



A mouse homologue of Strawberry Notch is transcriptionally regulated by Reelin signal

馬場, 孝輔

(Degree)

博士 (医学)

(Date of Degree)

2007-03-06

(Resource Type)

doctoral thesis

(Report Number)

乙2931

(URL)

<https://hdl.handle.net/20.500.14094/D2002931>

※ 当コンテンツは神戸大学の学術成果です。無断複製・不正使用等を禁じます。著作権法で認められている範囲内で、適切にご利用ください。



【 1 8 9 】

氏 名・（本 籍） 馬場 孝輔 （ 岡山県 ）

博士の専攻分野の名称 博士（医学）

学 位 記 番 号 博ろ第2006号

学位授与の 要 件 学位規則第5条第1項該当

学位授与の 日 付 平成19年3月6日

【 学位論文題目 】

A mouse homologue of Strawberry Notch is transcriptionally
regulated by Reelin signal
(不リーリンシグナルによるストロベリー・ノッチのマウス相同遺伝子の
転写制御)

審 査 委 員

主 査 教 授 南 康博

教 授 久野 高義

教 授 饗場 篤

【緒言】

Reelin は脊椎動物において胎生期から成体において特定の神経細胞から分泌される糖タンパク質である。Reelin 欠損動物である *reeler* マウスの脳は形態学的異常を呈することより Reelin は脳の形成において必須であるが、Reelin の生化学的機能はよくわかっていない。今回、我々は microarray 法を用いて Reelin の下流で転写制御を受ける遺伝子群について検討した。その結果、*reeler* マウスの胎児脳において *Strawberry Notch* のマウス相同遺伝子 (*mSno1*) の発現が大きく減少していることを発見した。そこで、本研究では *in situ* hybridization 法を用いてマウス胎生期の脳における *mSno1* mRNA の空間的・経時的発現パターンを詳細に調べ、さらに培養細胞を用いて Reelin 刺激による *mSno1* mRNA の発現変化を real time RT-PCR 法により検討した。

【方法】

動物：実験に使用した *reeler* マウスのホモ接合体及び野生型は *reeler* マウスのヘテロ接合体の交配により得た。本実験における全ての動物実験は「神戸大学医学部実験動物に関する指針」を遵守した。

RNA の単離及び real time PCR：Total RNA は ISOGEN を使用して単離した。Real time PCR は PCR MASTER MIX、ABI7500 を用いて行った。

DNA microarray：胎生 11.5 日のマウス脳より total RNA を分離し、cRNA probe を調整した。クローニング：*mSno1* の特異的プライマーを作成し RT-PCR を行いその全長を獲得した。

In situ hybridization：組織をパラフィン包埋し 10 μ m のパラフィン切片を作成した。Digoxin 標識した *mSno1* 及び *Apoer2* の RNA probe をそれぞれハイブリダイゼーションさせ、抗 DIG 抗体によってシグナルを検出した。

プラスミド：mouse *Apoer2* cDNA 全長の 3'末端に HA 標識し pcDNA3.1(+)にサブクローニングし pcDNA-Apoer2-HA を調製した。

細胞培養及び遺伝子導入：Apoer2 を恒常的に発現する P19 細胞変異株を作成するために pcDNA-Apoer2-HA を Lipofectamine 2000 transfection system を用いて遺伝子導入を行った。48 時間後から 400 μ g / ml の geneticin を加え変異株の選択を行った。変異株取得後に Apoer2-HA の発現をウェスタンブロット法によって確認した。

【結果】

胎生早期における *Reelin* 発現

whole mount *in situ* hybridization 法を用いて、マウス胎生 8.5-10.5 日での *reelin* の発現について検討したところ、中脳上丘、後脳に特に明瞭な *reelin* mRNA シグナルを認めた。

reeler マウスにおける *mSno1* 発現の低下

microarray 法により胎生 11 日の野生型と *reeler* マウスの脳の遺伝子発現プロファイルを用い

て *Reelin* の下流で転写制御を受けている遺伝子群を検索した。その結果、*Strawberry Notch* のマウスホモログ (*mSno1*) の発現が大きく減少していることを発見した。*mSno1* の全長を取得した。

Reelin による mSno1 の発現調節

次に胎生期における野生型と *reeler* マウスでの *mSno1* の発現を real time RT-PCR 法を用いて定量的に比較した。野生型と *reeler* 共に胎生 11.5 日にその発現量は一過性に上昇することが示された。更に胎生 11.5 日の *reeler* マウス脳における *mSno1* の発現量は野生型のそれに比較して半減していた。この *reeler* マウスにおける *mSno1* の発現低下は *Reelin* シグナルの欠損によるものかどうか確認するために、P19 細胞株を用いて *Reelin* によって mSno1 の発現が誘導されるかを検討した。P19 細胞培養培地中に *Reelin* を加え経時的、定量的に測定したところ、*Reelin* 負荷によって *mSno1* の発現が 2 倍に増強され、その後 3 時間で発現量がピークとなり、以後減少した。更に *Reelin* 受容体である Apoer2 を恒常的に発現する P19 細胞変異株を用いて同様の実験を行うと、その効果はより増強された。以上より *Reelin*-Apoer2 シグナル伝達経路によって *mSno1* の発現が調節されている可能性を示した。

mSno1 の発現領域

次に我々は *mSno1* の臓器特異性について RT-PCR 法で検討した結果、*mSno1* は脳と精巣に強い発現を認め、それ以外の臓器での発現は認められなかった。更に mSno1 と Apoer2 の脳における発現局在について *in situ* hybridization 法で検討したところ、胎生 11.5 日で神経上皮全体に *mSno1* の強いシグナルを検出した。さらに *mSno1* の発現は胎生 15.5 日から 18.5 日にかけて大脳皮質の表層と脳室周囲によりシグナルが限局した。成体の脳では海馬、嗅球に特に強いシグナルを認めた。この発現傾向は Apoer2 でも同様に認められた。

【考察】

Reelin は胎生期の脳形成において神経細胞の移動やその位置決定に重要な役割を持つことが示唆されている。また、その機能に関わる Tau、Lis1 といった関連蛋白質も同定されている。本研究では *Reelin* の発現時期を *in situ* hybridization 法で詳細に調べた結果、*Reelin* が従来の報告よりも早い時期、すなわち神経細胞の移動が行われる前に既に神経上皮に発現していることを明らかにした。これは *Reelin* シグナルが、神経細胞の移動や位置決定以外の新規の生理機能をもつ可能性を示唆するものである。この可能性を検討する為に microarray 法を用いて野生型と *reeler* の胎生期の脳における遺伝子発現について検討したところ、*reeler* の胎児脳において *Strawberry Notch* のマウスホモログ (*mSno1*) の発現が大きく減少していることを見いだした。さらに real time PCR 法により、mSno1 は野生型および *reeler* マウスともに胎生 11.5 日目に非常に強く発現するが、*reeler* では野生型と比較してその発現量が半減していた。同様に *Reelin* によって mSno1 の発現が誘導されることを P19 細胞株を用いた培養実験から確認した。また

Reelin 受容体である Apoer2 を恒常的に発現する P19 細胞変異株を用いた場合、mSno1 の発現誘導効果はより増強された。これらの結果は *reeler* で *mSno1* の発現量が減少しているという microarray 法や real time PCR の結果と矛盾しない。つまり Reelin-Apoer2 シグナル伝達経路によって *mSno1* の発現が調節されている可能性が考えられる。*mSno1* は胎生 11.5 日では脳全体に強く発現し、以後発進が進むにつれその発現が脳室周囲に限局する。これは Apoer2 の発現パターンと類似している。このことは *in vivo* においても Reelin-Apoer2 シグナル伝達経路と mSno1 の発現が関連していることを示唆するものである。

最近、*reeler* では脳虚血後の新生ニューロンの数が野生型と比較して減少しているという報告や、胎生期の新皮質での神経発生に影響するといった報告がなされている。しかしながら Reelin の神経発生に関わる分子機構については未だに明らかになっていない。ショウジョウバエにおいて *Strawberry Notch* は Notch シグナルや EGF シグナルに関わる因子であり、神経細胞の分化に関わることが示唆されている。また Notch シグナルは脊椎動物の神経発生に必須である。これらのことより本研究の結果は Reelin が mSno1 の発現調節を行い、また Reelin が mSno1 の発現調節を介して神経細胞移動以外の神経発生にかかわる何らかの機能をもつ可能性を示唆するものである。

論文審査の結果の要旨			
受付番号	乙 第 2011 号	氏名	馬場孝輔
論文題目 Title of Dissertation	A mouse homologue of Strawberry Notch is transcriptionally regulated by Reelin signal リーリンシグナルによるストロベリー・ノッチのマウス相同遺伝子の転写制御)		
審査委員 Examiner	主 査 南 康博 Chief Examiner 副 査 久野 高義 Vice-Examiner 副 査 饗 場 篤 Vice-Examiner		
審査終了日	平成 19 年 2 月 21 日		

(要旨は1, 000字～2, 000字程度)

Reelin 欠損動物である *reeler* マウスの脳では形態学的異常を呈することより Reelin は脳の形成において必須であるが、Reelin の生化学的機能はよくわかっていない。そこで今回、microarray 法を用いて Reelin の下流で転写制御を受ける遺伝子群について検討した。

胎生 11.5 日のマウス脳より total RNA を分離し、cRNA probe を調整した。mouse *Strawberry Notch* (mSno1) の特異的プライマーを作成し RT-PCR を行いその全長を獲得した。組織をパラフィン包埋し 10 μ m のパラフィン切片を作成して、Digoxin 標識した mSno1 及び apoer2 の cRNA probe を用いて in situ hybridization を行った。さらに mouse *Apoer2* cDNA 全長の 3'末端に HA 標識し pcDNA3.1(+) にサブクローニングし pcDNA-Apoer2-HA を調製した。Apoer2 を恒常的に発現する P19 細胞変異株を作成した。

Reelin の機能を推察するために microarray 法を用いて胎生 11 日の野生型と *reeler* マウスの脳の遺伝子発現プロファイルについて検討した。その結果、*Strawberry Notch* のマウスホモログ (mSno1) の発現が大きく減少していることを発見した。mSno1 の全長を取得した。次に胎生期における野生型と *reeler* マウスでの mSno1 の発現を real time RT-PCR 法を用いて定量的に比較した。その結果、胎生 11.5 日の発現量は *reeler* は野生型の約半分であった。この mSno1 の発現低下は Reelin シグナルの欠損がもたらしたものかを確認する為に、P19 細胞培養培地中に Reelin を加え経時的、定量的に mSno1 の発現を測定した。Reelin 負荷によって mSno1 の発現が増強され 3 時間で発現量がピークとなりその後、減少した。また P19 細胞に Reelin 刺激を加えると mSno1 の発現が約 2 倍に増強された。更に Reelin 受容体である Apoer2 を恒常的に発現する P19 細胞変異株を用いて同様の実験を行うとその効果はより増強された。これらの結果より Reelin-Apoer2 シグナル伝達経路によって mSno1 の発現が調節されている可能性を示した。更に mSno1 と Apoer2 の脳における発現局在について in situ hybridization 法で検討したところ、胎生 11.5 日で神経上皮全体に mSno1 の強いシグナルを検出した。さらに mSno1 の発現は胎生 15.5 日から 18.5 日にかけて大脳皮質の表層と脳室周囲によりシグナルが限局的になった。成体の脳では海馬、嗅球に特に強いシグナルを認めた。この発現傾向は Apoer2 でも同様に認められた。

microarray 法を用いて野生型と *reeler* の胎生期の脳における遺伝子発現について検討したところ、*reeler* の胎児脳において mSno1 の発現が大きく減少していた。さらに Real time PCR 法により、mSno1 は野生型および *reeler* マウスともに胎生 11.5 日目に非常に強く発現するが、*reeler* では野生型と比較してその発現量が半減していた。しかし *reeler* においてもその発現が完全に消失することはないので、mSno1 の発現には Reelin 以外の別の因子が関与していることを示唆する。同様に Reelin によって mSno1 の発現が誘導されることを P19 細胞株を用いた培養実験から確認した。また Reelin 受容体である Apoer2 を恒常的に発現する P19 細胞変異株を用いた場合、mSno1 の発現誘導効果はより増強された。これらの結果は *reeler* で mSno1 の発現量が減少しているという microarray 法や real time

PCR の結果と矛盾しない。mSno1 は胎生 11.5 日では脳全体に強く発現しておりステージがあがるにつれ脳室周囲に限局されて発現するというパターンを示した。これは Apoer2 の発現パターンと類似している。このことは in vivo においても Reelin-Apoer2 シグナル伝達経路と mSno1 の発現が関連していることを示唆するものである。

本研究では、microarray 法を用いて Reelin の下流で転写制御を受ける遺伝子群について検討し、*reeler* マウスの胎児脳において *Strawberry Notch* のマウス相同遺伝子 (mSno1) の発現が大きく減少していることを発見した。この研究成果は Reelin が mSno1 の発現調節を介して神経細胞移動以外の神経発生にかかわる可能性を示唆するものであり、価値ある業績であると認める。よって本研究は、博士 (医学) の学位を得る資格があると認める。