

## マトリックスメタロプロテアーゼのマウス脳内における発現分布

佐藤 悠樹 (筑波大学 生物学類) 指導教員: 富所康志 (筑波大学医学医療系)

## 【背景と目的】

マトリックスメタロプロテアーゼ (matrix metalloproteinase, MMP) は、細胞外プロテアーゼの一種であり、コラーゲンやプロテオグリカンといった細胞外マトリックスの分解を行うことで知られている。このMMPに属するADAMTS (A disintegrin and metalloprotease with thrombospondin type-1 motifs) ファミリー分子は、disintegrin 様ドメインおよびトロンボスポンジン 1 型モチーフをもつ分泌型タンパクであり、高等脊椎動物で数多く同定されている (ヒトで現在 19 個、マウスで現在 19 個)。ADAMTS ファミリー分子は、そのトロンボスポンジン 1 型モチーフを介して、プロテオグリカンと結合することが知られている。ADAMTS-1,4,5,8,9 ならびに 15 は、プロテオグリカンの 1 つであるアグリカンに結合したのち、それを切断する活性を有する [1]。一方で、ADAMTS-4,5 は、アグリカン切断するほか、パーシカン・プレビカンといったプロテオグリカンにも結合し、これらを切断する [1]。ADAMTS-4,5 によるプレビカンの切断は神経系における生理機能、特に神経可塑性と脳腫瘍浸潤との関連が示唆されている [2,3]。さらに、ADAMTS-1,4,8,9 の脳内発現が脳虚血で増加することや、ADAMTS-1 の脳内発現がアルツハイマー病やダウン症患者で増加することから、ADAMTS ファミリー分子が神経変性疾患に広く関連していることが予想される [4]。

ADAMTS ファミリー分子の 1 つである ADAMTS-16 は、ヒトの胎児期において、肺・腎臓・卵巣といった器官にその発現が見られる [5]。特に、軟骨肉腫において過剰な発現が観察されるなど、特定の癌組織に発現がみられるため、癌治療における新規マーカーもしくはターゲット分子としての期待が集まっている [6]。その一方で、成体脳でも ADAMTS-16 は発現しているが [5]、中枢神経系におけるその機能は未だ明らかとなっていない。

そこで、本研究では、ADAMTS-16 の中枢神経系における機能解析を目指し、マウス脳におけるその発現分布を *in situ* ハイブリダイゼーション法を用いて詳細に検討し、基礎的知見を得ることを目的とした。

## 【方法】

## プローブの作製

ADAMTS-16 の mRNA から 1000 bp の長さの配列をプローブの配列として選出した。次に、その配列部分を RT-PCR で増幅し、増幅した遺伝子断片をプラスミドベクターにクローニングした。シーケンス解析で正しい配列がクローニングされていることを確認したのち、ベクターを制限酵素で切断し鋳型 DNA を作製した。続いて、この鋳型を用いて *in vitro* 転写を行い、ジゴキシンゲン (DIG) で標識した RNA プローブ (センスプローブ・アンチセンスプローブ) を調製した。

*in situ* ハイブリダイゼーション法

胎生 13.5 日目のマウス胚および成体マウスから脳を取り出し、Tissue-Tek O.C.T.コンパウンドで包埋・急速凍結したのち、30

μm 厚の冠状断の切片を作製した。ハイブリダイゼーション前処理として、4%パラホルムアルデヒド/0.1 M phosphate buffer で 10 分間固定後、100%メタノールで 1 時間脱水操作を行い、続いてトリエタノールアミンによるアセチレーション処理を 10 分間行った。その後、50%ホルムアミドを含むハイブリダイゼーション液で 500 ng/ml の濃度に希釈した DIG 標識 RNA プローブを用いて、72°C で 18 時間、切片に対してハイブリダイゼーションを行った。

翌日、72°C の standard saline citrate で 30 分間ずつ 3 回、切片を洗浄したのち、blocking reagent で 1 時間ブロッキングを行った。次に、10,000 倍希釈したアルカリフォスファターゼ標識抗 DIG 抗体をかけ、4 °C で 2 日間反応させた。そののち、nitro blue tetrazolium chloride/5-bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate を用いて、切片を発色させた。

画像比較

*in situ* ハイブリダイゼーション法で染色した切片を写真撮影したのち、The Mouse Brain (Academic Press) および Developing Mouse Brain (CRC Press) を参照して画像比較を行い、ADAMTS-16 の脳内における発現部位の特定を行った。

## 【結果と考察】

画像比較の結果、成体脳で ADAMTS-16 の顕著な発現が観察された部位は、内側手綱核、中心傍核、視床背内側核、後内側扁桃皮質、視床室傍核、背側扁桃体外側核、歯状回顆粒細胞であった。このことから、ADAMTS16 は大脳辺縁系において、海馬と扁桃体を軸とした機能的部位に存在することがわかる。また、歯状回や海馬台、アンモン角にも部分的に発現がみられることから、ADAMTS16 は臭いや痛みといった感覚刺激から想起された情動を記憶する際に働いているのかもしれない。

次に 13.5 日胚の脳では、顕著な発現が観察された部位は外側嗅索であり、次いで海馬、海馬神経上皮、延髄網様体であった。また、嗅球や梨状葉皮質、内側縦束などにも発現が観察されていることから、ADAMTS16 は胎生期の嗅覚、視覚、眼球運動の発達に関与している可能性が示唆された。

## 【参考文献】

- [1] Stanton H et al. Biochim Biophys Acta 1812: 1616-1629, 2011.
- [2] Dimitrie K et al. PLoS One 7: e7793, 2012.
- [3] Held-weindt J et al. Int J Cancer 118: 55-61, 2006.
- [4] Gottschall PE et al. Matrix Biol 44-46: 70-76, 2015.
- [5] Santiago C et al. Gene 282: 49-62, 2002.
- [6] Alison K S et al. Matrix Biol 28: 416-424, 2009.