the prevention of naturally occurring neuronal death by Bax deletion. *J Neurosci.* 23(19):7298-310.

Sund M, Ylönen R, Tuomisto A, Sormunen R, Tahkola J, Kvist AP, Kontusaari S, Autio-Harmainen H, Pihlajaniemi T. (2001). Abnormal adherence junctions in the heart and reduced angiogenesis in transgenic mice overexpressing mutant type XIII collagen. *EMBO J.* 20(18):5153-64.

Sund M, Väisänen T, Kaukinen S, Ilves M, Tu H, Autio-Harmainen H, Rauvala H, Pihlajaniemi T. (2001). Distinct expression of type XIII collagen in neuronal structures and other tissues during mouse development. *Matrix Biol.* 20(4):215-31.

Takahashi H, Katayama K, Sohya K, Miyamoto H, Prasad T, Matsumoto Y, Ota M, Yasuda H, Tsumoto T, Aruga J, Craig AM. (2012). Selective control of inhibitory synapse development by Slitrk3-PTP $\delta$  trans-synaptic interaction. *Nat Neurosci.* 15(3):389-98, S1-2.

Takahashi H, Arstikaitis P, Prasad T, Bartlett TE, Wang YT, Murphy TH, Craig AM. (2011). Postsynaptic TrkC and presynaptic PTP $\sigma$  function as a bidirectional excitatory synaptic organizing complex. *Neuron.* 69(2):287-303.

Tanaka H. (1987). Chronic application of curare does not increase the level of motoneuron survival-promoting activity in limb muscle extracts during the naturally occurring motoneuron cell death period. *Dev Biol.* 124(2):347-57.

Tanaka T, Wakabayashi T, Oizumi H, Nishio S, Sato T, Harada A, Fujii D, Matsuo Y, Hashimoto T, Iwatsubo T. (2014). CLAC-P/collagen type XXV is required for the intramuscular innervation of motoneurons during neuromuscular development. *J Neurosci.* 34(4):1370-9.

Tang J, Landmesser L. (1993). Reduction of intramuscular nerve branching and synaptogenesis is correlated with decreased motoneuron survival. *J Neurosci.* 13(7):3095-103.



Terrado J, Burgess RW, DeChiara T, Yancopoulos G, Sanes JR, Kato AC. (2001). Motoneuron survival is enhanced in the absence of neuromuscular junction formation in embryos. *J Neurosci.* 21(9):3144-50.

Uetani N, Chagnon MJ, Kennedy TE, Iwakura Y, Tremblay ML. (2006). Mammalian motoneuron axon targeting requires receptor protein tyrosine phosphatases sigma and delta. *J Neurosci.* 26(22):5872-80.

Uetani N, Kato K, Ogura H, Mizuno K, Kawano K, Mikoshiba K, Yakura H, Asano M, Iwakura Y. (2000). Impaired learning with enhanced hippocampal long-term potentiation in PTPdelta-deficient mice. *EMBO J.* 19(12):2775-85.

Van Lieshout EM, Van der Heijden I, Hendriks WJ, Van der Zee CE. (2001). A decrease in size and number of basal forebrain cholinergic neurons is paralleled by diminished hippocampal cholinergic innervation in mice lacking leukocyte common antigen-related protein tyrosine phosphatase activity. *Neuroscience.* 102(4):833-41.

Veit G, Zwolanek D, Eckes B, Niland S, Käpylä J, Zweers MC, Ishada-Yamamoto A, Krieg T, Heino J, Eble JA, Koch M. (2011). Collagen XXIII, novel ligand for integrin alpha2beta1 in the epidermis. *J Biol Chem.* 286(31):27804-13.

Wallace MJ, Batt J, Fladd CA, Henderson JT, Skarnes W, Rotin D. (1999). Neuronal defects and posterior pituitary hypoplasia in mice lacking the receptor tyrosine phosphatase PTPsigma. *Nat Genet.* 21(3):334-8.

Wang F, Wolfson SN, Gharib A, Sagasti A. (2012). LAR receptor tyrosine phosphatases and HSPGs guide peripheral sensory axons to the skin. *Curr Biol.* 22(5):373-82.

Wang L, Marquardt T. (2012). Direct live monitoring of heterotypic axon-axon interactions in vitro. *Nat Protoc.* 7(2):351-63.

Yaffe D, Saxel O. (1977). Serial passaging and differentiation of myogenic cells isolated from dystrophic mouse muscle. *Nature.* 270(5639):725-7.

Yamamoto Y, Henderson CE. (1999). Patterns of programmed cell death in populations of developing spinal motoneurons in chicken, mouse, and rat. *Dev Biol.* 214(1):60-71.

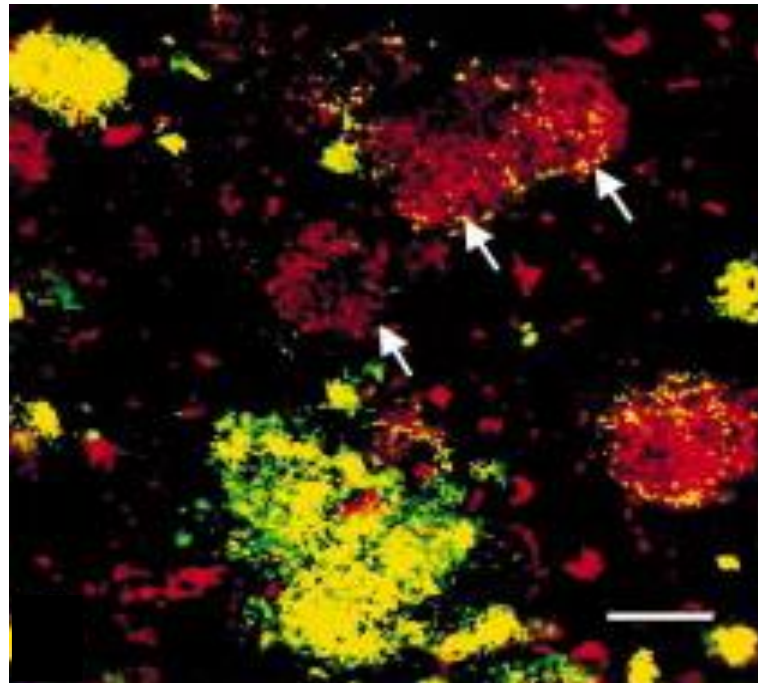
Yayon A, Klagsbrun M, Esko JD, Leder P, Ornitz DM. (1991). Cell surface, heparin-like molecules are required for binding of basic fibroblast growth factor to its high affinity receptor. *Cell.* 64(4):841-8.

Yeo TT, Yang T, Massa SM, Zhang JS, Honkaniemi J, Butcher LL, Longo FM. (1997). Deficient LAR expression decreases basal forebrain cholinergic neuronal size and hippocampal cholinergic innervation. *J Neurosci Res.* 47(3):348-60.

Yoshida T, Shiroshima T, Lee SJ, Yasumura M, Uemura T, Chen X, Iwakura Y, Mishina M. (2012). Interleukin-1 receptor accessory protein organizes neuronal synaptogenesis as a cell adhesion molecule. *J Neurosci.* 32(8):2588-600.

Yoshida T, Yasumura M, Uemura T, Lee SJ, Ra M, Taguchi R, Iwakura Y, Mishina M. (2011). IL-1 receptor accessory protein-like 1 associated with mental retardation and autism mediates synapse formation by trans-synaptic interaction with protein tyrosine phosphatase  $\delta$ . *J Neurosci.* 31(38):13485-99.

## VI 図表

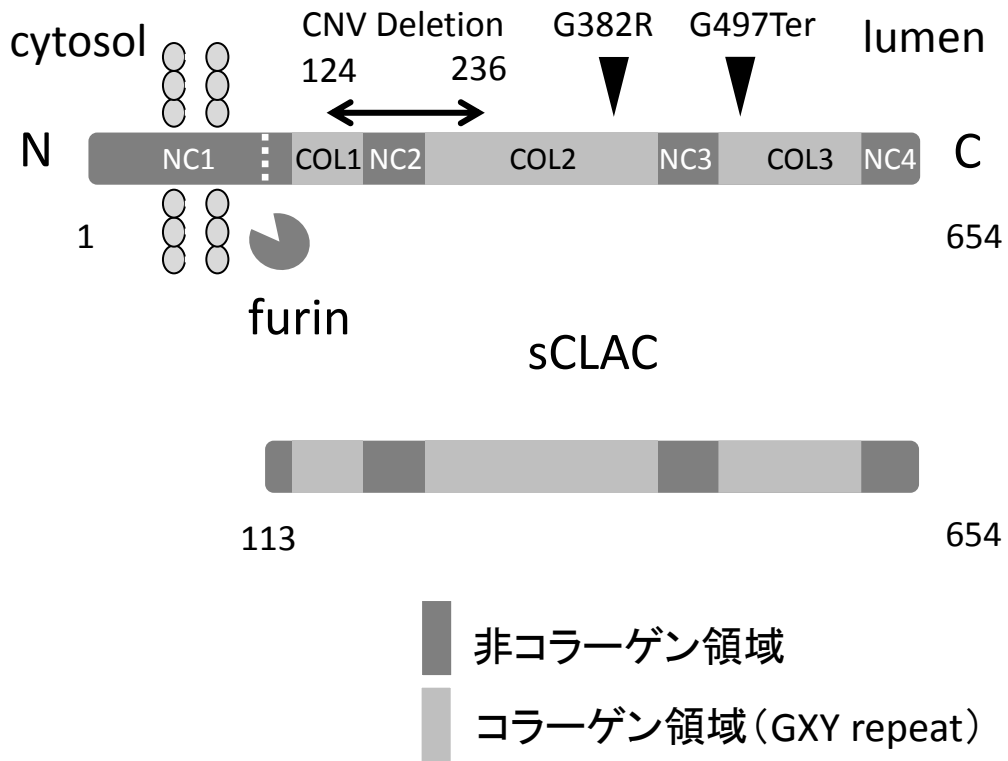


A $\beta$   
CLAC

## 図表 1

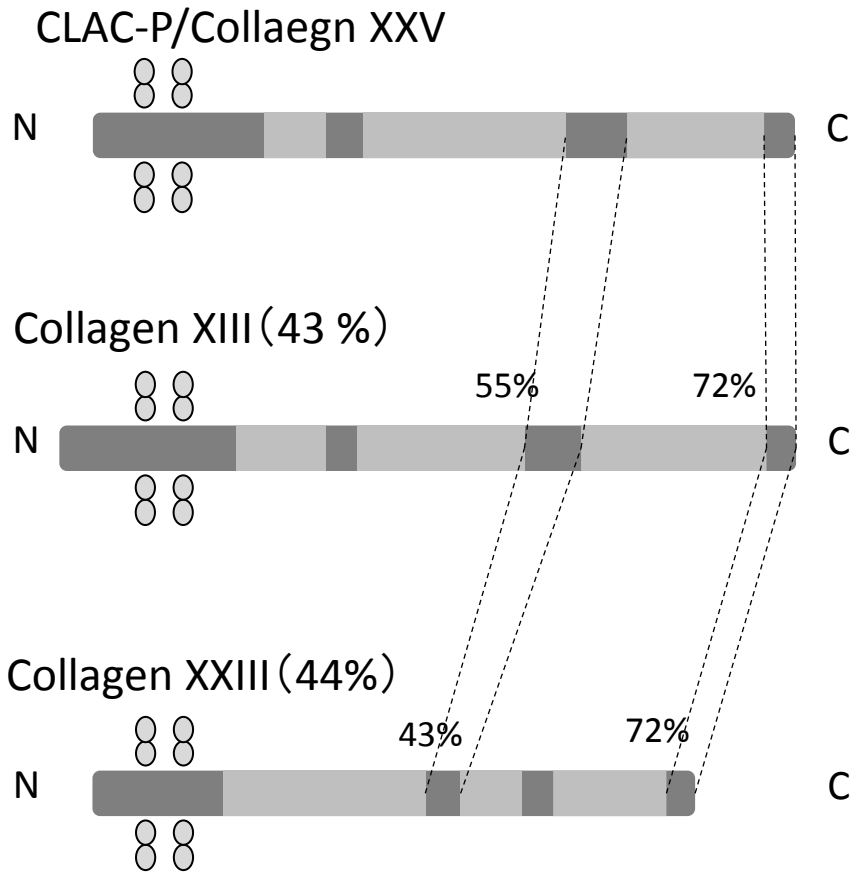
AD脳におけるCLACの染色像。抗A $\beta$ 抗体(赤色)と抗CLAC抗体9D2(緑色)によるAD脳の蛍光二重染色。CLACは典型的老人斑に蓄積を認める一方、ほとんど蓄積を認めない斑も存在する(矢印)。scale bar = 50  $\mu$ m (Hashimoto *et al.*, 2002より改変)

## Human CLAC-P/Collagen type XXV



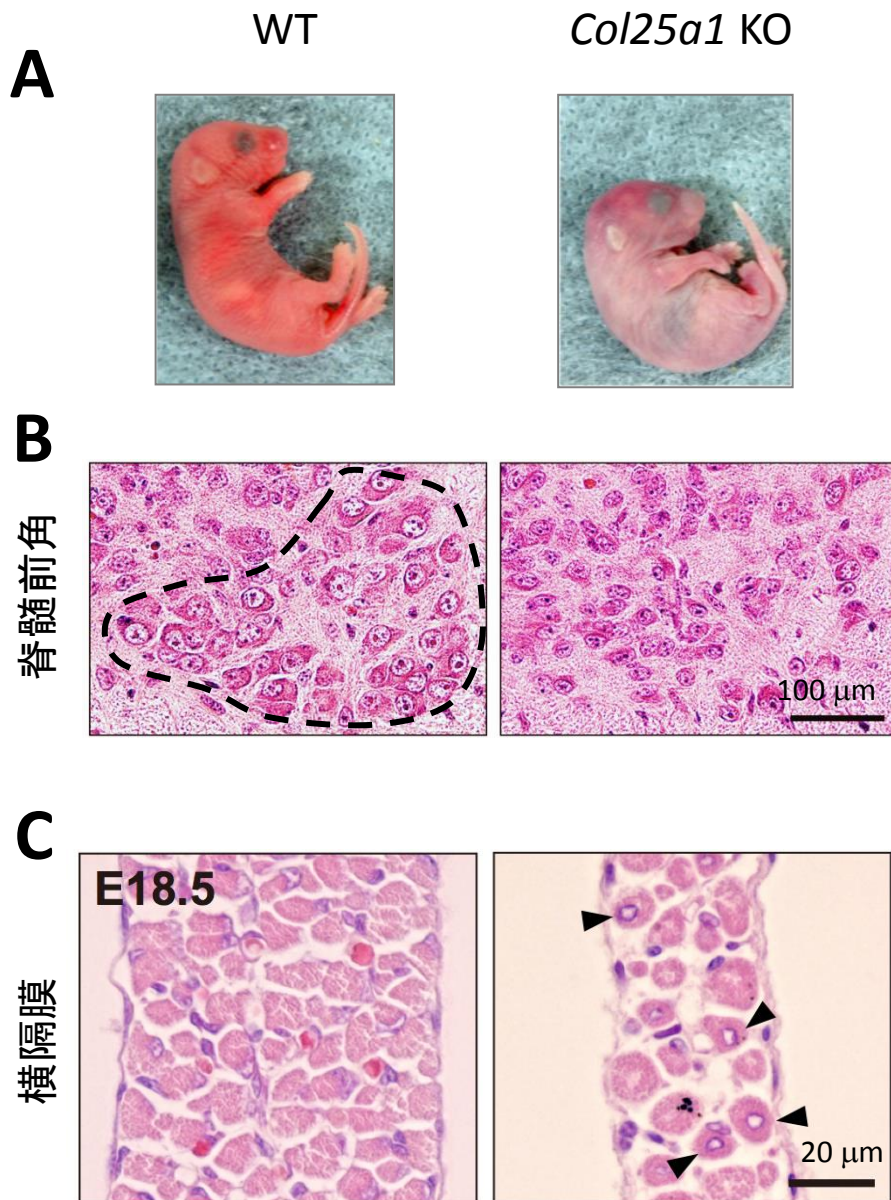
**図表 2**

CLAC-P/Collagen type XXVの構造。3つのコラーゲン領域(COL)と4つの非コラーゲン領域(NC)を有し、NC1の細胞外部分でfurinによる切断を受ける。COL2中のミスセンス変異(G382R)が劣性遺伝性に先天性脳神経支配異常症(Congenital Cranial Dysinnervation Disorder: CCDD)を引き起こす。そのほか、COL3中のナンセンス変異(G497Ter)および124-236間のcopy number deletion変異もCCDDの原因となりうる。



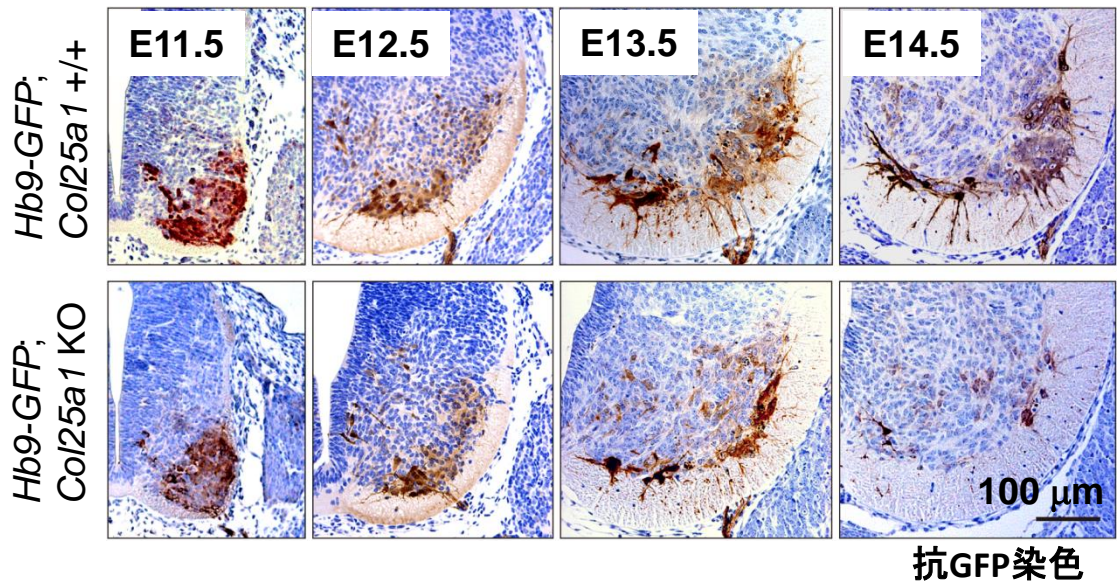
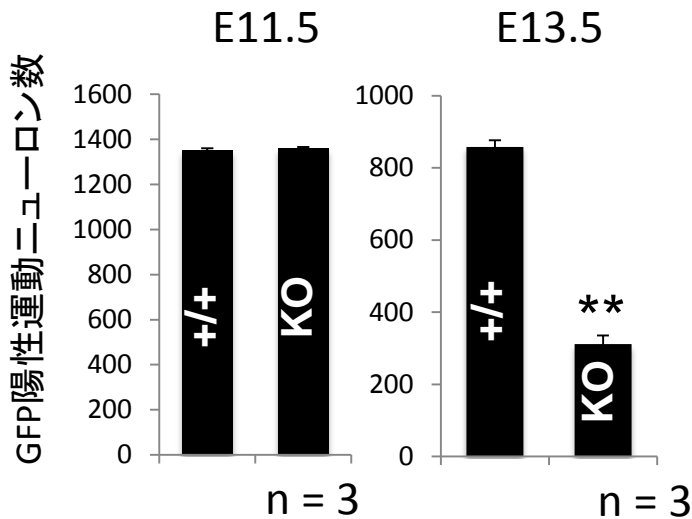
**図表 3**

CLAC-PとMACITファミリー分子の相同性の比較。Collagen type XIIIおよびXXIIIはCLAC-Pと同様に4つのNC領域と3つのCOL領域からなり、NC1の細胞外部分でfurinによる切断を受ける。CLAC-Pとのアミノ酸レベルの相同性はCollagen XIIIと43%、Collagen XXIIIと44%であり、NC領域の相同性が高い。



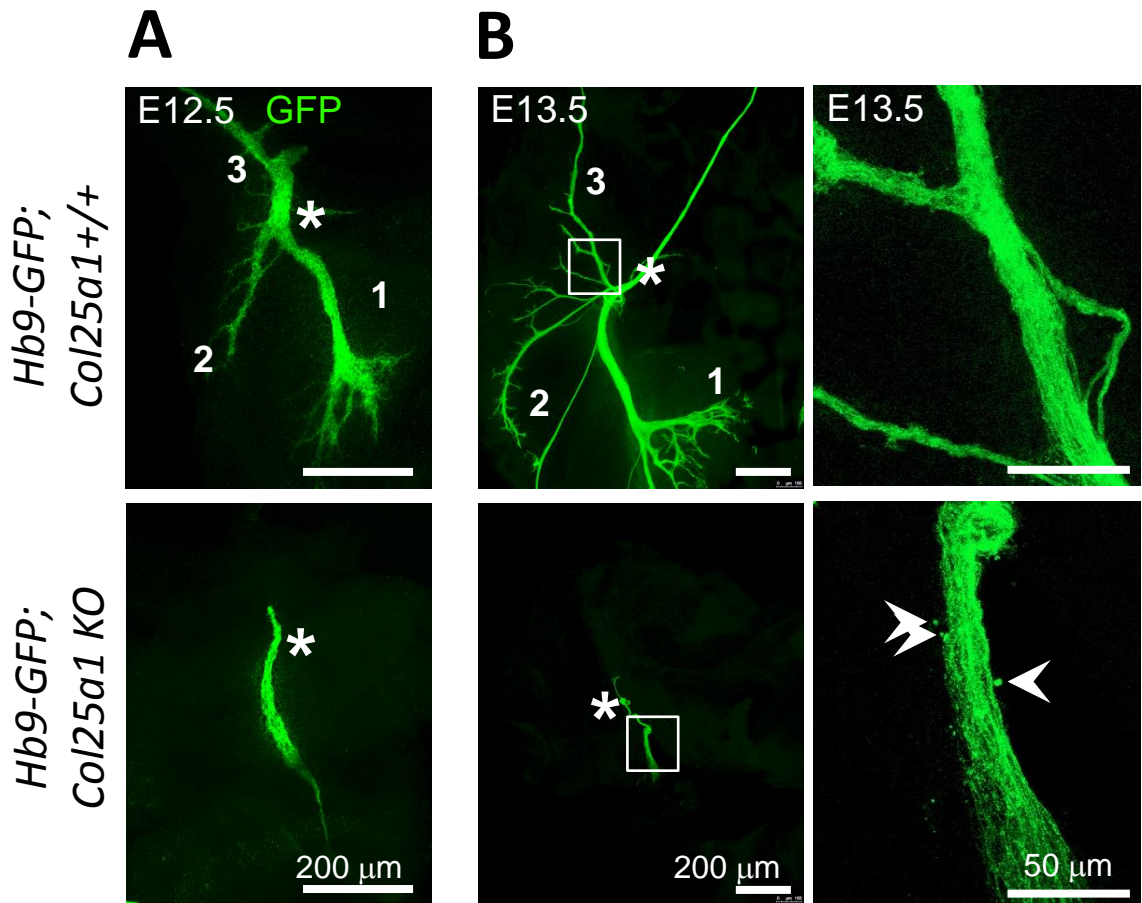
**図表 4**

*Col25a1* KOマウスの出生前後の表現型。A. *Col25a1* KOマウスは自発的な運動を示さず、出生直後に死亡した。B. P0個体の脊髓前角のHE染色像。WTでは大型の核と細胞質を持つ運動ニューロン細胞体が存在するが(点線内)、*Col25a1*KOではこれらの大型神経細胞が広汎に消失した。C. E18.5胎児の横隔膜。*Col25a1* KOでは筋層が菲薄化し、中心核が顕著で未熟な筋細胞が多く見られた(矢頭)。(Tanaka *et al.*, 2014より改変)

**A****B****図表 5**

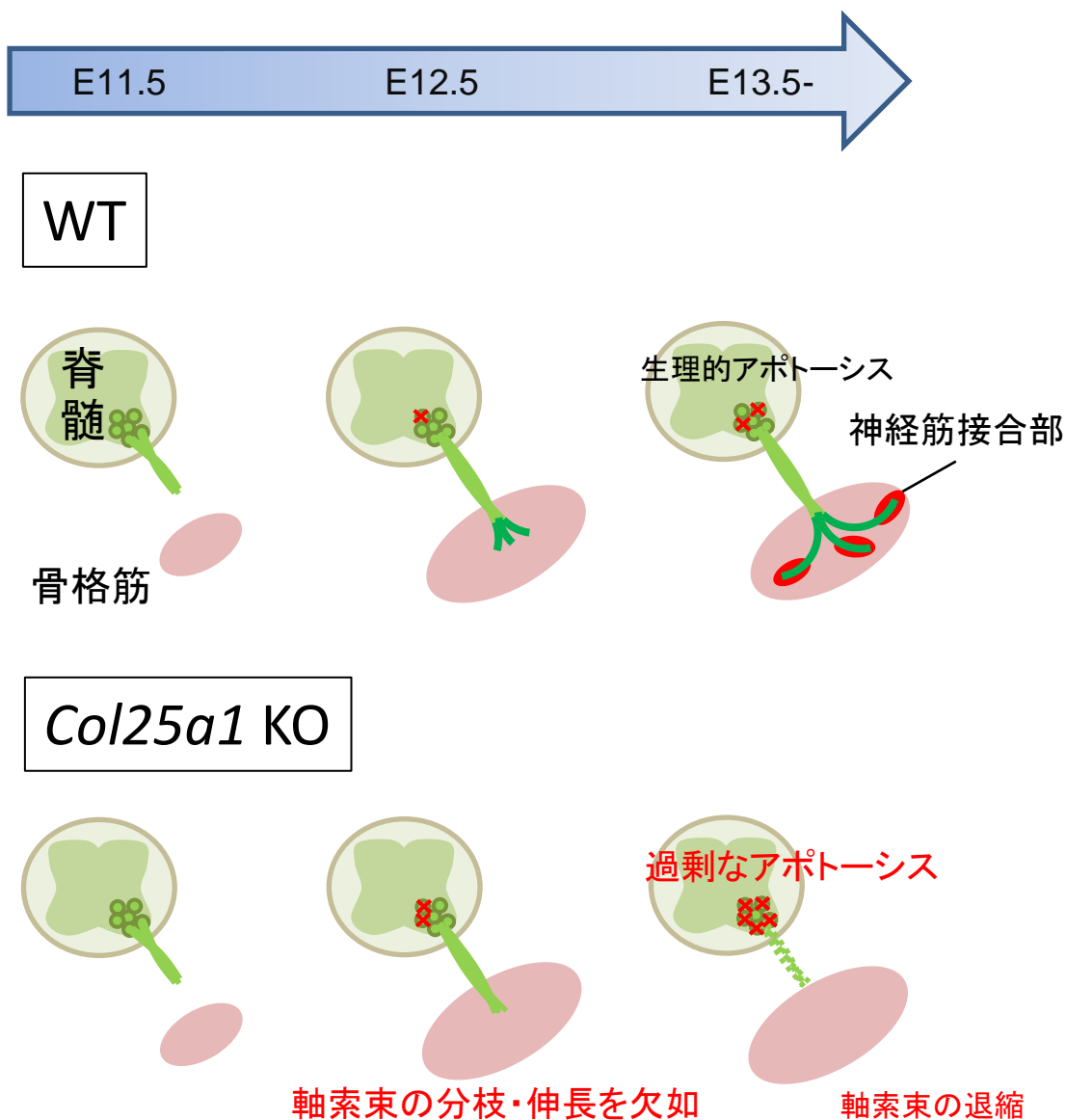
E11.5以降の脊髄前角運動ニューロン数の変化。A. *Hb9-GFP; Col25a1 +/+*および*Hb9-GFP; Col25a1 KO*マウスの下部頸髄運動ニューロンを、日齢を追って抗GFP染色により標識。B. GFP陽性細胞数の定量。E11.5では運動ニューロンは同程度に存在したが、*Hb9-GFP; Col25a1 KO*はE13.5では約70%の減少が見られた。\*\* $p < 0.001$ ,  $n = 3$  (Tanaka *et al.*, 2014より改変)





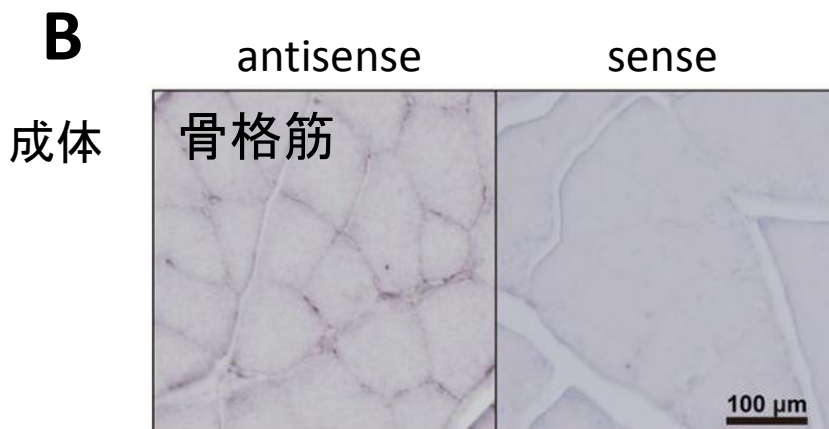
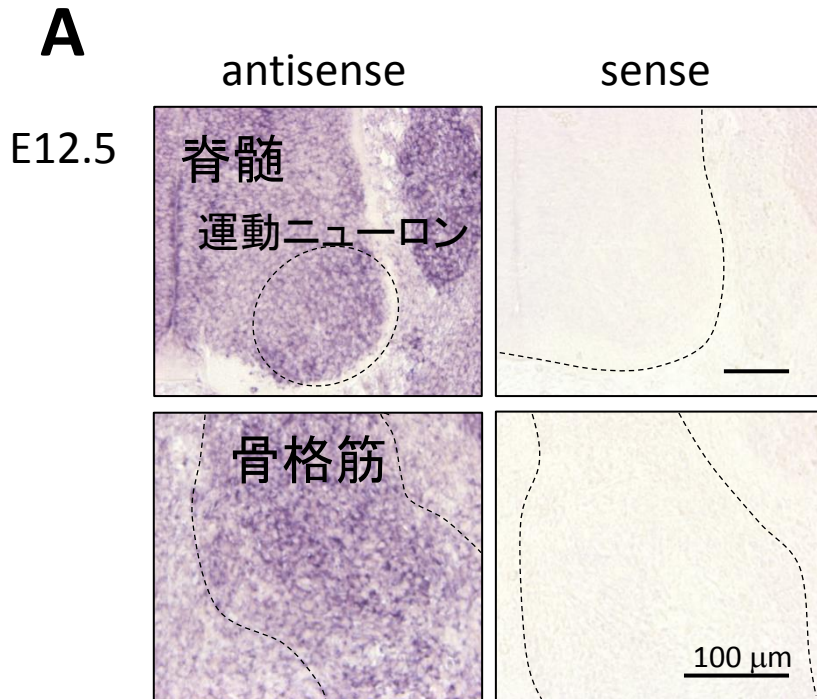
図表 6

*Col25a1* KO胎児における横隔膜の神経支配異常。A. E12.5 *Hb9-GFP*陽性胎児の横隔膜のwhole mount蛍光染色。抗GFP抗体により運動ニューロン軸索を緑色に染色。*Col25a1+/+*胎児においては軸索束は横隔膜へ到達後、進入部位(アスタリスク)から3方向に分枝が見られたが、*Col25a1* KOにおいては軸索の分枝・伸長を完全に欠損していた。B. E13.5時点での横隔膜のwhole mount蛍光染色。*Col25a1* KO胎児において運動ニューロン軸索束の退縮が顕著であり、拡大するとretraction bulb様構造(矢頭)が認められた。(Tanaka *et al.*, 2014より改変)



## 図表 7

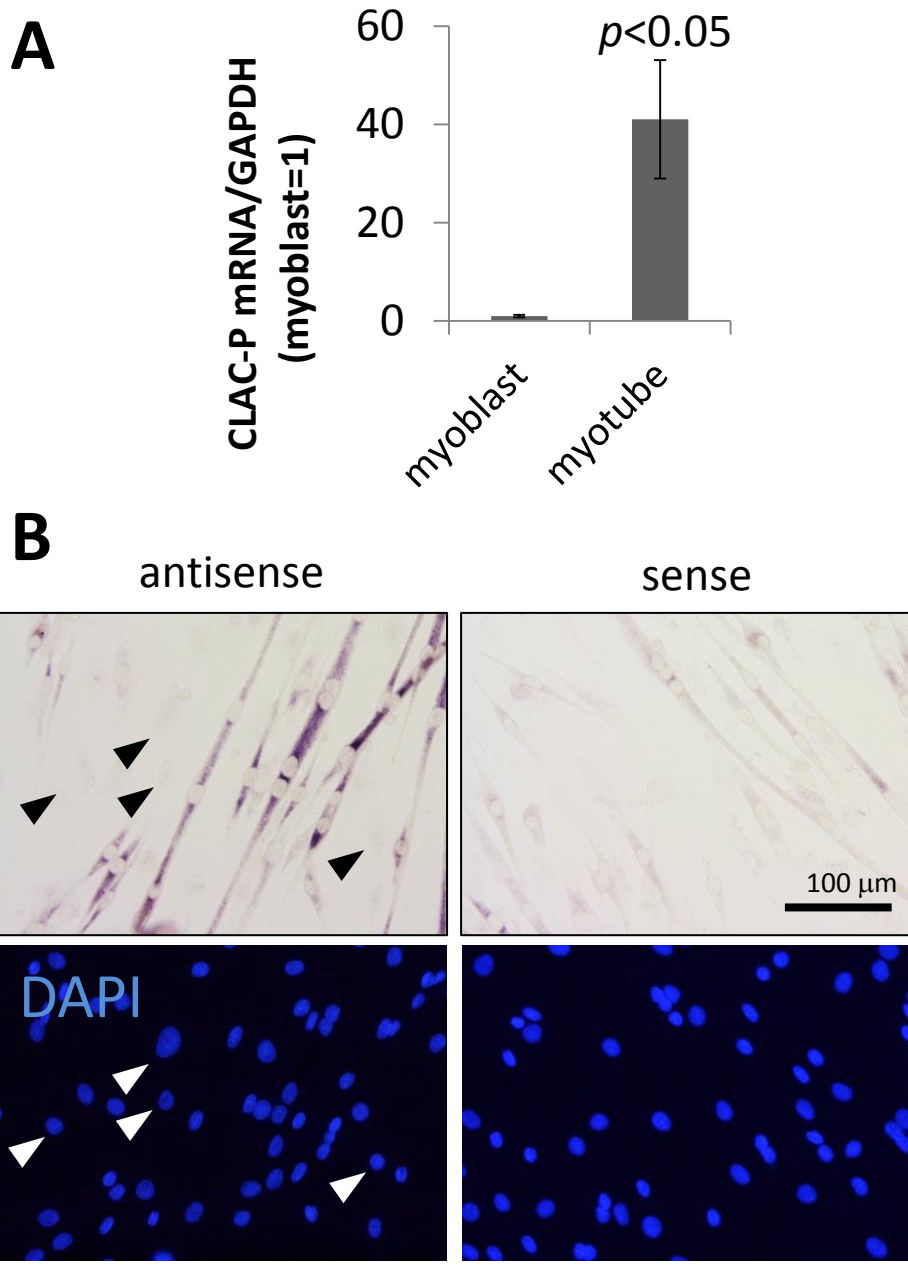
神経筋発達における*Col25a1* KOマウスの表現型。E11.5時点で*Col25a1* KOマウスにおいても運動ニューロンは正常に分化し、軸索束が脊髄から伸長する。E12.5時点で*Col25a1* KOマウスは骨格筋内の軸索発達を欠如する。E13.5以降、野生型においては神経筋接合部の形成を開始するが、*Col25a1* KOマウスにおいては野生型に比して過剰な運動ニューロンのアポトーシスと、軸索束が退縮する。



(Tanaka *et al.*, *J. Neurosci* 2014)

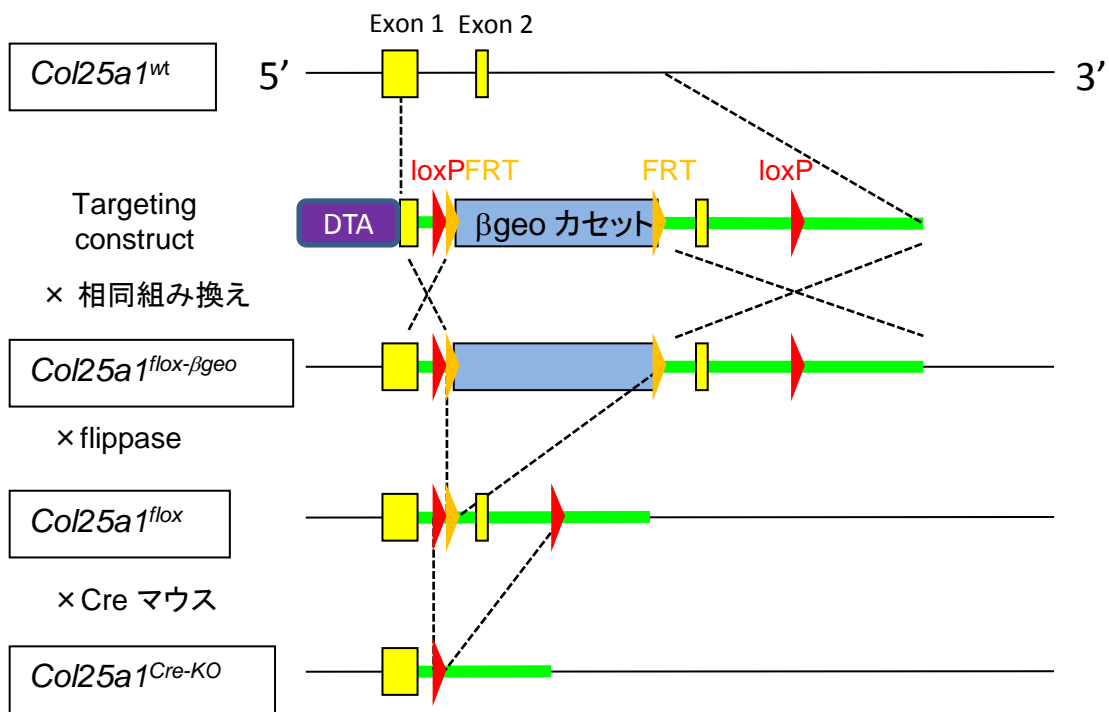
## 図表 8

*In situ* hybridizationによるCLAC-P mRNA発現解析。A. E12.5時点で、CLAC-P mRNAは脊髄前角の運動ニューロン(上段、点線内)と骨格筋(下段、点線内)の両者に発現が見られた。B. 成体骨格筋ではCLAC-P mRNA発現は消失することが示されている。(B: Tanka *et al.*, 2014より改変)



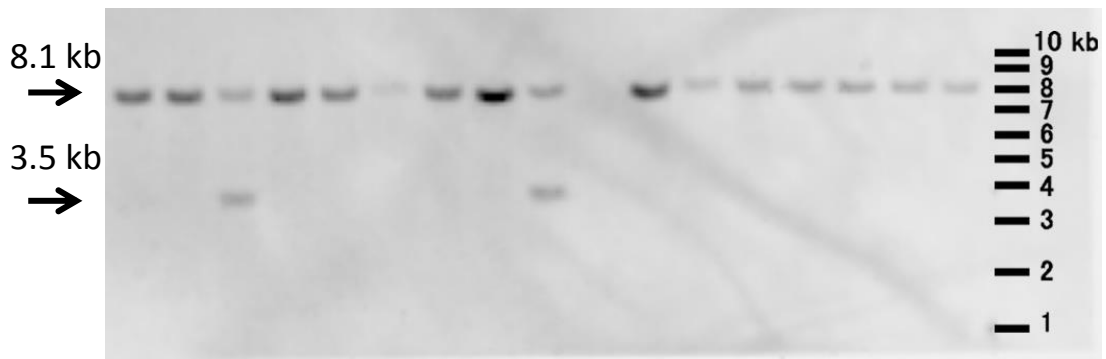
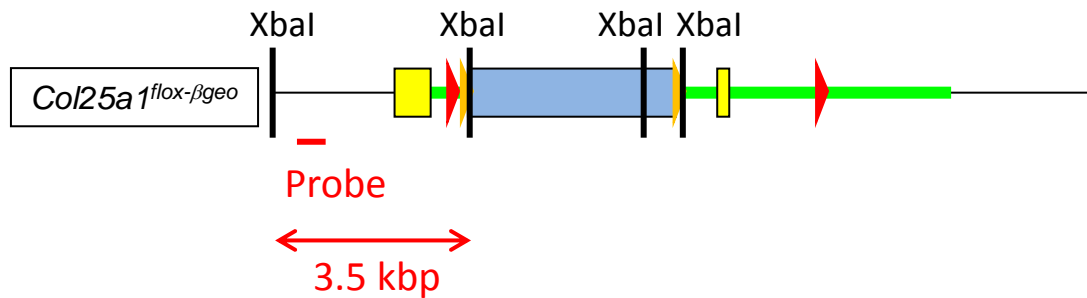
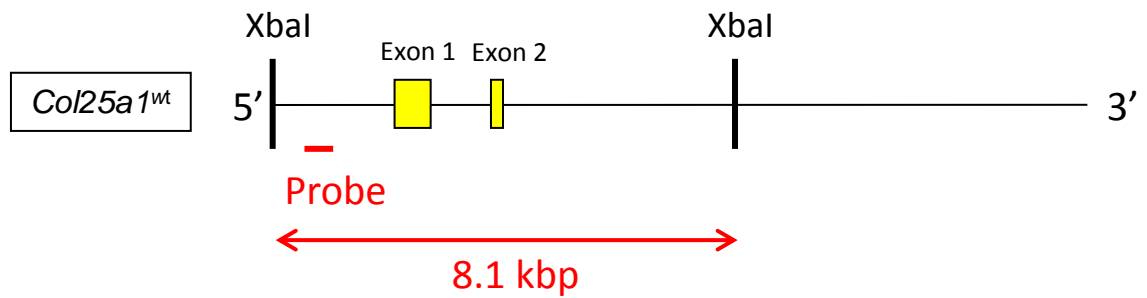
**図表 9**

C2C12細胞におけるCLAC-P mRNAの発現解析。A. C2C12細胞の分化前後におけるCLAC-P mRNAの発現量比較。GAPDH量をinternal controlとして、リアルタイムPCRを用いてCLAC-P mRNA発現量を比較したところ、分化誘導後5日目の筋管において筋芽細胞の約40倍のCLAC-P mRNA発現の上昇を認めた。N=4, student's t-test。(大泉寛明修士論文より改変)B. C2C12分化条件下(分化誘導後5日目)における*in situ* hybridization解析。すべての筋管についてアンチセンスプローブにてシグナルが確認された一方で、筋芽細胞(矢頭)にはシグナルが認められなかった。



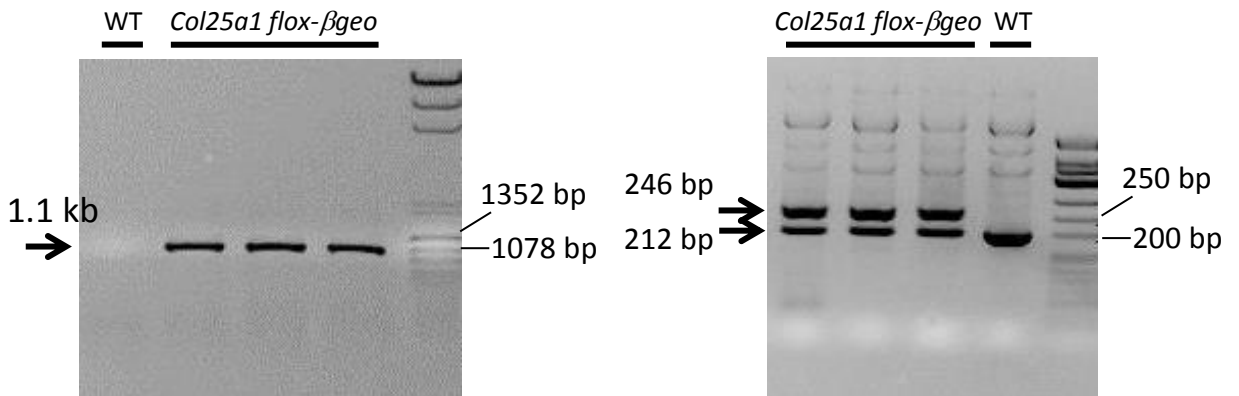
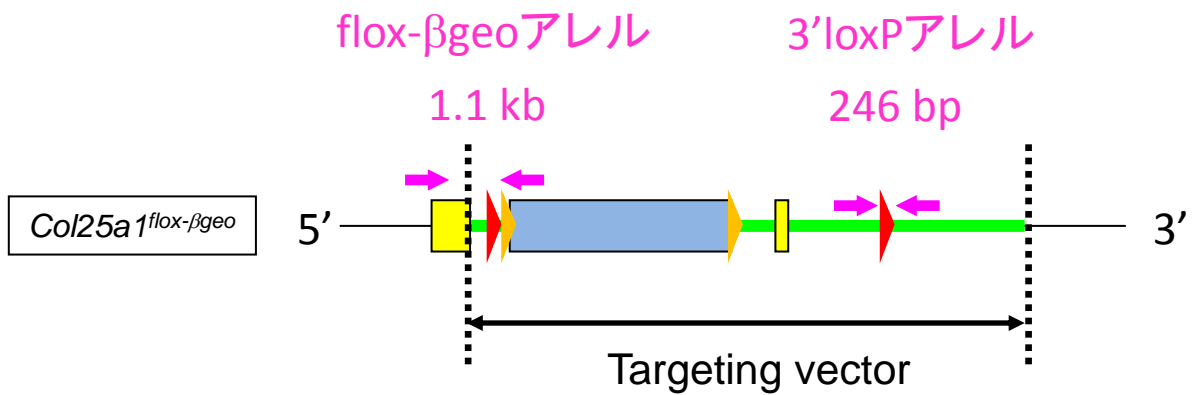
**図表 10**

*Col25a1* conditional KOのtargeting strategy。エキソン2を標的にした targeting vectorを作製した。相同組み換えにて*Col25a1<sup>flox- $\beta$ geo</sup>*アレルを導入したES細胞はflippase導入によりカセットが除去され*Col25a1<sup>flox</sup>*アレルとなる。*Col25a1<sup>flox</sup>*アレルを持つES細胞から誕生した*Col25a1<sup>flox</sup>*マウスはCre発現マウスとの交配により、Cre発現部位特異的に*Col25a1*がKOされる。



**図表 11**

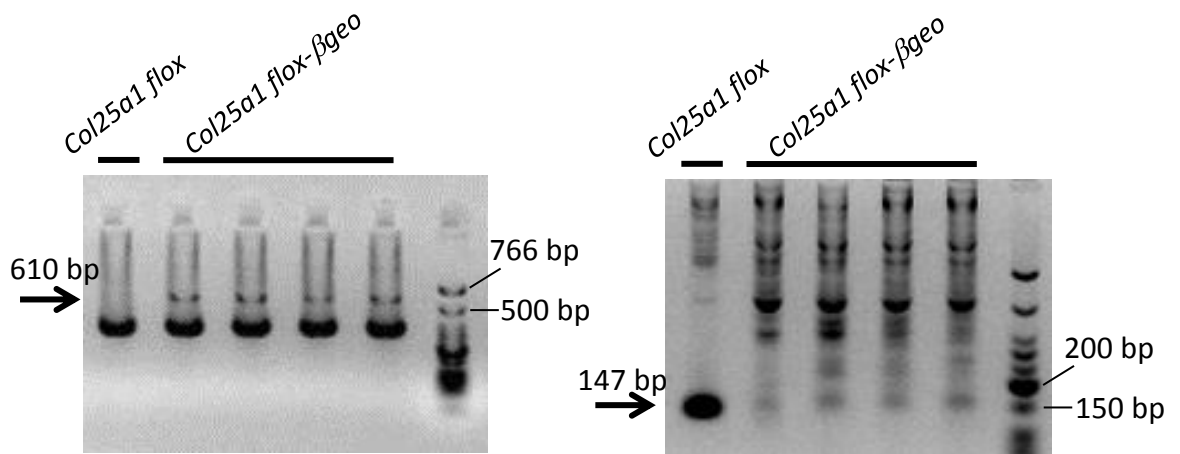
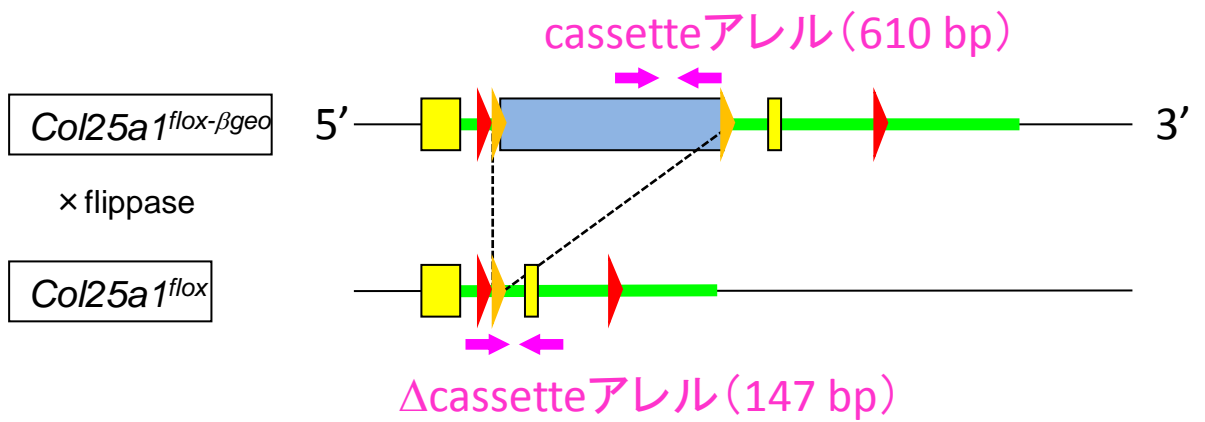
相同組み換えによりtargeting vectorが挿入されたES細胞のサザンブロットティングによるスクリーニング。ES細胞から抽出したゲノムDNAをXbaIにより制限酵素処理し、電気泳動後サザンブロットティングを行った。WTアレルでは約8.1 kb、相同組み換えを起こした*Col25a1 flox-βgeo*アレルでは約3.5 kbのバンドが出現。*Col25a1 flox-βgeo*アレルをヘテロにもつクローンを複数得た。



## 図表 12

PCR法による相同組み換えの確認。Targeting vectorの内外に設計したプライマーペアを用いてPCRを行った結果、*Col25a1 flox-βgeo*アレルで1.1 kbのバンドを確認(左)。3'側loxP配列の両端に設計したプライマーペアでPCRを行い、*Col25a1 flox-βgeo*アレルで246 bpのバンドを認め、3'側loxPを含む相同組み換えを確認した(右)。

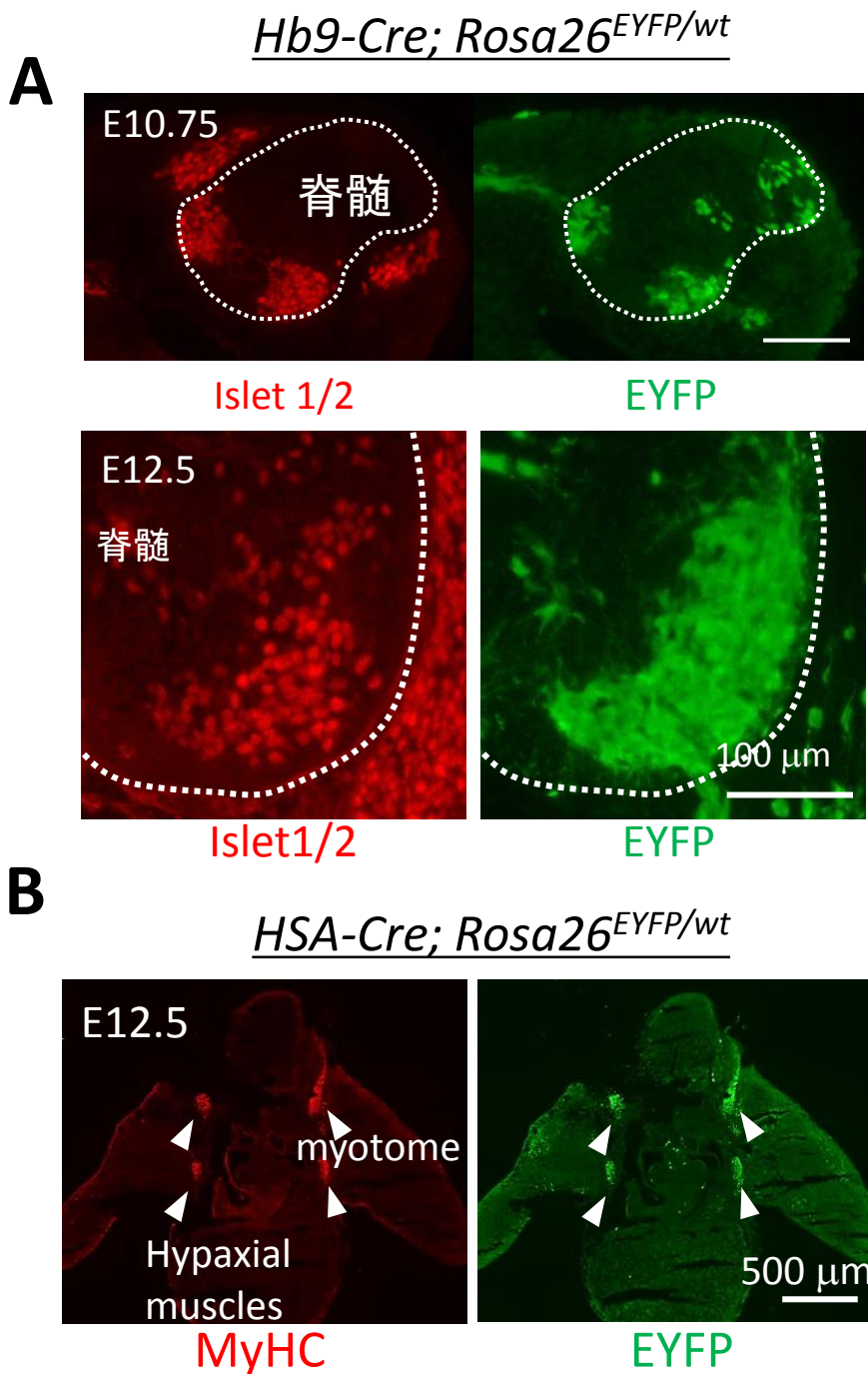




**図表 13**

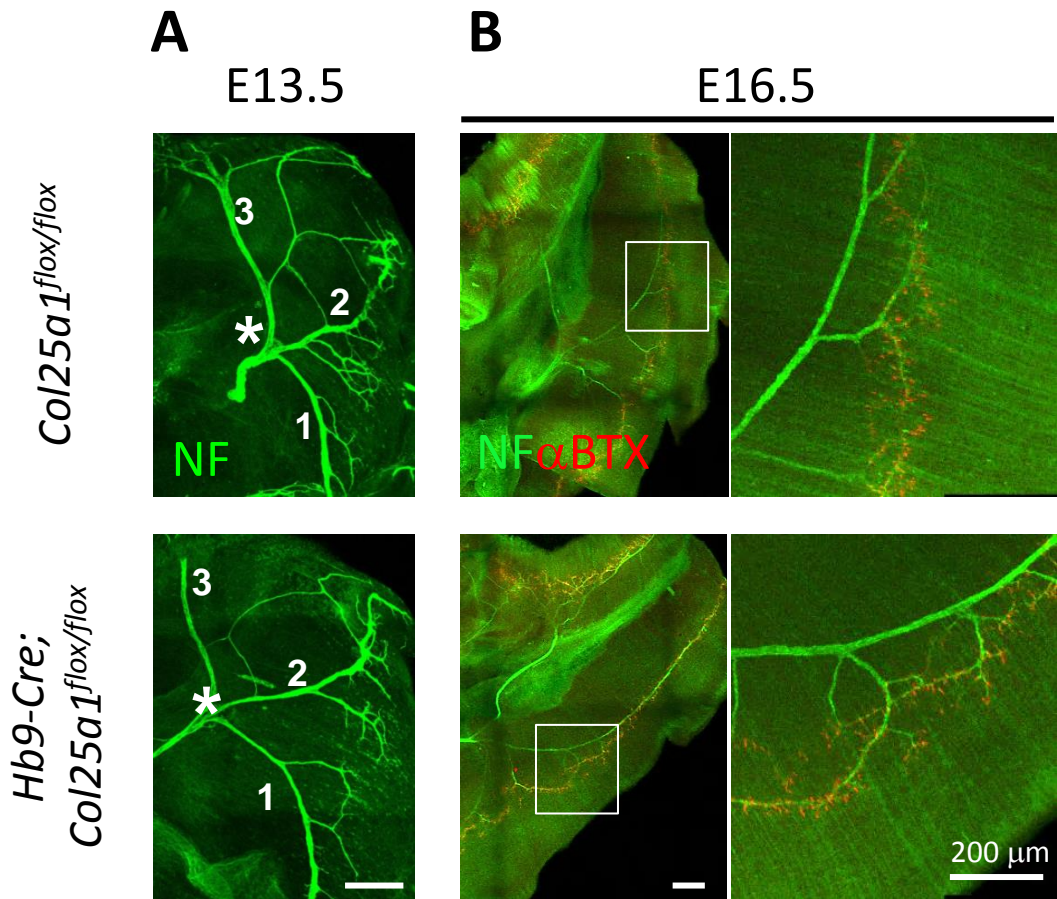
ES細胞におけるβgeoカセットの除去確認。βgeoカセット内部にプライマーペアを設計してPCR解析を行った結果、カセット由来の610 bpのバンド(左図矢印)が出現しないクローンを得た。さらに、同クローンは、カセット除去により特異的に増幅されるプライマーペアにより、147 bpのバンドの出現を確認した(右図矢印)。





**図表 14**

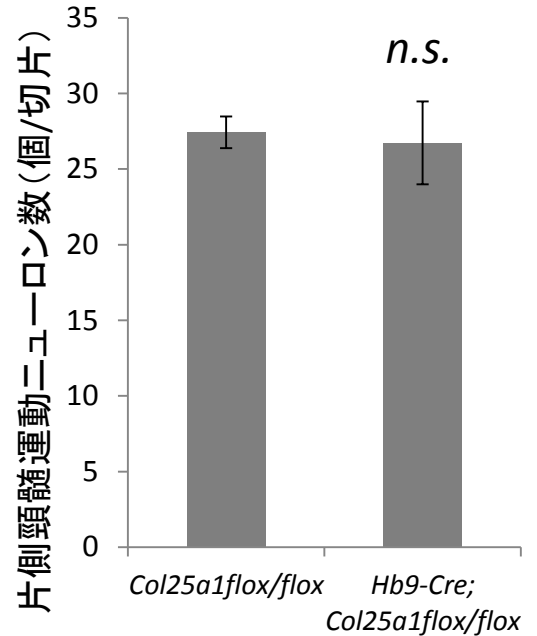
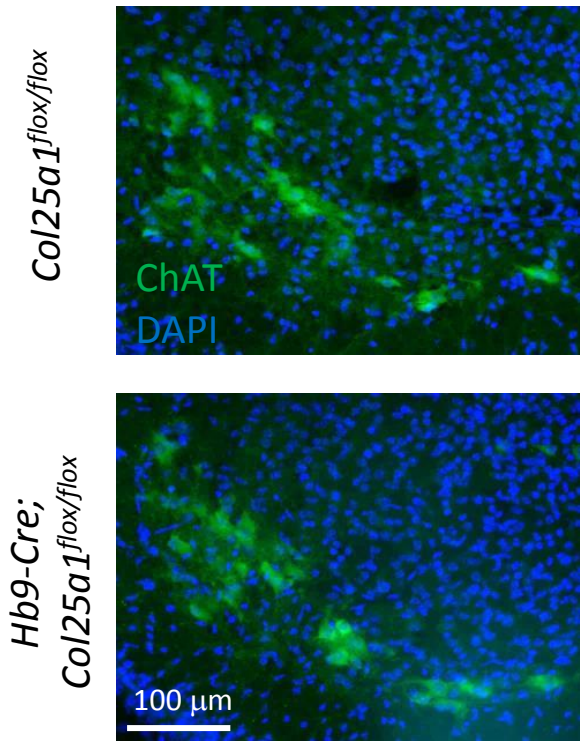
*Rosa26<sup>stop-EYFP</sup>*マウスを用いたCre発現確認。A. *Hb9-Cre*マウスにおけるCre発現確認。*Hb9-Cre; Rosa26<sup>stop-EYFP/wt</sup>* E10.75 (上段)およびE12.5 (下段)胎児切片を運動ニューロンマーカーであるIslet1/2 (赤色)およびEYFP (緑色)を共免疫染色したところ、E10.75時点では約70%の、E12.5時点では大部分の運動ニューロンにおいてEYFPの発現を認めた。B. *HSA-Cre*マウスにおけるCre発現確認。*HSA-Cre; Rosa26<sup>stop-EYFP/wt</sup>* E12.5胎児切片について筋管マーカーであるmyosin heavy chain (MyHC、赤色)およびEYFP (緑色)を共免疫染色したところ、骨格筋に特異的にEYFPの発現を認めた。



## 図表 15

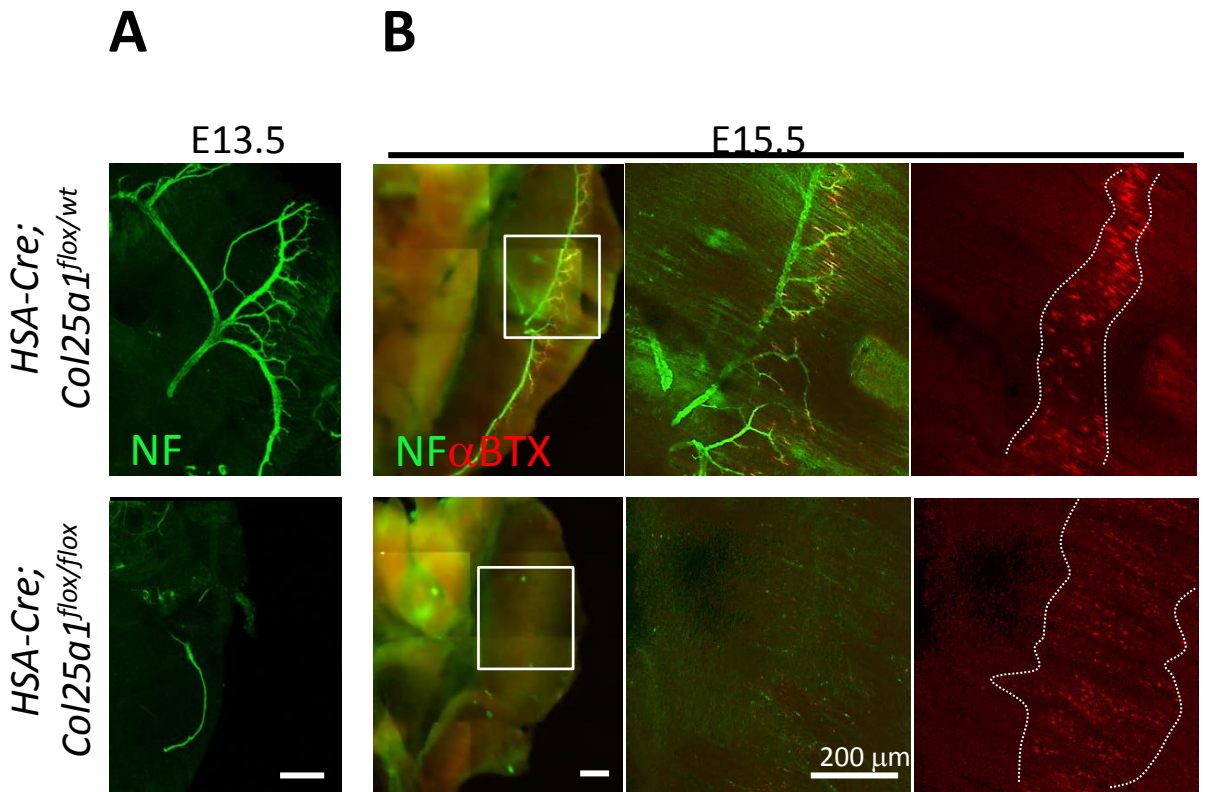
運動ニューロン特異的*Col25a1* KOマウス横隔筋の神経支配像。A. E13.5横隔筋の whole mount 蛍光免疫染色。抗ニューロフィラメント(NF)抗体染色で運動ニューロン軸索を緑色に染色。*Hb9-Cre; Col25a1<sup>flox/flox</sup>*胎児においても軸索束進入部位(アスタリスク)から3方向への分枝・伸長とsecondary branchの形成を認め、*Col25a1<sup>flox/flox</sup>*胎児との間に差異は認められなかった。B. E16.5横隔筋の whole mount 蛍光免疫染色。抗NF抗体で運動ニューロン軸索を緑色に、 $\alpha$ -Bungarotoxin ( $\alpha$ -BTX)にてアセチルコリン受容体(AChR)を赤色にそれぞれ染色。*Hb9-Cre; Col25a1<sup>flox/flox</sup>*胎児においても軸索束の分枝・伸長を認め、さらに軸索末端はAChRとマージし神経筋接合部の形成が確認され、*Col25a1<sup>flox/flox</sup>*胎児との間に差異は認められなかった。

## E18.5 脊髄前角(頸髄)



## 図表 16

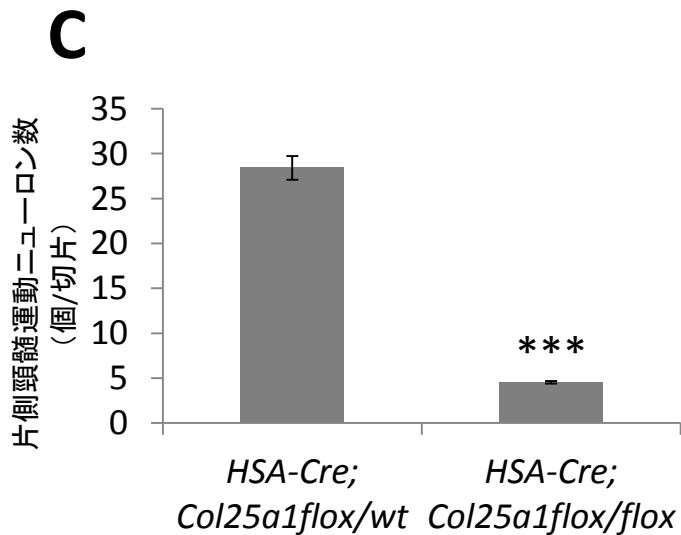
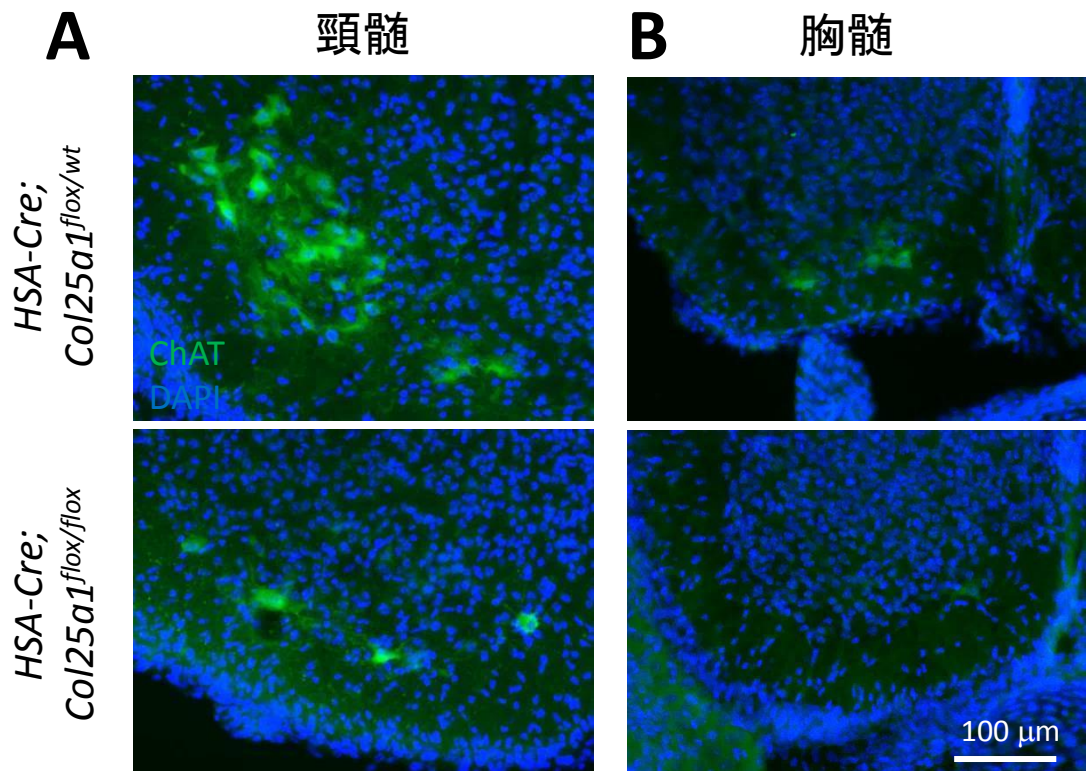
運動ニューロン特異的Col25a1 KOマウスの脊髄前角運動ニューロン数の定量。E18.5胎児凍結切片をコリンアセチルトランスフェラーゼ (ChAT) に対する抗体を用いて免疫染色し、運動ニューロン細胞体を標識した。Hb9-Cre;Col25a1<sup>flox/flox</sup>胎児においても運動ニューロン細胞体の生存が確認され、頸髄C3-5の領域で運動ニューロン細胞体数を計測したところ、その数はCol25a1<sup>flox/flox</sup>胎児と同程度であった。Student's t-test, n=3



**図表 17**

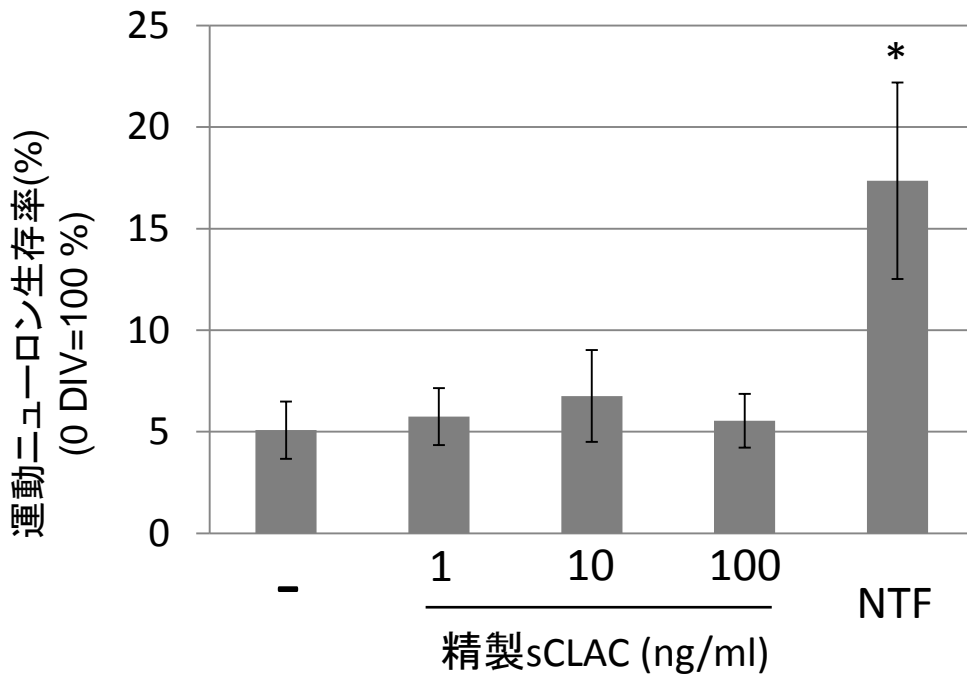
骨格筋特異的*Col25a1* KOマウス横隔膜の神経支配像。A. E13.5横隔膜のwhole mount蛍光免疫染色。抗NF抗体染色で運動ニューロン軸索を緑色に染色したところ、*HSA-Cre;Col25a1<sup>flox/flox</sup>*胎児においては運動ニューロン軸索束の分枝・伸長を欠損していた。B. E15.5横隔膜のwhole mount蛍光免疫染色。抗NF抗体で運動ニューロン軸索を緑色に、α-BTXにてAChRを赤色にそれぞれ染色。*Hb9-Cre;Col25a1<sup>flox/flox</sup>*胎児においては運動ニューロン軸索束が横隔膜から消失していた。さらに、*HSA-Cre; Col25a1<sup>flox/flox</sup>*においてはAChRが横隔膜中央部に限局してendplate band(点線)を形成が認められたが、*HSA-Cre; Col25a1<sup>flox/flox</sup>*胎児においては径の小さい未成熟なAChRクラスターが幅広く分散して存在し、この所見は運動ニューロンによる神経支配を欠如した骨格筋の特徴に一致していた。





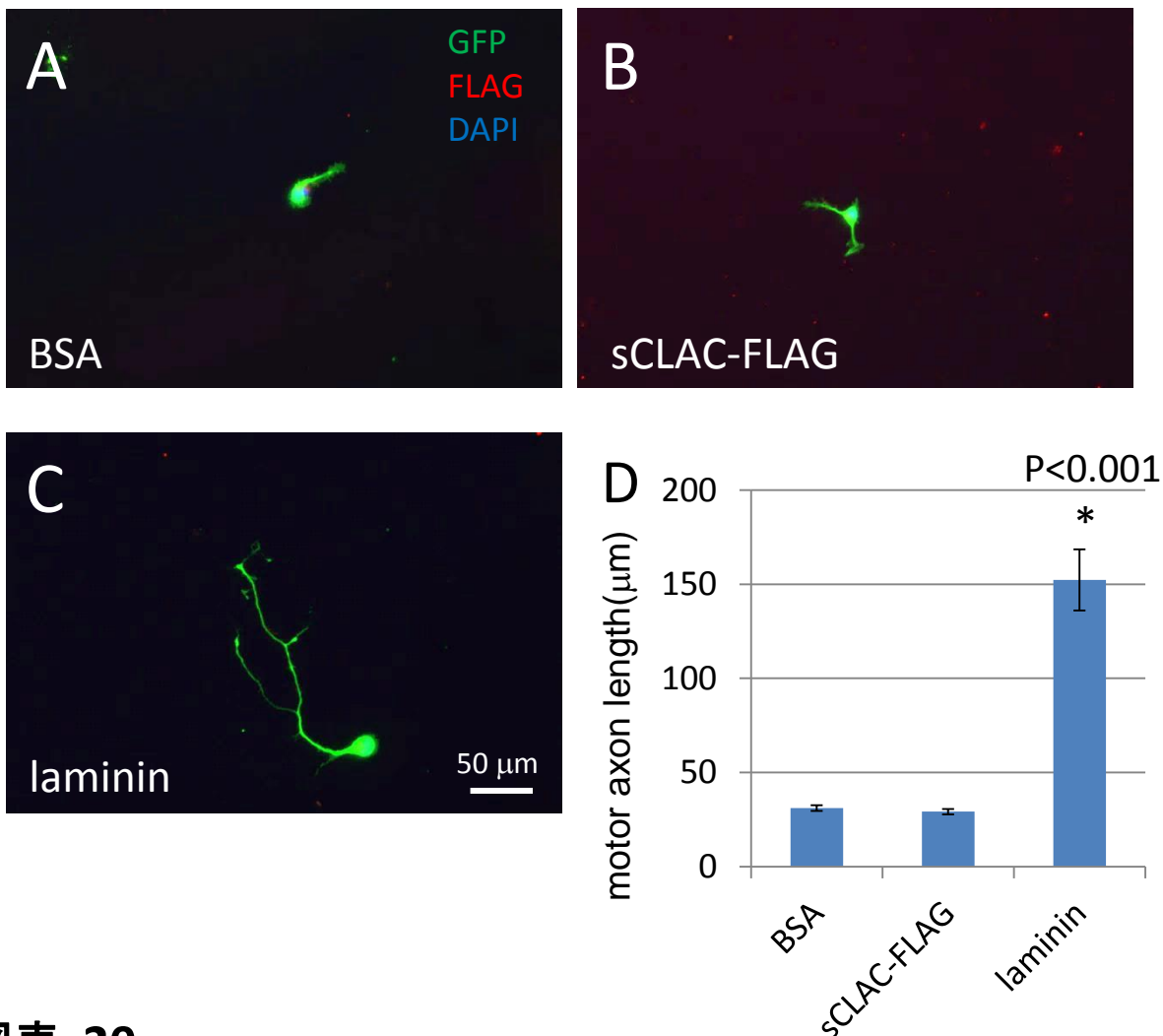
**図表 18**

骨格筋特異的*Col25a1* KOマウスの脊髄前角運動ニューロンの染色像。A, B. E18.5胎児凍結切片をChATに対する抗体を用いて免疫染色し、運動ニューロン細胞体を標識した。*HSA-Cre;Col25a1*<sup>flox/flox</sup>胎児において、頸髄(A)および胸髄(B)の運動ニューロン細胞体の広汎な消失を認めた。C. 頸髄C3-5の領域における運動ニューロン細胞体数の定量。*HSA-Cre;Col25a1*<sup>flox/flox</sup>胎児は*HSA-Cre;Col25a1*<sup>flox/wt</sup>に比して約85%の消失を示した。Student's *t*-test, *n*=3, \*\*\*: *p*<0.005



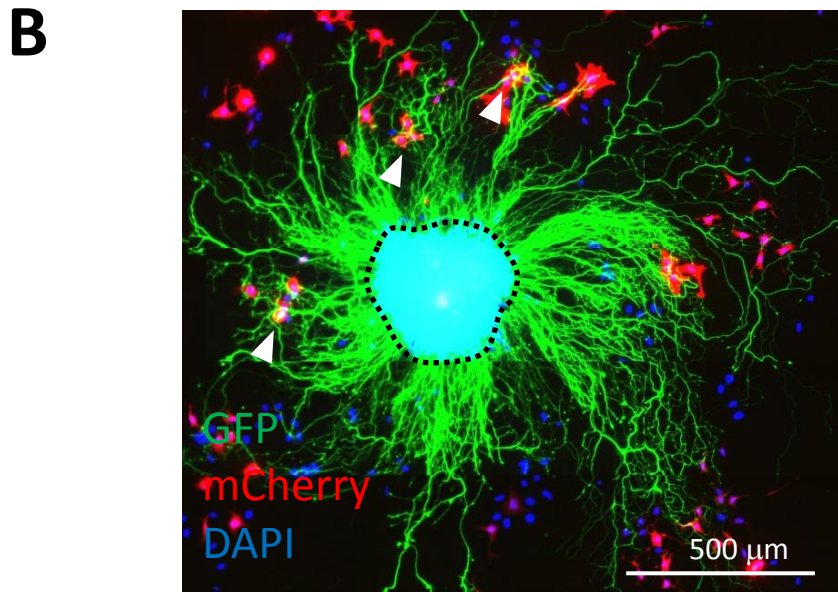
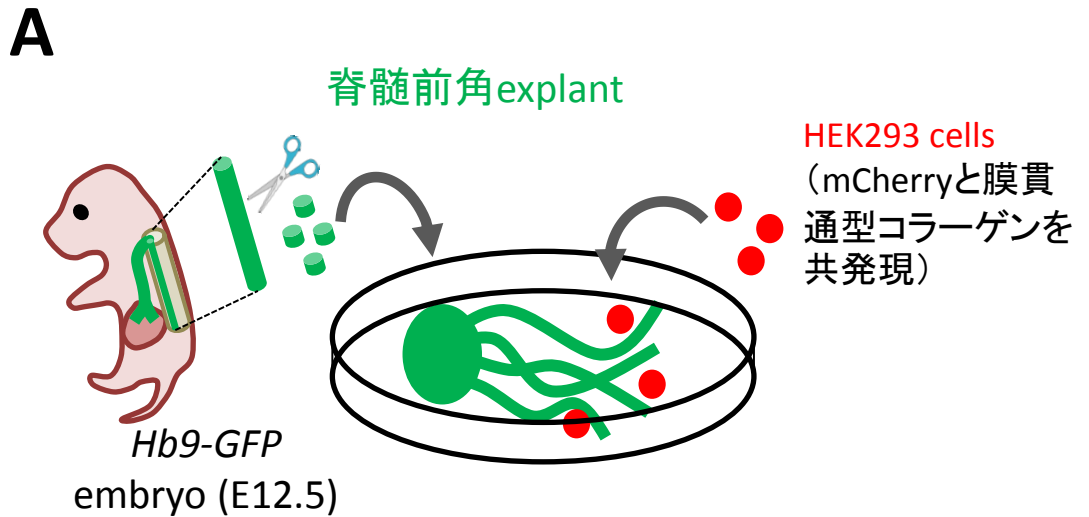
**図表 19**

精製sCLAC-FLAG添加時の培養運動ニューロンの生存率。Hb9-GFP陽性運動ニューロンについて、0 DIVにおける生存率を100 %として3 DIVにおける生存率を計測。BDNF(1 ng/ml),CNTF(10 ng/ml),GDNF(0.1 ng/ml)を添加した NTF群においては運動ニューロン生存率の有意な上昇が認められたのに対し、精製sCLAC-FLAGタンパク質を1-100 ng/mlの濃度で培地中に添加した群では、いずれも運動ニューロン生存率の上昇は認められなかった。One-way ANOVA with Dunnett's test,  $n=5$ , \*:  $p < 0.05$



**図表 20**

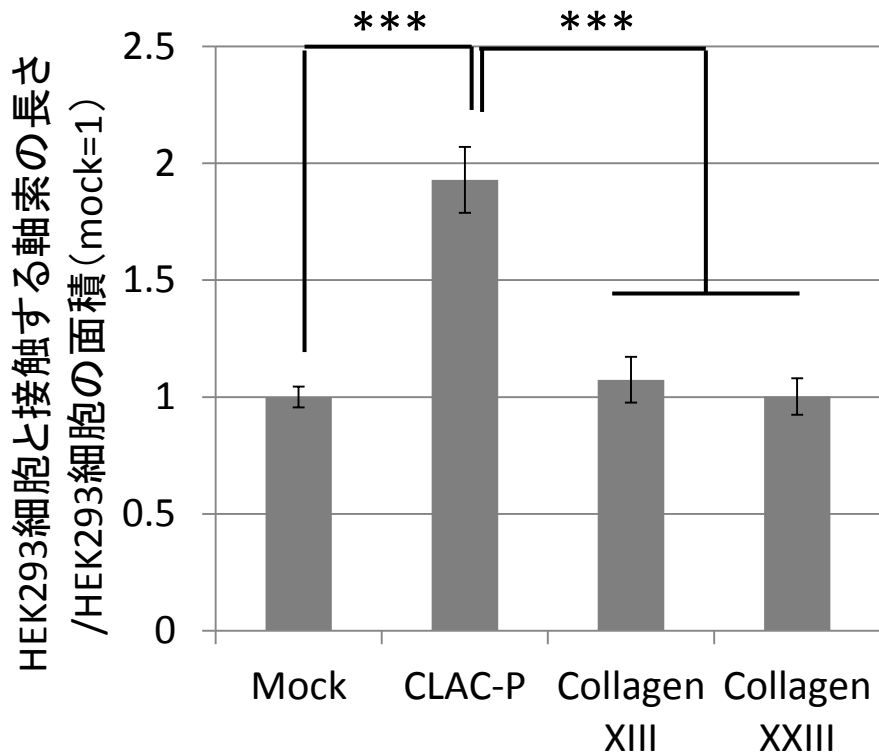
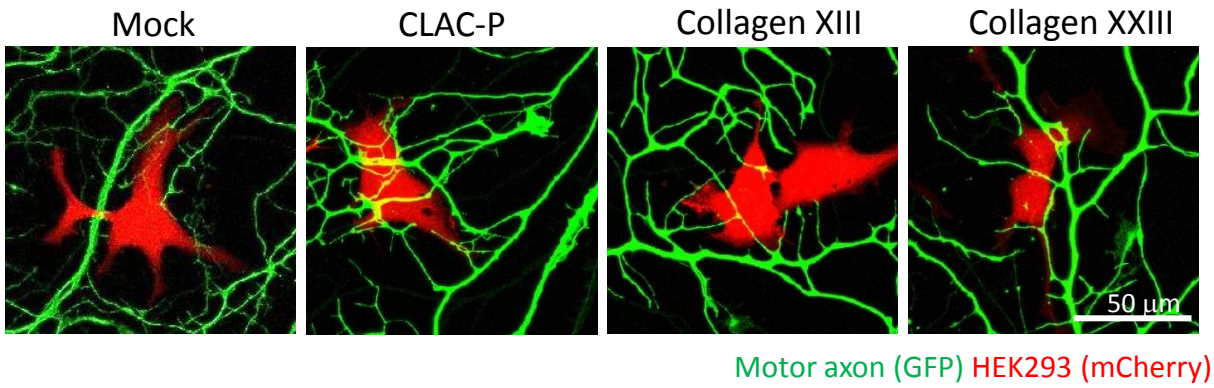
精製sCLAC-FLAGコーティング時の培養運動ニューロンの神経突起長の計測。3 mg/mlのBSA (A)、sCLAC (B)、laminin (C)をそれぞれコーティングしたカバースリップ上にてHb9-GFP陽性運動ニューロンを培養し、24時間後に抗GFP抗体および抗FLAG抗体を用いて免疫染色した。sCLAC-FLAGコーティング群においてはカバースリップ上に赤色の染色が見られ、sCLACのコーティングが確認された。(D) 神経突起長の定量。最も長い神経突起についてその長さを計測したところ、Lamininコーティング群においてはBSAコーティング群に比して神経突起長が5倍程度上昇したのに対し、sCLACコーティング群においては突起長に変化が見られなかった。N=57, 62, 125, One-way ANOVA with Tukey's multiple test



## 図表 21

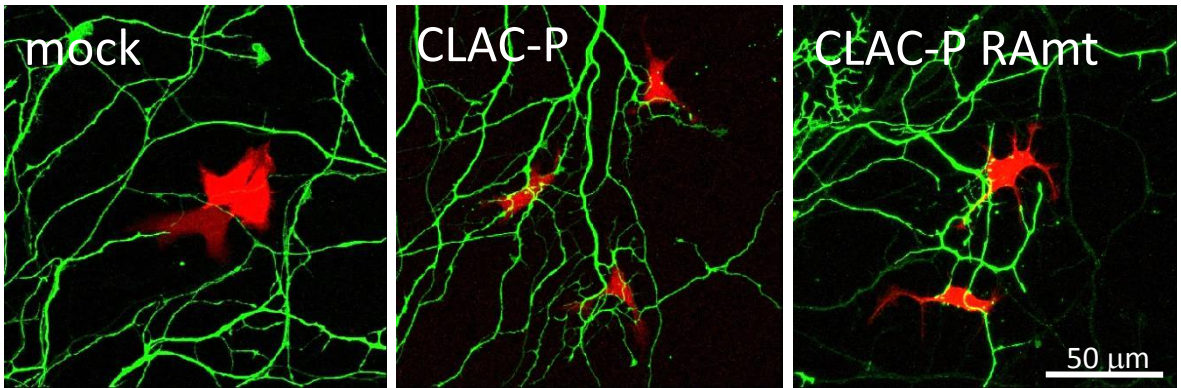
脊髄前角explantとCLAC-P発現HEK293細胞の共培養。A. 共培養の手法。mCherryと各コラーゲンを共発現するHEK293細胞を播種し、その1.5-2時間後に脊髄前角explantを播種して、2日間の共培養を行った。B. 共培養後の染色像。mCherryとCLAC-Pを共発現するHEK293細胞と*Hb9-GFP*陽性胎児由来の脊髄前角explantとの2日間の共培養の後、抗GFP抗体により免疫染色した。脊髄前角explant(点線)からGFP陽性軸索が放射状に伸長し、その一部はmCherry陽性HEK293細胞と接触した(矢頭)。



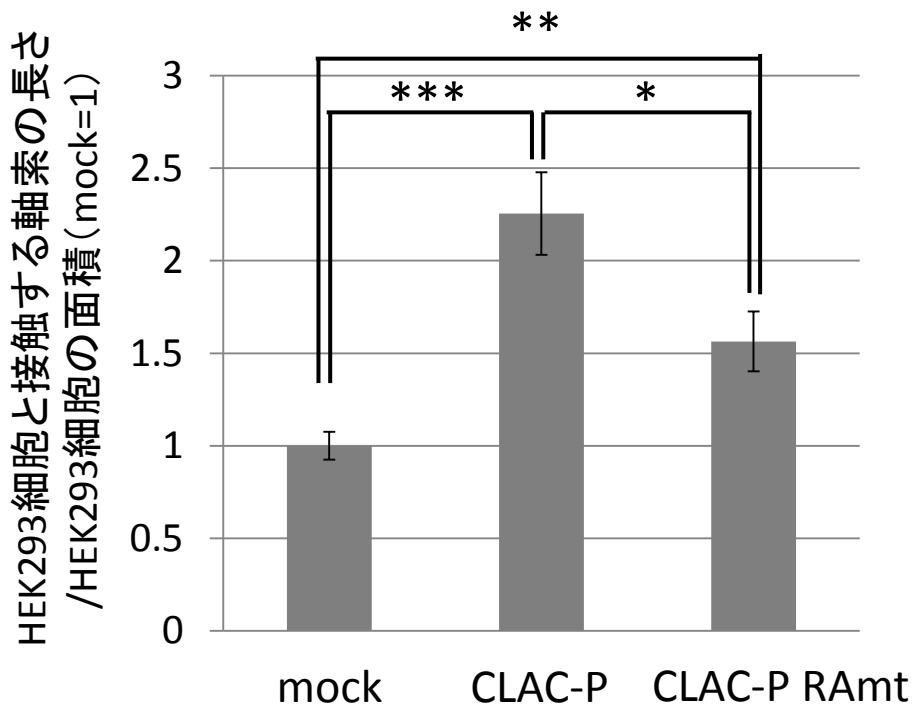


**図表 22**

運動ニューロン軸索と各HEK293細胞との相互作用の検討。HEK293細胞の周囲に伸長した運動ニューロン軸索の走行を観察したところ、CLAC-P発現HEK293細胞にはより多くの運動ニューロン軸索の集簇が見られた。軸索がHEK293細胞と接触・マージする部分の長さを定量したところ、CLAC-P発現細胞においてはmock、Collagen XIII、Collagen XXIII発現細胞に比して、軸索集簇の程度が有意に増大していた。One-way ANOVA with Tukey's test,  $n=175, 130, 52, 72$ , \*\*\*:  $p < 0.001$

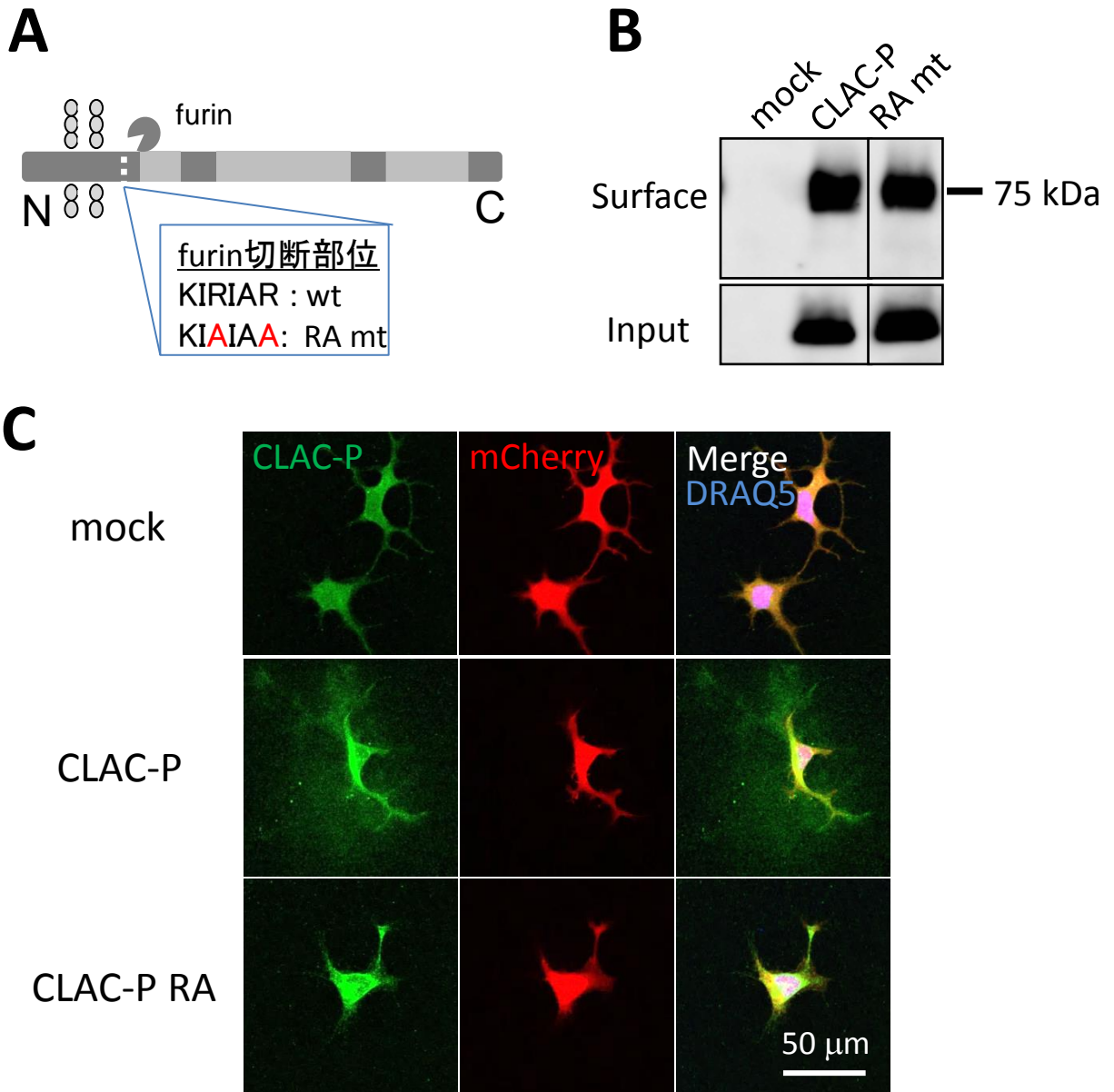


Motor axon (GFP) HEK293 (mCherry)



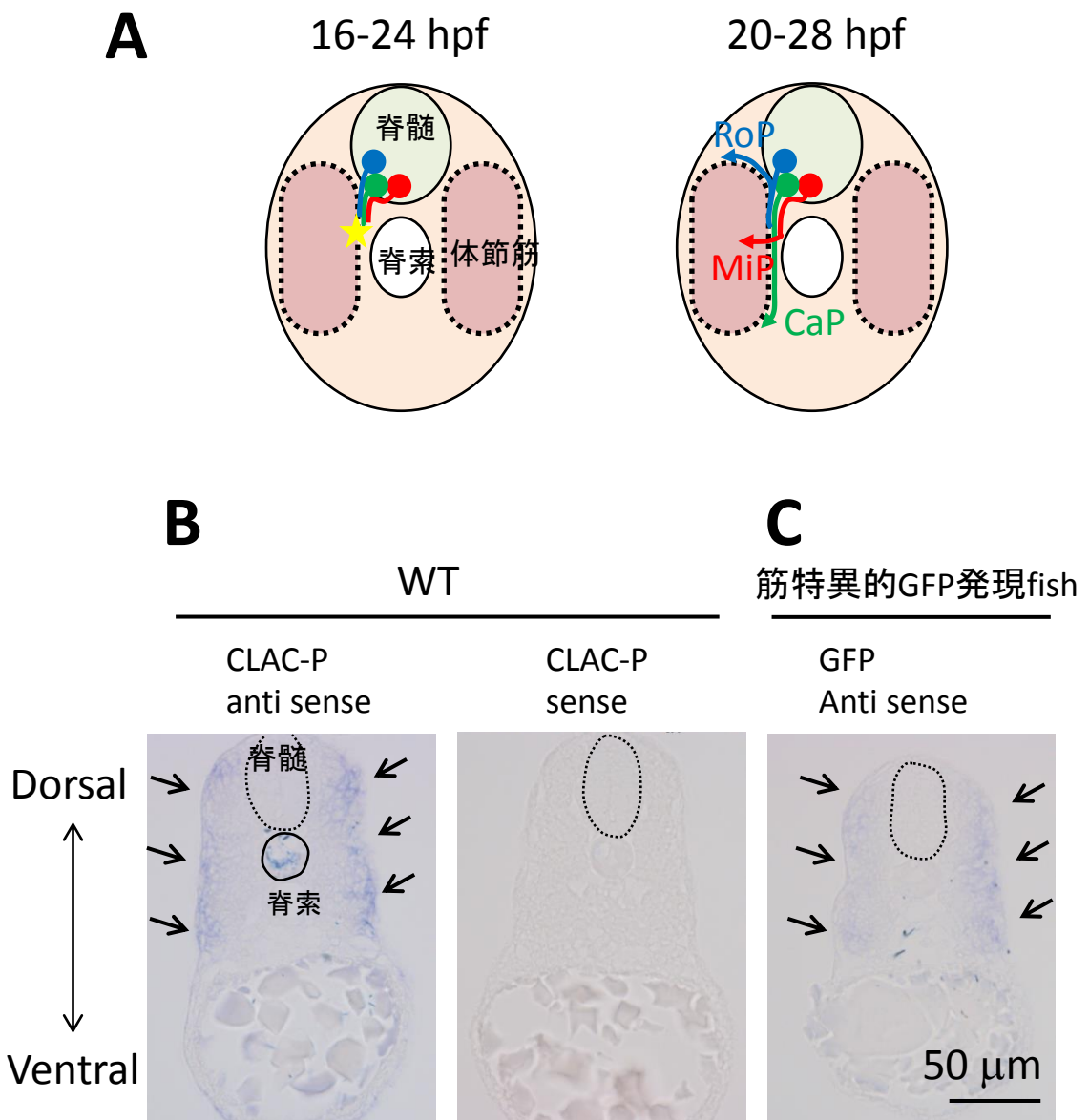
図表 23

CLAC-P発現HEK293細胞とCLAC-P RAmt発現HEK293細胞に対する運動ニューロン軸索集簇の比較。CLAC-P RAmt発現細胞はmockに比して運動ニューロン軸索集簇の程度が有意に大きかった。一方で、CLAC-P発現細胞と比較した場合、CLAC-P RAmt発現細胞における軸索集簇の程度は有意に小さかった。*One-way ANOVA with Bonferroni correction, n=65, 48, 75, \*: p<0.05, \*\*: p<0.01, \*\*\*: p<0.001*



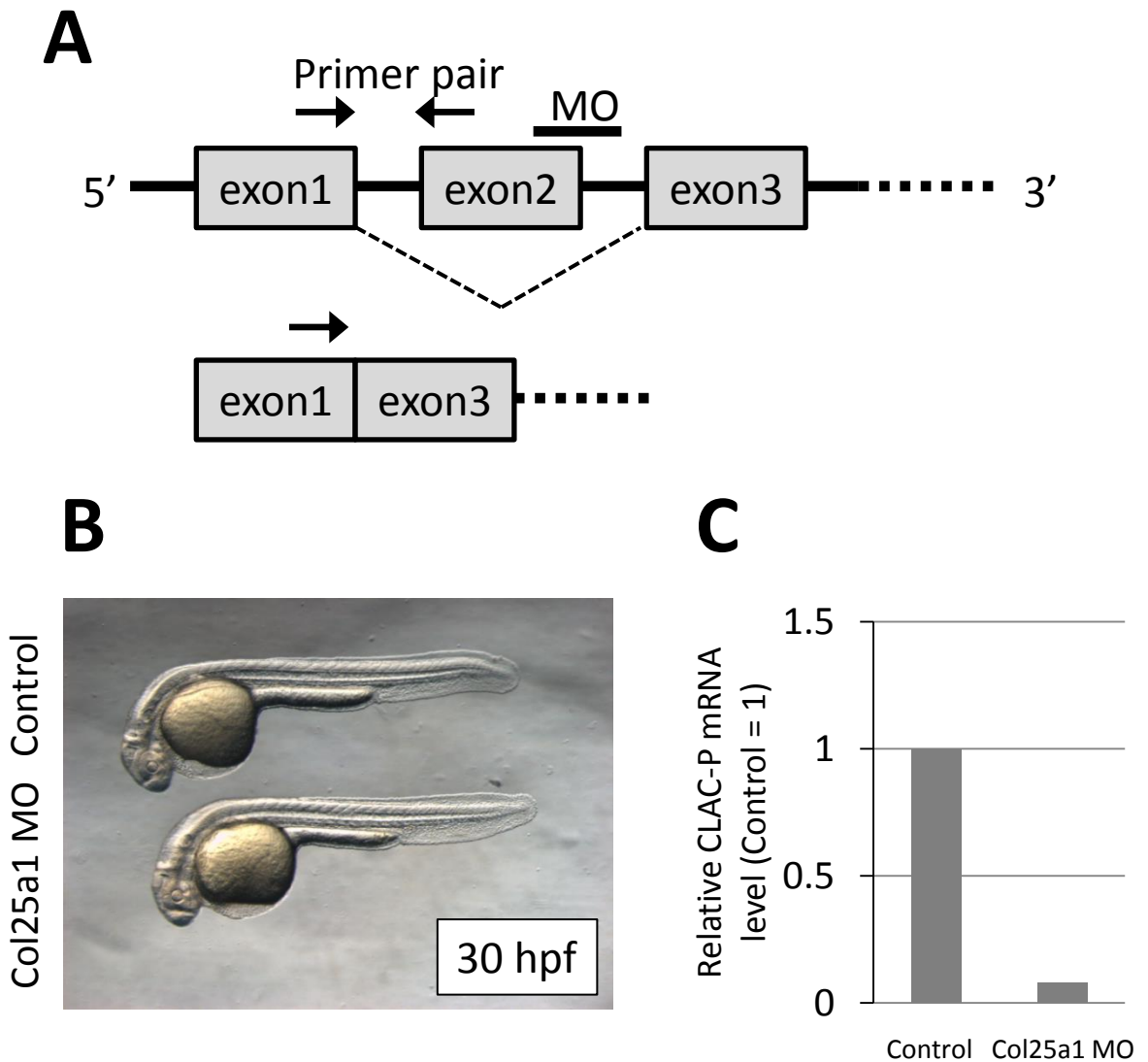
**図表 24**

CLAC-P RAmt発現HEK293細胞の発現確認。A. CLAC-P配列中のfurin認識部位とRAmt。B. 表面ビオチン化実験による細胞表面CLAC-P発現量の比較(抗CLAC-P NC3抗体によるウエスタンブロッティング)。CLAC-PおよびCLAC-P RAmtは同程度に発現しており、細胞表面のCLAC-P発現量も同程度であった。C. CLAC-PおよびCLAC-P RAmt発現HEK293細胞の免疫染色。抗CLAC-P NC4抗体によりCLAC-PおよびsCLACを緑色に染色。CLAC-P発現細胞の周囲にはsCLACの分泌・蓄積が認められたが、CLAC-P RAmt発現細胞の周囲にはsCLACの蓄積が見られなかった。



**図表 25**

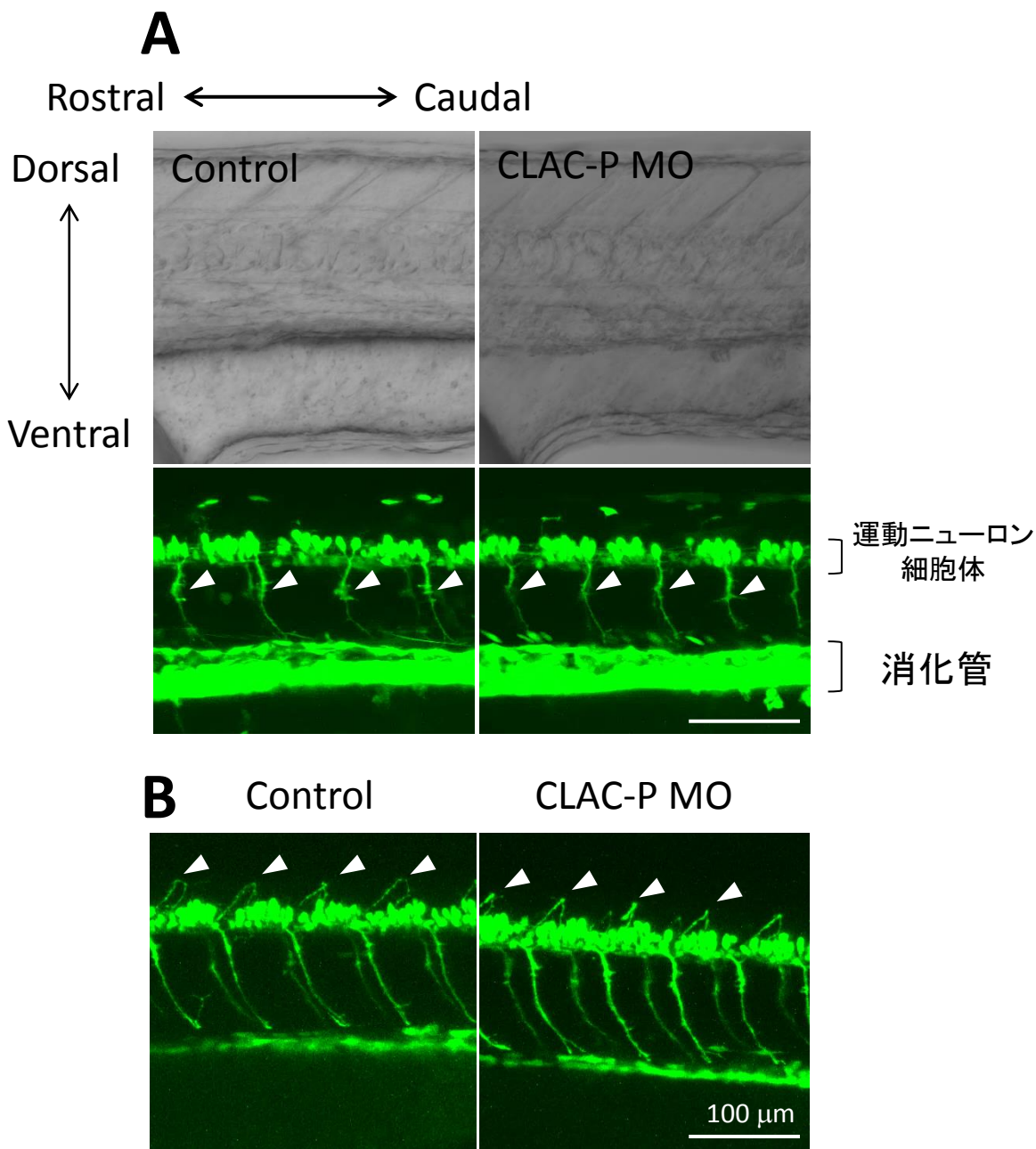
A. ゼブラフィッシュ胚における運動ニューロン軸索伸長。16-24 hpfにかけてCaP、MiP、RoPの各1次運動ニューロンはchoice point(星)まで共通の進路をとる。20- 28 hpfにかけて各1次運動ニューロンは各々の伸長方向に分岐する。B, C. 24 hpfゼブラフィッシュ胚に対する*in situ* hybridization(transverse section)。B. WT fishにおける、CLAC-P mRNA アンチセンス・センスプローブを用いた解析。CLAC-P mRNA発現は脊髓(点線)で認められないが、体節筋(矢印)および脊索(実線)において発現が認められた。C. 体節筋特異的にGFPを発現するfish(プロモーター未同定)に対して、GFPアンチセンスプローブを用い、体節筋のマーカーとした。CLAC-P mRNAの体節筋における発現パターンと同様の染色パターンを示した。



**図表 26**

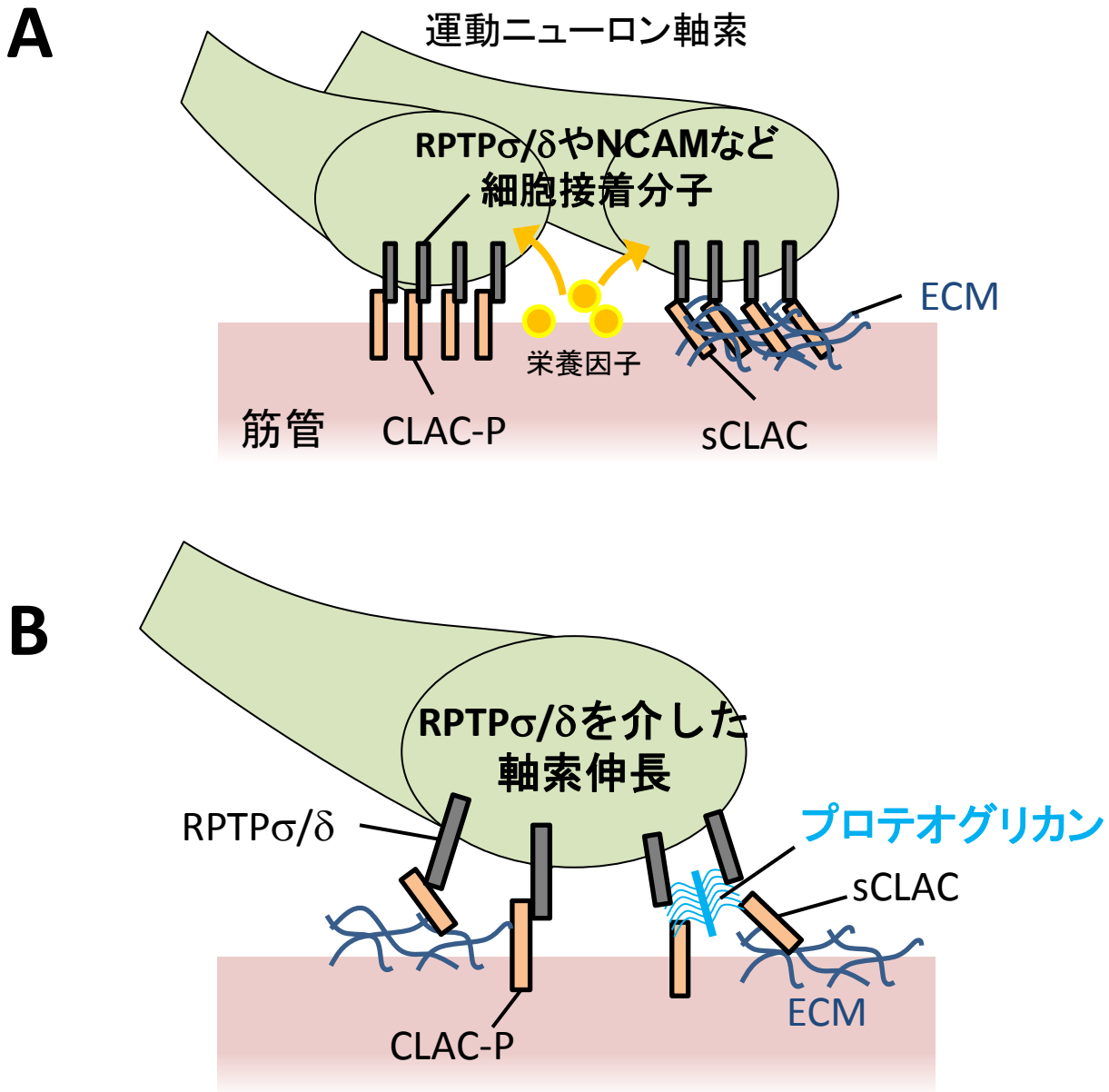
モルフォリノ(MO)を用いたゼブラフィッシュ*Col25a1*遺伝子ノックダウン実験。A. *Col25a1* MOの標的部。 *Col25a1*遺伝子のエキソン2のスプライシングドナー部位を標的に、スプライシング阻害MOを設計した。MOにより、エキソン2を欠失するエキソンスキッピングをきたす。B. *Col25a1* MO胚の外見上の表現型。 *Col25a1* MO胚は30 hpf時点で-MOコントロールと比較して外見上の差異は認められなかった。C. *Col25a1* MOのノックダウン効率。エキソン1とエキソン3にプライマーペアを設計し、定量的RT-PCRにてCLAC-P mRNA量を定量。22 hpf時点でCLAC-P MOにより90%以上のCLAC-P mRNA量の低下を認めた。





**図表 27**

ゼブラフィッシュ *Col25a1* 遺伝子ノックダウンによる運動ニューロン軸索伸長の表現型。A. 26 hpf 胚の運動ニューロン軸索の走行。各体節の脊髄前角から出た CaP 運動ニューロン軸索 choice point (矢頭) より遠位への伸長が見られ、-MO コントロールと CLAC-P MO との間に差異は認められなかった。B. 32 hpf 時点での表現型。CaP 軸索の伸長と RoP 軸索 (矢頭) の伸長が見られ、MO コントロールと CLAC-P MO との間に差異は認められなかった。



図表 28

CLAC-P/sCLACが骨格筋内で運動ニューロン軸索発達を促進する分子メカニズム。A. 細胞間接着分子としての機能。筋管に発現したCLAC-Pあるいは細胞外マトリックス(ECM)に蓄積したsCLACが運動ニューロン-筋管あるいは運動ニューロン-ECM間の細胞接着を促進することで栄養因子などの授受を可能にし、間接的に軸索伸長を促進する可能性が考えられる。B. RPTP $\sigma/\delta$ シグナルを介した機能。CLAC-P/sCLACがRPTP $\sigma/\delta$ と直接結合して軸索伸長を促進する可能性や、CLAC-P/sCLACがプロテオグリカンを介したRPTP $\sigma/\delta$ による軸索伸長を制御する可能性が考えられる。

## 謝辞

本研究の遂行にあたり、終始適切な助言を賜り、懇切丁寧にご指導いただきました東京大学大学院医学系研究科・神経病理学分野 岩坪威教授に厚く感謝いたします。

大阪大学大学院医学系研究科・細胞生物学 原田彰宏教授、群馬大学生体調節研究所・核内情報制御分野 佐藤隆史准教授には *Col25a1flox* マウス **targeting construct** の設計をしていただくとともにサザンブロッティング等の手法をご教授いただきました。厚く感謝申し上げます。

University of Kansas Medical Center の西宗裕史先生には運動ニューロンの培養法をご教授いただきました。深く感謝いたします。

国立遺伝学研究所・初期発生研究部門の川上浩一教授ならびに浅川和秀助教にはゼブラフィッシュを用いた検討において、施設、動物を提供いただき、大変有意義なディスカッションをしていただきました。特に浅川和秀助教には懇切丁寧なご指導と、滞在中、研究内外において非常に厚いサポートをいただき、その研究に対する姿勢からたくさんのごことを学ばせていただきました。心より御礼申し上げます。

東京大学大学院、医学系研究科神経病理学分野ならびに薬学系研究科臨床薬学教室の皆様からは研究セミナーやディスカッションを通じて多くの刺激を受け、支えていただきました。特に、研究室配属当初より 6 年間にわたりいつも優しく親身なご指導をいただきました、若林朋子助教には心から感謝いたします。臨床薬学教室 富田泰輔教授には施設をご提供いただき、また研究セミナー等で非常に有意義な助言をいただきました。深く感謝いたします。CLAC-P 研究の先鞭をつけていただき、研究遂行において鋭いご指摘をいただきました橋本唯史講師に感謝いたします。マウスの管理等技術面全般のサポートをいただいた松尾祥子技術補佐員に感謝いたします。CLAC-P 生理機能研究の礎を築き、時には厳しく時には優しく、常に厚くご指導いただきました田中智弘博士に心からの感謝を表します。同じ研究グループとして多数の助言をいただき、日常生活においても常に的確な提言・ご指導をいただきました宗實悠佳修士、西尾周学士に感謝の意を表します。6 年間の研究生生活の中で同期として切磋琢磨し支えていただいた、衛藤樹先生、石渡智之修士、遠藤誉也学士、末永宗士朗学士、山下雄大学士、吉田真梨子修士に感謝いたします。

最後に、研究生生活をあらゆる面から支えてくれた両親、弟に感謝いたします。