

へパラン硫酸エンドスルファターゼ遺伝子の成体マウス脳における発現細胞の解析

小林 央人 (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

へパラン硫酸はイズロン酸またはグルクロン酸とグルコサミンからなる二糖が繰り返してできる糖鎖であり、コアタンパクに結合しへパラン硫酸プロテオグリカンの形をとっている。へパラン硫酸プロテオグリカンは細胞外基質や細胞膜上に存在していて、成長因子などと相互作用し、細胞の分化、増殖、移動に関わっている。へパラン硫酸は 2-O-、6-O-、N-位が硫酸化されるが、その硫酸化が不均一であることにより、構造多様性を有する。へパラン硫酸エンドスルファターゼである *Sulf1* はへパラン硫酸の 6-O-位を脱硫酸化することで成長因子などのシグナル伝達を調節している。これまでに *Sulf1* は嗅覚神経回路や情動・報酬に関する側坐核などに強く発現することが見いだされている。側坐核は腹側線条体の一部で、報酬・快楽などの役割を果たす。線条体は、その投射細胞により、直接路と間接路の二つの経路で構成されている。直接路は線条体から黒質網様部につながり報酬行動に関与していて、間接路は線条体から淡蒼球を介して黒質網様部に至り忌避行動に関与している。直接路のニューロンはドーパミン D1 受容体やサブスタンス P を強く発現していて、間接路のニューロンはドーパミン D2 受容体やエンケファリンを強く発現している。本研究では成体マウス脳において、*Sulf1* とサブスタンス P の前駆体プレプロタキキニン A 遺伝子 (*Tac1*)、エンケファリンの前駆体プレプロエンケファリン A 遺伝子 (*Penk*) のダブル *in situ* hybridization を行い、*Sulf1* が直接路・間接路のいずれのニューロンで発現しているかを明らかにすることを目的とした。

・方法

プローブの作製

Tac1 と *Penk* のプローブについてはクローニングから行った。まず、*Tac1* の mRNA から 749 bp、*Penk* の mRNA から 1163 bp の配列をプローブの配列として選び、RT-PCR で増幅し、TA クローニングを行った。インサートのシーケンスを確認し、プラスミドを調製した。これを制限酵素によって一カ所で切断しテンプレートを作製した。*Sulf1* のプローブの配列は感度を上げるために 3'UTR とコーディング領域の二つを選んだ。直鎖化したテンプレートと RNA ポリメラーゼを用いてジゴキシゲニン (DIG) で標識した *Sulf1* と Fluorescein で標識した *Tac1* と *Penk* のプローブを、センスプローブとアンチセンスプローブの両方について合成した。

in situ hybridization

5~7 週齢の野生型マウスの脳を取り出し、O.C.T コンパウンドで包埋・急速凍結し、厚さ 15 μm 、冠状断の切片を作製した。この切片を 4%パラホルムアルデヒド (PFA) /リン酸緩衝生理食塩水 (PBS) で 40 分間固定し、PBS で洗浄した。次に無水酢酸トリエタノールアミン溶液で 10 分間アセチル化し、PBS で洗浄した。その切片にハイブリダイゼーション溶液 (5 \times SSC, 50%ホルムアミド, 5 \times Denhardt's 溶液, 250 $\mu\text{g}/\text{ml}$

Yeast tRNA, 500 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Salmon sperm DNA) をかけ、プレハイブリダイゼーションを行った。その間に、ハイブリダイゼーション溶液に、*Sulf1* は 2 種のプローブを 0.5 $\text{ng}/\mu\text{g}$ ずつ、*Tac1* と *Penk* はそれぞれプローブを 1 $\text{ng}/\mu\text{l}$ になるように加え、80°C で 5 分間変性させ、氷で急冷した。ハイブリダイゼーション溶液を捨て、プローブ溶液をかけて 72°C で 18 時間ハイブリダイズした。

翌日、72°C の 0.2 \times SSC で 30 分間ずつ 3 回洗浄した。次に、TS7.5 (0.1 M Tris-HCl, pH7.5, 0.15 M NaCl) で 5 分間洗浄し、1% Blocking reagent で 1 時間ブロッキングを行い、1% Blocking reagent にアルカリフォスファターゼ標識抗 DIG 抗体とペルオキシダーゼ標識抗 FITC 抗体をそれぞれ 1000 倍と 4000 倍に希釈したものをかけ、4°C で 18 時間反応させた。

翌日、TNT (TS7.5, 0.05% Tween-20) で洗浄し、biotin tyramide 反応液をかけ 5 分間反応させた。TNT で洗浄し、1000 倍に希釈した Streptavidin-Alexa488 をかけ 30 分間反応させた。次に、TNT で洗浄し、TS8.0 (0.1 M Tris-HCl, pH8.0, 0.1 M NaCl, 10 mM MgCl₂) で 10 分間平衡化し、HNPP/Fast Red をかけ顕微鏡で観察しながら適当なところで PBS-EDTA (10 mM EDTA in PBS) によって反応を止め、FluoromountG で封入した。

・結果と考察

この実験を行うにあたって *Sulf1* の検出と *Tac1*、*Penk* の検出をそれぞれ別にして条件検討を行った。

使用するマウスの脳については、灌流固定してから急速凍結した脳よりも新鮮凍結脳の方が強いシグナルを得られた。

Sulf1 のプローブについて、3'UTR の領域だけのものと、コーディング領域のプローブを加えた場合を試すと、コーディング領域のプローブを加えた方が強いシグナルが得られた。

Tac1 のプローブの濃度を、0.5 $\text{ng}/\mu\text{l}$ 、1 $\text{ng}/\mu\text{l}$ 、5 $\text{ng}/\mu\text{l}$ と変えたところ、0.5 $\text{ng}/\mu\text{l}$ ではシグナルが弱く、5 $\text{ng}/\mu\text{l}$ ではバックグラウンドが強くなるので、濃度を 1 $\text{ng}/\mu\text{l}$ と決めた。

Fluorescein の検出で抗 FITC 抗体の希釈倍率を 1000 倍、2000 倍、4000 倍と変えると、希釈倍率が 1000 倍、2000 倍ではバックグラウンドが高くなったので 4000 倍とした。

ペルオキシダーゼの検出を biotin tyramide と Streptavidin-Alexa488 の組み合わせと tyramide-Alexa488 のみの二通りを試した。しかし tyramide-Alexa488 の反応時間が 5 分、10 分のときはシグナルが得られず、20 分ではバックグラウンドが高くなり、適切な条件が見つからなかった。そこで biotin tyramide と Streptavidin-Alexa488 の組み合わせで検出を行うこととし、biotin tyramide の反応時間を変えると、7.5 分と 10 分ではバックグラウンドが高くなったので、反応時間を 5 分間とした。

それぞれで検出できる条件が見つかったので、その条件で二重検出を行った。その結果、*Sulf1* と *Penk* でははっきりしたシグナルを得ることができた。しかし、*Tac1* に関しては強いシグナルが得られなかったため、更なる条件検討が必要である。