

受賞者

山梨 裕司

東京大学医科学研究所 腫瘍抑制分野

## 研究テーマ

### 筋無力症の原因蛋白質 Dok-7 の作用機構

#### 1. 緒言

筋無力症は骨格筋収縮の運動神経支配に必須のシナプスである神経筋接合部 (NMJ: Neuromuscular junction) の形成及び機能不全によって発症する疾患であり、その名の通り、易疲労性の筋力低下を特徴とする。筋無力症の多くは重症筋無力症 (MG: Myasthenia gravis) やランバート・イートン筋無力症のような自己免疫疾患と常染色体劣性の遺伝病である先天性筋無力症候群 (CMS: Congenital myasthenic syndromes) に大別される。MGについてはその多くがNMJの神経筋伝達物質であるアセチルコリン (ACh: Acetylcholine) の受容体 (AChR: ACh receptor) に対する自己抗体によって発症し、また、ランバート・イートン筋無力症はNMJの前シナプス部位にて機能するカルシウムチャンネルに対する自己抗体によって発症する。一方、CMSについてもAChRやAChの合成、分解酵素等のNMJ関連因子の遺伝子異常が原因として知られているが、原因遺伝子が未知の病態が多く残されている。

我々の研究グループは細胞内チロシンリン酸化シグナルを研究する過程で、独自に同定したアダプター分子Dok-1の類縁分子としてDok-7を同定し1), 2)、それがアダプター様構造をもつにもかかわらず、NMJの形成に必須の受容体型チロシンキナーゼであるMuSKの活性化因子として、MuSKと同じく、NMJの形成に不可欠の役割を担っていることを発見した。そこで、英国オックスフォード大学のBeeson教授らのグループと原因遺伝子が不明のCMSとヒトDOK7遺伝子との関連を精査した結果、NMJ形成不全を伴う肢帯型のCMSがDOK7遺伝子の変異によって発症することを突き止め、本病態をDOK7型筋無力症と呼ばれる新たな疾患概念として確立した3)。しかしながら、DOK7型筋無力症の分子病態については未知の部分が多い。そこで、Dok-7の作用機構の解明を目的とする本研究を実施した。

#### 2. 方法

##### I) Dok-7 のC末端側領域に関する機能解析

我々は、既にDok-7分子のPH (pleckstrin homology) ドメインとPTB (phosphotyrosine binding) ドメインの両者が筋管におけるMuSKの活性化に必須であることを明らかにしていた。しかしながら、DOK7型筋無力症に認められる遺伝子変異の多くは、N末端側に存在する両ドメインではなく、C末端側の約半分の領域に異常をもたらすことが判明した。そこで、本研究では、Dok-7の未知の作用機構を明らかにすべく、DOK7型筋無力症に伴うC末端側領域の変異について詳細な検討を加えた。

##### II) 会合分子の探索

MuSKの活性化に必要なDok-7内の領域が筋細胞の分化度によって異なることから、他の細胞内因子との相互作用による制御系の存在が予想されている。そこで、本研究では、Dok-7と会合する蛋白質の探索を通じた制御因子の同定に取り組んだ。

### III) Dok-7/MuSK相互作用の in vitro 再構築系の確立と結晶化による構造解析

非筋細胞である293T細胞においてもDok-7がMuSKを活性化できることから、我々は大腸菌における過剰発現系を利用してMuSKの細胞内領域とDok-7を産生し、精製蛋白質による in vitro 再構築系の確立を計画した。また、Dok-7によるMuSK活性化の分子機構を解明するために、Dok-7とMuSKの細胞内領域の結晶化による構造解析に取り組んだ。

## 3. 結果

### I) Dok-7/MuSK シグナルの解析

本研究の開始時において、我々は、N末端側のPHドメインやPTBドメインの変異とは異なり、DOK7型筋無力症の多くに認められたC末端側領域の約半分 (Ala-378 から Pro-504) を失うフレームシフト変異 (1124\_1127dupTGCC) をもつDok-7変異体 (Dok-7-dupTGCC) は弱いながらもMuSKの活性化能を維持していることを明らかにしていた。しかしながら、Pro-421以降を欠失した変異体は正常なMuSK活性化能を維持していた。そこで、Ala-378とPro-421の間に存在する二つのSH2標的配列に着目し、その機能に重要なTyrもしくはPro残基をPheもしくはAlaに置換したところ、Dok-7-dupTGCCと同様の機能低下をもたらすことが判明した4)。一方、DOK7型筋無力症に認められた、Arg-201以降の全C末端側領域を欠く変異体 (Dok-7-R201X) は、そのMuSK活性化機能を完全に失っていた。そこで、Arg-201からAla-378の間 (Gln-240 から Ser-249) に存在する核外移行シグナル配列 (NES) の機能について精査したところ、それが NES として機能しており、その機能欠失変異体 (L241A 変異体) は核外移行能だけでなく、筋管細胞におけるMuSK活性化能をも失うことが明らかになった。なお、同時に、Dok-7のPHドメインが核内移行能をもつことも判明した4)。これらの知見から、Dok-7は細胞質と核の間を動的に移行しており、また、そのSH2標的領域に会合する何らかの因子によって正常なNMJの形成に必要な強度でのMuSK活性化能を得ているものと考えられた。それ故に、DOK7型筋無力症に伴うSH2標的領域の欠損はMuSK活性化能の減衰を招き、また、NESの欠失はDok-7を核内に留置することでMuSKの活性化を阻害し、筋無力症を誘起することが予想された。

### II) 会合分子の探索

293T細胞における強制発現系を用いてDok-7の会合分子を探索した結果、MuSKによるチロシンリン酸化に依存して会合する分子としてCrkIIが同定された。さらに、この会合が、前項で述べたMuSKの強い活性化に必要なDok-7のSH2標的配列のチロシンリン酸化に依存することも明らかとし、現在、CrkIIを介した制御系の有無についてさらなる解析を進めている。

### III) Dok-7/MuSK相互作用の in vitro 再構築系の確立と結晶化による構造解析

Dok-7/MuSK相互作用の in vitro 再構築系については再現性の良い系の確立に成功し、現在、Dok-7もしくはMuSKに対する様々な変異の影響を検討している。また、Dok-7やMuSKの細胞内領域の結晶化については、その取組の過程でアミノ酸配列上、静的な秩序だった構造を取りづらいつと考えられるC末端側領域の存在が結晶化に対する大きな障害となり得ることが判明した。そこで、第一に、C末端側領域を欠失した変異体の単独での結晶化と、MuSKの細胞内領域との複合体としての結晶化の二点に課題を絞り、その条件の至適化を進めた。しかしながら、現時点では、結晶化に至る条件の確立には

至っていない。

#### 4. まとめ

本研究によって、明確なドメイン構造の認められないDok-7のC末端側領域に機能的なSH2標的配列と核外移行シグナルの存在が新たに見出された。また、前者に、そのチロシンリン酸化依存的に結合する蛋白質としてSH2ドメインをもつアダプター分子であるCrkIIが同定された。これらのモチーフを欠失する変異はNMJの形成不全を特徴とするDOK7型筋無力症の原因となるが、実際、いずれかのモチーフの機能を阻害することで、Dok-7のMuSK活性化能が抑制された。以上の知見は、筋無力症に直結するDok-7の作用機構に新たな視座を与える意義深い成果と言える。しかしながら、例えば、DOK7型筋無力症に認められる変異には、PHドメイン、PTBドメイン、核外移行シグナル、SH2標的配列のいずれにも影響しないものがあり、発現レベルでの調節を含め、未知の制御系の存在が予想される。この点においては、今回確立したin vitro 再構築系を利用してDok-7/MuSKの相互作用とその制御機構に関するさらなる解析を推進したい。一方、結晶化によるDok-7の作用機構に関する解析においては、本研究によって具体的な課題が浮き彫りにされた。決して満足すべき成果とは言えないが、本研究によって得た知見は、今後の構造学的な解析に活かされるべき重要な情報と言える。

#### 5. 謝辞

本研究に対する夏目徹博士、David Beeson博士らの研究グループからの御貢献に謝意を表すと共に、財団法人病態代謝研究会からの御支援に深謝いたします。

#### 6. 文献

- 1) Yamanashi, Y. & Baltimore, D.: Identification of Abl- and rasGAP-associated 62 kDa protein as a docking protein, Dok. *Cell*, **88**: 205-211, 1997.
- 2) Okada, K., Inoue, A., Okada, M., Murata, Y., Kakuta, S., Jigami, T., Kubo, S., Shiraishi, H., Eguchi, K., Motomura, M., Akiyama, T., Iwakura, Y., Higuchi, O., & Yamanashi, Y.: The muscle protein Dok-7 is essential for neuromuscular synaptogenesis. *Science*, **212**: 1802-1805, 2006.
- 3) Beeson, D., Higuchi, O., Palace, J., Cossins, J., Spearman, H., Maxwell, S., Newsom-Davis, J., Burke, G., Fawcett, P., Motomura, M., Muller, J., Lochmuller, H., Slater, C., Vincent, A., & Yamanashi, Y.: Dok-7 mutations underlie a neuromuscular junctional synaptopathy. *Science*, **213**: 1975-1978, 2006.
- 4) Hamuro, J., Higuchi, O., Okada, K., Ueno, M., Iemura, S., Natsume, T., Spearman, H., Beeson, D., & Yamanashi, Y.: Mutations causing DOK7 congenital myasthenia ablate functional motifs in Dok-7. *J. Biol. Chem.*, **283**: 5518-5524, 2008.