

薬学実習 4 分子生物学教室

10191043 鈴木健一

1 マウス神経系前駆細胞の分化運命の解析

目的

RNA sequencing の生データを扱い、神経系前駆細胞の分化運命の生業に関与する可能性のある分子を抽出する。

手法

マウス胎児大脳から採取した神経前駆細胞を *in vitro* で培養した細胞を用いて細胞免疫染色を行う。今回は神経系前駆細胞の発生時期による変化と FGF2 の有無による変化を観察する。

結果

画像は添付した紙の通りである。理想的な画像をとることができた昨年之物と比べると GFP の蛍光が少ないことが顕著にみて取れる。またニューロンの形成も見ることが出来るが昨年のものほどではないという結果であった。

考察

3DIV の FGF2 の有無から TuJ1 の蛍光の変化がみられる。FGF2 によって神経細胞の複製が活発になって神経系前駆細胞ニューロンへの分化が進んだということが考えられる。また、9DIV ではアストロサイトの発達が顕著であった。以上の結果から培養 3 日目付近では神経系前駆細胞からニューロンへの分化が活性化し、培養 9 日目付近では神経系前駆細胞からアストロサイトへの分化が活性化することが推測される。

課題

Pytohn の外部ライブラリである Pandas を用いて、Nocth に関連する遺伝子とそうでないものとそれぞれについて、発現量の変化が時期によって大きく変化するものをソートし、その中でも特徴的なものについて調べた。

1. Notch 関連遺伝子

図のように発生が進むにつれて発現量が大きく減少する Notch1 遺伝子について調べた。Notch1 については以下のようなことがわかっている。

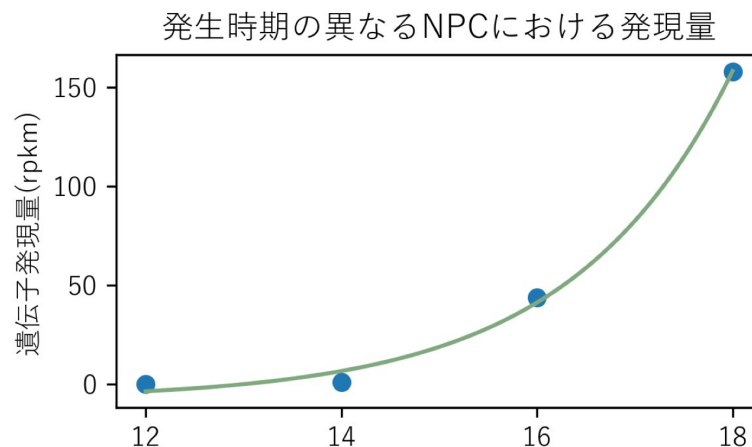
- Notch1 の細胞内ドメインは核移行することで未分化性の維持に関わる Hes1/5 と Notch のリガンドである Delta の発現を誘導する。
- Notch1 をノックアウトした胎児では胎生中期に神経幹細胞の激減し死に至る。
- 神経幹細胞において Notch3 と共に強制発現すると神経幹細胞からアストロサイトへの分化が誘導される。

これらの結果から Notch1 は神経幹細胞の未分化の維持に重要な役割を果たし、ニューロンやアストロサイトの数を適切に制御するという役割があると考えられる。

分化段階	E12	E13	E14	E16
発現量 (rpkm)	66.03	29.865	7.85	2.85

2. 非 Notch 関連遺伝子

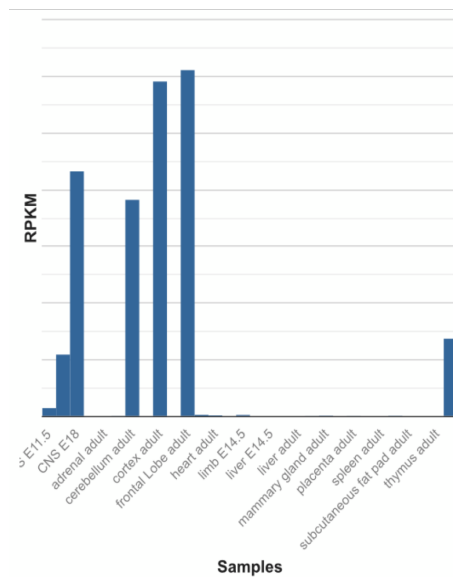
図のように発現量が大幅に上昇する Slco1c1 について調査した。



Slco1c1 は脳での発現量が多く、有機アニオントランスポーター Oatp1c1 をコードするがわかっている。Oatp1c1 は T4(チロキシン) を選択的に細胞内に取り込むことで甲状腺ホルモンの取り込みに貢献している。

甲状腺ホルモンはミエリン鞘形成に大きく貢献している。これは先天性甲状腺機能障害の脳におけるミエリン鞘の形成異常に甲状腺ホルモンを補填すると回復することからも示されている。

また、発現量が発生後期に上昇することから甲状腺ホルモンがグリア細胞の特にオリゴデンドロサイトに作用することからグリア細胞に特異的に発現すると考えられる。



2 マウス遺伝子型の解析

目的

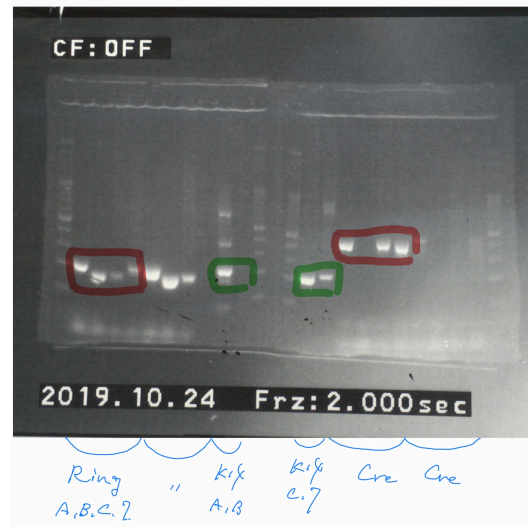
遺伝子破壊について学ぶにあたって、実際にゲノム改変を検出する実験を行う。

手法

与えられた3サンプルと目的試料のDNAをPCR法で培養し、電気泳動でDNAが伸長した結果を観察する。PCRで用いたプライマーで判定する遺伝子はNestin-Cre、RING1B、human K14の3種類である。

結果

電気泳動の結果は以下の画像のようになった。何箇所かはゲルへの注入を失敗するなどの不手際があったが、遺伝子を判定するには十分な量のバンドを得ることができた。



考察

画像で赤く囲まれているように目的試料の RING1B と Nestin-Cre が試料 A と同じ結果になっていることから、目的試料の DNA は試料 A のマウスと同じタイプのもの由来であると判明した。

課題

- (1) GFP 発光オワンクラゲから見つかった緑色蛍光タンパク質である。GFP に UV を照射しても蛍光を発することから、生体蛍光マーカーとして使用されている。GFP をタグとして使うことには生きた細胞でタンパク質の動的な挙動を追跡できるという利点があるため、遺伝子が発現を判別するためのレポーター遺伝子として広く用いられている。

検出までの大まかな流れは以下のようになる。

- 目的のタンパク質をコードしている遺伝子や cDNA を植物用 GFP 発現ベクターに組み込む
- 得られたプラスミドをパーティクルガン法などで標的細胞に導入する。
- 遺伝子が増幅したのちに蛍光を検出する。

- (2) RNA 干渉とは、2 本鎖 RNA が複数のタンパク質と複合体を作り相同な塩基配列をもつメッセンジャー RNA と特異的に対合して切断することによって遺伝子の発現を抑える現象である。RNA 干渉は、ウイルス感染に対する防御機構やゲノムの安定性を保つことにも関わるなど、生体内のさまざまな場面で重要な役割を果たしている。また、マイクロ RNA と呼ばれる短い 2 本鎖 RNA が多くの遺伝子の発現調節をしていることも明らかになってきている。さらに RNA 干渉は遺伝子の機能を人為的に抑制することにも応用できるため、遺伝子機能解析の汎用性の高いツールとしても注目されている。

CRISPR-Cas9 とは、DNA 二本鎖を切断してゲノム配列の任意の場所を削除、置換、挿入することができる新しい遺伝子改変技術である。新たなゲノム編集ツールとして 2013 年に報告され、標的遺伝子の変更や複数遺伝子をターゲットとすることが容易であるため、幅広い種類の細胞や生物種

において、ゲノム編集や修正に利用されている。

3 マウス大脳新皮質の構造の観察

目的

ゴルジ染色及び免疫組織染色した野生型のマウスと Reeler マウスの大脳の神経細胞の形態や層構造を観察し、比較する。

手法

実験1で行った細胞免疫染色を大脳組織切片について行う。野生型のマウスと Reeler マウスの大脳組織切片を顕微鏡で観察し記録する。

結果・考察

スケッチを含む観察結果などは別途提出済みである。

課題

生物の進化の過程において哺乳類の脳は他の脳領域を覆い隠すほどに拡大している。他の動物とは異なり脳の層構造が“inside-out”様式をもって形成されるのは辺縁帯に局在する Cajal-Retzius 細胞から分泌される Reelin が重要な役割をとされている。近年の研究で Reelin は移動の終点の近くにおいてニューロンの移動様式の変換を促進することや、細胞骨格を制御すること、そののちにニューロンを集合させる機能をもつことなどが明らかにされた。また、産生されたばかりのニューロンはサブタイプの決定において可塑性をもつことが明らかにされ、ニューロンの移動により適切に配置された場所において特殊な細胞外環境に曝露されることにより、その場所に応じた特異的なサブタイプに分化するよう制御されるしくみの存在が示された。このような研究結果から、神経細胞が脳内を移動して特異的に分化することが脳の高次的な機能の獲得につながったと言えるだろう。神経細胞の移動をよりダイナミックに行うには、脳の層構造が内から外に広がるように堆積していく方がより大きい移動距離を稼げるからと推測される。

参考資料

- <http://www.f.kpu-m.ac.jp/k/jkpum/pdf/123/123-9/nomura09.pdf>
- <https://www.s.u-tokyo.ac.jp/ja/story/newsletter/keywords/04/03.html>
- <https://www.cosmobio.co.jp/product>
- https://www.promega.co.jp/pdf/reporter_guide.2015.pdf