

## エンドスルファターゼ Sulf1 によるヘパラン硫酸修飾と成獣マウスの神経新生の関係

永田 邦彦 (筑波大学 生物学類) 指導教員: 榎 正幸 (筑波大学 医学医療系)

### ・背景と目的

ヘパラン硫酸は、細胞の増殖、分化、移動に関わる分子の一つで、細胞の表面に存在し、細胞外のタンパク質と相互作用する。ヘパラン硫酸は、グルクロン酸またはイズロン酸と、グリコサミンの二糖単位が繰り返し並んだ多糖鎖であり、2位または6位の水酸基、及びN位がいろいろな組合せで硫酸化されるため、構造多様性に富む。Sulf1は、ヘパラン硫酸を修飾するエンドスルファターゼの一種で、ヘパラン硫酸の特定の硫酸基を脱硫酸化する機能をもつ。細胞外で働くため、糖鎖上の硫酸基の並び方を様々に変化させることができ、この特性により、ヘパラン硫酸と相互作用するタンパク質との結合性を制御している。

成獣マウスの脳において、Sulf1は、側脳室の脳室下帯に強く発現する。哺乳類の成体の場合、通常脳内で新しい神経細胞は作られないが、脳室下帯では神経幹細胞が分裂し、神経を新生する。脳室下帯で分裂した神経幹細胞は、嗅球へと移動する。嗅球は、鼻腔で空気中の臭い分子を認識した、嗅細胞からの情報が送られてくる一次中枢であり、内側から順に顆粒状細胞層、内網状層、僧帽細胞層、外網状層、糸球体層に分けられる(図1)。糸球体層は、嗅細胞の軸索と僧帽細胞の樹状突起が、シナプスを形成する糸球体の層である。

神経幹細胞が脳室下帯から嗅球へと移動する経路は Rostral migratory stream (RMS) と呼ばれる。分裂後、2日から6日ほどかけて嗅球にたどり着いた神経幹細胞は、分裂後5日から7日目にRMSから出て、顆粒状細胞層や糸球体層などに向かう。15日から30日目には顆粒状細胞層や、糸球体層を縁取るように存在する傍糸球体細胞となり、新しく神経回路に組み込まれ、成熟した神経細胞として活動し始める(図2)。神経幹細胞の分裂は、脳室下帯の尾側から吻側に向かって起きており、RMSの中で再度分裂するものもある。

Sulf1は、その発現する場所が神経新生の始まる場所と重なっているが、Sulf1が神経新生に影響を与えるか否か、また影響するとすれば、神経新生のどの段階で、どのような役割をはたすのかについては、判っていない。そこで、本研究では、脳室下帯で

発現する Sulf1 が、脳室下帯から嗅球にわたる神経新生に与える影響を明らかにすること

を目的とした。

### ・材料と方法

3ヶ月齢の Sulf1 ノックアウトマウスと野生型マウスに、ブロモデオキシウリジン (BrdU, 100 mg/kg) を1回腹腔内注射し、2時間後に4%パラホルムアルデヒド (PFA) で還流固定し、脳を取り出した。BrdUはチミジンの類似体であり、DNA合成期の細胞で新たに合成されるDNAに取り込まれる。取り出した脳を4%PFA中に、一晚4°Cで浸した後、30%スクロース/リン酸緩衝液 (PBS) 溶液に移し、一日4°Cで浸した。次にO.C.T.コンパウンドに包埋し、クリオスタットを用いて厚さ20µm、冠状断で嗅球の凍結切片を作製した。切片は0.3% $H_2O_2$ /5%ジメチルスルホキシド/TBST (0.1%Tween-20を含むTBS)の混合溶液で処理し、2Nの塩酸で37°C、30分処理した。続いて0.5%blocking reagent/0.1%TritonX-100/PBSで、1時間、室温でブロッキングした後、抗BrdUラットモノクローナル抗体(40倍希釈)と、一晚4°Cで反応させた。PBT (0.1%Tween-20を含むPBS)で、室温で30分ずつ3回洗浄した後、ビオチン化抗ラットIgG抗体(500倍希釈)と、室温で2時間反応させた。PBTで、室温で30分ずつ3回洗浄した後、avidin-biotin complex (ABC)法を利用して、反応を増幅した。続いてTBSTで5分ずつ3回洗浄した後、ジアミノベンジジンで発色反応させた。封入した後、顕微鏡で観察し、層ごとにBrdU陽性細胞の数を数えた。

### ・結果と考察

上記の条件で実験する以前に、BrdUを4時間毎に3回注射し、1日後にPFA固定した後、60µm、冠状断の凍結切片を作製してBrdUを染色する、別の実験を行った。脳室下帯を含む凍結切片と、嗅球の凍結切片をそれぞれ作製、顕微鏡で観察し、脳室下帯については背側、腹側などの場所ごとに、嗅球の場合は層ごとに、BrdU陽性細胞の数を数えた。

その結果、脳室下帯については、ノックアウトマウスと野生型マウスの間に、BrdU陽性細胞数の差は見られなかった。

嗅球については、嗅球吻側の先端部では、ノックアウトマウスの方が野生型マウスよりも、BrdU陽性細胞数が多いように思われた。しかしこの条件では、BrdUを取り込む細胞の数が多く、切片も厚過ぎたため、正確な数を数えられていない可能性があり、

上記の条件で実験しなおした。切片は、尾側から吻側まで切り出した順序がわかるように保存した上で、嗅球の細胞数を数えることとし、現在進行中である。

### ・今後

嗅球の吻側から尾側までの全ての切片について、ノックアウトマウスと野生型マウスの各層ごとのBrdU陽性細胞数を比較し、差の有無を調べる。

図1 嗅球の冠状断面図

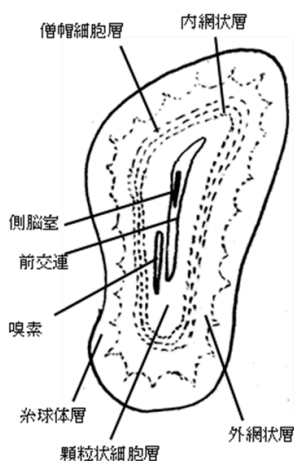


図2 側脳室と嗅球の位置関係

