

200833017A

厚生労働科学研究費補助金

こころの健康科学研究事業

NAD・Sir2依存性軸索保護機構を用いた神経変性疾患治療とその分子基盤

平成20年度 総括研究報告書

研究代表者 荒木 敏之

平成21(2009年)3月

目次

I. 総括研究報告		
NAD・Sir2依存性軸索保護機構を用いた神経変性疾患治療とその分子基盤		
荒木敏之	-----	1
館野美成子		
II. 研究成果の刊行に関する一覧表	-----	13
III. 研究成果の刊行物・別刷	-----	14

NAD・Sir2 依存性軸索保護機構を用いた神経変性疾患治療とその分子基盤

主任研究者 国立精神神経センター 神経研究所 部長 荒木 敏之

分担研究者 国立精神神経センター 神経研究所 室長 館野 美成子

研究要旨

カロリー摂取制限は多種多様な生物種において寿命の延長効果を担うことが知られているが、NAD 依存型デアセチル化酵素である Sir2 の活性化がこの効果を介在することから、Sir2 の役割は近年非常に注目を集めている。我々は、神経細胞での NAD 過剰産生が Sir2 の活性化を介して軸索突起の傷害刺激からの保護をもたらすことを過去に明らかにした。

NAD-Sir2 による神経軸索保護効果は、特に老化とともに進行する神経変性疾患など神経系の難病において神経保護による治療効果をもたらす可能性が高く、このメカニズムによる軸索保護の分子機構の詳細を解明することは非常に重要な意義をもっている。

本年度の研究では (1)特にミトコンドリア機能に対して注目した Nicotinamide mononucleotide adenyltransferase(NMNAT)過剰発現トランスジェニックマウス (Tg) のフェノタイプ解析、(2)NMNAT 活性過剰発現による神経保護効果の有効性の範囲から見た神経保護メカニズムの検討 (3)ウイルスベクターを用いた治療モデルに関する検討、を中心に行った。

A. 研究目的

高齢化社会の進展に伴って、老化とともに進行する疾患への治療アプローチは一層その重要度を増している。神経変性疾患は多くの場合老化と共に進展し、有効な治療法の開発は今後の高齢化社会における喫緊の課題である。

神経軸索変性は、細胞死の防止(たとえば *bcl2* の過剰発現など)によっては抑制できないことから細胞死とは独立したプロセスであると考えられるが、その一方で、軸索変性は神経細胞死に先立って見られ、軸索変性過程のいずれかが細胞死のプロセスを

スタートする引き金を引き、最終的な細胞死に至ると考えられる。これらのことから、軸索変性を抑制できれば神経変性疾患の症状も抑制され、また軸索だけでなく神経細胞体も保護される可能性が高いと考えられ、実際そのような方法での神経保護も既に観察されている。

我々はこれまでに自然発症変異マウス *wlds* において観察される神経傷害後の著明な軸索変性遅延の原因が NAD 合成酵素活性の亢進と、それに伴う NAD 依存性蛋白デアセチル化酵素 Sir2 の活性化によるものであることを明らかにした。NAD-Sir2

による神経軸索保護効果は、特に老化とともに進行する神経変性疾患など神経系の難病において神経保護による治療効果をもたらす可能性がたかく、このメカニズムによる軸索保護の分子機構の詳細を解明することは非常に重要な意義をもっている。

本研究プロジェクトにおいては、NAD・Sir2 依存性軸索保護のメカニズムを解明し、神経疾患への治療応用を実現することを目的としている。最終年度にあたる本年度の研究においては、これまでの成果を踏まえて、(1)特にミトコンドリア機能に対して注目した Nicotinamide mononucleotide adenylyltransferase (NMNAT)過剰発現トランスジェニックマウス (Tg) のフェノタイプ解析、(2)NMNAT 活性過剰発現による神経保護効果の有効性の範囲から見た神経保護メカニズムの検討 (3)NMNAT 活性過剰発現の神経疾患に対する治療効果に関する検討、(4)軸索変性遅延をきたすメカニズム全般に関するスクリーニングと解析、を中心に行った。

## B. 研究方法

### 1) ミトコンドリア機能に対して注目した NMNAT 過剰発現 Tg マウスのフェノタイプ解析

*in vivo*での軸索保護による疾患モデル治療効果を検討するため、昨年度までに NMNAT 過剰発現モデルマウスの作成を行った。哺乳類においては NMNAT の3種のファミリーメンバーが存在することが知られており、Wlds 変異蛋白の一部を構成する NMNAT1 のほかにゴルジ体に主として存在する NMNAT2、ミトコンドリアに主と

して存在する NMNAT3 がある。神経細胞には NMNAT2 が強く発現している一方、NMNAT1,3 の発現は非常に低いことが知られており、本研究では、NMNAT1Tg、NMNAT3Tg、Wlds(W258A)Tg (Wlds 蛋白の NMNAT 酵素活性部位に変異を導入することにより、NAD 合成酵素活性を持たない Wlds 蛋白を発現する)を作成し、軸索変性遅延 Phenotype を示した NMNAT3-Tg、wlds マウスと、軸索変性遅延を示さなかったマウスの比較検討を行った。特に、それぞれのグループ間におけるトランスジーン由来蛋白の発現部位、ミトコンドリアの電子伝達系構成蛋白の発現レベル、ミトコンドリア呼吸機能的解析結果に関する比較を行った。

### 2) NMNAT 活性過剰発現による神経保護効果の有効性の範囲から見た神経保護メカニズムの検討

NAD・Sir2 依存性軸索保護による疾患治療効果に関しては、培養細胞レベルでは我々の研究において抗がん剤 (Vincristine) の神経毒性からの保護においては、神経突起の保護だけでなく細胞死からの保護も観察されたほか、他機関からの報告においては *wlds* マウスと疾患モデル動物との交配において症状の軽減、寿命の延長などの効果が、複数の疾患モデルにおいて認められているなど、モデル動物を用いた実験でも確かめられている。これらの結果は NAD・Sir2 依存性軸索保護の神経疾患治療に対する有用性を示唆している。

一方で、たとえば Parkinson 病モデルを *wlds* マウスにおいて作成した場合には、神

神経突起が変性から保護される一方、神経突起が残存している間にも細胞体の死が起きることが観察されている。このような例は他のいくつかのモデルにおいても観察・報告されているが、これらのことから、神経突起の変性は神経細胞体の死（細胞死）とは独立した現象であるが、神経突起の変性が時間的経過として細胞死より先に起こるものの、これらの現象の間には必ずしも因果関係は無い可能性が考えられる。NAD・Sir2 依存性メカニズムが神経突起を保護するケースは非常にさまざまな神経変性のプロセスにおいて認められているが、どのような場合に神経突起だけでなく細胞全体がこのメカニズムで保護されるのかは明らかではなかった。本研究においては、培養細胞を用いた実験において NAD・Sir2 依存性メカニズムが細胞死を抑制できるのはどのような場合かを明らかにすることを目指し、今年度の研究においては、前年度の結果に基づき、低酸素・低栄養刺激（Oxygen-glucose deprivation: OGD）に対する保護効果の詳細を検討し、さらにミトコンドリア機能との関係に関する検討を行った。細胞の生存は MTT アッセイによって定量的評価を行った。

### 3) NMNAT 活性過剰発現の神経疾患に対する治療効果に関する検討

NMNAT 活性過剰発現の神経疾患治療効果に関しては、wlds マウスを用いた検討に関する報告がなされている。それらによると、wlds マウスにおいて作成された末梢神経損傷、虚血性脳障害、一部の变性疾患モデルにおいては著明な神経保護効果を示す

一方、変異型 SOD1 を発現する家族性筋萎縮性側索硬化症 (FALS) モデルに対しては、殆ど神経保護効果を示さないことが報告されている。今回我々は NMNAT 活性が極めてたかい NMNAT3-Tg マウスを作成したため、このマウスを用いることで、これまで Wlds マウスによる保護効果が得られなかった疾患モデルに対する保護効果が示せるかどうかを検討した。

### (4) 軸索変性遅延をきたす細胞内反応のスクリーニング

NAD・Sir2 依存性軸索保護メカニズムに限らず、軸索変性の細胞内メカニズムに関係する反応全般をスクリーニングする目的で、様々なスクリーニングを行った。ここでは、その一つとして、Kinase、Phosphatase に対する阻害剤ライブラリーを入手し、それぞれの化合物が軸索変性過程に対して影響を及ぼすかどうかを、初代培養 DRG 神経細胞を用いて検討した。

### 倫理面への配慮

本研究で行う動物実験および遺伝子組み換え実験は関係法令および指針に基づき、実施場所である国立精神・神経センター神経研究所の定める「小型実験動物倫理指針」、「小型実験動物研究施設の運営に関する規則」および「組み換え DNA 実験安全規則」、「組み換え DNA 実験内部規則」に従って行った。

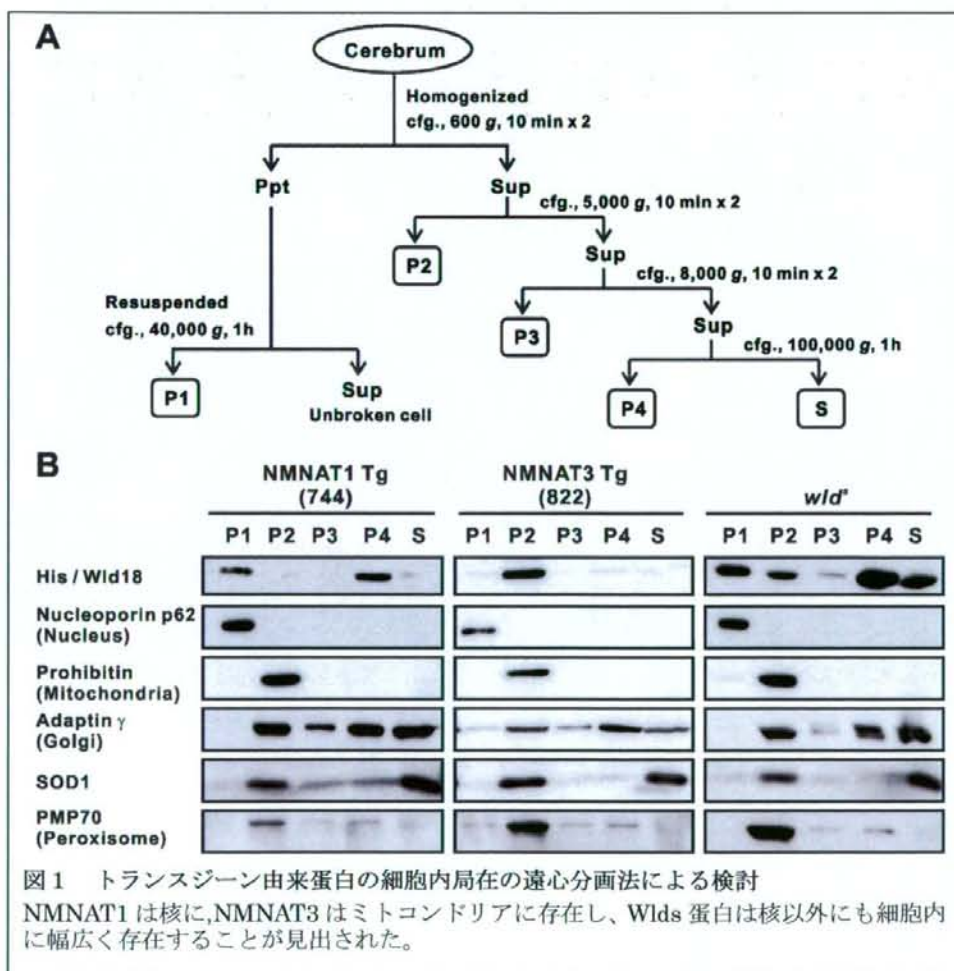
## C. 研究成果

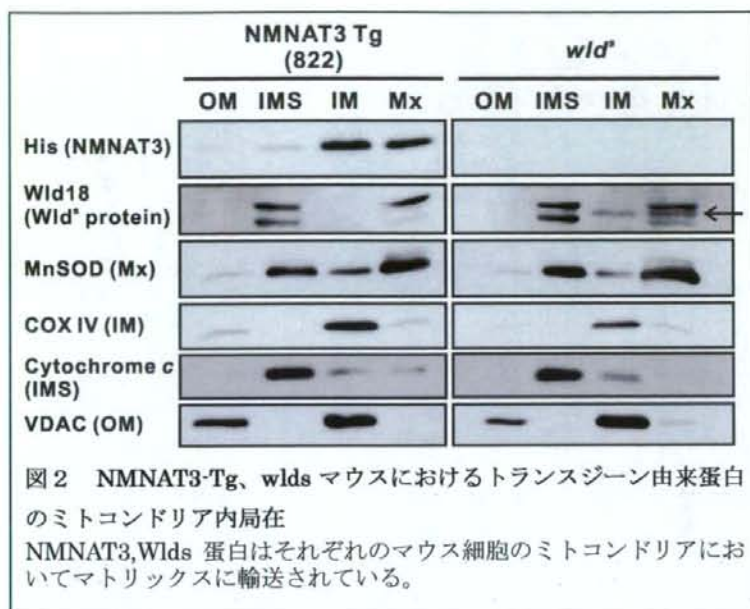
### 1) ミトコンドリア機能に対して注目した

## NMNAT 過剰発現 Tg マウスのフェノタイプ解析

作成した全ての Tg マウスにおいて、異なる外来遺伝子の発現レベルを示す複数の系統を得た。酵素活性の解析においては、NMNAT1、NMNAT3 のいずれの Tg においても自然発症 *wlds* マウスよりも高い NMNAT 酵素活性を示す系統を得た。一方で *Wlds* (W258A) -Tg マウスにおいては、NMNAT 活性は野生型マウスと同程度のレベルであった。

これらのマウスにおける神経軸索変性を比較検討するため、坐骨神経傷害モデルにおけるワーラー変性の進展を、傷害部位より末梢側の Neurofilament の immunoreactivity の発現によって検討したところ、NMNAT3-Tg においてのみ、*wlds* マウスと同程度の軸索変性遅延効果が観察されたが、NMNAT1-Tg、*Wlds* (W258A) -Tg においては軸索変性遅延は観察されなかった。特に、軸索変性遅延効果を認めた NMNAT3-Tg のうち最も





NMNAT 活性が低いラインと、軸索変性遅延を認めなかった NMNAT1-Tg のうち最も NMNAT 活性が高かったラインを比較すると、組織 Lysate 中での単位蛋白量あたりの NMNAT 活性は軸索変性遅延効果を認めた NMNAT3-Tg の方がより高かった。このことは、軸索変性遅延フェノタイプの発現のためには NMNAT 活性の過剰発現が必要であるが、軸索変性遅延効果は細胞内の NMNAT 活性レベルと単純な比例関係にあるのではないことを示しており、それ以外の要因の必要性が示唆された。

NMNAT1 は核に、NMNAT3 はミトコンドリアに、それぞれ存在することが知られていることから、活性レベル以外の要因として NMNAT 活性の細胞内存在部位が重要である可能性が考えられた。*wlds* マウスにおいて軸索変性遅延の原因となっている Wlds 蛋白に関しては、UFD2a の N 末端側 70 アミノ酸に NMNAT1 の全長が融合したものであり、NMNAT1 は核移行シグナルを

持っているため核に存在するものと考えられたが、今回遠心分画法をもちいて詳細に細胞内局在を検討したところ、Wlds 蛋白は核だけではなく、細胞内に広く分布しており、NMNAT3 が存在するミトコンドリアにも存在することがわかった。(図1)

Wlds 蛋白と NMNAT3 蛋白のミトコンドリア内での存在部位をさらに遠心分画法を用いた Subfractionation 法によって検討したところ、いずれの蛋白も、ミトコンドリアの Matrix に存在することが確認された。(図2) このことは、本来ミトコンドリアに存在する NMNAT3 だけではなく、Wlds 蛋白も単にミトコンドリアの周辺に存在したり外膜に接着しているのではなく、マトリックスに輸送されていることを示しており、これらのタンパクがミトコンドリアにおいて何らかの機能を果たすことによって軸索変性遅延フェノタイプに寄与している可能性が考えられた。

軸索変性遅延フェノタイプを示すマウスにおけるミトコンドリアの特性を検討するため、まず神経組織中におけるミトコンドリア量に関する検討を行った。ミトコンドリア量に関しては、ミトコンドリア電子伝達系を構成する蛋白のうち各酵素複合体の

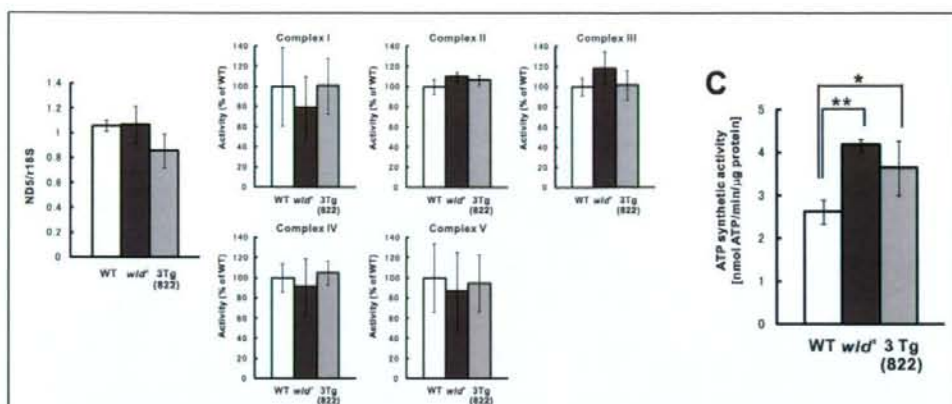


図3 軸索変性遅延効果を示したマウスに由来するミトコンドリアの機能解析  
NMNAT3-Tg、wlds マウス脳組織由来のミトコンドリアに関しては、細胞あたりの数、電子伝達系の各酵素複合体の活性は野生型マウス由来のミトコンドリアと同じであるが、ミトコンドリア全体としてはATP合成能が高まっている。

代表的構成成分の発現量、体細胞ゲノムDNA量とミトコンドリアゲノムDNA量の比率を用いて比較したが、いずれの場合にも軸索変性に関するフェノタイプによって違いは認められず、NMNAT活性の過剰発現による細胞全体でのミトコンドリア量の変動はないものと考えられた。さらに、NMNAT活性を過剰発現したミトコンドリア

の電子伝達系の酵素活性をそれぞれの酵素複合体ごとに測定したが、酵素複合体I-Vのそれぞれにおいて、酵素活性は変化していなかった。

一方、それぞれのマウス脳組織からミトコンドリアを分離し、単位ミトコンドリア量あたりのATP合成能を比較検討したところ、上述のように各酵素複合体の活性に

は変動がなかったにもかかわらず、ミトコンドリア全体を取り出して測定した場合のATP合成能は、軸索変性遅延フェノタイプを示すマウスにおいてATP合成能が向上していることが認められた。このような変化が、軸索変性遅延フェノタイプと関係している可能性が考えられた。(図3)

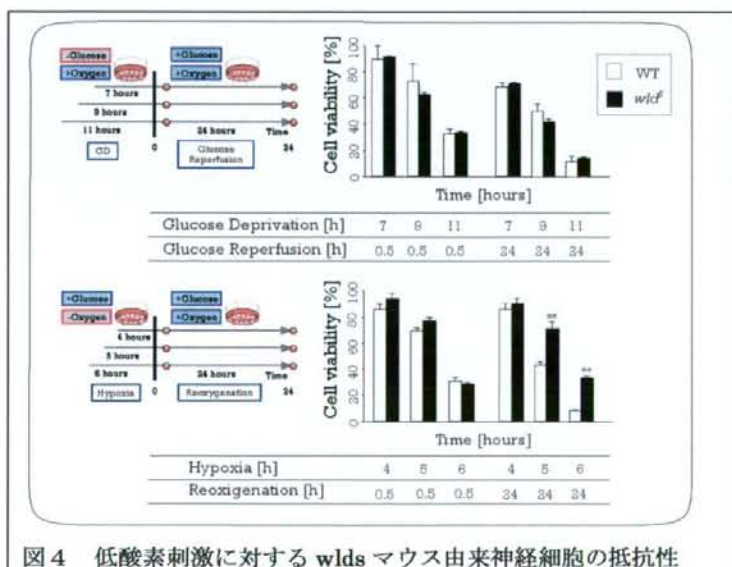


図4 低酸素刺激に対する wlds マウス由来神経細胞の抵抗性



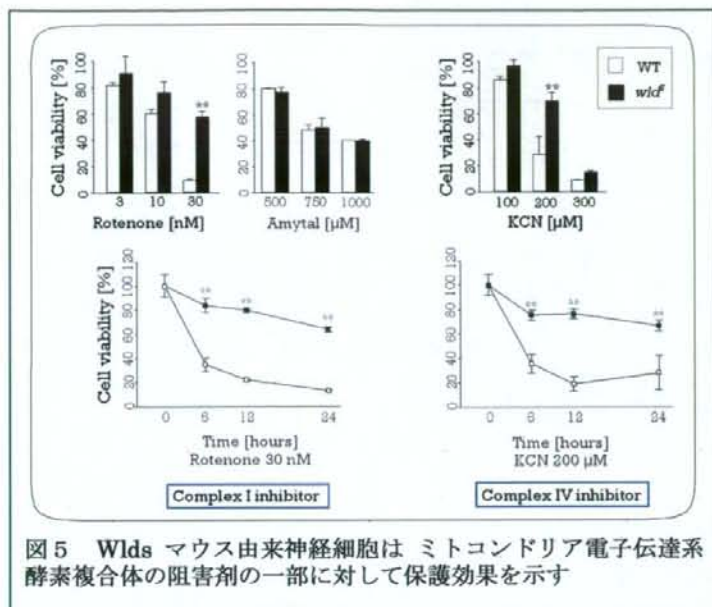


図5 Wlds マウス由来神経細胞は ミトコンドリア電子伝達系酵素複合体の阻害剤の一部に対して保護効果を示す

次に、同じ初代培養大脳皮質神経細胞へのストレスモデルを用いて、既に知られているミトコンドリア電子伝達系酵素複合体のそれぞれに対する阻害作用を有する化合物に対する NMNAT 活性過剰発現による保護効果を検討した。その結果、Complex1 の阻害剤のうち Rotenone を投与した場合と、Complex4 の阻害剤のうち KCN を投与

2) NMNAT 活性過剰発現による神経保護効果の有効性の範囲から見た神経保護メカニズムの検討

前年度までの研究において、初代培養大脳皮質神経細胞にさまざまなストレス刺激に対する応答を検討することによって、NMNAT 活性を過剰発現する神経細胞において細胞死を抑制されるのは、低酸素・低栄養刺激 (OGD) に対してのみであることを示した。OGD に対する保護メカニズムの詳細を更に検討するため、低酸素、低栄養のいずれに対する保護効果があるのかを調べたところ、低酸素に対して保護があり、特に再酸素化に際して惹起される細胞傷害に対する保護効果を認めることが明らかとなった。(図4)

低酸素・再還流による細胞傷害に関してはミトコンドリアの関与が考えられたため、

した場合の細胞毒性に対する保護効果を認めたが、これら以外の阻害剤に対しては保護効果は認められなかった。(図5)

3) NMNAT 活性過剰発現の神経疾患に対する治療効果に関する検討

変異型 SOD1 過剰発現による FALS マウスモデルにおいては、脊髄運動神経細胞の細胞死に先立って運動神経軸索の変性を認めることが知られているが、wlds マウスと FALS モデルマウスの交配によって FALS モデルマウスの症状の軽減は認められず、寿命にも変わりがないことが報告されている。wlds マウスにおける NMNAT 活性は UFD2a プロモータによって発現しているが、この活性はマウスの老化と共に低下するものと考えられ、このことが w l d s マウスとの交配によって保護が出現しない原

因となっている可能性が考えられる。今回 も通常の SOD1(G93A)-Tg マウスと同様に

進行した。

SOD1(G93A)-Tg メスマウスは発症時期、寿命ともにわずかではあるが有意な延長を認めた。(図6)

(4)軸索変性遅延をきたす細胞内反応のスクリーニング

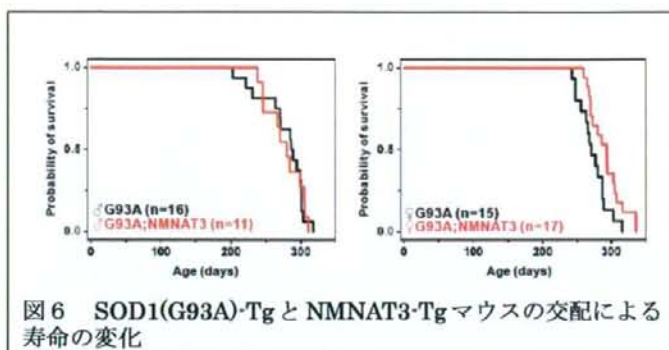


図6 SOD1(G93A)-TgとNMNAT3-Tgマウスの交配による寿命の変化

我々が作成した NMNAT3-Tg の中で最も Transgene の発現量が多く、高齢においても NMNAT 活性の発現が低下しないマウスと、SOD1(G93A)-Tg マウスとを交配して SOD1(G93A)-Tg マウスにおける神経変性の進行を観察した。

NMNAT3-Tg マウスは NMNAT 活性を高齢に至るまで維持していることが確認されたが NMNAT3 を過剰発現する

SOD1(G93A)-Tg オスマウスについては、発症時期、寿命は変わらず、運動神経変性

キナーゼ阻害剤ライブラリ (Roche) を用いた検討の結果、GSK3beta 阻害剤が in vitro ワーラー変性過程を抑制することを発見した。

GSK3beta は Akt によるリン酸化によって機能制御を受け、GSK3beta リン酸化が、GSK3beta を不活性化することが以前より知られている。今回、我々は Akt による GSK3beta リン酸化が、GSK3beta 阻害剤と同様に in vitro ワーラー変性過程を抑制

することを見

出した。

これまでの報告、ならびに我々の

Preliminary な結果から、軸索変性の進展にはプロテアソームの機能が必要であることがわかっている。今回、我々は軸索変性過程でプロ

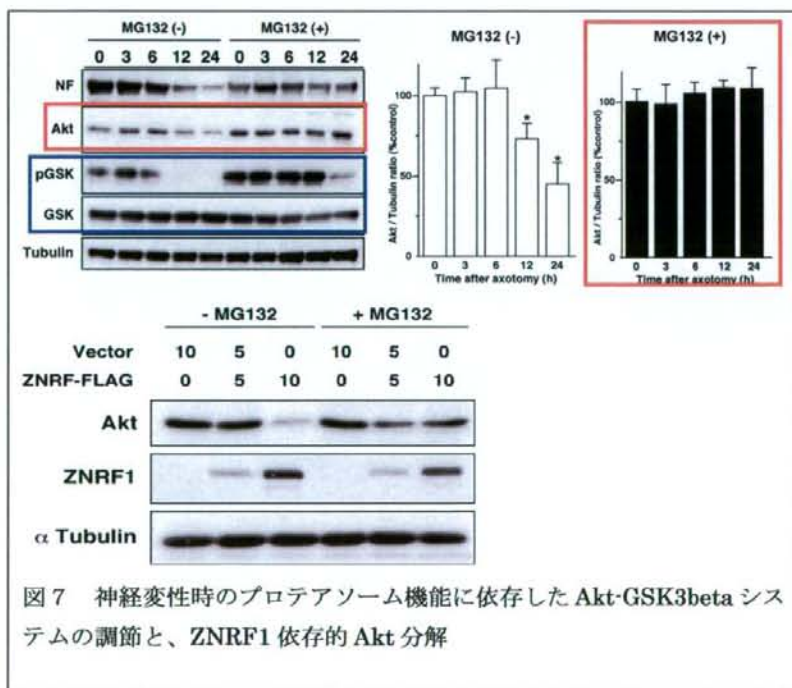


図7 神経変性時のプロテアソーム機能に依存した Akt-GSK3beta システムの調節と、ZNRF1 依存的 Akt 分解

テアソーム分解をうけることを見出し、その反応に関与するユビキチンリガーゼとして ZNRF1 を同定した。ZNRF1 は軸索変性の際に Akt と結合し、Akt を分解することによって、GSK3beta を活性化し、軸索変性過程を進行させる方向に制御しているものと考えられた。(図7)

#### D. 考察

NMNAT 活性過剰発現による神経保護効果におけるミトコンドリア機能の関与について

NMNAT 活性過剰発現による神経軸索保護効果の細胞内機序として、2004 年に発表した論文において我々は NAD 依存性蛋白脱アセチル化酵素である Sirt1 の活性化を想定した。一方、この想定機序とは一見矛盾する実験結果がいくつか報告されている。例えば wlds マウスでは神経組織中の NMNAT 活性の上昇にもかかわらず、組織中の NAD 含有量は増えていないことが報告されており、この結果は NAD の細胞内濃度上昇を介して Sirt1 が活性化される、という仮説に反するとも考えられる。また、今回の我々の実験において、NMNAT1-Tg マウスでは軸索保護効果が認められないことは、Sirt1 活性化仮説と合致しない。

今回の Tg マウスによる検討の結果、我々は NMNAT 活性のミトコンドリアへの局在がミトコンドリア機能へ与える影響が軸索保護効果に重要な役割を持っているのではないかと考えるに至った。NMNAT 活性の神経細胞への過剰発現は、NAD 過剰産

生効果を介して Sirt1 活性化をきたす効果と、ミトコンドリア機能に対する効果の両方があり、*in vitro* ワーラー変性モデルにおいて細胞培養液中に NAD を投与した場合の神経突起変性遅延効果が Sirt1 の発現抑制によって阻害されることから、神経細胞内の NAD 濃度が上昇した場合には Sirt1 活性化を介したメカニズムが寄与することには疑いが無いが、wlds マウス、あるいは今回作成した NMNAT3-Tg マウスにおいては、このメカニズムの寄与は小さく、NMNAT 活性のミトコンドリア機能に対する影響が軸索変性遅延効果に大きく寄与しているものと考えられた。

今回作成した Tg マウスを用いた検討においては、ミトコンドリアの ATP 合成能の向上を認めたにもかかわらず、個々の電子伝達系酵素複合体の発現量や酵素活性には明らかな変化を認めなかったことから、NMNAT 酵素活性の ATP 産生に対する影響は電子伝達系には直接的な影響を及ぼさない様式によるものであることが推定される。このことは、大脳皮質神経細胞の初代培養においてミトコンドリア電子伝達系酵素複合体の阻害剤を投与した実験の結果からも推定され、たとえば酵素複合体 V に対する阻害剤の毒性に対する保護効果はないことから、NMNAT 酵素活性が直接 ATP 合成に関与したり、ATP 合成反応の活性化などに作用しているわけではないと考えられる。ここで一つの可能性としては、ROS 産生の阻害効果である。ミトコンドリア電子伝達系酵素複合体の阻害剤のうち、一部の ROS 産生と関与したステップに対して NMNAT 過剰発現神経細胞が保護効果を持

つことは、この可能性を支持するものとも考えられる。いずれにせよ、ミトコンドリアの機能とNMNAT酵素活性過剰発現との関係は、さらに具体的な分子レベルでの解析を必要としている。

wlds マウスに見られる軸索変性遅延効果の神経疾患治療に関しては当初非常に幅広い応用が期待され、実際異なる発症機序に基づく神経変性に対してNMNAT活性過剰発現マウスは神経保護的治療効果を示すことが明らかになっているが、その一方で今回の FALS モデルマウスのように、NMNAT 活性過剰発現では殆ど保護・治療的効果の得られない例の存在することが明らかとなった。FALS モデルにおいても、神経細胞死に先立って神経軸索変性が進行することは知られているが、その背景にある細胞内反応は同じではないことが示唆される結果となった。

## E. 結論

本年度の研究によって下記の結果を得た。

1) NMNAT1, NMNAT3, Wlds (W258A) -Tg マウスを作成し、wlds マウス、野生型マウスと比較を行う研究により、NMNAT 活性過剰発現による軸索変性遅延効果にはNMNAT活性のミトコンドリアマトリックスへの局在が重要であると考えられた。ミトコンドリアに局在する NMNAT により、ミトコンドリアの ATP 産生能の向上が認められたことから、このようなミトコンドリア機能の改変が、NMNAT 活性過剰発現による軸索変性遅延効果の分子メカ

ニズムである可能性が考えられた。

2) NMNAT 酵素活性を過剰発現する初代培養大脳皮質神経細胞は、低酸素・再酸素化による細胞毒性に対して保護効果を示した。さらにミトコンドリア電子伝達系酵素複合体に対する阻害剤の細胞毒性に対しても、一部の阻害剤に対する保護効果を示すことが明らかとなり、NMNAT 過剰発現による神経細胞保護効果は、ATP 産生の直接的な活性化ではなく、酸化ストレスの産生抑制などの効果を介したものである可能性が示唆された。

3) 変異型 SOD1 過剰発現による FALS モデルマウスの神経軸索変性、神経細胞死に対し NMNAT 過剰発現は神経保護的治療効果を示さず、神経細胞死に先立って神経軸索変性が進行する場合であってもその背景にある分子機序は多様である可能性が示唆された。

4) 軸索変性の細胞内反応として、ZNR1-Akt-GSK3beta の反応系を同定した。

## F. 健康危険情報

特記事項なし

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

Wakatsuki S, Yumoto N, Komatsu K, Araki T, Sehara A.

Roles of meltrin beta/ADAM19 in progression of Schwann cell differentiation and myelination during sciatic nerve regeneration.  
J. Biol.Chem. 284: 2957-2966, 2009

Tateno M, Kato S, Sakurai T, Nukina N, Takahashi R, Araki T.  
Mutant SOD1 impairs axonal transport of choline acetyltransferase and acetylcholine release by sequestering KAP3.  
Hum Mol Genet 18: 942-955, 2009

## 2. 学会発表

### 国内学会

#### シンポジウム講演

佐々木 洋, 荒木敏之  
神経変性過程における軸索の変性と保護の分子機構  
第 31 回日本分子生物学会年会・第 81 回日本生化学会大会 (BMB2008), 神戸, 12.9, 2008

若月修二, 荒木敏之  
神経変性軸索の変性とその細胞内シグナル  
第 31 回日本分子生物学会年会・第 81 回日本生化学会大会 (BMB2008), 神戸, 12.9, 2008

荒木敏之  
神経細胞における NAD 合成酵素 NMNAT の発現による細胞保護機構  
第 114 回日本解剖学会総会・全国学術集会, 岡山理科大学, 3.30, 2009

### 一般演題

徳永慎治・荒木敏之  
自然発症軸索変性遅延 wlds マウス神経細胞における保護効果  
第 23 回神経組織の成長・再生・移植研究会学術集会 2008 年 5 月 17 日

勝又 澄, 西山 潤, 本橋淳子, 武田純三, 荒木敏之, 柚崎 通介  
ラーチャーでの神経変性に対するワーラー変性遺伝子の役割.  
第 31 回日本神経科学大会, 東京国際フォーラム, 7.9, 2008

館野美成子, 臺 知子, 高橋良輔, 荒木敏之  
変異性 SOD1 の凝集化によって引き起こされるコリンアセチル基転移酵素の輸送障害.  
第 31 回日本神経科学大会, 東京国際フォーラム, 7.9, 2008

八幡直樹, 湯浅茂樹, 荒木敏之  
NAD 合成酵素(NMNAT)過剰発現マウスにおける軸索変性遅延効果の検討.  
第 31 回日本神経科学大会, 東京国際フォーラム, 7.10, 2008

富樫和也, 荒木敏之  
細胞外イオンによるオートファジーの調節  
第 31 回日本分子生物学会年会・第 81 回日本生化学会大会 (BMB2008), 神戸, 12.10, 2008

徳永慎治, 荒木敏之

自然発症軸索変性遅延 wlds マウス神経細胞における保護効果  
第 31 回日本分子生物学会年会・第 81 回日本生化学会大会 (BMB2008), 神戸, 12.11, 2008

齋藤文典, 荒木敏之

ZNRF1 によるユビキチン・プロテアソーム系を示したグルタミン合成酵素の発現制御機構

第 31 回日本分子生物学会年会・第 81 回日本生化学会大会 (BMB2008), 神戸, 12.12, 2008

徳永慎治, 荒木敏之

自然発症軸索変性遅延マウス wlds 由来大脳皮質神経細胞は低酸素一酸化窒素およびミトコンドリア機能障害が引き起こす細胞死に抵抗性を示す。

第 8 回日本ミトコンドリア学会年会, 東京女子医科大学, 12.19, 2008

荒木敏之, 八幡直樹

神経細胞における NMNAT 過剰発現による軸索保護とミトコンドリア機能

第 8 回日本ミトコンドリア学会年会, 東京女子医科大学, 12.19, 2008

荒木敏之, 齋藤文典

ZNRF1 によるユビキチン・プロテアソーム系を介したグルタミン合成酵素の発現制御機構

第 114 回日本解剖学会総会・全国学術集会, 岡山大学, 3.29, 2009

国際学会

(一般発表)

Yahata N, Yuasa S, Araki T: Axonal protection against Wallerian degeneration in vivo is observed in mice overexpressing NMNAT3 located in mitochondria. Society for Neuroscience, Washington D.C., U.S.A. 11.18, 2008

H. 知的財産権の出願・登録

なし

研究成果の刊行に関する一覧表

書籍

著者氏名	論文タイトル名	書籍全体の編集者名	書籍名	出版社名	出版地	出版年	ページ

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Wakatsuki S, Yumoto N, Komatsu K, Araki T, Sehara A.	Roles of meltrin beta /ADAM19 in progression of Schwann cell differentiation and myelination during sciatic nerve regeneration.	Journal of Biological Chemistry	284	957-2966	2009
Tateno M, Kato S, Sakurai T, Nukina N, Takahashi R, Araki T.	Mutant SOD1 impairs axonal transport of choline acetyltransferase and acetylcholine release by sequestering KAP3.	Human Molecular Genetics	18	942-945	2009

# Roles of Meltrin- $\beta$ /ADAM19 in Progression of Schwann Cell Differentiation and Myelination during Sciatic Nerve Regeneration<sup>\*[5]</sup>

Received for publication, April 25, 2008, and in revised form, November 25, 2008. Published, JBC Papers in Press, December 2, 2008, DOI 10.1074/jbc.M803191200

Shuji Wakatsuki<sup>1,51</sup>, Norihiro Yumoto<sup>2</sup>, Koji Komatsu<sup>2</sup>, Toshiyuki Araki<sup>3</sup>, and Atsuko Sehara-Fujisawa<sup>1,2</sup>

From the <sup>1</sup>Department of Growth Regulation, Institute for Frontier Medical Sciences, Kyoto University, Kawahara-cho 53, Shogo-in, Kyoto 606-8507, Japan and the <sup>2</sup>Department of Peripheral Nervous System Research, National Institute of Neuroscience, National Center for Neurology and Psychiatry, 4-1-1 Ogawahigashi-cho, Kodaira 187-8502, Japan

Remyelination is an important aspect of nerve regeneration after nerve injury, but the underlying mechanisms are not fully understood. Here, we show that meltrin- $\beta$  (ADAM19), a member of the ADAM (a disintegrin and metalloprotease) family, plays crucial roles in nerve regeneration after a crush injury to the sciatic nerves. The expression of meltrin- $\beta$  was up-regulated in neurons after the crush injury. Morphometrical analysis revealed a delay in remyelination in meltrin- $\beta$ -deficient nerves, whereas no significant defects were observed in their axon elongation. The activation of Krox-20, an indispensable transcription factor for myelination, was delayed in meltrin- $\beta$ -deficient nerves and was accompanied by the retarded expression of myelin-related proteins. Expression of Krox-20 in Schwann cells was mediated by Akt. Phosphorylation of Akt but not that of Erks was reduced in regenerating nerves of meltrin- $\beta$ -deficient mice. The cell membrane fraction prepared from meltrin- $\beta$ -deficient nerves showed a defective activation of Akt in the membrane-loaded Schwann cells. Meltrin- $\beta$ -deficient mice exhibited delayed sciatic functional recovery after the nerve crush. Altogether, these results reveal a role of meltrin- $\beta$  in Schwann cell differentiation and re-myelination in nerve regeneration. Moreover, this study suggests that meltrin- $\beta$  functions as a modulator of juxtacrine signaling from axons that activate the Akt pathway and the Krox-20 expression, which is the prerequisite for Schwann cell differentiation.

The peripheral nervous system (PNS)<sup>3</sup> is mainly composed of neurons and glial cells. Differentiation of Schwann cells, a

group of glial cells that sheathe axons of the peripheral nerves, including sensory and motoneurons, is a multistep process. Immature Schwann cells migrate along axons and then differentiate to promyelinating Schwann cells, which sheathe single axons, before differentiation into myelinating Schwann cells (1). Differentiation from immature to myelinating Schwann cells requires the POU domain transcription factor Oct-6 (also called suppressed cAMP-inducible protein, SCIP) and the zinc-finger transcription factor Krox-20 (Egr-2), respectively (2–4).

Differentiation of Schwann cells is regulated by various growth factors, such as neuregulin-1 (NRG1), the major ErbB ligand acting as a glial growth factor (5). Receptor-tyrosine kinases, including ErbBs, transmit intracellular signals mainly through extracellular signal-regulated kinases (Erks) and phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K)-Akt pathways (6), of which the latter pathway is crucial for initiation of myelination (7, 8). NRG1-ErbB signaling in promyelinating and myelinating Schwann cells activates Erks and PI3K-Akt pathways, respectively. These studies reveal the importance of identifying modifiers that alter growth factor signaling, including NRG1, from the Erks- to PI3K-Akt-dependent pathway for the initiation of myelination.

Here, we show that meltrin- $\beta$  (ADAM19) plays roles in Schwann cell differentiation during regeneration of the sciatic nerves after a crush injury. Meltrin- $\beta$  is a member of the ADAM (a disintegrin and metalloprotease) family of proteins that contains the active metalloprotease domain. Evidence suggests modulatory roles of ADAM proteases in the ectodomain shedding of various membrane proteins. Kuzbanian/ADAM10 is involved in the ectodomain shedding of multiple substrates, including Notch ligands, ephrins, and cadherins (9–11). Tumor necrosis factor- $\alpha$ -converting enzyme/ADAM17 plays essential roles in the phorbol ester-stimulated ectodomain shedding of various membrane-anchored growth factors, receptors, or adhesion molecules (12). We and Inoue *et al.* identified mouse meltrin- $\beta$  cDNA previously (13–15). Meltrin- $\beta$  is highly expressed in the developing PNS and enhances the generation of soluble ligands from membrane-anchored type I NRG1 in cultured neurons (5, 14, 16–18). Although physiological substrates of meltrin- $\beta$  remain elusive, the protease domain of meltrin- $\beta$  could, thus, regulate the growth factor signaling required for PNS development. From the structural point of view, meltrin- $\beta$  and several other ADAM proteins can be classified as subfamily proteins; these proteins contain well conserved dis-

<sup>\*</sup> This work was funded in part by a grant-in-aid for Scientific Research on Priority Areas from the Ministry of Education, Culture, Sports, Science, and Technology, a Research Grant for Nervous and Mental Disorders from the Ministry of Health, Labor, and Welfare, and a Research Grant from Core Research for Evolutional Science and Technology, the Japan Science and Technology Corporation. The costs of publication of this article were defrayed in part by the payment of page charges. This article must therefore be hereby marked "advertisement" in accordance with 18 U.S.C. Section 1734 solely to indicate this fact.

<sup>[5]</sup> The on-line version of this article (available at <http://www.jbc.org>) contains supplemental Data 1 and 2.

<sup>1</sup> A researcher with the 21st Century COE Program, Integration of Transplantation Therapy and Regenerative Medicine at Kyoto University.

<sup>2</sup> To whom correspondence should be addressed. Tel: 81-75-751-3826; Fax: 81-75-751-4642; E-mail: asehara@frontier.kyoto-u.ac.jp.

<sup>3</sup> The abbreviations used are: PNS, peripheral nervous system; PBS, phosphate-buffered saline; siRNA, small interfering RNA; NRG1, neuregulin-1; Erk, extracellular signal-regulated kinases; PI3K, phosphatidylinositol 3-kinase; RT, reverse transcription; PLSD, protected least significant difference; DAC, days after crush; IGF-I, insulin-like growth factor I; DRG, dorsal root ganglia.



## Delayed Myelination in the Absence of an ADAM

integrin and other cysteine-rich domains, conserved domains originally found in viper venoms, whereas these domains are less conserved in tumor necrosis factor- $\alpha$ -converting enzyme/ADAM17 and Kuzbanian/ADAM10 (13, 19, 20). The functions of disintegrin and cysteine-rich domains of meltrin- $\beta$  have not been elucidated.

Most meltrin- $\beta$ -deficient mice died soon after birth, probably due to developmental defects in the heart (19, 21, 22). However, some of meltrin- $\beta$ -deficient mice carrying a mixed genetic background of 129/Sv and C57BL/6, but not those carrying a single C57BL/6 background, survived to adulthood despite these defects (22). These survivors enabled us to investigate whether meltrin- $\beta$  participates in the development of the PNS after birth. In this study we found meltrin- $\beta$ -deficient mice exhibited a delay in remyelination and a prolonged period of hind limb dysfunction after injury. Meltrin- $\beta$ -deficient nerves showed delayed up-regulation of Krox-20, leading to retarded activation of the genes for myelin-related proteins. Moreover, Akt activation, an essential process for expression of Krox-20 in Schwann cells, is less efficient in lesioned meltrin- $\beta$ -deficient nerves. These results revealed that meltrin- $\beta$  functioned as one of the modulators of Schwann cell differentiation from promyelinating stages during regeneration through the activation of Akt signaling pathway.

### EXPERIMENTAL PROCEDURES

**Animals**—Meltrin- $\beta$ -deficient mice were generated as previously described (22). Heterozygous mice of the mixed background (129Sv  $\times$  C57BL6) were crossed, and the offspring were genotyped by PCR. No gross abnormalities were observed in wild type and heterozygous littermates on overall development, growth characteristics, and histology (22); therefore, littermates with wild type genotypes were used as controls throughout this study. All animals were maintained in accordance with the guidelines of Kyoto University. The technical protocols for animal experiments in this study were approved by a review committee of the Institute for Frontier Medical Sciences, Kyoto University.

**Antibodies**—The antibodies used and their sources were as follows: rabbit polyclonal anti-C terminus of meltrin- $\beta$  antibody (16), rabbit polyclonal anti-Akt and anti-phospho-Akt antibodies (9272, 9271, Cell Signaling Technology), mouse monoclonal anti-Erk1 and anti-Erk2 antibodies (610030, 610103, BD Biosciences), rabbit polyclonal anti-phospho-Erk1/2 antibody (9101S, Cell Signaling), rabbit polyclonal anti-Krox-20 antibody (PRB-236P, Covance), goat polyclonal anti-Oct-6 antibody (sc-11661, Santa Cruz), rat monoclonal anti-F4/80 antibody (clone Ab-3, Serotec), rabbit polyclonal anti-myelin basic protein antibody (A0623, Dako), rabbit polyclonal anti-GAP-43 antibody (AB5220, Chemicon), mouse monoclonal anti-neurofilament 160 antibody (clone NN18, Sigma), and horseradish peroxidase-conjugated secondary antibodies (Vector Laboratories).

**Immunoblotting and Histology**—Several days after surgery, distal portions of the sciatic nerve from the crush-lesioned or unlesioned side were homogenized in radioimmune precipitation assay buffer (1% Triton X-100, 0.5% sodium deoxycholate, 0.1% SDS, 150 mM NaCl, 50 mM Tris-HCl, pH 7.5). Twenty

micrograms of sciatic nerve lysates were analyzed by SDS-PAGE followed by immunoblotting. Immunoblots were developed with a horseradish peroxidase-conjugated secondary antibody and detected by enhanced chemiluminescence. The intensity was determined by laser densitometry of immunoblots using a densitometer and ImageQuant software (GE Healthcare). Scans at multiple exposures were obtained to ensure that the results fell within the linear range of the instrument.

For immunohistochemical analyses, sciatic nerves and lumbar DRG were dissected at various days after the nerve crush, flash-frozen in optimal cutting temperature compound, and cryosectioned at 8  $\mu$ m. After preparation, sections were fixed with ice-cold acetone and immunostained using antibodies against NF160, GAP-43, and meltrin- $\beta$ . For the staining with antibodies against Krox-20 and Oct-6, sections were fixed with 4% paraformaldehyde in PBS. For toluidine blue staining, sciatic nerves were postfixed overnight in PBS containing 2% glutaraldehyde and then dehydrated and embedded in plastic for microtome sectioning. For quantification of immunostained nerves, longitudinal cryosections (10  $\mu$ m) of uninjured or injured nerves at 7, 12, and 21 days after crush were prepared from wild type and mutant mice. Each section was immunostained with antibodies against transcription factors Oct-6 and Krox-20 and counterstained with 4',6-diamidino-2-phenylindole. Photographs were taken from three wild type and three mutant nerves, and immunostained nuclei were counted with reference to the 4',6-diamidino-2-phenylindole-stained signals.

**Membrane Preparation and Analysis of Akt or Erks Activation in Schwann Cells**—DRG neurons from 35-mm dish cultures were washed twice with ice-cold PBS and collected with fine forceps and homogenized with 20 strokes of a 0.2-ml micro tissue grinder (Wheaton, Millville, NJ) in 150  $\mu$ l of ice-cold PBS. The volume was brought up to 1.5 ml with ice-cold PBS, and the homogenate was centrifuged (100  $\times$  g, 20 min, 4  $^{\circ}$ C) to remove debris. The supernatant, diluted up to 3 ml, was then centrifuged at 35,000  $\times$  g for 1 h at 4  $^{\circ}$ C. The supernatant was discarded, and the pellet was resuspended in culture media by vortexing. To analyze the activation levels of either Akt or Erks in Schwann cells, the membrane fraction prepared from either wild type or meltrin- $\beta$ -deficient neurons was loaded onto Schwann cell cultures, and after 20 min cell lysates were prepared, blotted, and probed for phospho-Akt, total Akt, phospho-Erk, and total Erks as described above. Conditioned media were prepared as previously described (23). Briefly, conditioned media from  $\sim$ 12 cultures each of wild type and meltrin- $\beta$ -deficient DRG were collected and concentrated 100-fold. Concentrated media were diluted 10-fold with Dulbecco's modified Eagle's medium and exposed to the Schwann cell for 20 min. Schwann cell lysates were prepared, blotted, and analyzed described above.

**Quantitative Reverse Transcription (RT)-PCR**—Total RNA was extracted from distal parts of sciatic nerves at various days after crush injury or cultured Schwann cells using the RNeasy MiniKit (Qiagen, Basel, Switzerland). RNA samples were further purified by DNase digestion and extraction with phenol and chloroform and subjected to RT-PCR. Briefly, 0.5  $\mu$ g of

total RNA was converted to cDNA using Superscript II (Invitrogen) in the presence of random hexamer primers. The mRNAs for Krox-20, P0, and myelin basic protein were measured by real-time quantitative RT-PCR using the Applied Biosystems prism model 7700 sequence detection instrument. The mRNA levels were corrected for glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase.

**Transfection of siRNA**—For transfection of siRNA, control or Akt targeting siRNA were electroporated into primary Schwann cells using the nucleofector mouse embryo fibroblast mixture 1 (program T20; Amaxa Biosystems) and then plated onto 6-well culture plates (100,000 cells per well). The siRNA effect was analyzed by immunoblotting 48 h after transfection. All the siRNAs used in this study were purchased from Qiagen (negative control siRNA, catalog no. 1033076; Akt targeting siRNAs, catalog no. 1022427 and SI02652419). RNA samples were prepared from Schwann cells and analyzed as described above.

**Sciatic Nerve Crush**—Mice were anesthetized by intraperitoneal injection of 2.5% avertin. The sciatic nerve was exposed at the mid-thigh region and crushed for 30 s using Dumont no. 5 forceps. This was repeated at the same site to completely sever the axons.

**Quantitation of Degenerating and Myelinated Axons**—For the assessment of the extent of axonal degeneration and regeneration, we measured numbers of degenerating and myelinated axons. Toluidine blue-stained sections prepared from at least five control mice and five mutant mice were photographed and 10,000  $\mu\text{m}^2$  areas were chosen at random for analysis. Irregular and darkly stained myelin profiles were classified as degenerating myelin sheaths. Myelin sheaths that wrap axons to a greater or lesser extent were counted as myelinated.

**Tracing of DRG Neurons and Motoneurons**—Crystals of Fluorogold (Molecular Probes) were applied onto the cut nerve 7 mm distal to the crush lesion. After 48 h mice were deeply anesthetized with pentobarbital and perfused with 4% paraformaldehyde. Spinal cords and DRG were removed and processed for cryosectioning. For counting DRG neurons, all experiments were evaluated using cresyl violet staining for serial sections and Fluorogold-labeled large cells with abundant cytoplasm and prominent nucleolus in each section were counted. Thus, the number of neurons can be counted based on the number of nucleolus in Fluorogold-labeled cells. Numbers of motoneurons were counted similarly using these criteria.

**Behavior Analysis**—At various day points after unilateral crush injury, mice were tested for recovery of hind limb function on the crushed side by measuring toe spread and the ability to grip an inverted wire screen (24, 25). For the outer toe spread assay, the hind feet of the mice were painted with black pigment ink; the mice were then allowed to walk freely on a blank sheet of paper. The distance between the first and fifth digits (outer toe spread) was measured. For the grip assay mice were placed on a wire screen mesh, which was then turned over to test the ability of the mice to grip the screen correctly with their hind paws. The test was repeated 10 times for each mouse, and the number of failed trials was recorded.

**Statistical Analysis and Ethical Considerations**—Results were expressed as the mean  $\pm$  S.E. Differences between groups

## Delayed Myelination in the Absence of an ADAM

were examined for statistical significance using Fischer's protected least significant difference (PLSD) test.  $p < 0.05$  denoted the presence of a statistically significant difference.

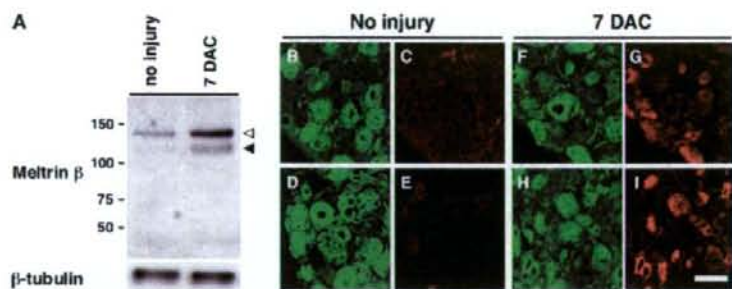
## RESULTS

**Expression of Meltrin- $\beta$  (ADAM19) in Peripheral Neurons after Crush Injury**—To investigate whether meltrin- $\beta$  participates in the development of the PNS after birth, heterozygous mice of the mixed background of 129/Sv and C57BL/6 were crossed, and the meltrin- $\beta$ -deficient mice were generated. Approximately 10–15% of the meltrin- $\beta$ -deficient mice survived to adulthood despite the heart defects (22). These survivors enabled us to investigate roles of meltrin- $\beta$  in the development of the PNS after birth. Although the numbers of axons in the meltrin- $\beta$ -deficient mice were slightly lower than those in the wild type mice (about 77% at L5 level), both myelinating and non-myelinating axons were normal in appearance. The g-ratio of myelinating axons in the meltrin- $\beta$ -deficient mice was similar to that in the wild type mice. IB4-positive, calcitonin gene related peptide-positive, and parvalbumin-positive neurons of meltrin- $\beta$ -deficient mice were more or less equally reduced in number compared with those of wild type mice, suggesting that the smaller number of axons in the sciatic nerves is not due to defects in the formation of certain types of neurons. Meltrin- $\beta$ -deficient mice showed no abnormality in walking or in sensing heat or touch (data not shown).

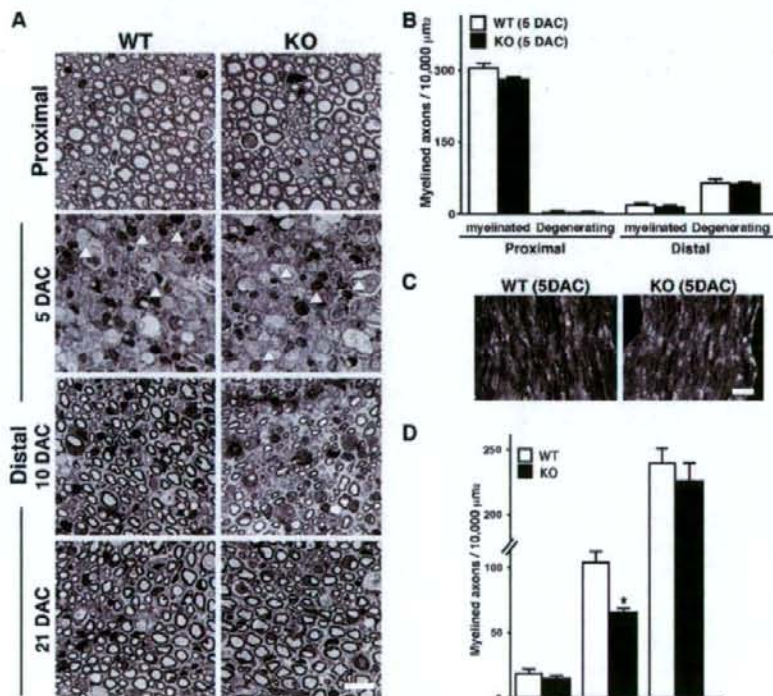
We adopted another approach to explore the roles of meltrin- $\beta$  in PNS, hypothesizing that the roles of meltrin- $\beta$  might be elucidated by examining the regeneration processes after the sciatic nerve crush, which is a well established paradigm for nerve regeneration. We examined the expression of meltrin- $\beta$  before and after the nerve crush by Western blotting and immunohistochemical analyses (Fig. 1). Meltrin- $\beta$  protein was scarcely detectable in uninjured DRG neurons. Several days after the sciatic nerve crush at the mid-femoral level, meltrin- $\beta$  expression increased strongly in L3–L5 DRG neurons (Fig. 1, C and G) and motor neurons (data not shown). GAP-43, which is a highly specific marker for regenerating peripheral neurons including DRG neurons (Fig. 1, E and I) (26), was induced similarly after the sciatic nerve crush. Thus, expression of meltrin- $\beta$  is up-regulated after the sciatic nerve crush at the early phase of regeneration and persists at least for 2 weeks.

**Decreased Myelination in the Early Stage of Regeneration after Sciatic Nerve Crush in Meltrin- $\beta$ -deficient Mice**—To understand the roles of meltrin- $\beta$  in nerve regeneration processes, we first examined whether the absence of meltrin- $\beta$  affected nerve regeneration at the morphological level. The sciatic nerves of wild type and meltrin- $\beta$ -deficient animals were crush-lesioned at the mid-femoral level, and the extent of morphological degeneration and regeneration was assessed by serial sectioning and microscopic analyses of the lesioned nerves. After the nerve damage, self-destruction of axons or Wallerian degeneration (27) was observed in the nerve distal to the lesion, resulting in loss of axon-Schwann cell contact. Five days after the nerve injury, demyelinating features were prominent in the part distal to the lesion in both wild type and mutant mice nerves (Fig. 2A). There was no significant differ-

## Delayed Myelination in the Absence of an ADAM



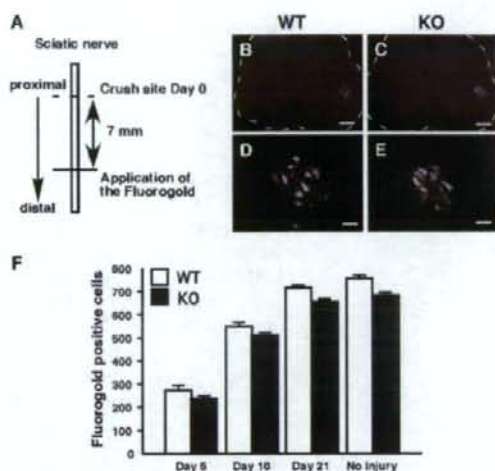
**FIGURE 1. Induction of meltrin- $\beta$  in DRG by sciatic nerve crush.** *A*, an immunoblot for meltrin- $\beta$  protein that indicates its up-regulation in adult L3-L5 DRG at 7 days after nerve crush. *Open and filled arrowheads* indicate  $\sim$ 120-kDa prodomain-bearing and  $\sim$ 100-kDa prodomain-lacking, active forms of meltrin- $\beta$ , respectively. The active form of meltrin- $\beta$  is scarcely detectable in uninjured samples. Molecular weight markers are shown at the left (*upper panel*). The expression of  $\beta$ -tubulin protein was used as a control for protein loading (*lower panel*). *B–I*, immunohistochemical analysis that demonstrates activation of meltrin- $\beta$  in DRG neurons after sciatic nerve crush. DRG sections before (*B–E*) and 7 DAC (*F–I*) were double-stained with anti-neurofilament 160 (*green*) and anti-meltrin- $\beta$  (*red*) antibodies (*B, C, F, and G*) or with anti-neurofilament 160 (*green*) and anti-GAP-43 (*red*) antibodies (*D, E, H, and I*). Meltrin- $\beta$  is activated similarly to GAP-43, a specific marker for regenerating peripheral neurons. Scale bar, 50  $\mu$ m.



**FIGURE 2. Decreased myelination in the early stage of regeneration after sciatic nerve crush in meltrin- $\beta$ -deficient mice.** *A*, semi-thin toluidine-blue-stained sections of sciatic nerves 3 mm proximal or distal to the lesion at 5, 10, and 21 DAC. Degenerating profiles from wild type (*WT*) and meltrin- $\beta$ -deficient (*KO*) mice on panels of five DACs are indicated with *arrowheads*. The number of myelinating nerves in meltrin- $\beta$  KO mice was less than that in wild type mice at 10 DAC, whereas similar numbers of myelinated nerves were found in wild type and meltrin- $\beta$  KO mice at 21 DAC. Scale bar, 25  $\mu$ m. *B*, the densities of myelinated fibers and degenerating axon profiles were measured in wild type (*open bars*) and meltrin- $\beta$ -deficient nerves (*filled bars*) 3 mm proximal or distal to crushed sites at 5 days after the injury. Degeneration occurred similarly in the nerves of both genotypes. The mean  $\pm$  S.E. obtained with five wild type and five mutant mice are represented. *C*, immunostaining of invaded macrophages using an antibody against F4/80 in the lesioned nerves. Macrophages invaded into injured nerves similarly in wild type and mutant-deficient mice. Scale bar, 100  $\mu$ m. *D*, the densities of myelinated axon profiles were measured in wild type and mutant-deficient nerves 3 mm distal to crushed sites at 5, 10, and 21 days after crush injury. Scale bar, 25  $\mu$ m.

ence between the numbers of myelinated (intact) or demyelinated (degenerating) axons in the sciatic nerve of the wild type and mutant mice groups 5 days after crush (DAC) (Fig. 2*B*). Immunochemical analyses of the markers for macrophages, F4/80 (Fig. 2*C*) and MOMA-2 (data not shown) showed similar profiles between each genotype, suggesting proper invasion of macrophages into the lesioned sites in meltrin- $\beta$ -deficient mice. In addition, many myelin ovoids that had not been cleared by macrophages and dark-stained macrophages with phagocytosed myelin were prominent in most areas of the cross-sections prepared from the lesioned mice of both genotypes (Fig. 2*A*, *arrowhead*). These results suggest that meltrin- $\beta$  is dispensable for nerve degeneration ahead of regeneration.

After demyelination, remyelination starts about a week after the crush (7 DAC) in wild type mice. Then, the progression of myelination during the second and third weeks results in the regeneration of nerves with thick myelin sheath. Fig. 2, *A* and *D*, show representative results in which wild type and meltrin- $\beta$ -deficient nerves were compared on 10 DAC (the early myelinating stage) and 21 DAC (the late myelinating stage). Ten days after crush many myelinating nerve fibers were already found in wild type mice, indicating their active regeneration. In contrast, only a few myelinated fibers and various degrees of myelination were observed in the distal segments from mutant mice, indicating that myelination of regenerating fibers was much less advanced at the early stage of regeneration in meltrin- $\beta$ -deficient mice. However, the number of myelinated axons gradually increased at the late stage of regeneration in these mice, and similar numbers of myelinated axons were found in wild type and meltrin- $\beta$ -deficient mice 3 weeks after the injury (Fig. 2, *A* and *D*). Overall, these results indicated that nerve regeneration is indeed affected in



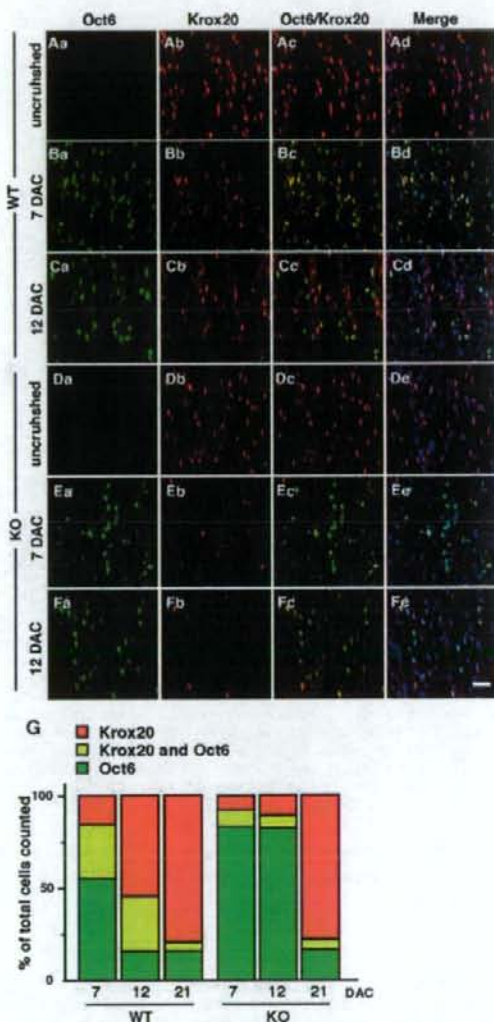
**FIGURE 3. Regenerating axons elongate normally in meltrin- $\beta$ -deficient mice.** *A*, at 5, 10, and 21 days after a sciatic nerve crush, the nerve (bar) was crushed 7 mm distal to the lesion, and crystals of the retrograde tracer Fluorogold were applied to the cut nerve. *B–E*, sections through the ventral horn of the spinal cord that show a similar number of motoneurons labeled with Fluorogold in both genotypes of animals at 10 days after the lesion. The dotted lines indicate spinal cords. Bars: 250  $\mu$ m (*B* and *C*) and 50  $\mu$ m (*D* and *E*). *WT*, wild type; *KO*, knock out. *F*, the numbers of neurons labeled in retrograde are similar in both genotypes of animals. The mean  $\pm$  S.E. from four wild type and three mutant deficient mice are shown.

meltrin- $\beta$ -deficient mice, although the progression of the myelination recovered in the late stage of regeneration in these mice.

The delay in the early stage of regeneration in meltrin- $\beta$ -deficient mice could be because of the decreased rate of axon elongation after the lesion. To evaluate the axonal regeneration rate, spinal motoneurons and DRG neurons were labeled in retrograde with Fluorogold 5, 10, and 21 days after the crush at a site 7 mm distal to the lesion (Fig. 3). Fluorogold was used as a marker because it is a long-lasting and non-diffusible tracer that undergoes rapid retrograde axonal transport (26, 28). Meltrin- $\beta$ -deficient mice had similar numbers of labeled spinal motoneurons as wild type mice at any day point after the crush, suggesting that the axons of meltrin- $\beta$ -deficient mice elongated over the lesion and reached the injection site as efficiently as those of the wild type mice (Fig. 3*F*). Similar results were obtained in the DRG neurons (data not shown). These results exclude primary defects of meltrin- $\beta$ -deficient mice in the axonal elongation during regeneration.

**Delay in Progression of Schwann Cell Differentiation in Meltrin- $\beta$ -deficient Nerves during Regeneration**—The delayed regeneration of meltrin- $\beta$ -deficient nerves could be caused by a defect in development of the Schwann cell, including its proliferation, viability, and differentiation. For this reason, we compared Schwann cell viability and proliferation in wild type and meltrin- $\beta$ -deficient sciatic nerves during regeneration. There was little apoptosis in the lesioned nerves of meltrin- $\beta$ -deficient mice, as evidenced by similar numbers of cleaved caspase-3-positive apoptotic cells that were observed in the part distal to the lesion of wild type and meltrin- $\beta$ -deficient nerves 4 days after nerve crush (data not shown). Bromodeoxyuridine incor-

## Delayed Myelination in the Absence of an ADAM



**FIGURE 4. Delayed generation of Krox-20-positive Schwann cells during regeneration in meltrin- $\beta$ -deficient nerves.** *A–F*, longitudinal sections of uninjured or injured nerves at 7 (*B* and *E*) and 12 (*C* and *F*) DAC were prepared from wild type (*WT*) and mutant (*KO*) mice. Each section was immunostained with antibodies against transcription factors, Oct-6 (green) and Krox-20 (red). The nuclei were stained with 4',6-diamidino-2-phenylindole (shown in merged profiles). Scale bar, 100  $\mu$ m. *G*, the percentage of cells expressing only Krox-20 (red), Krox-20 and Oct-6 (yellow green), and only Oct-6 (green) in the cells expressing Krox-20 and/or Oct-6 at 7, 12, and 21 DAC. Note that the progression of Schwann cell differentiation from Oct-6<sup>+</sup>Krox-20<sup>-</sup> to Oct-6<sup>+</sup>Krox-20<sup>+</sup> and then to Oct-6<sup>-</sup>Krox-20<sup>+</sup>-myelinating cells are delayed in the mutant nerves.

poration into glial fibrillary acidic protein-positive immature Schwann cells was similar in the nerves from both genotypes at 7 days after nerve crush (bromodeoxyuridine incorporation in each microscopic field of 100  $\times$  100  $\mu$ m<sup>2</sup>: wild type, 13.7  $\pm$  1.0; mutant, 13.0  $\pm$  2; *n* = 4). Similar numbers of GFAP-positive cells were found in wild type and meltrin- $\beta$ -deficient nerves (data not shown). Thus, the viability and