

氏 名	かわしまさとし 川 嶋 聡 史
学位(専攻分野)	博 士 (医 学)
学 位 記 番 号	医 博 第 3197 号
学位授与の日付	平 成 20 年 3 月 24 日
学位授与の要件	学 位 規 則 第 4 条 第 1 項 該 当
研究科・専攻	医 学 研 究 科 分 子 医 学 系 専 攻
学 位 論 文 題 目	Localization of the membrane-anchored MMP-regulator RECK at the neuromuscular junctions (膜結合型 MMP 制御因子 RECK の神経筋接合部への局在)
論文調査委員	(主 査) 教 授 渡 邊 大 教 授 大 森 治 紀 教 授 金 子 武 嗣

論 文 内 容 の 要 旨

神経筋接合部 (NMJ) は、運動神経、筋線維、シュワン細胞の 3 種の細胞から形成される。運動神経と筋線維の間は、シナプス基底層 (sBL) と呼ばれる特殊な細胞外マトリックス (ECM) で充填されている。座骨神経等において神経線維が切断された場合 (脱神経)、神経末端が元の NMJ に再投射される現象が知られているが、この際には sBL が重要な役割を演ずる。筋線維上のシナプス後膜は、わずかに陥没し、アセチルコリン受容体 (AChR) 型イオンチャンネルに富む「1 次ひだ」を形成する。1 次ひだの一部はさらに入り組んだ陥入を起こし、ジストロフィンや電位依存性ナトリウムチャンネルに富む「2 次ひだ」を形成する。マウスでは、胎生 14.5 日頃には、神経非依存的にアセチルコリン受容体 (AChR) の集積が起こり、胎生 16.5–18.5 日頃には、全ての AChR クラスターが sBL を介して神経末端と密着するようになり、2 次ひだの形成も始まる。

活性化 *RAS* がん遺伝子による悪性転換を抑制する遺伝子として発見された *RECK* は、膜に GPI アンカーされたマトリックス・プロテアーゼ (MMP) 制御因子をコードし、その産物は、少なくとも 3 種の MMP (MMP-2、MMP-9、MT1-MMP) を負に制御する。以前の研究において、*RECK* 欠損マウスが ECM 形成異常を伴って胎生 10.5 日前後で死亡することが見出されたが、それ以降の個体発生や成体における *RECK* の役割については不明の点が多い。そこで本研究では、免疫染色法や免疫ブロット法を用いて、成体マウスの骨格筋における *RECK* の発現パターンを解析した。その結果：

- 1) *RECK* の免疫反応は、NMJ に認められる。
- 2) 胎生 16.5 日目の骨格筋末端、生後 7 日目の食道周囲の平滑筋でも *RECK* の免疫反応が認められる。
- 3) 横隔膜抽出物中の総タンパクに占める *RECK* の割合は、胎生 16.5 日後、徐々に減少する。

などの知見が得られた。そこで、NMJ における *RECK* の局在に注目し、共焦点顕微鏡と電子顕微鏡を用いて形態学的な解析を進めた。その結果、以下の知見が得られた：

- 4) *RECK* の免疫反応は、神経末端、シュワン細胞には、ほとんど認められない。
- 5) *RECK* の免疫反応は、筋肉 (シナプス後膜) に認められる。
- 6) *RECK* の免疫反応は、筋線維上の 2 次ひだおよびシナプス直下の細胞内膜構造に認められる。
- 7) 脱神経をした筋肉においても、シナプス後膜に *RECK* の免疫反応が認められる。
- 8) GPI アンカーを切断する酵素 PI-PLC で処理した横隔膜では、*RECK* の免疫反応は、著明に減少する。

これらの結果は、*RECK* が NMJ のシナプス後膜に発現していることを示唆する。次に NMJ の発生に伴う *RECK* の発現パターンを解析した結果、胎生 16.5 日では、NMJ における *RECK* の免疫反応は見られないが、胎生 18.5 日以降では、ほとんどの NMJ に *RECK* の免疫反応が見られた。

以上の結果より、膜結合型プロテアーゼ制御因子である RECK が、機械的強度を必要とする NMJ の形成、成熟、維持などに関わる可能性が示唆された。

論文審査の結果の要旨

膜結合型 MMP 制御因子 RECK は、マウスの胎仔発生に必須であることが示されているが、成熟マウスにおける RECK の機能については不明の点が多い。本研究において、申請者らは、成熟マウスにおける RECK 発現を免疫組織化学的手法を用いて解析し、以下の知見を得た。

- 1) 成熟マウスの横隔膜 NMJ に豊富な RECK 抗原性が局在する。
- 2) 横隔膜全タンパク質に占める RECK タンパク質の割合は、胎生 16.5 日以降、急激に減少する。
- 3) NMJ における RECK 抗原性は、神経終末やシュワン細胞マーカーとは重ならず、基底膜や骨格筋（特に 2 次ひだ）のマーカーと重なる。電子顕微鏡像もこの知見を支持した。
- 4) 大腿神経の切断後、神経終末が退縮しても、RECK 抗原性はアセチルコリン受容体の近傍に局在し続ける。
- 5) RECK 抗原性の NMJ への局在は、胎生 16.5 日～18.5 日の間に進む。これは、2 次ひだの形成開始およびアセチルコリン受容体集合体への運動神経の投射が完了する時期と一致する。

これらの結果より、RECK が NMJ の形成や機能維持に関わる可能性が示唆された。

以上の研究は、哺乳類神経筋接合部の分子構築の理解に寄与するところが多い。したがって、本論文は博士（医学）の学位論文として価値あるものと認める。

なお、本学位授与申請者は、平成 20 年 1 月 22 日実施の論文内容とそれに関連した試問を受け、合格と認められたものである。