



Title	GAP-43 N-terminal translocation signal targets β -galactosidase to developing axons in a pan-neuronal transgenic mouse line
Author(s)	加藤, 英政
Citation	大阪大学, 2000, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/41779
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、 ＜a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed">https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed >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	加 藤 英 政
博士の専攻分野の名称	博 士 (医 学)
学 位 記 番 号	第 1 5 2 1 0 号
学 位 授 与 年 月 日	平成12年 3 月 24 日
学 位 授 与 の 要 件	学位規則第4条第1項該当 医学系研究科生理系専攻
学 位 論 文 名	GAP-43 N-terminal translocation signal targets β -galactosidase to developing axons in a pan-neuronal transgenic mouse line (汎神経系トランスジェニックマウスにおける GAP-43 N 末移行シグナル付 β -ガラクトシダーゼによる成長軸索可視化)
論 文 審 査 委 員	(主査) 教 授 遠 山 正 彌 (副査) 教 授 内 山 安 男 教 授 三 木 直 正

論 文 内 容 の 要 旨

【目的】

マウス発生工学的技術の出現により、「体の設計図」の人工的操作が可能になったことで、これら誘発された発生上の変異を効率よく解析することが望まれている。特に神経発生過程においてはその形態を解剖するに当たり、後の神経系の機能ユニットとも言える神経投射路やそれらの接続に主眼を置くことが必要となってくる。従来のように組織切片より得られた知見を3次元的に再構築するのは面倒であるばかりか、異なった個体間での比較が難しくなる。細胞膜拡散性染料 (DiI など) や従来の軸索トレース法は、問題となる神経回路が既知の場合にのみ実現的となる。次善の策として種々の抗神経線維抗体を用いた解析においても、胚の発生に応じて検出がぎこちなくなる傾向にある。これらを鑑みてマウスの発生を通じて一定して利用しやすい解析法の開発が待たれていた。今回我々は鋭敏な組織マーカーである β -galactosidase と神経成長円錐局在蛋白 GAP-43 の輸送シグナルと融合蛋白をトランスジェニックマウスを用いて広く神経系に発現させ in vivo において簡便且つ再現性よく神経発達過程を解剖することを試みた。

【方法ならびに成績】

広く神経系に発現する成長関連膜蛋白 GAP-43 のプロモーター領域をマウスゲノムライブラリーより得た。ラット遺伝子におけるプロモーター解析において既に 5' 上流領域に加えて第1イントロンの大部分が神経系特異的遺伝子制御に関わっていることが明らかになっていた。これをヒントにマウスの 5' 上流領域 6.5kb 及び第1イントロン 9 kb を含んだ DNA 断片を本ベクターのプロモーターとして用いた。PCH110由来 β -galactosidase (β -gal) の N 末端に GAP-43 の軸索・成長円錐輸送シグナルであるところの 27 個のアミノ酸 (GNT) を in frame につないだ。得られたベクター (pC2V) を常法に従い CBA/Ca $\times$ C57/Bl/6J ハイブリッドマウスの雄性前核に注入しトランスジェニック動物を得た。

本研究においては GNT- β -gal 融合蛋白の活性を可視化することになるため、まず得られたマウスの胚を用いて X-gal 染色を行った。(詳細略) これによって今までにない解像度で単一軸索を可視化することに成功した。この方法を用いると、胎生13.5日胚までは簡便に胚全体における神経回路を示すことができた。これ以降の胚及び生動物においては新鮮凍結切片を作成し、後に X-gal 染色を施した。これらを通じて明らかになったのは、GNT- β -gal 融合蛋白が内因性 GAP-43 蛋白と極めて同様な輸送動態を示し、尚かつ本トランスジェニックマウスが何世代にも渡って継代され、ホモ動物においても行動異常などが観察されないため、その毒性も問題がないということであっ

た。

今回作製したトランスジェニックマウスの発現分布を以下にまとめる。

β -gal 活性はまず胎生10.0日胚の三叉神経節 (V) 及び顔面神経節 (VI) に認められた。11.5日胚ではこれらに加えて舌咽 (IX)・迷走 (X) 各神経節細胞と、全てのレベルで脊髄後根神経節 (DRG) が陽性に転じた。このように発生中期までには神経提由来の各組織が GNT- β -gal を発現した。これら及び以降の発現パターンは内因性 GAP-43発現様式と酷似していた。胎生12.5日以降は脳の各領域、発達眼や鼻粘膜感覚細胞及びその投射路全体において陽性反応が見られた。

以上の結果は、GNT-LacZ レポーターシステムが以前より報告のある tau-lacZ と同等の有用性を神経細胞の種類に関わらず広く発揮することを強く示唆した。

【総括】

GNT- β -gal は、特に発達神経回路を今までにない解像度で可視化する能力をもち、他の面倒なトレース法に代わる有用なツールであることが示された。今後は本マウスを各種ノックアウト動物と掛け合わせたり、又、単に GNT-LacZ を領域特異的プロモーターにて発現させることにより、複雑難解とされる神経発達過程解明の一助となることが期待される。

論文審査の結果の要旨

本論文では、GAP-43遺伝子のプロモーター及び同分子N末輸送シグナルを現行の β -ガラクトシダーゼに連結し、トランスジェニックマウスを作製し、その発現シグナルの詳細な解析を行っている。その過程で、未知であった GAP-43の in situ における発現動態が更に明らかにされ (三叉神経節、Froberg's 神経節、肢芽における一過性発現)、また発達軸索が簡便に表示できる点で大変興味深い。このアイデア自体は新しいものではないが、その応用範囲を広げての全神経系に渡った詳細な解析、他のノックアウト動物との交配にても得られるであろう解像度の高い画像が呈示されており注目に値する。また発表会においては、本トランスジェニック解析を通じて得られた神経系における epigenetics にもふれられており、今後の展開が待ち遠しい。以上により、神経発生過程解明の一助となると共に、全く新たな分野への飛躍が期待され、国際的な見地から見ても本論文は高く評価されるべきものである。よって、本論文は学位論文に値するものと考えられる。