



Title	Neuron-Specific Expression of a Chicken Gicerin cDNA in Transient Transgenic Zebrafish
Author(s)	金, 哲熙
Citation	大阪大学, 1997, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/40052
rights	
Note	著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、大阪大学の博士論文についてをご参照ください。

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

The University of Osaka

氏名	金哲熙
博士の専攻分野の名称	博士(医学)
学位記番号	第12988号
学位授与年月日	平成9年3月25日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当 医学研究科生理系専攻
学位論文名	Neuron-Specific Expression of a Chicken Gicerin cDNA in Transient Transgenic Zebrafish (Zebrafishの神経特異発現系を用いたニワトリ gicerin の機能解析)
論文審査委員	(主査) 教授 三木直正 (副査) 教授 平野俊文 教授 遠山正彌

論文内容の要旨

【目的】

ニワトリ胚毛様体神経節ニューロンの突起伸展を引き起こす因子として神経突起伸展因子(neurite outgrowth factor, NOF)が単離精製されている。Gicerinは、NOFの受容体として見い出されたイムノグロブリンスーパーファミリーに属する新しい細胞接着因子である。Gicerinは、シナプス形成や細胞移動期に発現し、その後、成長と共に発現が消失することから、初期神経系形成に重要な役割を果たしていることが推測されている。このgicerinの神経系形成における役割を解析するため、zebrafish胚へのgicerin cDNAの導入を試みた。Zebrafishは、受精卵が容易に得られ、胚が透明で、かつ一日で基本的な神経系が完成するために、脊椎動物の初期神経系形成機構を研究するのに適した実験動物である。Neurofilamentプロモーターを用いてgicerinをzebrafish胚に発現させ、神経系形成への影響を調べた。

【方法】

- (1) Zebrafishより受精卵を採取し、マニプレーターを使って受精卵へのDNA導入を行った。DNAは濃度25 μg/mlになるようにして0.5% phenol red, 0.1MKCl溶液にて調整した。
- (2) 発現ベクターは、ヒトcytomegalovirus(CMV)プロモーターを持つpcDNA1を用いた。これに、β-galactosidase(LacZ), green fluorescent protein(GFP), マウスneurofilamentプロモーター(NFP), ニワトリgicerin cDNAなどを組み込んだ。特にNFPはトランスジェニックマウス作製に用いられている1.7kbのHindIII断片を用いた。
- (3) LacZ遺伝子の発現は、胚をpronase処理で卵殻膜を除去、パラフォルムアミド固定、X-gal染色を行った。ホールマウント免疫組織化学の場合はさらに、アセトン処理の後、gicerin抗体、HNK-1抗体などを用いてABC法より染色を行った。ホールマウントの胚は立体的観察が可能であるノマルスキーメンツル装置を用いた。

【成績】

- (1) Zebrafishを用いて、gicerinの神経系形成における機能を解析するためには、神経特異発現系が必要である。pCMV-LacZ発現ベクターを導入したzebrafish胚をX-gal染色で調べると、発現がモザイクであるが、数十匹の

zebrafish 胚を合わせて検討したところ、その発現が全身的であることが認められた。これに対し、pNFP-LacZ ベクターを導入した zebrafish 胚の場合は、ホールマウントでの X-gal 染色、 β -galactosidase 抗体、又は X-gal と HNK-1 抗体の二重染色した結果、その発現は神経特異的であることが観察された。マウス neurofilament プロモーターは、zebrafish 胚においても、神経特異性を示すことが分かった。

(2)Neurofilament プロモーターを用いて、ニワトリ gicerin cDNA の発現を試みた。Zebrafish 受精卵約150個に NFP を用いた gicerin 発現ベクター (pNFP-gicerin) を導入した。1日目に得られた約130個の胚について、gicerin 抗体を用いてホールマウント染色を行ったところ、約80個がニワトリ gicerin cDNA を発現する transgenic zebrafish であった。これら陽性の胚は、モザイク様の発現性に加えて、限局的な神経特異発現をしており、zebrafish 胚当たり一つから十数個の gicerin 陽性細胞が見られた。その中、77匹の zebrafish 胚において gicerin を発現する細胞のほとんどが神経軸索を持つ神経細胞であることが認められた。他に、ごく一部の筋肉細胞などにおいても発現が見られたが、これはプラスミッド DNA の組み込み過程における一部プロモーター領域の欠損などによるものと推測される。このように、マウス neurofilament プロモーターにより誘導された gicerin は、zebrafish において神経細胞に限られ発現していたが、中でも 1 次感覚神経細胞である三叉神経節、体表の触覚を脊髄に伝える Rohon-Beard 神経細胞などが高頻度に gicerin を発現していることが観察された。

(3)Zebrafish 神経系に発現する gicerin を細胞レベルで調べてみると、ニワトリ胚と同じく、初期神経細胞の突起伸展の開始から細胞体を含め、神経突起全体に渡ってその発現が見られた。特に、1日目の陽性の zebrafish 胚を調べてみると、隣接した gicerin を発現する神経細胞の軸索間に接合が頻繁に観察され、線維束形成の過程と考えられた。このようなことは、発生が進んだ 2 日目の胚においてもっと著明になった。Gicerin を発現する神経細胞間に見られる軸索の接合は、gicerin の持つ同種接着活性によると考えられた。

【総括】

神経突起伸展因子 (NOF) の受容体として見い出された gicerin は、NOF との異種間接着活性に加えて、gicerin 同種間の接着活性をも持っている。Gicerin の神経系発生期における役割を調べるために、zebrafish 胚に gicerin cDNA を導入した。マウス neurofilament プロモーターを用いることにより神経特異発現ベクター系を確立することができた。この発現ベクター系を用いて、zebrafish 神経系に gicerin を発現させたところ、ニワトリ初期胚における神経細胞と同様のパターンを示した。特に、隣接した神経細胞の間には、神経回路形成に基本的な線維束形成が見られた。これはニワトリ gicerin 分子間の同種接着活性によるものと推測され、初期神経系形成における gicerin の重要な役割を示唆する。本研究は、zebrafish 胚に異遺伝子を導入し、特異的に神経系に発現させることにより、その遺伝子の機能を *in vivo* で解析が可能であることを示した。

論文審査の結果の要旨

神経突起伸展因子 (neurite outgrowth factor, NOF) の受容体として見い出されたニワトリ gicerin は、NOF との異種間接着活性に加えて、gicerin 同種間の接着活性をも持っている。Gicerin の神経系発生期における役割を調べるために、zebrafish 胚に gicerin 遺伝子を導入した。マウス neurofilament プロモーターを用いることにより zebrafish の神経特異発現系を確立した。この神経特異発現系を用いて、zebrafish 神経系に gicerin を発現させたところ、ニワトリ初期胚における gicerin の神経細胞と同様のパターンを示した。さらに、隣接した gicerin 陽性神経細胞の間には、神経回路形成に基本的な線維束形成が見られた。これはニワトリ gicerin 分子間の同種接着活性によるものと推測され、初期神経系形成における gicerin の重要な役割が示唆された。本研究は、新しい実験動物である zebrafish 胚に異遺伝子を導入し、神経特異的に発現させることにより、その遺伝子の *in vivo* での機能解析が可能であることを初めて報告した。以上より、本研究は学位の授与に値すると考えられる。