

主論文の要旨

**Motor nerve arborization requires proteolytic domain  
of Damage-induced neuronal endopeptidase (DINE)  
during development**

〔 Damage-induced neuronal endopeptidase (DINE)のプロテアーゼ活性  
ドメインは胎生期脊髄運動ニューロンの軸索終末分枝形成に必要である 〕

名古屋大学大学院医学系研究科 機能構築医学専攻  
機能形態学講座 機能組織学分野

(指導：木山 博資 教授)

松本 早紀子

## 【緒言】

Damage-induced neuronal endopeptidase (DINE)は、神経損傷に発現応答する分子として当研究室で同定された膜一回貫通型メタロプロテアーゼである。DINE は損傷ニューロンに加えて胎生期脊髄運動ニューロンでも顕著に発現する分子である。このため、DINE 欠損(DINE KO)マウスでは、横隔神経の軸索終末分枝及び神経筋接合部の形成が著しく阻害され、生直後呼吸不全により死亡する。DINE は  $A\beta$  の分解酵素である Neprilysin と同じファミリーに属するが、これまでどの基質候補に対しても活性を示さずプロテアーゼとして機能するかどうか不明であった。また最近では、メタロプロテアーゼファミリーに属しながらもプロテアーゼではなく接着因子として機能する分子が報告されている。そこで本研究では、胎生期運動ニューロンの軸索分枝形成において DINE がプロテアーゼとして機能するかどうかを明らかにするため、DINE KO マウスの *in vivo* レスキュー実験を行った。さらに DINE が軸索-シュワン細胞間相互作用を制御し軸索分枝形成を促す可能性についても検討した。

## 【方法】

胎生期運動ニューロン特異的転写因子 Hb9 のプロモーターを用いて、野生型 DINE (DINE<sup>WT</sup>) もしくは2種類の変異型 DINE (DINE<sup>mut</sup>および DINE<sup>E613V</sup>)を GFP と共にそれぞれ過剰発現する3種類の Tg マウス (Tg<sup>WT</sup>, Tg<sup>mut</sup>, Tg<sup>E613V</sup>)を作製した。DINE<sup>mut</sup>は、ファミリー間で保存されたプロテアーゼ活性領域である5アミノ酸(612-616)の欠失とC末側アミノ酸(672)の点変異によって作製し (Fig.1B)、DINE<sup>E613V</sup>は613番目のアミノ酸残基にのみ点変異を加えて作製した。作製した Tg マウスを DINE KO マウスと交配し、得られた胎児の横隔膜等に投射する運動神経の分枝パターンを *whole-mount* 免疫組織化学を用いて可視化した。また、定量 PCR、*in situ* hybridization、免疫組織化学、運動ニューロンとシュワン細胞の共培養を用いて、シュワン細胞の分化およびニューロンとの相互作用を評価した。

## 【結果】

DINE は胎生期運動ニューロンで豊富に発現するが、DINE KO マウスでは、横隔神経軸索終末が横隔膜表面までは到達するもののその後の分枝に異常が見られ、神経筋接合部形成が阻害される (Fig.1A)。この現象に DINE のプロテアーゼ活性が関与するかどうかを明らかにするため、DINE<sup>WT</sup> または活性部位変異型の DINE<sup>mut</sup> を胎生期脊髄運動ニューロンで過剰発現する Tg マウスを作製し、DINE KO マウスと交配してレスキュー実験を行った。はじめに各 Tg マウスにおける外来性 DINE の発現パターンを調べたところ、共に胎生期脊髄運動ニューロン特異的に外来性の DINE を同程度発現した (Fig.1C,D)。DINE 過剰発現による横隔神経軸索分枝への影響を調べるために、胎児の横隔膜を用いて *whole-mount* 免疫組織化学を行ったが、Tg<sup>WT</sup>、Tg<sup>mut</sup> マウスともに横隔神経の分枝の長さにおいて野生型(WT)マウスとの間に有意な差は認められなかった (Fig.1E,F)。次に、これらの Tg マウスを DINE KO マウスと交配し、得られた胎児につ

いて、横隔膜の分枝パターンを免疫染色にて可視化した。その結果、外来性 DINE<sup>WT</sup> を発現する DINE KO マウス(KO;Tg<sup>WT</sup>)では、DINE KO マウスで見られる軸索分枝異常や神経筋接合部形成不全がレスキューされ、横隔神経の分枝の長さ・複雑性ともに WT マウスと同様の結果を示した(Fig.2A-C)。興味深いことに、KO;Tg<sup>WT</sup> マウスは生後も生存し、成体まで成長した(Fig.2D, E)。これに対し、DINE<sup>mut</sup>を発現する DINE KO マウス(KO;Tg<sup>mut</sup>)では、レスキュー効果が全く認められず、横隔神経の長さ、分枝の複雑性がともに WT マウスより有意に減少し、KO マウスと同一の表現型を示した(Fig.2A-C)。同様の結果が広背筋に投射する胸背神経においても認められた(Fig.3A-C)。さらに 1 塩基置換の変異型 DINE を発現する Tg<sup>E613V</sup> マウスを DINE KO マウスと交配して同様の実験を行ったところ、KO および KO;Tg<sup>mut</sup> マウスとほぼ同じ表現型が得られた。これらの結果から、DINE のプロテアーゼ活性が運動ニューロン軸索終末の分枝形成に極めて重要であることが明らかとなった。

次に DINE KO マウスの横隔神経軸索終末を組織学的に詳細に観察したところ、軸索周囲の未分化シュワン細胞の形態に異常が認められた(Fig.4A,B)。DINE はニューロン特異的に発現し、シュワン細胞には発現しないことから、DINE が軸索と未分化シュワン細胞の相互作用に関与する可能性に着目した。胎生期運動神経における未分化シュワン細胞の増殖および分化について検討したところ、軸索の DINE 欠損によって未分化シュワン細胞の移動・増殖は影響されなかったが、分化マーカーである Oct-6 の発現が有意に減弱することが示された(Fig.5A,B)。さらに、WT、KO、KO;Tg<sup>WT</sup> および KO;Tg<sup>mut</sup> マウスから調整した運動ニューロンと WT のシュワン細胞を用いて共培養を行ったところ、KO と KO;Tg<sup>mut</sup> の運動ニューロンでは神経突起に沿って配置するシュワン細胞の数が WT に比べて有意に減少していた(Fig.5C,D)。以上の結果から、軸索における DINE のプロテアーゼ活性が軸索-未分化シュワン細胞間相互作用を制御する可能性が示唆された。

### 【考察】

本研究で我々は、胎生期運動ニューロンの軸索終末分枝形成において DINE がプロテアーゼとして機能する可能性を生体内ではじめて示唆した。最近ではヒト先天性関節拘縮症において DINE (ECEL1) の変異が相次いで報告されており、ヒトにおいても同様に DINE がプロテアーゼとして重要な役割を果たしていると考えられる。また本研究において、軸索に存在する DINE が軸索-シュワン細胞間相互作用に関与する可能性が示唆された。運動神経の発生において、軸索とシュワン細胞の相互作用が筋内の軸索終末分枝に重要であることが Neuregulin や ErbB2/3 欠損マウスを用いた過去の研究で報告されている。DINE のプロテアーゼ活性によって分解を受けた基質が軸索-シュワン細胞間相互作用を制御し、正常な軸索終末分枝を促進する可能性が考えられた。

### 【結論】

DINE のプロテアーゼ活性は運動ニューロン軸索終末分枝および神経筋接合部の形

成に極めて重要であることが明らかになった。またこの現象には DINE によって切断された基質による軸索-シュワン細胞間相互作用の適切な制御が関与している可能性が考えられた。