

へパラン硫酸エンドスルファターゼ *Sulf1/Sulf2* ダブルノックアウトマウス

における反屈束の形成異常の解析

橋本 沙也加 (筑波大学 生物学類)

指導教員：榎 正幸 (筑波大学 医学医療系)

1. 背景と目的

へパラン硫酸プロテオグリカン(CPG)はコアタンパクとへパラン硫酸糖鎖から構成される糖タンパクで、細胞表面と細胞外マトリックスに存在し、細胞の分化、増殖、移動に関わる。へパラン硫酸はグルクロン酸またはイズロン酸と *N*-アセチルグルコサミンの二糖単位の繰り返しから成り、2位、6位、*N*位が硫酸化され得る。硫酸基は、シグナル分子との相互作用に重要であり、硫酸化パターンの変化によりシグナル伝達が変化する。

へパラン硫酸エンドスルファターゼ *Sulf1/Sulf2* は、細胞外でへパラン硫酸の 6-*O* 硫酸を分解する脱硫酸酵素であり、硫酸化パターンを変化させて細胞外シグナルを調節する。*Sulf1/Sulf2* ダブルノックアウトマウスでは皮質脊髄路に異常がみられることが明らかになっているが、他の神経線維の走行異常については調べられていない。

手綱核は背側視床に位置する左右一対の神経核であり、前脳と中脳、後脳を繋ぐ中継核として働く。ドパミン、セロトニン系の調節機能を有し、情動と感覚を統合する役割を持つ。手綱核は内側手綱核と外側手綱核から成り、内側手綱核の神経細胞は、反屈束と呼ばれる神経束を介して中脳後部の腹側正中にある脚間核へと投射する(図1)。内側手綱核の腹側部神経細胞は脚間核中央部へ、背側部神経細胞は脚間核側方部へと投射する(図2)。反屈束は胎生 9.5 日に伸長し始め、胎生 11.5 日に最初の軸索が腹側正中部に到達する。胎生 13.5 日には繊維が尾側方向へ屈曲し、数回正中交差しながら脚間核を取り巻いてコイル状の構造を形成する。

本研究では、*Sulf1/Sulf2* ノックアウトマウスにおける反屈束の走行を免疫組織化学と三次元的再構成を用いて明らかにすることを目的とした。

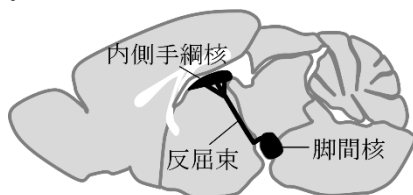


図1. 成体マウス脳矢状断の模式図

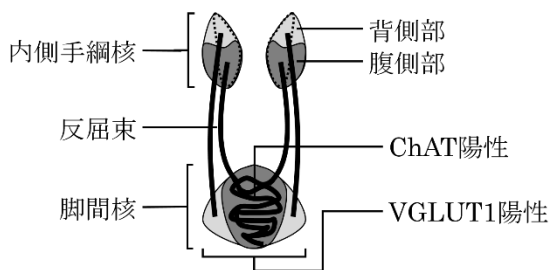


図2. 反屈束の投射

2. 方法

まず成体マウスにおける反屈束の走行を調べるため、野生型、*Sulf1* または *Sulf2* の単独ノックアウト、ダブルノックアウトのマウスを用いて実験を行った。マウスを深麻酔後 4%パラホルム

アルデヒド (PFA) /リン酸緩衝生理食塩水 (PBS) で灌流固定し、脳を取り出して 4%PFA/PBS により 4°Cで一晩後固定した。脳を洗浄後、30%ショ糖/PBS に 4°Cで一晩浸漬し、O.C.T. コンパウンドに包埋し凍結した。クリオスタットにて厚さ 50 μm、冠状断の切片を作製した。

内側手綱核の腹側部に発現する ChAT (choline acetyltransferase) と内側部に発現する VGLUT1 (vesicular glutamate transporter 1) をマーカーとして免疫組織化学を行った。ChATについては内因性ペルオキシダーゼ活性除去のため 3% H₂O₂/80%メタノール/20% DMSO (ジメチルスルホキシド) で 30 分処理し、250 倍希釈した抗 ChAT 抗体と室温で一晩反応させた。洗浄後、1000 倍希釈したビオチン化二次抗体と室温で 2 時間反応させた。感度増幅のため、ABC キットを用いてアビジン-ビオチン-ペルオキシダーゼ複合体と 30 分反応させた。3, 3'-Diaminobenzidine (DAB) と 10 分反応後、切片をスライドグラスに貼り付け、Fluoromount G で封入した。切片を明視野顕微鏡と CCD カメラで撮影し、コンピューター上で AutoAligner と Imaris を用いた三次元的再構成を行った。VGLUT1 については ChAT と同様に 3% H₂O₂/80%メタノール/20% DMSO で処理後、500 倍希釈の抗 VGLUT1 抗体、1000 倍希釈の Cy3 蛍光標識二次抗体を用いて免疫組織化学を行い、顕微鏡で観察した。

次に、発生過程の反屈束に異常が生じているかを調べるために、反屈束の繊維が脚間核へと到達した時期である胎生 15.5 日胚を用いて実験を行った。新鮮凍結胚を用いて、クリオスタットにて厚さ 10 μm、冠状断の凍結切片を作製した。脚間核背内側部に発現する NKX6.1 (NK6 homeobox 1) と脚間核前部・脚間核中央部に発現する PAX7 (paired box 7) を脚間核のマーカー、ROBO3 (roundabout 3) を反屈束のマーカーとして、VGLUT1 と同様に免疫組織化学を行った。PAX7 と NKX6.1 に対して Cy3 標識二次抗体を、ROBO3 に対して Alexa488 蛍光標識二次抗体を用いて蛍光二重染色した。

3. 結果と考察

Sulf1 または *Sulf2* の単独ノックアウト成体マウスでは反屈束の走行異常はみられなかったが、*Sulf1/Sulf2* ダブルノックアウトマウスでは、ChAT 陽性繊維と VGLUT1 陽性繊維の両方で走行異常が観察された。野生型では、反屈束が中脳腹側正中部の脳表に達した後、後方へ向かって伸長し、脚間核に投射する。ダブルノックアウトマウスでは、脚間核の吻側端において一部の軸索が脳表に沿って側方へと異常に伸長していた。脚間核の後部では野生型と同様にコイル状の構造がみられたが、投射先(脚間核)の形が背腹方向にやや扁平であった。反屈束が脚間核に達する胎生 15.5 日胚においても、ダブルノックアウトの反屈束に異常がみられた。詳細な表現型については現在解析中である。今後は胎生 15.5 日より前の胚を解析し、反屈束の走行異常が生じていく過程を調べる予定である。