

# 学位論文

ニワトリ胚の脳において高度に発現する  
軸索性 RNA

Axonal RNAs highly expressed  
in the brain of chicken embryos

岩手大学大学院連合農学研究科  
寒冷圏生命システム学専攻

小野寺 望

# 目次

## 第1章 研究の背景

- 1.1 軸索におけるタンパク質合成、リボソーム、そして mRNA の発見
- 1.2 軸索性タンパク質合成、リボソーム、および mRNA の由来に関する議論
- 1.3 軸索性 mRNA がコードするタンパク質の種類と役割、それらの翻訳調節
- 1.4 軸索性 mRNA の輸送機構
- 1.5 本研究の起点

## 第2章 実験結果

- 2.1 ニワトリ後期胚の脳における複数の高レベル軸索性 mRNA の発見
- 2.2 ISH 染色の特異性の検討
- 2.3 他の軸索性 mRNA プロファイリング研究の結果との比較
- 2.4 ニワトリ胚の脳において高レベル軸索性 RNA は E14 で初めて検出される
- 2.5 調べた限りニワトリ後期胚において高レベル軸索性 mRNA がコードするタンパク質は軸索において検出されない
- 2.6 調べた限りマウスでは軸索性 mRNA は検出されない
- 2.7 ニワトリ後期胚中脳視蓋において高レベル軸索性 RNA を発現するニューロンは SGC 中の大型投射ニューロンであるらしい
- 2.8 後期胚における SGC 中の大型投射ニューロンの前駆体候補である初期胚の DTmesV ニューロンは GAP-43 陰性である

## 第3章 考察

## 第4章 実験方法・材料

- 4.1 動物
  - 4.1.1 ニワトリ
  - 4.1.2 マウス
- 4.2 cDNA 断片のサブクローニング
- 4.3 切片作製と ISH
  - 4.3.1 パラフィン切片作製法
  - 4.3.2 凍結切片作製法
  - 4.3.3 *in situ* ハイブリダイゼーション (ISH)
- 4.4 免疫蛍光抗体法
  - 4.4.1 パラフィン包埋切片の前処理
  - 4.4.2 凍結切片の前処理
  - 4.4.3 切片免疫蛍光抗体法

#### 4.4.4 TSA Plus Biotin System

#### 4.5 ノザンブロット解析

#### 4.6 脂溶性蛍光色素による軸索の逆行性標識

### 第5章 参考文献

### 第6章 謝辞

## 第1章 研究の背景

### 1.1 軸索におけるタンパク質合成、リボソーム、そして mRNA の発見

細胞はしばしば極性を持ち、その極性は眼に見える構造として顕在化する (Martin & Ephrussi, 2009)。例えば、上皮細胞は頂端側に微絨毛を持つ一方、基底側にはヘミデスモソームを持つ。また脊椎動物の典型的なニューロンは、複数の樹状突起を伴う細胞体と一本の長い軸索から成る。mRNA はしばしば、そのような極性に応じて細胞内の特定の場所に局在する (ショウジョウバエ受精卵の前端に局在する bicoid mRNA や繊維芽細胞の葉状仮足に局在する  $\beta$  アクチン mRNA、ニューロンの樹状突起に局在するカルシウムカルモジュリン依存性タンパク質キナーゼ  $\alpha$  鎖 (CamKII  $\alpha$ ) mRNA など)。

以前、ニューロンの軸索にはリボソームや mRNA は存在せず、タンパク質合成は起こらないと考えられてきた。1960 年台の後半には、軸索におけるタンパク質合成やリボソームの存在を、1990 年前後には軸索性 mRNA の存在を示唆するデータが報告され始めたが、それらの存在はすぐには受け入れられなかった。実際、2006 年に執筆された教科書には、軸索ではタンパク質合成が起こらないとの記述がある (Bears *et al.*, 2006)。

Koenig (1967) は、コリン作動性末梢神経における、不可逆的不活性化後のアセチルコリンエステラーゼ活性の回復が、新しいタンパク質合成に因ることを示唆した。また、Giuditta *et al.* (1968) はグリアの混入の可能性が哺乳類よりも少ないイカの巨大軸索において、タンパク質合成を報告した。

Tennyson (1965, 1970) はウサギ胚の背根神経節の神経芽細胞において、初めて軸索にリボソームが存在することを報告した。引き続き、成体のミエリン化した軸索 (背根神経節軸索) においてもリボソーム様小体の存在が報告された (Zéléna, 1970, 1972)。その後、エネルギーフィルタ型透過電子顕微鏡を用いた解析により、無脊椎動物 (巨大軸索を持つイカ星状神経細胞) の非ミエリン化軸索 (Martin *et al.*, 1989) や脊椎動物のミエリン化軸索において [キングョのマウスナー軸索 (Koenig & Martin, 1996) ; ラットおよびウサギ脊髄神経根軸索 (Koenig *et al.*, 2000)]、軸索にリボソームが存在することの直接的証拠が示された。

軸索性 mRNA の存在に関する報告はやや遅れて、1980 年台後半に初めてあった。Giuditta *et al.* (1986) は、イカの巨大軸索で、 $\beta$  アクチンや  $\beta$  チューブリンをコードする mRNA を発見し、それらの一部はリボソームと結合している、すなわち翻訳上活性であることを示した。脊椎動物では Jirikowski *et al.* (1990) が、下垂体ニューロン軸索でオキシトシンの軸索性 mRNA を検出した。

## 1.2 軸索性タンパク質合成、リボソーム、および mRNA の由来に関する議論

このように軸索におけるタンパク質合成やリボソーム、mRNA の存在の報告が始めた一方、議論になったのは、それらのデータの信頼性に加え、リボソームや mRNA の起源が、グリアなど周囲の細胞なのか、それともニューロンの細胞体であるのか、ということであった。例えば、通常の電子顕微鏡法では、成長円錐を含む軸索において常にリボソーム（あるいはリボソーム RNA）が観察されるとは限らず（例えば、Lasek *et al.*, 1973; Ellis *et al.*, 1985; Mohr & Richter, 1992）、また、オートラジオグラフィーを用いた初期の研究においては、軸索原形質とミエリンやシュワン細胞を区別するための解像度が問題となった（Edström, 1966; Fischer & Litvak, 1967）。更に、無脊椎動物でグリアからタンパク質が軸索に（Lasek *et al.*, 1974）、哺乳類ではリボソームもグリアから軸索に輸送されることが示唆された（Li *et al.*, 2005）。但し、リボソームのグリアから軸索への輸送が mRNA を伴うかについては結論が出ていない（Sotelo *et al.*, 2013）。加えて、シナプス標的から mRNA が逆行輸送されるということも報告された（Jirikowski *et al.*, 1992; Maciejewski-Lenoir *et al.*, 1993）。周囲の細胞から mRNA もタンパク質も共に輸送される可能性があるということは、軸索においてタンパク質合成が局所的に起こるかどうかが、と言う点に関しても議論を引き起こした。

軸索でのタンパク質合成が初めて明確に示されたのは、イカ神経前終末由来のシナプトソームにおいてであった（Crispino *et al.*, 1997）。脊椎動物の系では、Eng *et al.* (1999) が、ラット上頸神経節の軸索 mRNA が局所的に新しいタンパク質に翻訳されるだけでなく、 $\beta$ アクチンのごく一部のみが交感ニューロンの軸索区画で生ずることを、区画化培養系を用いて示した。

軸索性 mRNA の存在をよりはっきり示す証拠、あるいは細胞体に由来する mRNA やリボソームの存在を示す証拠も得られていった。Olink-Coux & Hollenbeck (1996) は、ニワトリの交感ニューロンの培養において蛍光 *in situ* ハイブリダイゼーション (FISH) により軸索性ポリ A<sup>+</sup> RNA を、更に軸索由来 mRNA の RT-PCR により、チューブリンと  $\beta$ アクチンの軸索性 mRNA の存在を明らかにした。彼らはまた、阻害剤を用いて軸索性 mRNA の存在がアクチン繊維ではなく微小管に依存することも示した。更に、区画化培養系を用いて、細胞体から軸索への RNA の輸送が脳皮質ニューロンの分散培養において確認された（Taylor *et al.*, 2009）。一方、ラット坐骨神経軸索中のリボソームの分布の解析により、リボソームが微小管による速い軸索輸送により末梢の軸索領域に輸送される可能性が示唆されている（Kun *et al.*, 2007）。

細胞体から切断された培養中の軸索における研究も、軸索性タンパク質合成の存在の証明に寄与している。Campbell & Holt (2001) は、*Xenopus* の網膜神経節細胞の細胞体から単離した軸索において、ネトリン1やセマフォリン3Aに対する化学向性反応がタンパク質合成阻害剤により阻止されることを見出した。このことも軸索内で局所的翻訳が起こることを示している。また、細胞体から切断された再生中の感覚軸索の成長円錐の維持にも局所的翻訳が必要であることが示唆されている (Zheng *et al.*, 2001)。

### 1.3 軸索性 mRNA がコードするタンパク質の種類と役割、それらの翻訳調節

Lee & Hollenbeck (2003) は培養交感神経を用いて、細胞で起こる全タンパク質合成の5~10%が軸索区画で起こることを報告した。様々な種類の神経細胞の軸索で合成されるタンパク質は共通して存在する(細胞骨格タンパク質など)ものがあると共に、その型の神経細胞で特に多く見られるものもあることが、網羅的なRNAプロファイリングにより明らかになりつつある。例えば、Willis *et al.* (2007) は、培養開始7日前に損傷した再生中のラット成体感覚ニューロンを16~20時間培養後、軸索 mRNA のプロファイリングを行い、タンパク質合成、代謝、細胞骨格、シグナル伝達、シャペロン、タンパク質分解、細胞内輸送に関わるタンパク質やチャネルタンパク質、核酸結合タンパク質、神経伝達物質といった幅広いタンパク質をコードする軸索性 mRNA を同定した。Taylor *et al.* (2009) は、18日目ラット胚の脳皮質ニューロンを13日培養後 mRNA プロファイリングを行い、翻訳、輸送、細胞骨格、ミトコンドリアの機能に関連するタンパク質をコードする mRNA が豊富であることを示した。また Gummy *et al.* (2011) は、E16 および成体ラット由来の背根神経節ニューロンを4日培養後、軸索性 mRNA のプロファイリングを行い、胚の軸索は軸索伸長に関わる細胞骨格関連タンパク質をコードする mRNA に富む一方、成体の軸索は慢性疼痛や神経障害性疼痛に関わる免疫反応関連分子をコードする mRNA に富むことを示した。このことは、痛覚に軸索性翻訳が必要であるという報告と密接な関連があると考えられる (Jiménez-Díaz *et al.*, 2008; Géranton *et al.*, 2009)。

Zivraj *et al.* (2010) はマウスと *Xenopus* の網膜神経節細胞の成長円錐中の mRNA プロファイリングを行い、タンパク質合成、酸化的リン酸化、ガン、神経疾患、およびシグナル伝達に関わるタンパク質をコードする mRNA に富むことを見出した。彼らは *Xenopus* の経路探索中の成長円錐より、標的に達したもののほうが mRNA の数が多く複雑度も高く、多くの前シナプスタンパク質 mRNA も特異的に含むことを

見出した。更に、それ以外の軸索部分に比べ成長円錐に豊富な mRNA が存在することや、EphB4 mRNA が経路探索中のニューロンの細胞体にも標的に達したものの細胞体にも豊富である一方、成長円錐に関しては後者のそれで特異的に検出されることも報告している。

軸索性 mRNA がコードするタンパク質のうち機能が比較的はっきりしているものの多くは、成長円錐の機能と関連した細胞骨格タンパク質やその調節に関わるタンパク質、例えばβアクチンやコフィリン、RhoA、Par3 などである (Leung *et al.*, 2006; Yao *et al.*, 2006; Piper *et al.*, 2006; Wu *et al.*, 2005; Hengst *et al.*, 2009)。これらの局所的翻訳はネトリン1、BDNF、Slit2、セマフォリン3A といったシグナル分子がトリガーを引くことが示されている (総説として Lin & Holt, 2007; Jung *et al.*, 2012)。これらに加えて、ニワトリ交連軸索における EphA2 の局所的翻訳が、成長円錐の反応性に影響を及ぼす可能性が指摘されている (Brittis *et al.*, 2002)。なお、局所的翻訳は 48 時間を越えても軸索伸長に必要ないことが示されている (Blackmore & Letourneau, 2007)。

軸索性 mRNA は軸索から細胞体への逆行性シグナル伝達にも関与することが示されている。例えば、培養背根神経節ニューロンにおいて CREB の軸索性翻訳は、細胞体の核に於いてリン酸化 CREB の蓄積を引き起こし、NGF が誘導する逆行性の生存に必要であることが示されている (Cox *et al.*, 2007)。また三叉神経では、BDNF と BMP4 の同時刺激により眼および上顎分枝中の軸索において Smad1/5/8 が局所的に翻訳され、逆行的に輸送されたリン酸化 Smad1/5/8 が三叉神経節内におけるニューロンのアイデンティティの獲得に重要な役割を果たすことが報告されている (Ji & Jaffrey, 2012)。

また、軸索性 mRNA の局所的翻訳は、軸索再生にも必要であることが示されている (総説として Willis & Twiss, 2006)。軸索損傷後、核移行シグナルを持つタンパク質の細胞質-核輸送に関与するインポータインβの軸索性 mRNA は局所的に翻訳され、生じたインポータインβは既存のインポータインαと複合体を形成し、ダイニンによる逆行輸送によりカーゴ(積み荷)を細胞体へ輸送する (Hanz *et al.*, 2003)。カーゴとして重要なのは、軸索損傷後急速に活性化される (Chierzi *et al.*, 2005) Erk1/2 (MAP キナーゼ) である (Sung *et al.*, 2001; Reynolds *et al.*, 2001)。但し、リン酸化された Erk1/2 はインポータインに直接結合しない。中間径繊維ビメンチンの mRNA は培養背根神経節軸索で翻訳され (Willis *et al.*, 2005)、坐骨神経挫滅後ビメンチンの軸索原形質レベルが上昇するが、インポータインと Erk をつなぐのはビメンチンのタンパク質分解された断片である (Perlson *et al.*, 2005)。軸索損傷後、

転写因子 STAT3 の軸索性 mRNA が局所的に翻訳され、ダイニンやインポーティン  $\alpha$  5 により逆行輸送された STAT3 が感覚ニューロンの生存を調整することも報告されている (Ben-Yaakov *et al.*, 2012)。線虫でも軸索再生時に転写因子 CEBP-1 の局所的翻訳が起こることが報告されている (Yan *et al.*, 2009)。

さらに、*Xenopus* オタマジャクシ幼生の網膜神経節細胞軸索において、通常は核膜に結合する中間径繊維タンパク質ラミン B2 の mRNA が局所的に翻訳され、ミトコンドリアに結合してその機能を維持することにより、軸索の変性を防いでいることが示されている (Yoon *et al.*, 2012)。その他、新しく形成された終末ボタンの  $\beta$  カタニンの局所的翻訳は、シナプス小胞放出動態を調節することが報告されている (Taylor *et al.*, 2013)。

#### 1.4 軸索性 mRNA の輸送機構

軸索性 mRNA のうち輸送機構が最も良く研究されているのが、 $\beta$  アクチン mRNA である。そのシスエレメントのうちで、軸索を含む細胞末梢への  $\beta$  アクチン mRNA の輸送に非常に重要であるのは、その 3' 非翻訳領域 (UTR) に存在する 54 ヌクレオチド長の zipcode である (Kislauskis *et al.*, 1994; Zhang *et al.*, 2001; Willis *et al.*, 2011)。この zipcode に結合するのが zipcode 結合タンパク質 1

(ZBP1/IMP1/IGF2BP1) であり、 $\beta$  アクチン mRNA の局在、安定性、あるいは翻訳調節に関与することが示されている (Ross *et al.*, 1997; Farina *et al.*, 2003; Huttelmaier *et al.*, 2005)。ZBP1 はそれ自身も含め 3 つのメンバーから成るファミリーを構成する (総説として、Yisraeli, 2005; Bell *et al.*, 2013)。これらのメンバーは 2 つの RNA 認識モチーフ (RRM) とそれに引き続く 4 つの hnRNP K 相同 (KH) ドメインを持つ。 $\beta$  アクチンは BDNF の刺激により局所的に翻訳されるが (Yao *et al.*, 2006)、その際には ZBP1 が Src 依存的にリン酸化されることが必要である

(Sasaki *et al.*, 2010)。 $\beta$  アクチンの zipcode と他の軸索性 mRNA の塩基配列を比較しても、相同性を示す領域が見つかっていなかったため、ZBP1 の結合に関するコンセンサス配列は不明であったが、最近、第 3 および第 4 の KH ドメインが、適切に間隔をおいた 5' 配列 (CGGAC) と 3' 配列 ([C/A]CA[C/U]) 配列を認識することが明らかになった (Patel *et al.*, 2012)。

一方、ZBP1 タンパク質の存在量が  $\beta$  アクチンや GAP43 の mRNA の軸索局在を制限しているということが示されている (Donnelly *et al.*, 2011)。GAP-43 mRNA の場合、その 3' UTR は  $\beta$  アクチンのそれと相同性を示さないが、3' UTR 中の高 AU 調節配列 (ARE) はその軸索局在に必要な十分であり、ZBP1 は HuD/Elavl4 と複合体を形成して ARE を通じて GAP-43 mRNA を軸索に局在化させることが提唱され



ている (Yoo *et al.*, 2013)。HuD は培養 P19 ニューロンの軸索・成長円錐でも、ZBP1 や KIF3A と共に tau mRNA と複合体を形成することが報告されている (Aronov *et al.*, 2002; Atlas *et al.*, 2004)。

更に、 $\beta$ アクチン mRNA の成長円錐への局在や翻訳を hnRNP-R と共に調節する SMN (Rossoll *et al.*, 2003) も HuD と相互作用することが示されている (Akten *et al.*, 2011; Fallini *et al.*, 2011; Hubers *et al.*, 2011)。SMN は脊髄性筋萎縮症 (SMA) の原因遺伝子であり、スプラセオソームの核内低分子リボ核タンパクの集合において機能することが良く知られている (総説として Li *et al.*, 2014)。SMN はポリリボソームに結合することで翻訳を抑制できるが (Sanchez *et al.*, 2013)、その標的であるコアクチベーター結合型アルギニンメチル基転移酵素 1 (CARM1) mRNA がコードする CARM1 は HuD をメチル化することにより、p21 mRNA と HuD の相互作用を下方調節する (Hubers *et al.*, 2011)。最近、SMN が miR-183/mTOR 経路を介して軸索における局所的翻訳を調節することが報告されている (Kye *et al.*, 2014)。

$\beta$ アクチンや GAP-43 mRNA 以外にも幾つかの軸索性 mRNA において局在機構が研究されている。シャペロンタンパク質カルレティキュリンの 3'UTR には哺乳類のオルソログ間で保存された 2 つの領域が存在し、それらの領域は軸索や樹状突起への輸送に十分である (Vuppalachchi *et al.*, 2010)。そのうち片方のみが、ニューロトロフィン 3 やミエリン関連糖タンパク質 (MAG) が誘導する軸索輸送を仲介する。オルタナティブポリ A 付加により、軸索に局在する mRNA が異なる 3'UTR を持つ例 (ミオイノシトールモノホスファターゼ 1) も知られている (Andreassi *et al.*, 2010)。また、ニューリチン/CPG15 mRNA の場合、3'UTR よりも主として 5'UTR が軸索局在に関与する (Merianda *et al.*, 2013)。これらの系において、 $\beta$ アクチン mRNA と同様の調節機構が機能しているか、一部、あるいは全く異なる調節因子による調節が行われているかは不明である。

## 1.5 本研究の起点

中脳視蓋は、哺乳類を除く脊椎動物の視覚情報処理の中枢である。ニワトリの成熟した中脳視蓋は 16 層、視神経線維層 (SO)、浅灰白線維層 (SGFS) A~J、中心灰白層 (SGC)、中心白層 (SAC)、脳室周囲灰白層 (SGP)、脳室周囲線維層 (SFP)、および上衣細胞層から成る (Ramón y Cajal, 1911; LaVail & Cowan, 1971; Hunt & Brecha, 1984; Dubbeldam, 1997)。これらの層には、異なる型の網膜神経節細胞が軸索を投射することが示されている (van Gehuchten, 1892; LaVail & Cowan, 1971; Acheson *et al.*, 1980; Yamagata & Sanes, 1995)。脊椎動物の脳が領域化後、

構造の複雑化を更に進めていくプロセスを分子レベルでより深く理解するため、ニワトリの中期から後期胚の中脳視蓋において、層構造特異的に発現する遺伝子（主に転写因子をコードするもの）のスクリーニングを *in situ* ハイブリダイゼーション法（ISH）により行っていたところ、幾つかの遺伝子に関し、後期胚で線状のシグナルが検出された。シグナルが検出された部位や、染色の形状から、軸索性 mRNA を検出したのではないかと考えられた古典的な ISH により、軸索性 mRNA のシグナルがこれほど強く検出された。例は殆ど無いので、研究の対象をこれらのシグナルに変更することにした。

## 第2章 実験結果

### 2.1 ニワトリ後期胚の脳における複数の高レベル軸索性 mRNA の発見

ニワトリ中脳視蓋の層構造形成過程の分子機構を明らかにするため、層特異的に発現する可能性がある主として転写因子をコードする候補遺伝子の ISH によるスクリーニングを行った（小野寺望、修士論文「ニワトリ胚中枢神経系における *Scrt2* の発現と機能解析」、2012 年）。その結果、*Scratch2* や *NeuroD6*（マウス *Math2* のホモログ）、*Cash1/Ascl1*（マウス *Mash1* のホモログ）、*Ascl3*（マウス *Mash3* のホモログ）といった幾つかの遺伝子が、孵卵開始 9 日目（E9）の中脳視蓋で層構造特異的に発現することを見出した。次に、これらを含む遺伝子のうちの幾つかに関し、E18 の脳における発現を ISH により解析したところ、一方向に揃った線状の強い発現パターンを示す遺伝子が存在することを見出した（図 2.1.1）。これら遺伝子のシグナルが神経軸索を多く含む視蓋の SAC で主として見られたこと、そしてそのシグナルが線状であることは、これらの遺伝子の転写産物が神経軸索に局在している可能性を示唆する。SAC 以外では幾つかの遺伝子に関し、一部の切片において視神経の軸索が通る SO でも線状のシグナルが検出された（図 2.1.1、図 2.1.2）。SO のシグナルは背側の水平断切片でよく観察される印象を持った。もし、この印象が正しければ、視蓋は後期胚までに前方へ少し回転するので、鼻側網膜の神経節細胞軸索が伸びる部分で線状のシグナルが観察される、ということになる。

以下の研究では、特に *Scratch2* 遺伝子とアミロイド前駆タンパク質（APP）遺伝子に焦点を当てつつ行った。*Scratch2* 遺伝子は zinc finger 転写因子をコードし、神経前駆細胞の移動に関与することが示されている（Nieto, 2002; Itoh *et al.*, 2013）。APP は、病理学的にはアルツハイマー病の原因物質として疑われている A $\beta$  を生ずる一方、正常な神経において多面的な生理学的役割を果たすと考えられている（総説として Müller & Zheng, 2012）。例えば、発生中のニワトリ胚視蓋では、網膜神経節細胞の軸索伸長に関わることが示されている（Osterfield *et al.*, 2008）。

図 2.1.1 に示す ISH で検出したシグナルが、神経軸索に対応することを証明するために隣接切片において、上記の実験で線状の染色を示した *Scratch2* 遺伝子の ISH と、神経軸索を特異的に染色する抗アセチル化チューブリン抗体を用いた免疫蛍光染色を行ったところ、ISH の染色パターンと似た、線状の蛍光パターンが見られた（図 2.1.3）。更に、同一切片上で *Scratch2* の蛍光 ISH と抗アセチル化チューブリン抗体による免疫蛍光抗体法による二重染色を行ったところ、蛍光の重複が見られた（図 2.1.4、黄色の蛍光）。これらのデータは、図 2.1.1 の ISH で得られたシグナルが神経軸索におけるものであり、軸索性 mRNA を検出したことを示す。

## 2.2 ISH 染色の特異性の検討

ISH で検出された軸索におけるものと思われる染色が特異的なものであるか調べるために、対照実験を行った (図 2.2.1)。対照実験において、(1) 脱パラフィン後、標本に発色液のみ添加したもの、(2) プローブを含まないハイブリダイゼーション溶液を用いたもの、(3) pBluescript II SK(+) 由来のプローブを用いたもの、の何れもシグナルを生じなかった。

更に、古典的には対照実験として行われるセンスプローブを用いた ISH を行った (図 2.2.2、図 2.4.5)。Scratch2、APP のセンスプローブは、それらのアンチセンスプローブと同様の染色パターンを中脳視蓋において示した。即ち、中脳視蓋では軸索性 mRNA と同じ分布パターンをアンチセンス RNA が示した。一方、端脳では、Scratch2 のセンスプローブによる染色は、そのアンチセンスプローブと異なり、見られなかった。このことは、筆者が検出した ISH 染色の特異性を裏付ける。

次に、アンチセンス RNA の存在をさらに確認するため、ニワトリ後期胚 (E18) の脳から RNA を抽出し、ノザンブロット解析を行った。その結果、Scratch2 と APP に関し、センスおよびアンチセンスプローブの両方でバンドが観察された (図 2.2.3)。このデータは、ニワトリ後期胚の脳におけるアンチセンス RNA の存在を更に支持する。

更に、検出した線状の ISH 染色が特異的であることの別の証拠としては、他にも多くの軸索が標本中に存在するにも関わらず、それらの軸索においては強い染色が見られないことも挙げられる。

## 2.3 他の軸索性 mRNA プロファイリング研究の結果との比較

図 2.1.1 に示す実験で同定した軸索性 mRNA のうち、これまでに行われた軸索性 mRNA に関するプロファイリング研究 (Taylor *et al.*, 2009; Zivraj *et al.*, 2010; Gumy *et al.*, 2011) で同定されているものを調べたところ、表 2.3.1 に示すように、12 の遺伝子に関し、それらの研究でも軸索性 mRNA として同定されていることが分かった。

## 2.4 ニワトリ胚の脳において高レベル軸索性 RNA は E14 で初めて検出される

次にニワトリ後期胚 (E18) で観察された高レベル軸索性 RNA がいつ頃出現するかを明らかにするため、Scratch2 のアンチセンスプローブおよびセンスプローブを用いて E9, E12, E14, E16 胚の脳切片において ISH を行った (図 2.4.1~5)。その結果、両プローブとも、E14 の試料で初めて軸索性 RNA を検出した。

## 2.5 調べた限りニワトリ後期胚において高レベル軸索性 mRNA がコードするタンパク質は軸索において検出されない

筆者が検出した高レベル軸索性 mRNA が軸索において局所的に翻訳されているかどうかを、ニワトリ後期胚 (E18) において、Scratch2 および APP に関して調べた。抗 Scratch2 抗体または抗 APP 抗体と、抗ニューロフィラメント M (NF-M) 抗体による蛍光二重染色を行ったが、軸索において抗 Scratch2 抗体および抗 APP 抗体によるシグナルは検出されなかった (図 2.5.1、図 2.5.2)。このことは少なくとも、調べた発生段階において、これらの軸索性 mRNA は局所的に翻訳されていないことを示す。

## 2.6 調べた限りマウスでは軸索性 mRNA は検出されない

本研究で検出した高レベル軸索性 mRNA がどの程度普遍的に見られる現象かを、マウスにおいて調べた。マウス後期胚 (E17)、新生仔 (出生後 0 日目 (P0)、P5、P10、P15)、成体の脳において、Scratch2 mRNA、APP mRNA、そして軸索性 mRNA として最も良く研究されている  $\beta$  アクチン mRNA の分布を ISH で解析した (図 2.6.1~5)。しかし、何れの場合も、ニワトリ後期胚で検出されたような高レベルのシグナルは軸索において検出されなかった。

Ji & Jaffrey (2012) は、マウス三叉神経において Smad1/5/8 の軸索性 mRNA の局所的翻訳とそれにより生成された Smad1/5/8 転写因子の逆行輸送がニューロンの運命に影響を与えることを示しているが、彼らはまた、マウス E12.5 胚における Smad1/5/8 の三叉神経軸索における ISH データも提示している。このデータにおいてそれらの軸索性 mRNA のシグナルのレベルは非常に低い。筆者は、このデータに関する追試を行ったが、彼らと同様、マウス E12.5 胚の三叉神経軸索における Smad1 の発現レベルは大変低いことを確認した (図 2.6.6)。

## 2.7 ニワトリ後期胚中脳視蓋において高レベル軸索性 RNA を発現するニューロンは SGC 中の大型投射ニューロンであるらしい

ニワトリ後期胚中脳視蓋で見られる高レベル軸索性 RNA を伴う神経軸索の細胞体の位置を特定するため、脂溶性蛍光色素 DiI による軸索の逆行性標識実験を行った (図 2.7.1)。高レベル軸索性 RNA が見られる中脳視蓋後部の SAC に DiI を埋め込んだところ、逆行性に標識された細胞体の多くが、SGC に位置する大型投射ニューロンであった。

## 2.8 後期胚における SGC 中の大型投射ニューロンの前駆体候補である初期胚の DTmesV ニューロンは GAP-43 陰性である

一般的に脳室に近い層のニューロンは軟膜側の層のニューロンよりも早い発生段階に生ずるとされている。ニワトリ胚の発生初期に中脳背側で生じ、後方に軸索を伸ばすニューロンは DTmesV ニューロンと視蓋延髄路ニューロンである (Ware & Schubert, 2011)。中脳視蓋 SGC 付近から延髄に伸びる軸索の起始部に存在するニューロンは、これらのニューロンである可能性がある。そこで、両初期ニューロンの発生を観察するため、一般的に発生中の胚において汎ニューロンマーカーとされている GAP-43 に対する抗体を用いて初期胚の染色を行ったところ、DTmesV ニューロンが GAP-43 陰性であることを見出した (図 2.8.1、図 2.8.2、Onodera *et al.*, 2013)。また、GAP-43 が終神経で強く発現することも見出した。

### 第3章 考察

本研究において、筆者はニワトリ後期胚の脳の一部の軸索に通常の ISH により容易に検出が可能な高いレベルで多様な RNA が存在することを見出した。このような高レベル軸索性 RNA が同じぐらいの発生段階のマウスの脳で検出できるかに関し、少数の遺伝子に関し解析を行ったが、マウスでは検出されなかった。筆者が知る限り通常の ISH により軸索で RNA が、筆者が検出したようなレベルで見出された例は、*Xenopus* のオタマジャクシ幼生の網膜神経節細胞軸索におけるラミン B2 mRNA のみである (Yoon *et al.*, 2012)。一般的にある系において、何かが存在しないことを証明するのは大変難しい。ただ、哺乳類神経細胞では ZBP1 の存在量が軸索性 RNA の量を制限しているという報告があり (Donnelly *et al.*, 2011)、そのことがマウスで高レベルの軸索性 RNA が検出されないことと関係があるのかもしれない。ニワトリや *Xenopus* の神経細胞では哺乳類に比した ZBP1 の存在量がどのようになっているのか興味を持たれる。軸索性 mRNA は軸索再生にも寄与するので (総説として Willis & Twiss, 2006)、軸索性 mRNA の量が制限されていることは軸索再生能力の制限につながっている可能性がある。*Xenopus* オタマジャクシ幼生の視神経は再生することが知られている (総説として Tanaka & Ferretti, 2009)。このことと *Xenopus* の網膜神経節細胞軸索でラミン B2 mRNA が高いレベルで存在することを考え合わせると、ニワトリ後期胚で高レベル軸索性 mRNA を有するニューロンの軸索再生能が哺乳類に比べ高いかどうか、興味のあるところである。この観点から、ニワトリの高レベル軸索性 RNA の局在機構を明らかにすることは、軸索再生研究に貢献するかもしれない。

筆者は、ニワトリ後期胚の脳において、Scratch2 と APP に関し、アンチセンス RNA が存在し、それらの分布が高レベル軸索性 mRNA と一部重複する、もしくは同じ分布をすることを見出した。古典的な実験では ISH において、センスプローブを負の対照実験として用いることが多かった。しかし、近年のシーケンシング技術の格段の進歩により、ゲノムの大半の部分が転写されることが明らかになっている (Hangauer *et al.*, 2013) ことを鑑みると、センスプローブでシグナルが検出されたことは驚くに当たらない。アンチセンス RNA のうち、miRNA については軸索において少数の報告がこれまでにある (Natera-Naranjo *et al.*, 2010; Sasaki *et al.*, 2014)。本研究で調べた発生段階では、Scratch2 および APP タンパク質は軸索で検出できなかった。このことは高レベル軸索性 mRNA を有する軸索において翻訳調節が行われていることを示唆する。筆者が同定した軸索性アンチセンス RNA がどのような構造をとっているか、あるいはそれが miRNA へとプロセッシングされるのかに

については不明であるが、何らかの形でそのような翻訳調節に関与している可能性はある。

*Scratch2* はマウス大脳皮質において神経前駆細胞の移動に関与することが示されている (Itoh *et al.*, 2013)。もし、軸索性 *Scratch2* mRNA が翻訳されるとしても、その機能は細胞移動とは関係しない可能性が高いと考えられる。

軸索における局所的翻訳は、ニューロトロフィンを含む細胞外シグナル分子の外部刺激により引き起こされる (総説として Lin & Holt, 2007; Jung *et al.*, 2012)。この観点から BDNF や NT-3 のようなニューロトロフィンの mRNA が高レベル軸索性 mRNA として検出されたことは興味深い。軸索性のニューロトロフィン mRNA は、局所的翻訳に関し自己フィードバックループを形成しているのかもしれない。

筆者はヒストン H1F0 の軸索性 mRNA も検出した。ヒストン mRNA は軸索には存在しないとされてきたが (Taylor *et al.*, 2005)、より最近、ラットの背根神経節軸索において、H1F0 を含む幾つかのヒストンの mRNA が検出されている (Gumy *et al.*, 2011)。仮にヒストンが軸索で局所的に翻訳されたとして、それがどのような機能を持つかは不明である。

本研究で検出された高レベル軸索性 RNA を伴う軸索は、中脳視蓋 SGC 付近から延髄に伸びるもの、端脳中央部に後方から伸びるもの、そして中脳視蓋 SO で検出されるものの3種類である。このうち SO は視神経が投射する層であり、恐らく網膜神経節細胞軸索でシグナルが検出されていると考えられる。同じ胚由来の切片でも SO でシグナルが検出されるものとそうでないものがあるので、網膜神経節細胞における高レベル軸索性 mRNA の分布は一樣ではないことが予想される。SO でシグナルが検出された遺伝子には *Pax6* および *Otx2* が含まれる。Yoon *et al.* (2012) は *Xenopus* のオタマジャクシ幼生の網膜神経節細胞軸索でラミン B2 の高レベル軸索性 mRNA を検出しているが、彼らのデータでは *Pax6* の発現レベルが大変低く、この点が本研究と異なる。また、Sugiyama *et al.* (2008) はマウスの網膜神経節細胞で産生された *Otx2* タンパク質が、2つのシナプスを越えて、外側膝状体経由で一次視覚野に達することを示している。本研究で同定した網膜神経節細胞由来と思われる軸索中の *Otx2* 高レベル mRNA が局所的に翻訳されるかどうか、あるいはそのタンパク質が中脳視蓋でシナプスを越えて機能するかどうかは、今後の研究課題である。分泌性タンパク質としては *Otx2* だけでなく *Fgf8* の高レベル軸索性 mRNA も筆者は検出している。マウスの三叉神経で組織レベルで検出限界に近い低いレベルの軸索性 mRNA が局所的に翻訳され機能しているらしいことを鑑みると (Ji &



Jaffrey, 2012)、軸索からシグナル分子が分泌されるような系で、局所的翻訳が見逃されている可能性があると考えられる。

本研究で同定した高レベル軸索性 RNA の由来が細胞体由来のものか、それともグリアなど周囲の細胞に由来するものかは不明である。これらの軸索が由来するニューロンは、その分布から判断するに、何れも投射ニューロンである。前述の通り、SO で検出される軸索は網膜神経節細胞軸索である可能性が高い。一方、端脳中央部に後方から伸びる軸索は起始部が本研究では良く分からなかった。今後、連続切片を系統的に染色し、三次元再構成することにより、起始部を明らかにできるはずである。中脳視蓋 SGC 付近から延髄に伸びる軸索の場合、ISH のシグナルパターンと脂溶性蛍光標識による逆行性標識実験より、少なくとも一部はニューロピリン 1 陽性ニューロンおよび／またはコリンアセチルトランスフェラーゼ陽性ニューロンである可能性が高いと思われる (Yamagata *et al.*, 2006)。

筆者は後期胚の中脳視蓋 SGC 中の大型投射ニューロンの前駆体候補である DTmesV ニューロンが GAP-43 陰性であることを発見した (Onodera *et al.*, 2013)。GAP-43 は軸索伸長に重要であるとされているので (総説として Benowitz & Routtenberg, 1997)、これは予想外の発見であったが、GAP-43 と構造は異なるものの機能的に相同である CAP-23/Basp1 が (Frey *et al.*, 2000)、DTmesV ニューロンで機能しているのかもしれない。あるいは、DTmesV ニューロンでは、GAP-43 が他の初期胚のニューロンと異なる翻訳後修飾をうけ、このため使用した抗 GAP-43 抗体で認識されなかったのかもしれない。

シャルコー・マリートウス病 (CMT)、脆弱 X 症候群 (FXS)、脊髄性筋萎縮症 (SMA) といった幾つかの遺伝性神経疾患が、軸索性翻訳が損なわれることにより発症することが明らかになりつつある (Wallen & Antonellis, 2012; Bassell & Warren, 2008; Li *et al.*, 2014)。高レベル軸索性 RNA の研究の進展は、前述した再生医療の発展に加え、そのような疾患の診断や予後、治療に大きな寄与をするであろう。

## 第4章 実験方法・材料

### 4.1 動物

#### 4.1.1 ニワトリ

本実験で用いたニワトリ有精卵はヤマギシズム生活榛名実頭地より購入した。購入後、ニワトリ有精卵は16°Cの気相インキュベーター中で実験に用いるまで保管した。孵卵開始後、水を満たした容器も同時に入れることで湿度を保ちながら、気相インキュベーターにより38.5°Cで孵卵した。

組織学用の試料を得るために、適当な時間培養した有精卵中の胚から解剖により脳を取り出し、室温で固定した。固定方法は胚の大きさや染色方法に応じて、パラホルムアルデヒド (PFA) 溶液 (4% in PBS) による16時間の固定、もしくはブアン固定液 (ピクリン酸飽和水溶液 : ホルマリン : 氷酢酸 = 15 : 5 : 1) による6~12時間の固定を使い分けた。抗体染色用の試料の場合、抗原性に影響が出るのをできるだけ避けるため、4% PFA 溶液、もしくは氷酢酸を欠くブアン固定液を固定に用いた。

その後、ジエチルピロカーボネート (DEPC) 処理済み PBST (PBS + 0.1% Tween-20) (DEPC-PBST) で洗浄し、50% EtOH/ DEPC-PBST、80% EtOH/ DEPC 処理済み DW (DEPC-DW)、95% EtOH/ DEPC-DW、100% EtOH により脱水を30分~3時間ずつ行い、-20°Cで保存した。凍結切片用の試料の場合、固定後、脱水は行わず、ショ糖による凍結保護処理後、O.C.T. Compound に包埋した (後述)。

#### 4.1.2 マウス

本実験で用いたマウスは、日本クレアより購入した。成体マウスの試料を採取する場合は、頸椎脱臼後、4% PFA 溶液による灌流固定を行ったのち、また幼弱個体の場合は断頭後、解剖により脳を取り出し、4% PFA 溶液中で16時間固定を行った。胚試料を採取する場合は、妊娠マウスを頸椎脱臼後、胎生12.5日胚の場合は解剖により取り出した全胚を、胎生17日目胚の場合は解剖により取り出した脳を、4% PFA 溶液に移し、16時間固定を行った。成体、幼若個体、胚の何れの試料の場合も、固定後、DEPC-PBST で洗浄し、50% EtOH/ DEPC-PBST、80% EtOH/ DEPC-DW、95% EtOH/ DEPC-DW、100% EtOH により脱水を30分~3時間ずつ行い、-20°Cで保存した。

## 4.2 cDNA 断片のサブクローニング

ISH におけるプローブ作製のための鋳型 cDNA 断片の多くは、E2 全胚 E9 脳または E18 脳由来のポリ A<sup>+</sup>mRNA から RT-PCR により単離し、汎用ベクター pBluescript II SK(+) の EcoR V 部位にサブクローニングした。RT-PCR の際に用いたプライマーを表 4.2.1 に記す。一部の鋳型 cDNA は仲村春和研究室からの gift である (表 4.2.1)。

## 4.3 切片作製と ISH

解析に用いた胚試料は多くの場合、全胚として実験処理するには大きすぎるため、胚組織の切片を作製し、解析を行った。切片作製のための方法として、パラフィン切片作製法と凍結切片作製法を用いた。

### 4.3.1 パラフィン切片作製法

目的の試料を脱水処理した後、キシレンによる脱脂を行い、パラフィン浸透し、パラフィンブロックを作製した。これをマイクロトームにより 7~10 $\mu$ m 厚に薄切し、MAS コートスライドグラス (松浪硝子工業) に貼り付けた。

パラフィン切片の場合、ISH に先立ち、キシレンによる脱パラフィン処理と EtOH 置換を行った。

### 4.3.2 凍結切片作製法

固定した試料を PBS で洗浄した後、10%ショ糖溶液/PBS、20%ショ糖溶液/PBS でそれぞれ 1~2 時間置換した後、30%ショ糖溶液/PBS で一晩 (O/N) 置換した。そのあと Optimal Cutting Temperature (O.C.T.) Compound (Sakura, Tissue-Tek 4583) で包埋し、-80 $^{\circ}$ C のディープフリーザーで一晩凍結した。これを用いてクライオスタットにより 10 $\mu$ m 厚の切片を作製し、MAS コートスライドグラス (松浪硝子工業) に貼り付けた。

### 4.3.3 *in situ* ハイブリダイゼーション (ISH)

ISH の手順は、高木ら (2006) に従って行った。目的の試料を PBS で洗浄後、Proteinase K 処理 (1 $\mu$ l/ml in PBS、10 分) によるタンパク質の部分分解を行い、後固定 (4%PFA/DEPC-PBS、10 分) を行うことで弱くなった試料を補強した。続いて、プローブの非特異的な吸着によるバックグラウンドを防止するため、試料のアセチル化 (室温、20 分) を行った。アセチル化溶液の組成は、0.25% (v/v) 無水酢

酸 / 0.1M トリエタノールアミン (pH8.0) である。次に、試料をハイブリダイゼーション溶液に馴染ませるために、プローブが入っていないハイブリダイゼーション緩衝液中でプレハイブリダイゼーション (65°C、1時間) を行った後、ハイブリダイゼーション (65°C、O/N) を行った。ハイブリダイゼーション緩衝液の組成は、50%ホルムアミド(和光純薬、生化学用)、5x SSC(pH7.0)、50  $\mu$ g/ml ヘパリン(Sigma, H3393)、200  $\mu$ g/ml 酵母 tRNA (Sigma, R7125) である。ハイブリダイゼーションに際しては、反応を湿箱中で行うと共に、ハイブリダイゼーション溶液をスライドガラスに滴下後、パラフィルム (2.5cm  $\times$  6.0cm) をスライドガラスに被せることにより、溶液の蒸発を防いだ。パラフィルムによる被覆は、少量のハイブリダイゼーション溶液を試料上に効率よくかつ均一に広げる効果もある。プローブは前述の cDNA を制限酵素により直鎖化した後、T3 RNA ポリメラーゼ (Thermo Scientific) もしくは Thermo T7 RNA ポリメラーゼ (Toyobo) を用いて作製後、マイクロバイオスピнкаラム 30 Tris RNase free (BioRad, 732-6250) を用いて精製した。また、対照実験において用いた pBluescript II SK(+)由来プローブは、pBluescript II SK(+)を NgoM IV (NEB) で直鎖化後、T3 RNA ポリメラーゼを用いて作製した。

ハイブリダイゼーション後、2 $\times$ SSC/ホルムアミド (65°C) で 1 時間、0.1 $\times$ SSC (65°C) で 2 時間、プローブの洗浄を行い、TTBS (20mM Tris  $\cdot$  HCl(pH8.0), 0.5M NaCl, 0.1% Tween-20) に置換した。TTBS を除去後、スライドガラスの縁に付着している TTBS を拭き取った後、パップペンでスライドガラスの縁を囲むようにブロッカーを塗布した。続いて、室温で 30 分ブロッキング溶液 (5mg/ml カゼイン、0.1% ヒツジ血清 in TTBS) による処理を行った後、ブロッキング溶液で 2000 倍に希釈したアルカリホスファターゼ標識抗ジゴキシゲニン抗体 (抗 DIG-AP 抗体、Roche) で、室温にて 2 時間処理した。その後、TTBS による洗浄 (15 分) を 4 回を行い、NTM (100mM Tris  $\cdot$  HCl(pH9.5)、50mM MgCl<sub>2</sub>、100mM NaCl) に置換した。更に、発色反応を発色液 (4-ニトロブルーテトラゾリウムクロライド (NBT, 0.1g/ml ジメチルホルムアミド溶液, Roche) 4.5 $\mu$ l、5-ブロモ-4-クロロ-3-インドリル-リン酸

(BCIP/X-phosphate, 0.05g/ml ジメチルホルムアミド溶液 (4-トルイジン塩) , Roche) 3.5 $\mu$ l を NTM 1ml で希釈) 中で遮光しつつ 25°C で行った (約 6~18 時間)。最後に、試料を TE で洗浄後、水性封入し、正立型蛍光顕微鏡 (Axioskop2 plus, ZEISS) および、実体顕微鏡 (SZ61, OLYMPUS) で観察・撮影した。

なお、免疫蛍光抗体法と組み合わせた二重染色を行う場合は、発色基質を上記のものではなく Fast Red (Sigma, F4648) を用いて行った。

## 4.4 免疫蛍光抗体法

### 4.4.1 パラフィン包埋切片の前処理

パラフィン包埋切片の場合、脱パラフィン後、必要に応じて抗原の賦活化を行った。賦活化のために、0.01M クエン酸溶液 pH6.0 中で電子レンジにより 10 分間加熱し、引き続き室温で 20 分以上放冷した。そして、PBST により室温で 5 分間 3 回洗浄した。

### 4.4.2 凍結切片の前処理

凍結切片の場合、最初に O.C.T. compound を除去する必要がある。試料がスライドガラスに接着している場合、50ml の PBS を注いだ染色バット中に試料が載ったスライドガラスを入れ、室温で 5 分間の洗浄を 3 回行い、O.C.T. compound を除去した。また、試料が O.C.T. compound 上に接着し、スライドガラスに直接接着していない場合は、湿箱で以下の操作を行った。即ち、スライドガラスに PBS を 750  $\mu$ l 適下し、室温で 5 分間の洗浄を 3 回行った。O.C.T. compound 除去後、30 分から 1 時間程度乾燥させ使用した。

### 4.4.3 切片免疫蛍光抗体法

切片の前処理後、パップペンを用いてスライドガラスの縁を囲むようにブロッカーを塗布した。続いて、PBST で 5 分間 3 回洗浄し、ブロッキング溶液（5%ヒツジ血清 in PBST、熱変性済み）でブロッキングを行った後、ブロッキング溶液で希釈した一次抗体を加え、4°Cで一晩抗原抗体反応を行った。翌日 PBST で 5 分間 3 回洗浄後、ブロッキング溶液で希釈した二次抗体を加え、室温で 2 時間、あるいは 4°Cで一晩抗原抗体反応を行った。その後、PBST で 5 分間 3 回洗浄し、必要に応じて対比染色を行った。対比染色は、細胞核の分布と比較するために、DAPI 染色（DAPI（SIGMA,340-07971） / PBS 1 $\mu$ l/ml 遮光室温 5 分間、染色後 PBS で 5 分間 3 回洗浄する）を行った。最後に、水性封入剤（70%グリセロール）に退色防止剤 DABCO（封入剤 1ml 当たり 0.023g、Sigma D2522）を加え、封入し、正立型蛍光顕微鏡（Axioskop2 plus, ZEISS） および、実体顕微鏡（SZ61, OLYMPUS）で観察・撮影した。

本研究で用いた一次抗体および二次抗体の使用時の希釈率は以下の通りである。

#### 一次抗体

3A10 (Developmental Studies Hybridoma Bank, DSHB)	1/400
抗アセチル化チューブリンモノクローナル抗体 (Sigma, T6793)	1/500

抗 Scratch2 ウサギポリクローナル抗体 (Itoh <i>et al.</i> , 2013)	1/500
抗 APP ウサギポリクローナル抗体 (Invitrogen, 51-2700)	1/500
4H6 (抗ニューロフィラメント M 抗体、DSHB)	1/100
抗 GAP-43 ウサギポリクローナル抗体 (Novus Biologicals)	1/500

#### 二次抗体

Alexa Fluor 488 標識抗マウス IgG ヤギ抗体 (Invitrogen, A11001)	1/500
Alexa Fluor 594 標識抗マウス IgG ヤギ抗体 (Invitrogen, A11012)	1/500
HRP 標識抗ウサギ IgG ヤギ抗体 (Millipore, 12-348)	1/1500

#### 4.4.4 TSA Plus Biotin System

Scratch2 および APP の免疫蛍光抗体法による検出に当たっては、TSA Plus Biotin System による増感を行った。まず切片の前処理後、PBS で洗浄し、更に内在性ペルオキシターゼを不活性化するために 3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/PBS 処理を室温 30 分から 1 時間程度行った。PBS で洗浄後、パップペンを用いてスライドガラスの縁を囲むようにブロッカーを塗布した。TNT 洗浄液 (100mM Tris・HCl(pH7.5), 150mM NaCl, 0.05% Tween-20) で 5 分間 3 回洗浄し、TNB ブロッキング緩衝液 (100mM Tris・HCl(pH7.5), 150mM NaCl, 0.5% Blocking Reagent, Invitrogen, FP1020) でブロッキングを室温 30 分間行った後、一次抗体反応を 4°C で一晩行った。TNT 洗浄液による洗浄を 5 分間 3 回行った後、二次抗体 (Peroxidase AffiniPure Goat Anti-Mouse IgG (H+L)) を室温で 2 時間以上、あるいは 4°C で一晩反応させた。TNT 洗浄液による洗浄を 5 分間 3 回行った後、Biotin Plus Amplification Reagent (Perkin Elmer, NEL749A001KT) を用いてビオチン化チラミド生成反応を行った。TNT 洗浄液による洗浄を 5 分間 3 回行い、PBS で 1/1000 希釈した Streptavidin, Alexa 488 conjugate (Invitrogen, S-11223) を遮光室温で 30 分間ビオチンに結合させた。TNT 洗浄液による洗浄を 5 分間 3 回、PBS による洗浄を 10 分間行い、70% グリセロールで封入し、正立型蛍光顕微鏡 (Axioskop2 plus, ZEISS) で観察・撮影した。

#### 4.5 ノザンブロット解析

組織からトータル RNA 抽出後、ホルムアルデヒド (2%) を含む 1 x MOPS 緩衝液で作製した 1% アガロースゲルにて分離した。Hybond N+ (GE ヘルスケア /Amersham) へのブロッティングは 20×SSC (DEPC 処理済み) を用いて室温で 8 時間行った。Hybond N+ 上に核酸を固定させるために UV クロスリンク

(120mJ/cm<sup>2</sup>) を UV クロスリンカー (UVP Inc) を用いて行った。DIG Easy Hyb (Roche) 中でプレハイブリダイゼーションを 68°C で 30 分～数時間行い、ハイブリダイゼーションを 68°C で一晩行った。なお、各プローブは濃度 100ng/ml に希釈した。ハイブリダイゼーション後、Hybond N+ を 2×SSC/0.1%SDS (DEPC 処理済み) で 5 分間 2 回洗浄し、更に予熱した 0.1×SSC/0.1%SDS を用いて 68°C で 15 分の洗浄を 2 回行った。洗浄緩衝液 (pH7.5) (マレイン酸緩衝液 [0.1M マレイン酸、0.15M NaCl]、0.3% Tween-20) で 2 分洗浄後、ブロッキング溶液 (10%ブロッキング試薬 (Roche) /マレイン酸緩衝液) 中で 30 分～3 時間ブロッキング処理を行い、更にブロッキング溶液で 1:10000 に希釈した抗 DIG-AP 抗体を室温で 30 分間反応させた。その後、洗浄緩衝液で 15 分間 2 回洗浄後、検出緩衝液 (0.1M Tris-HCl(pH9.5)、0.1M NaCl) に置換した。そして、CDP-Star (Roche) 希釈標準溶液 (12.5mM 濃縮液を検出緩衝液で 50 倍希釈したもの) を添加し、5 分反応させ、フィルムに 15～25 分間露光した。

#### 4.6 脂溶性蛍光色素による軸索の逆行性標識

E18 ニワトリ胚の脳を採取後、4%PFA で一晩固定した。それを PBS で洗浄後、中脳視蓋の尾側の SAC 付近に脂溶性カルボシアニン色素 1,1'-ジオクタデシル-3,3,3',3'-テトラメチルインドカルボシアニンペルクロラート (DiI、TAKARA) の結晶を置き、PBS 中で約 1 ヶ月間遮光・静置した。必要に応じて、3～4 日間毎に顕微鏡下で DiI の拡散状態を確認した。十分 DiI が拡散したことを確認後、標本をアガロースゲル (2% in PBS) で包埋し、ビブラトームを用いて 50～100µm 厚の切片を作製した。それらの切片をスライドガラス上に並べ、水性封入し、正立型蛍光顕微鏡 (Axioskop2 plus, ZEISS) で観察・撮影を行った。

## 第5章 参考文献

### 1

#### 軸索性 RNA、リボソーム、タンパク質合成全般に関する総説

Vuppalanchi D, Willis DE, Twiss JL. (2009) Regulation of mRNA transport and translation in axons. *Results Probl Cell Differ.* 48:193-224.

Sotelo JR, Canclini L, Kun A, Sotelo-Silveira JR, Calliari A, Cal K, Bresque M, Dipaolo A, Farias J, Mercer JA. (2014) Glia to axon RNA transfer. *Dev Neurobiol.* 74(3):292-302.

### 1.1

Martin KC, Ephrussi A. (2009) mRNA localization: gene expression in the spatial dimension. *Cell.* 136(4):719-730.

Bear MF, Connors BW, Paradiso MA. (2006) *Neuroscience: exploring the brain* (3rd edition). Lippincott Williams and Wilkins. 「カラー版 ベアー コノーズ パラディーン 神経科学—脳の探求 (2007、西村書店)」

Koenig E. (1967) Synthetic mechanisms in the axon. 3. Stimulation of acetylcholinesterase synthesis by actinomycin-D in the hypoglossal nerve. *J Neurochem.* 14(4):429-435.

Giuditta A, Dettbarn WD, Brzin M. (1968) Protein synthesis in the isolated giant axon of the squid. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 59(4):1284-1287.

Tennyson VM. (1965) Electron microscopic study of the developing neuroblast of the dorsal root ganglion of the rabbit embryo. *J Comp Neurol.* 124(3):267-317.

Tennyson VM. (1970) The fine structure of the axon and growth cone of the dorsal root neuroblast of the rabbit embryo. *J Cell Biol.* 44(1):62-79.

Zéleéna J. (1970) Ribosome-like particles in myelinated axons of the rat. *Brain Res.* 24(2):359-363.

Zéleéna J. (1972) Ribosomes in myelinated axons of dorsal root ganglia. *Z Zellforsch Mikrosk Anat.* 124(2):217-229.



Martin R, Fritz W, Giuditta A. (1989) Visualization of polyribosomes in the postsynaptic area of the squid giant synapse by electron spectroscopy imaging. *J Neurocytol.* 18(1):11-18.

Koenig E, Martin R. (1996) Cortical plaque-like structures identify ribosome-containing domains in the Mauthner cell axon. *J Neurosci.* 16(4):1400-1411.

Koenig E, Martin R, Titmus M, Sotelo-Silveira JR. (2000) Cryptic peripheral ribosomal domains distributed intermittently along mammalian myelinated axons. *J Neurosci.* 20(22):8390-8400.

Giuditta A, Hunt T, Santella L. (1986) Messenger RNA in squid axoplasm. *Neurochem Int.* 8(3):435-442.

Jirikowski GF, Sanna PP, Bloom FE. (1990) mRNA coding for oxytocin is present in axons of the hypothalamo-neurohypophysial tract. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 87(19):7400-7404.

## 1.2

Lasek RJ, Dabrowski C, Nordlander R. (1973) Analysis of axoplasmic RNA from invertebrate giant axons. *Nat New Biol.* 244(136):162-165.

Ellis L, Wallis I, Abreu E, Pfenninger KH. (1985) Nerve growth cones isolated from fetal rat brain. IV. Preparation of a membrane subfraction and identification of a membrane glycoprotein expressed on sprouting neurons. *J Cell Biol.* 101 (5 Pt 1):1977-1989.

Mohr E, Richter D. (1992) Diversity of messenger RNAs in the axonal compartment of peptidergic neurons in the rat. *Eur J Neurosci.* 4(9):870-876.

Edström A. (1966) Amino acid incorporation in isolated Mauthner nerve fibre components. *J Neurochem.* 13(5):315-321.

Fischer S, Litvak S. (1967) The incorporation of microinjected <sup>14</sup>C-amino acids into TCA insoluble fractions of the giant axon of the squid. *J Cell Physiol.*

70(1):69-74.

Lasek RJ, Gainer H, Przybylski RJ. (1974) Transfer of newly synthesized proteins from Schwann cells to the squid giant axon. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 71(4):1188-1192.

Benech C, Sotelo JR Jr, Menendez J, Correa-Luna R. (1982) Autoradiographic study of RNA and protein synthesis in sectioned peripheral nerves. *Exp Neurol.* 76(1):72–82.

Li YC, Li YN, Cheng CX, Sakamoto H, Kawate T, Shimada O, Atsumi S. (2005) Subsurface cisterna-lined axonal invaginations and double-walled vesicles at the axonal-myelin sheath interface. *Neurosci Res.* 53(3):298–303.

Jirikowski GF, Sanna PP, Maciejewski-Lenoir D, Bloom FE. (1992) Reversal of diabetes insipidus in Brattleboro rats: intrahypothalamic injection of vasopressin mRNA. *Science.* 255(5047):996-998.

Maciejewski-Lenoir D, Jirikowski GF, Sanna PP, Bloom FE. (1993) Reduction of exogenous vasopressin RNA poly(A) tail length increases its effectiveness in transiently correcting diabetes insipidus in the Brattleboro rat. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 90(4):1435-1439.

Sotelo JR, Canclini L, Kun A, Sotelo-Silveira JR, Xu L, Wallrabe H, Calliari A, Rosso G, Cal K, Mercer JA. (2013) Myosin-Va-dependent cell-to-cell transfer of RNA from Schwann cells to axons. *PLoS One.* 8(4):e61905.

Crispino M, Kaplan BB, Martin R, Alvarez J, Chun JT, Benech JC, Giuditta A. (1997) Active polysomes are present in the large presynaptic endings of the synaptosomal fraction from squid brain. *J Neurosci.* 17(20):7694–7702.

Olink-Coux M, Hollenbeck PI. (1996) Localization and active transport of mRNA in axons of sympathetic neurons in culture. *J Neurosci.* 16(4):1346-1358.

Eng H, Lund K, Campenot RB. (1999) Synthesis of  $\beta$ -tubulin, actin, and other proteins in axons of sympathetic neurons in compartmented cultures. *J Neurosci.* 19(1):1-9.

Campbell DS, Holt CE. (2001) Chemotropic responses of retinal growth cones mediated by rapid local protein synthesis and degradation. *Neuron*. 32(6):1013-1026.

Zheng JQ, Kelly TK, Chang B, Ryazantsev S, Rajasekaran AK, Martin KC, Twiss JL. (2001) A functional role for intra-axonal protein synthesis during axonal regeneration from adult sensory neurons. *J Neurosci*. 21(23):9291–9303.

Taylor AM, Berchtold NC, Perreau VM, Tu CH, Li Jeon N, Cotman CW. (2009) Axonal mRNA in uninjured and regenerating cortical mammalian axons. *J Neurosci*. 29(15):4697–4707.

Kun A, Otero L, Sotelo-Silveira JR, Sotelo JR. (2007) Ribosomal Distributions in Axons of Mammalian Myelinated Fibers. *J Neurosci Res* 85:2087-98.

### 1.3

Lee SK & Hollenbeck PJ. (2003) Organization and translation of mRNA in sympathetic axons. *J Cell Sci*. 116(Pt 21):4467-4478.

Taylor AM, Berchtold NC, Perreau VM, Tu CH, Li Jeon N, Cotman CW. (2009) Axonal mRNA in uninjured and regenerating cortical mammalian axons. *J Neurosci*. 29(15):4697–4707.

Gumy LF, Yeo GS, Tung YC, Zivraj KH, Willis D, Coppola G, Lam BY, Twiss JL, Holt CE, Fawcett JW. (2011) Transcriptome analysis of embryonic and adult sensory axons reveals changes in mRNA repertoire localization. *RNA*. 17(1):85–98.

Jiménez-Díaz L, Géranton SM, Passmore GM, Leith JL, Fisher AS, Berliocchi L, Sivasubramaniam AK, Sheasby A, Lumb BM, Hunt SP. (2008) Local translation in primary afferent fibers regulates nociception. *PLoS One*. 3(4):e1961.

Géranton SM, Jiménez-Díaz L, Torsney C, Tochiki KK, Stuart SA, Leith JL, Lumb BM, Hunt SP. (2009) A rapamycin-sensitive signaling pathway is essential for the full expression of persistent pain states. *J Neurosci*. 29(47):15017-15027.

Zivraj KH, Tung YC, Piper M, Gumy L, Fawcett JW, Yeo GS, Holt CE. (2010) Subcellular profiling reveals distinct and developmentally regulated repertoire of growth cone mRNAs. *J Neurosci.* 30(46):15464-15478.

Willis DE, van Niekerk EA, Sasaki Y, Mesngon M, Merianda TT, Williams GG, Kendall M, Smith DS, Bassell GJ, Twiss JL. (2007) Extracellular stimuli specifically regulate localized levels of individual neuronal mRNAs. *J Cell Biol.* 178(6):965-980.

Leung KM, van Horck FP, Lin AC, Allison R, Standart N, Holt CE. (2006) Asymmetrical  $\beta$ -actin mRNA translation in growth cones mediates attractive turning to netrin-1. *Nat Neurosci.* 9(10):1247-1256.

Yao J, Sasaki Y, Wen Z, Bassell GJ, Zheng JQ. (2006) An essential role for  $\beta$ -actin mRNA localization and translation in  $Ca^{2+}$ - dependent growth cone guidance. *Nat Neurosci.* 9(10):1265-1273.

Piper M, Anderson R, Dwivedy A, Weinl C, van Horck F, Leung KM, Cogill E, Holt C. (2006) Signaling mechanisms underlying Slit2-induced collapse of *Xenopus* retinal growth cones. *Neuron.* 49(2):215–228.

Wu KY, Hengst U, Cox LJ, Macosko EZ, Jeromin A, Urquhart ER, Jaffrey SR. (2005) Local translation of RhoA regulates growth cone collapse. *Nature.* 436(7053):1020–1024.

Hengst U, Deglincerti A, Kim HJ, Jeon NL, Jaffrey SR. (2009) Axonal elongation triggered by stimulus-induced local translation of a polarity complex protein. *Nat Cell Biol.* 11(8):1024-1030.

Lin AC, Holt CE. (2007) Local translation and directional steering in axons. *EMBO J* 26(16):3729–3736.

Jung H, Yoon BC, Holt CE. (2012) Axonal mRNA localization and local protein synthesis in nervous system assembly, maintenance and repair. *Nat Rev Neurosci.* 13(5):308-324.

Brittis PA, Lu Q, Flanagan JG. (2002) Axonal protein synthesis provides a mechanism for localized regulation at an intermediate target. *Cell* 110(2):223–235.

Blackmore M, Letourneau PC. (2007) Protein synthesis in distal axons is not required for axon growth in the embryonic spinal cord. *Dev Neurobiol.* 67(7):976-986.

Cox LJ, Hengst U, Gurskaya NG, Lukyanov KA, Jaffrey SR. (2007) Intra-axonal translation and retrograde trafficking of CREB promotes neuronal survival. *Nat Cell Biol.* 10(2):149-159.

Ji SJ, Jaffrey SR. (2012) Intra-axonal translation of SMAD1/5/8 mediates retrograde regulation of trigeminal ganglia subtype specification. *Neuron.* 74(1):95-107.

Willis DE, Twiss JL. (2006) The evolving roles of axonally synthesized proteins in regeneration. *Curr Opin Neurobiol.* 16(1):111–118.

Hanz S, Perlson E, Willis D, Zheng JQ, Massarwa R, Huerta JJ, Koltzenburg M, Kohler M, van-Minnen J, Twiss JL, Fainzilber M. (2003) Axoplasmic importins enable retrograde injury signaling in lesioned nerve. *Neuron*, 40(6):1095-1104.

Willis D, Li KW, Zheng J-Q, Smit AB, Kelly TK, Merianda TT, Sylvester J, van Minnen J, Twiss JL. (2005) Differential transport and local translation of cytoskeletal, injury-response, and neurodegeneration protein mRNAs in axons. *J Neurosci*, 25(4):778-791.

Perlson E, Hanz S, Ben-Yaakov K, Segal-Ruder Y, Segar R, Fainzilber M. (2005) Vimentin-dependent spatial translocation of an activated MAP kinase in injured nerve. *Neuron.* 45(5):715-726.

Chierzi S, Ratto GM, Verma P, Fawcett JW. (2005) The ability of axons to regenerate their growth cones depends on axonal type and age, and is regulated by calcium, cAMP and ERK. *Eur J Neurosci*, 21(8):2051-2062.

Sung YJ, Povelones M, Ambron RT. (2001) RISK-1: a novel MAPK homologue in axoplasm that is activated and retrogradely transported after nerve injury. *J Neurobiol*, 47(1):67-79.

Reynolds AJ, Hendry IA, Bartlett SE. (2001) Anterograde and retrograde transport of active extracellular signal-related kinase 1 (ERK1) in the ligated rat sciatic nerve. *Neuroscience*. 105(3):761-771.

Ben-Yaakov K, Dagan SY, Segal-Ruder Y, Shalem O, Vuppalanchi D, Willis DE, Yudin D, Rishal I, Rother F, Bader M, Blesch A, Pilpel Y, Twiss JL, Fainzilber M. (2012) Axonal transcription factors signal retrogradely in lesioned peripheral nerve. *EMBO J*. 31(6):1350-1363.

Yan D, Wu Z, Chisholm AD, Jin Y. (2009) The DLK-1 kinase promotes mRNA stability and local translation in *C. elegans* synapses and axon regeneration. *Cell*. 138(5):1005 – 1018.

Yoon BC, Jung H, Dwivedy A, O'Hare CM, Zivraj KH, Holt CE. (2012) Local translation of extranuclear lamin B promotes axon maintenance. *Cell*. 148(4):752-764.

Taylor AM, Wu J, Tai HC, Schuman EM. (2013) Axonal translation of  $\beta$ -catenin regulates synaptic vesicle dynamics. *J Neurosci*. 33(13):5584-5589.

## 1.4

Kislauskis EH, Zhu X, Singer RH. (1994) Sequences responsible for intracellular localization of  $\beta$ -actin messenger RNA also affect cell phenotype. *J Cell Biol*. 127(2):441–451.

Zhang HL, Eom T, Oleynikov Y, Shenoy SM, Liebelt DA, Dichtenberg JB, Singer RH, Bassell GJ. (2001) Neurotrophin-induced transport of a  $\beta$ -actin mRNP complex increases  $\beta$ -actin levels and stimulates growth cone motility. *Neuron* 31(2):261–275.

Willis DE, Xu M, Donnelly CJ, Tep C, Kendall M, Erenstheyn M, English AW, Schanen NC, Kirn-Safran CB, Yoon SO, Bassell GJ, Twiss JL. (2011) Axonal

localization of transgene mRNA in mature PNS and CNS neurons. *J Neurosci.* 31(41):14481-14487.

Ross AF, Oleynikov Y, Kislauskis EH, Taneja KL, Singer RH. (1997) Characterization of a beta-actin mRNA zipcode-binding protein. *Mol Cell Biol.* 17(4):2158–2165.

Farina KL, Huttelmaier S, Musunuru K, Darnell R, Singer RH. (2003) Two ZBP1 KH domains facilitate  $\beta$ -actin mRNA localization, granule formation, and cytoskeletal attachment. *J Cell Biol.* 160(1):77–87.

Huttelmaier S, Zenklusen D, Lederer M, Dichtenberg J, Lorenz M, Meng X, Bassell GJ, Condeelis J, Singer RH. (2005) Spatial regulation of  $\beta$ -actin translation by Src-dependent phosphorylation of ZBP1. *Nature.* 438(7067):512–515.

Yisraeli JK. (2005) VICKZ proteins: A multi-talented family of regulatory RNA-binding proteins. *Biol Cell.* 97(1):87–96.

Bell JL, Wächter K, Mühleck B, Pazaitis N, Köhn M, Lederer M, Hüttelmaier S. (2013) Insulin-like growth factor 2 mRNA-binding proteins (IGF2BPs): post-transcriptional drivers of cancer progression? *Cell Mol Life Sci.* 70(15):2657-2675.

Patel VL, Mitra S, Harris R, Buxbaum AR, Lionnet T, Brenowitz M, Girvin M, Levy M, Almo SC, Singer RH, Chao JA. (2012) Spatial arrangement of an RNA zipcode identifies mRNAs under post-transcriptional control. *Genes Dev.* 26(1):43-53.

Donnelly CJ, Willis DE, Xu M, Tep C, Jiang C, Yoo S, Schanen NC, Kirn-Safran CB, van Minnen J, English A, Yoon SO, Bassell GJ, Twiss JL. (2011) Limited availability of ZBP1 restricts axonal mRNA localization and nerve regeneration capacity. *EMBO J.* 30(22):4665-4677.

Yoo S, Kim HH, Kim P, Donnelly CJ, Kalinski AL, Vuppalanchi D, Park M, Lee SJ, Merianda TT, Perrone-Bizzozero NI, Twiss JL. (2013) A HuD-ZBP1 ribonucleoprotein complex localizes GAP-43 mRNA into axons through its 3' untranslated region AU-rich regulatory element. *J Neurochem.* 126(6):792-804.

Aronov E, Aranda G, Behar L, Ginzburg I. (2002) Visualization of translated tau protein in the axons of neuronal P19 cells and characterization of tau RNP granules. *J Cell Sci* 115(Pt 19):3817–3827.

Atlas R, Behar L, Elliott E, Ginzburg I. (2004) The insulin-like growth factor mRNA binding-protein IMP-1 and the Ras-regulatory protein G3BP associate with tau mRNA and HuD protein in differentiated P19 neuronal cells. *J Neurochem* 89(3):613–626.

Rossoll W, Jablonka S, Andreassi C, Kröning AK, Karle K, Monani UR, Sendtner M. (2003) Smn, the spinal muscular atrophy-determining gene product, modulates axon growth and localization of beta-actin mRNA in growth cones of motoneurons. *J Cell Biol* 163(4):801–812.

Akten B, Kye MJ, Hao le T, Wertz MH, Singh S, Nie D, Huang J, Merianda TT, Twiss JL, Beattie CE, Steen JA, Sahin M. (2011) Interaction of survival of motor neuron (SMN) and HuD proteins with mRNA cpg15 rescues motor neuron axonal deficits. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 108(25):10337-10342.

Fallini C, Zhang H, Su Y, Silani V, Singer RH, Rossoll W, Bassell GJ. (2011) The survival of motor neuron (SMN) protein interacts with the mRNA-binding protein HuD and regulates localization of poly(A) mRNA in primary motor neuron axons. *J Neurosci.* 31(10):3914-3925.

Hubers L, Valderrama-Carvajal H, Laframboise J, Timbers J, Sanchez G, Côté J. (2011) HuD interacts with survival motor neuron protein and can rescue spinal muscular atrophy-like neuronal defects. *Hum Mol Genet.* 20(3):553-579.

Li DK, Tisdale S, Lotti F, Pellizzoni L. (2014) SMN control of RNP assembly: from post-transcriptional gene regulation to motor neuron disease. *Semin Cell Dev Biol.* 32:22-29.

Sanchez G, Dury AY, Murray LM, Biondi O, Tadesse H, El Fatimy R, Kothary R, Charbonnier F, Khandjian EW, Côté J. (2013) A novel function for the survival motoneuron protein as a translational regulator. *Hum Mol Genet.* 22(4):668-684.



Kye MJ, Niederst ED, Wertz MH, Gonçalves Ido C, Akten B, Dover KZ, Peters M, Riessland M, Neveu P, Wirth B, Kosik KS, Sardi SP, Monani UR, Passini MA, Sahin M. (2014) SMN regulates axonal local translation via miR-183/mTOR pathway. *Hum Mol Genet.* 23(23):6318-6331.

Andreassi C, Zimmermann C, Mitter R, Fusco S, De Vita S, Saiardi A, Riccio A. (2010) An NGF-responsive element targets myo-inositol monophosphatase-1 mRNA to sympathetic neuron axons. *Nat Neurosci.* 13(3):291-301.

Merianda TT, Gomes C, Yoo S, Vuppalanchi D, Twiss JL. (2013) Axonal localization of neuritin/CPG15 mRNA in neuronal populations through distinct 5' and 3' UTR elements. *J Neurosci.* 33(34):13735-13742.

## 1.5

Ramón y Cajal S. (1911) Le lobe optique des vertébrés inférieurs, toit optique des oiseaux. In: *Histologie du système nerveux de l'homme et des vertébrés* (Ramón y Cajal S, Ed). Madrid, pp 196–212.

LaVail JH & Cowan WM. (1971) The development of the chick optic tectum. I. Normal morphology and cytoarchitectonic development. *Brain Res.* 28(3):391–419.

Hunt SP & Brecha N. (1984) The avian optic tectum: a synthesis of morphology and biochemistry. In: Vanegas H, (Ed.), *Comparative neurology of the optic tectum*. Plenum, New York, pp 619-648.

Dubbeldam JL. (1997) Birds. In: Nieuwenhuys R, ten Donkelaar HJ, Nicholson C (Eds.), *The Central Nervous System of Vertebrates. An Introduction into its Structure and Function*. Springer, Berlin, pp 1525–1635.

van Gehuchten A. (1892). La structure des lobes optiques chez l'embryon de poulet. *La Cellule.* 8:1-43.

Acheson DWK, Kemplay SK & Webster KE. (1980) Quantitative analysis of optic terminal profile distribution within the pigeon optic tectum. *Neuroscience.* 5(6):1067–1084.

Yamagata M & Sanes JR. (1995) Lamina-specific cues guide outgrowth and arborization of retinal axons in the optic tectum. *Development*. 121(1):189–200.

## 2.1

Nieto MA. (2002) The snail superfamily of zinc-finger transcription factors. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 3(3):155-166.

Itoh Y, Moriyama Y, Hasegawa T, Endo TA, Toyoda T, Gotoh Y. (2013) Scratch regulates neuronal migration onset via an epithelial-mesenchymal transition-like mechanism. *Nat Neurosci*. 16(4):416-425.

Müller UC, Zheng H. (2012) Physiological functions of APP family proteins. *Cold Spring Harb Perspect Med*. 2(2):a006288.

Osterfield M, Egelund R, Young LM, Flanagan JG. (2008) Interaction of amyloid precursor protein with contactins and NgCAM in the retinotectal system. *Development*. 135(6):1189-1199.

## 2.3

Taylor AM, Berchtold NC, Perreau VM, Tu CH, Li Jeon N, Cotman CW. (2009) Axonal mRNA in uninjured and regenerating cortical mammalian axons. *J Neurosci*. 29(15):4697–4707.

Zivraj KH, Tung YC, Piper M, Gumy L, Fawcett JW, Yeo GS, Holt CE. (2010) Subcellular profiling reveals distinct and developmentally regulated repertoire of growth cone mRNAs. *J Neurosci*. 30(46):15464-15478.

Gumy LF, Yeo GS, Tung YC, Zivraj KH, Willis D, Coppola G, Lam BY, Twiss JL, Holt CE, Fawcett JW. (2011) Transcriptome analysis of embryonic and adult sensory axons reveals changes in mRNA repertoire localization. *RNA*. 17(1):85–98.

## 2.8

Ware M, Schubert FR. (2010) Development of the early axon scaffold in the rostral brain of the chick embryo. *J Anat.* 219(2):203-216.

Onodera N, Kakehata A, Araki I. (2013) Differential expression of GAP-43 protein in the rostral brain neurons of early chick embryos. *Tohoku J Exp Med.* 231(4):293-298.

Hamburger V, Hamilton HL. (1951) A series of normal stages in the development of the chick embryo. *J Morphol.* 88:49-92.

### 3

Tanaka EM, Ferretti P. (2009) Considering the evolution of regeneration in the central nervous system. *Nat Rev Neurosci.* 10(10):713-723.

Natera-Naranjo O, Aschrafi A, Gioio AE, Kaplan BB. (2010) Identification and quantitative analyses of microRNAs located in the distal axons of sympathetic neurons. *RNA.* 16(8):1516-1529.

Hangauer MJ, Vaughn IW, McManus MT. (2013) Pervasive transcription of the human genome produces thousands of previously unidentified long intergenic noncoding RNAs. *PLOS Genetics.* 9(6):e1003569.

Sasaki Y, Gross C, Xing L, Goshima Y, Bassell GJ. (2014) Identification of axon-enriched microRNAs localized to growth cones of cortical neurons. *Dev Neurobiol.* 74(3):397-406.

Lin AC, Holt CE. (2007) Local translation and directional steering in axons. *EMBO J.* 26(16):3729–3736.

Jung H, Yoon BC, Holt CE. (2012) Axonal mRNA localization and local protein synthesis in nervous system assembly, maintenance and repair. *Nat Rev Neurosci.* 13(5):308-324.

Satoh A, Graham GM, Bryant SV, Gardiner DM. (2008) Neurotrophic regulation of epidermal dedifferentiation during wound healing and limb regeneration in the axolotl (*Ambystoma mexicanum*). *Dev Biol.* 319(2):321-335.

Sugiyama S, Di Nardo AA, Aizawa S, Matsuo I, Volovitch M, Prochiantz A, Hensch TK. (2008) Experience-dependent transfer of Otx2 homeoprotein into the visual cortex activates postnatal plasticity. *Cell*. 134(3):508-520.

Yamagata M, Weiner JA, Dulac C, Roth KA, Sanes JR. (2006) Labeled lines in the retinotectal system: markers for retinorecipient sublaminae and the retinal ganglion cell subsets that innervate them. *Mol Cell Neurosci*. 33(3):296-310.

Onodera N, Kakehata A, Araki I. (2013) Differential expression of GAP-43 protein in the rostral brain neurons of early chick embryos. *Tohoku J Exp Med*. 231(4):293-298.

Benowitz LI, Routtenberg A. (1997) GAP-43: an intrinsic determinant of neuronal development and plasticity. *Trends Neurosci*. 20(2):84-91.

Frey D, Laux T, Xu L, Schneider C, Caroni P. (2000) Shared and unique roles of CAP23 and GAP43 in actin regulation, neurite outgrowth, and anatomical plasticity. *J. Cell Biol*. 149(7):1443-1454.

Wallen RC, Antonellis A. (2013) To charge or not to charge: mechanistic insights into neuropathy-associated tRNA synthetase mutations. *Curr Opin Genet Dev*. 23(3):302-309.

Bassell GJ, Warren ST. (2008) Fragile X syndrome: loss of local mRNA regulation alters synaptic development and function. *Neuron*. 60(2):201-214.

## 4.2

Katahira T, Sato T, Sugiyama S, Okafuji T, Araki I, Funahashi J, Nakamura H. (2000) Interaction between Otx2 and Gbx2 defines the organizing center for the optic tectum. *Mech Dev*. 91(1-2):43-52.

Matsunaga E, Araki I, Nakamura H. (2000) Pax6 defines the di-mesencephalic boundary by repressing En1 and Pax2. *Development*. 127(11):2357-2365.

Sato T, Araki I, Nakamura H. (2001) Inductive signal and tissue responsiveness defining the tectum and the cerebellum. *Development*. 128(13):2461-2469.

### 4.3

高木 晃、三ツ森正之、大内淑代 (2006) 「組織切片 *in situ* ハイブリダイゼーション法」野地澄晴編「免疫染色&*in situ* ハイブリダイゼーション最新プロトコール」(羊土社)

### 4.4

Itoh Y, Moriyama Y, Hasegawa T, Endo TA, Toyoda T, Gotoh Y. (2013) Scratch regulates neuronal migration onset via an epithelial-mesenchymal transition-like mechanism. *Nat Neurosci.* 16(4):416-425.

## 第6章 謝辞

本研究において、終始多大なるご支援、ご指導を賜り、また、本論文に関する有益なご助言、ご指導、ご校閲を賜りました岩手大学工学部応用化学・生命工学科の荒木功人准教授に謹んで御礼申し上げます。

東北大学加齢医学研究所の仲村春和教授および渡邊裕二助教（現、福島県立医科大学准教授）には、プラスミドを分与して頂き、また実験に関するご助言も頂き、篤く御礼申し上げます。

東京大学薬学部後藤由季子研究室の伊藤靖浩助教には抗 Scratch 抗体を分与して頂き、また実験に関する御助言も頂き、厚く御礼申し上げます。

ビブラトーム・クリオスタットを貸与頂いた岩手大学農学部獣医学課程の谷口和之岩手大学教授（現名誉教授）・山本欣郎教授・中牟田信明准教授に篤く御礼申し上げます。

実験のサポートをしていただいた岩手大学工学部技術職員の渡辺美和さん、岩手大学連合農学研究科の清水佑太郎さんに篤く御礼申し上げます。

共焦点レーザー顕微鏡の使用方法に関しご助言を頂いた岩手大学農学部附属寒冷バイオフィロンティア研究センターの河村幸男准教授に篤く御礼申し上げます。

プラスミドを分与して頂いた岩手大学工学部の福祉システム工学科（2012 卒業）の秋田谷卓生さんに篤く御礼申し上げます。

最後に、終始ご協力頂きました岩手大学工学部荒木研究室の皆様にご心から感謝いたします。

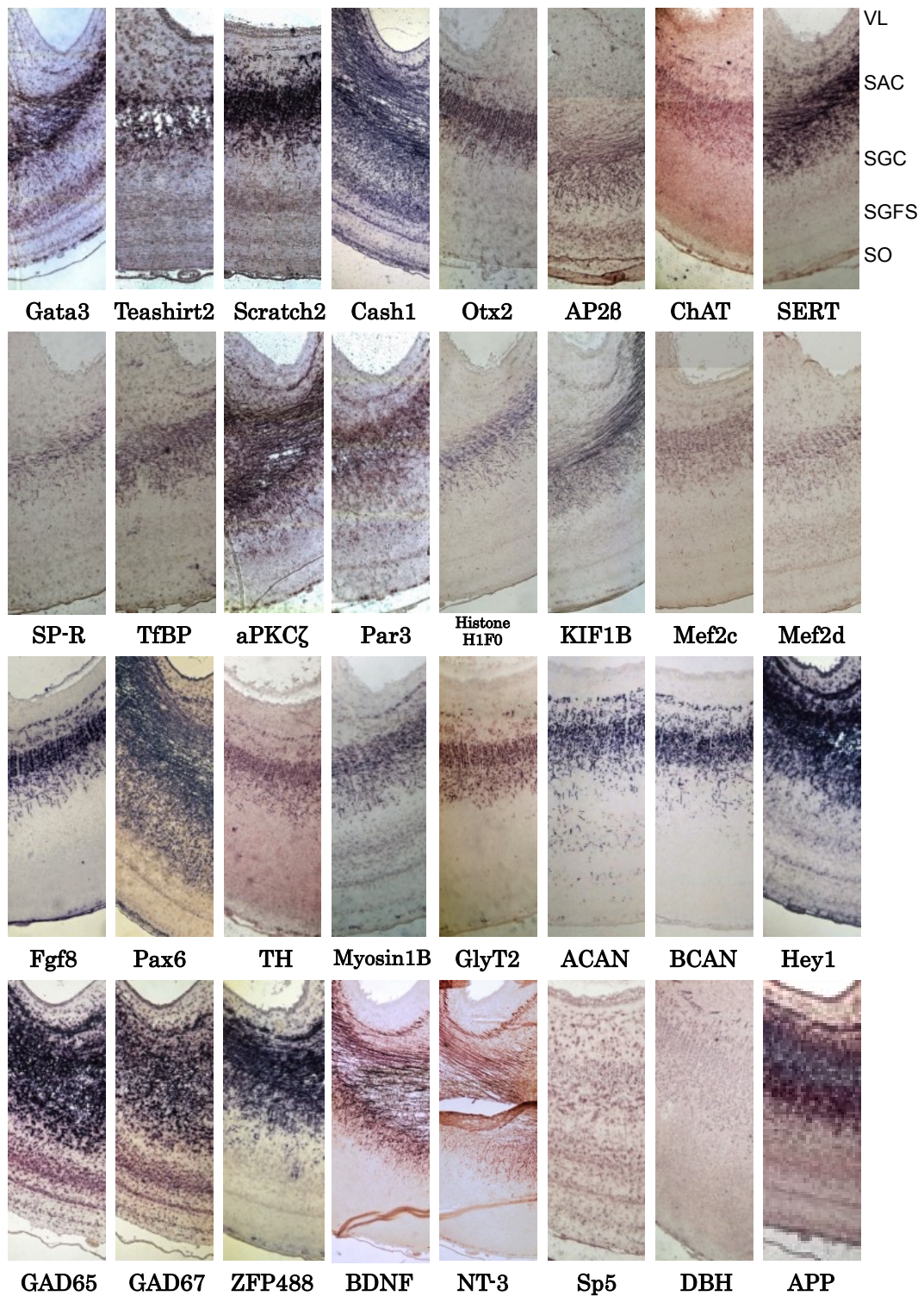


図 2.1.1 E18 ニワトリ胚中脳視蓋（前部）水平断切片における ISH シグナル  
 ニワトリ胚中脳視蓋は、視神経線維層 (SO, stratum opticum)、浅灰白線維層 (SGFS, stratum griseum et fibrosum superficiale)、中心灰白層 (SGC, stratum griseum centrale)、中心白層 (SAC, atratum album centrale)、脳室周囲線維層 (SFP, stratum fibrosum periventriculare)、脳室層 (VL, ventricular layer) から構成される。



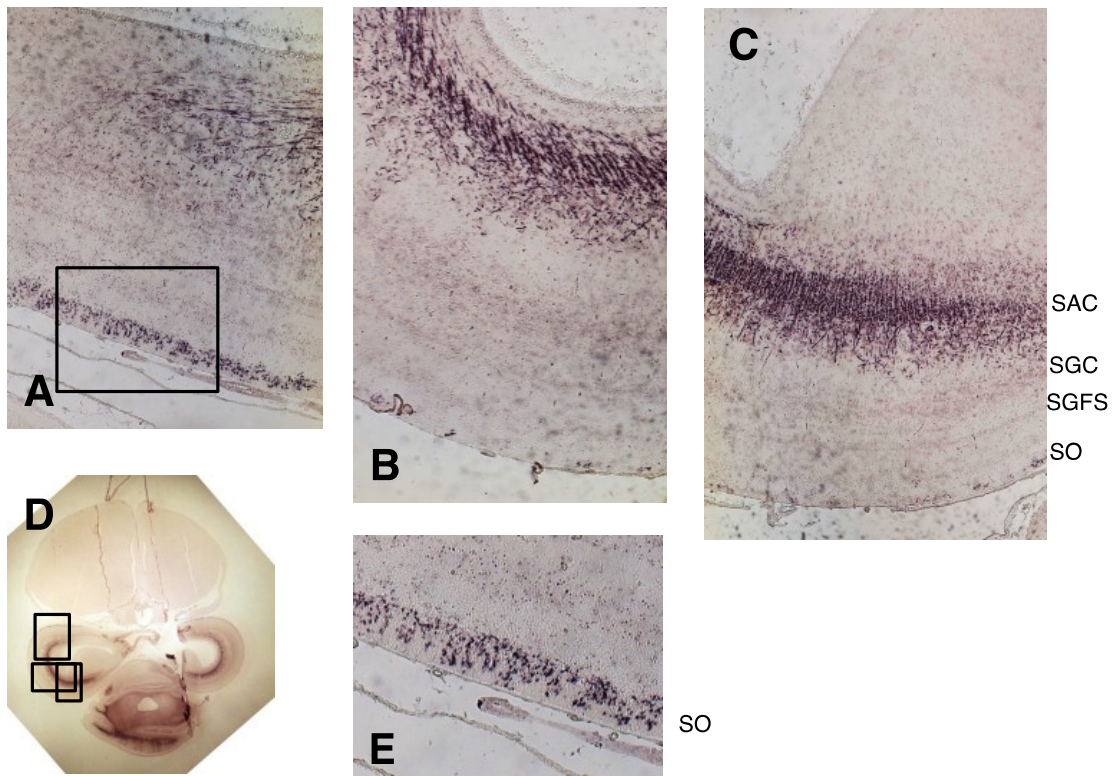


図 2.1.2 E18 ニワトリ胚中脳視蓋における *Otx2* の発現

切片は水平断である。A が視蓋前部、B が視蓋側部、C が視蓋後部、D が全体像である。E は A 中の四角部分の拡大図である。



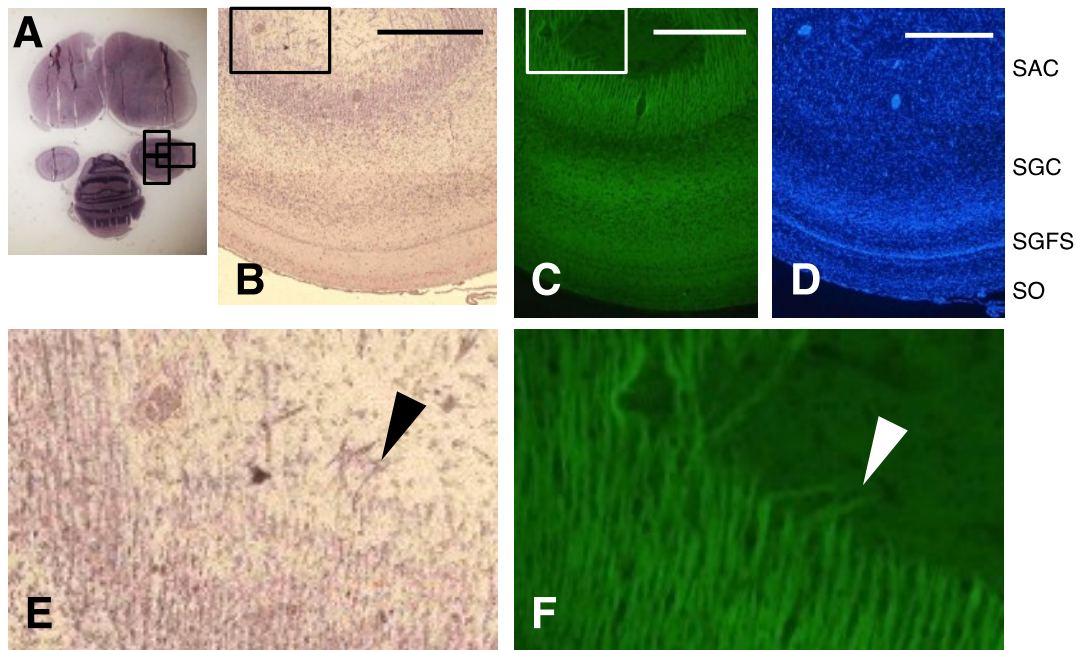


図 2.1.3 ニワトリ後期胚中脳視蓋の隣接切片における Scratch2 アンチセンスプローブによる ISH シグナルと軸索の走行の比較

孵卵開始後 18 日目のニワトリの脳から水平断切片を製作し、隣接切片において Scratch2 アンチセンスプローブによる ISH シグナルと軸索の走行を比較した。E と F はそれぞれ B と C の図中の四角部分の拡大図である。ISH の線状の染色が、軸索の染色と同じ方向を向いている (E, F)。A, B, E は Scratch2 アンチセンスプローブによる ISH シグナル、C, F は抗アセチル化チューブリン抗体による蛍光染色、D は DAPI 染色により C の切片における細胞核の位置を示す。C, D, F の切片では賦活化を行っている。スケールバーは 0.5mm である。

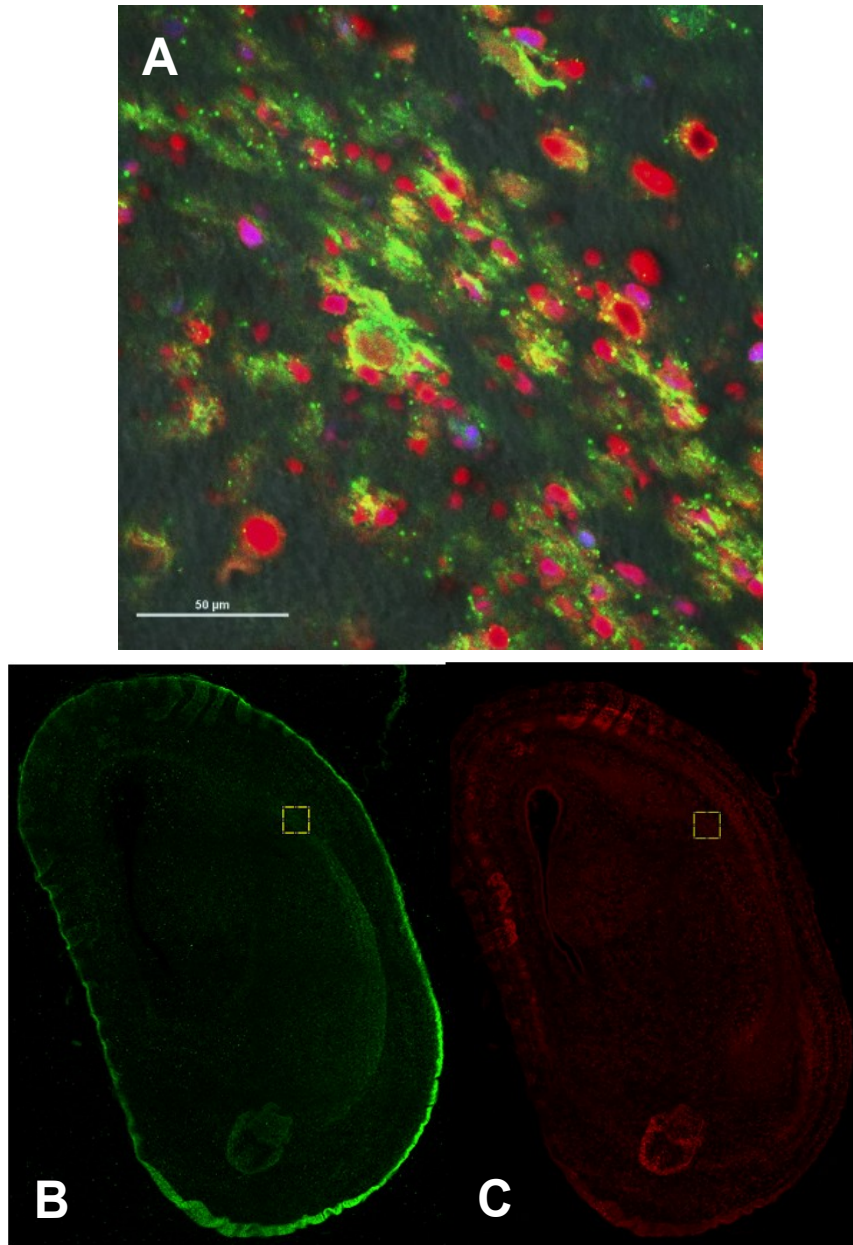


図 2.1.4 ニワトリ後期胚中脳視蓋の同一切片における Scratch2 アンチセンスプローブによる ISH シグナルと軸索の走行の比較  
 E18 ニワトリ胚の脳から凍結矢状切片を作製し、同一切片上で Scratch2 アンチセンスプローブによる FISH (B) と 3A10 抗体による免疫抗体染色 (C) の二重染色を行った。核は DAPI を用いて染色した。A は B, C の四角部分の拡大図である。

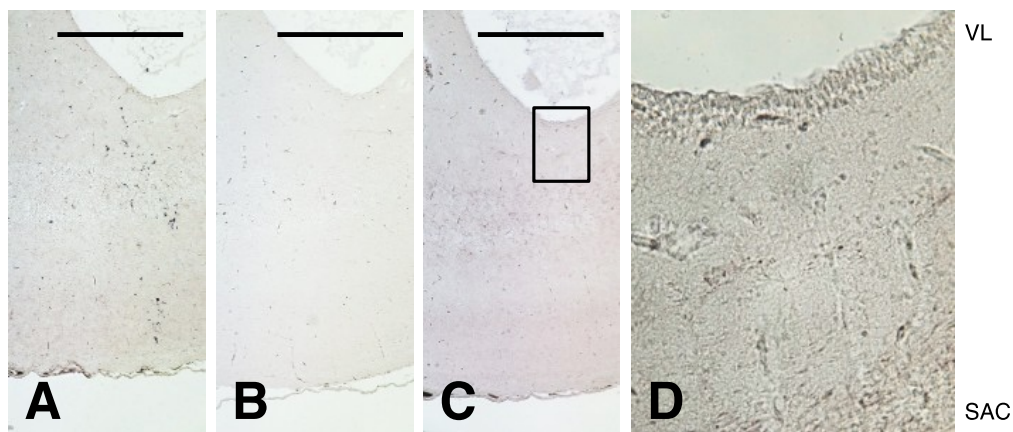


図 2.2.1 負の対照実験

ISH のシグナルが特異的であるか調べる為、対照実験を行った。切片は水平断、視蓋後部を使用した。A は脱パラフィン後、発色液のみを添加した試料、B はプローブ無しの染色、C は pBluescript II SK(+) 由来プローブによる染色を示し、その拡大写真を D に示す。スケールバーは 0.5mm である。



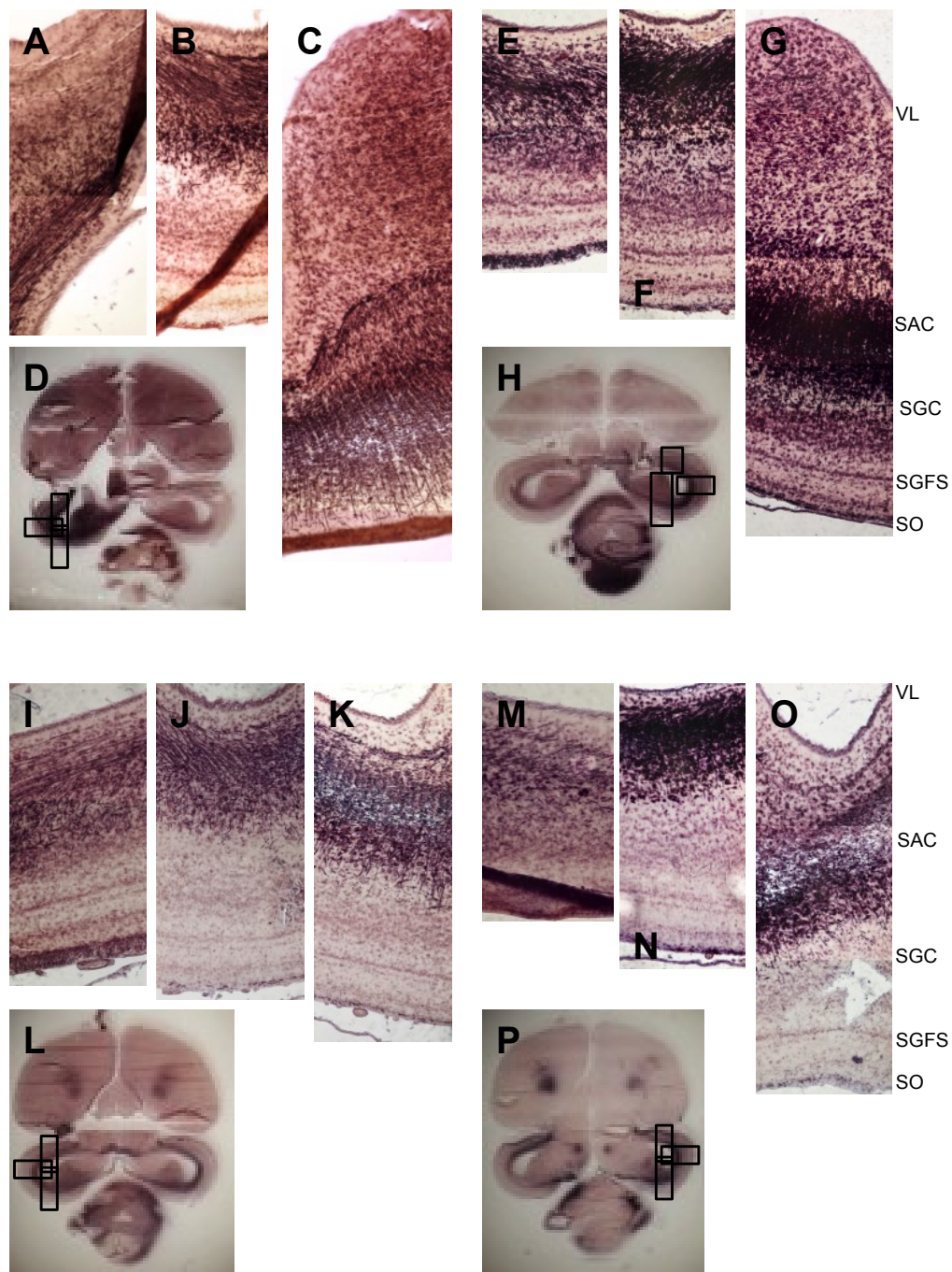


図 2.2.2 ニワトリ E18 胚の脳における APP mRNA および APP アンチセンス RNA の発現パターン

A, B, C, D が APP-N618 アンチセンスプローブで検出した APP mRNA の分布、E, F, G, H が APP-N618 センスプローブで検出した APP アンチセンス RNA の分布を示す。下段 I, J, K, L が APP-C2345 アンチセンスプローブで検出した APP mRNA の分布、M, N, O, P が APP-C2345 センスプローブで検出した APP アンチセンス RNA の分布を示す。奥平桂子修士論文 (2013) より一部改変。

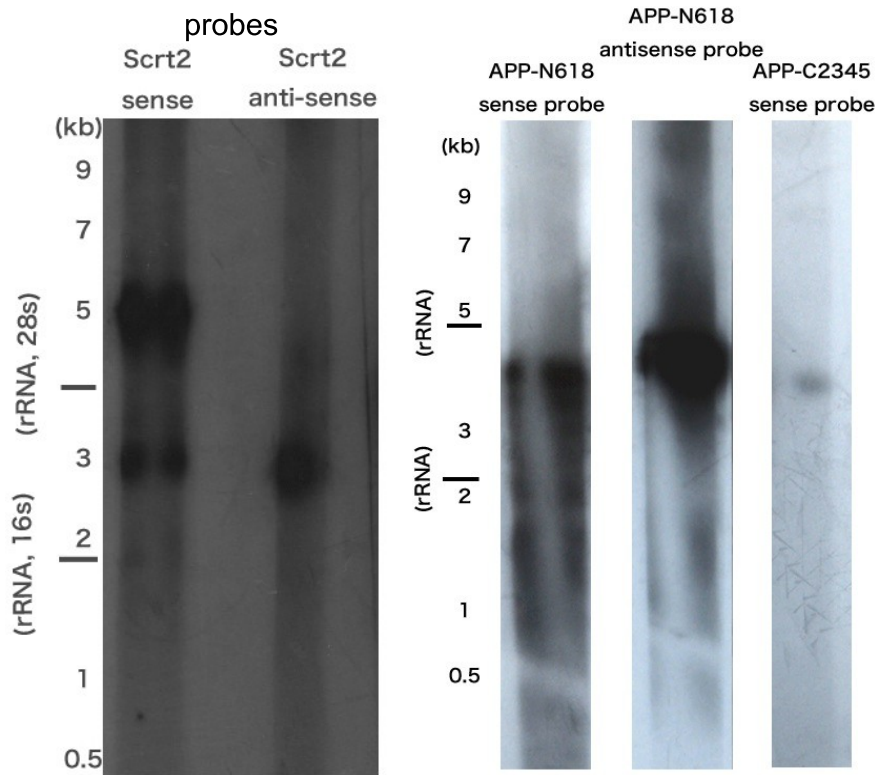


図 2.2.3 Scratch2 と APP-N618 および APP-C2345 のノザンブロット解析

アンチセンス RNA の存在を更に調べる為に、ニワトリ E18 胚から RNA を抽出し、ノザンブロット解析を行った。Scratch2 のセンス及びアンチセンスプローブの両方でバンドが検出された。

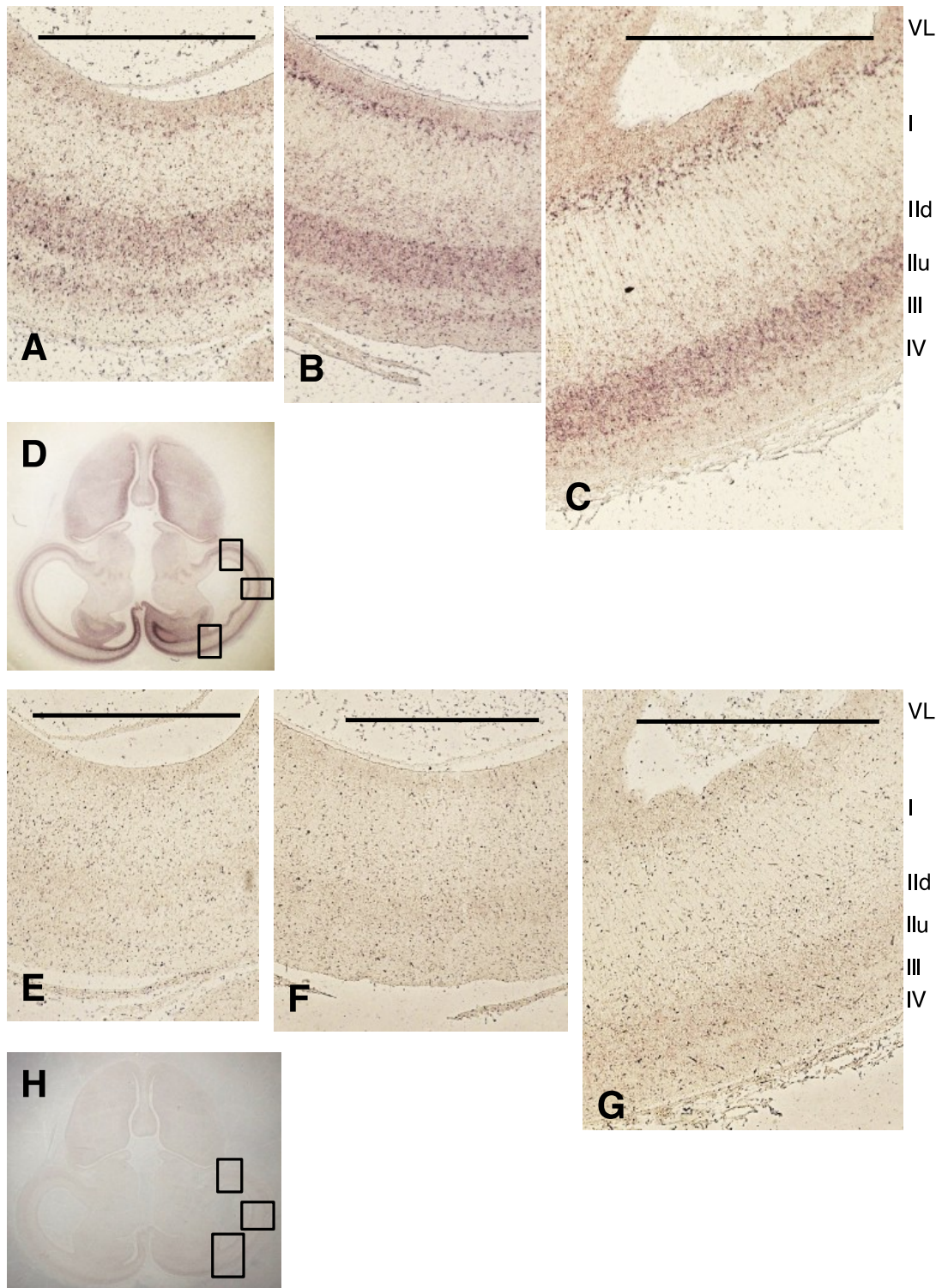


図 2.4.1 ニワトリ E9 胚の脳における Scratch2 mRNA 及びアンチセンス RNA の分布

A, B, C, D が mRNA、E, F, G, H がアンチセンス RNA。写真 A, E が視蓋前部、B, F が視蓋側部、C, G が視蓋後部、D, H が全体像を示す。スケールバーは 0.5mm である。



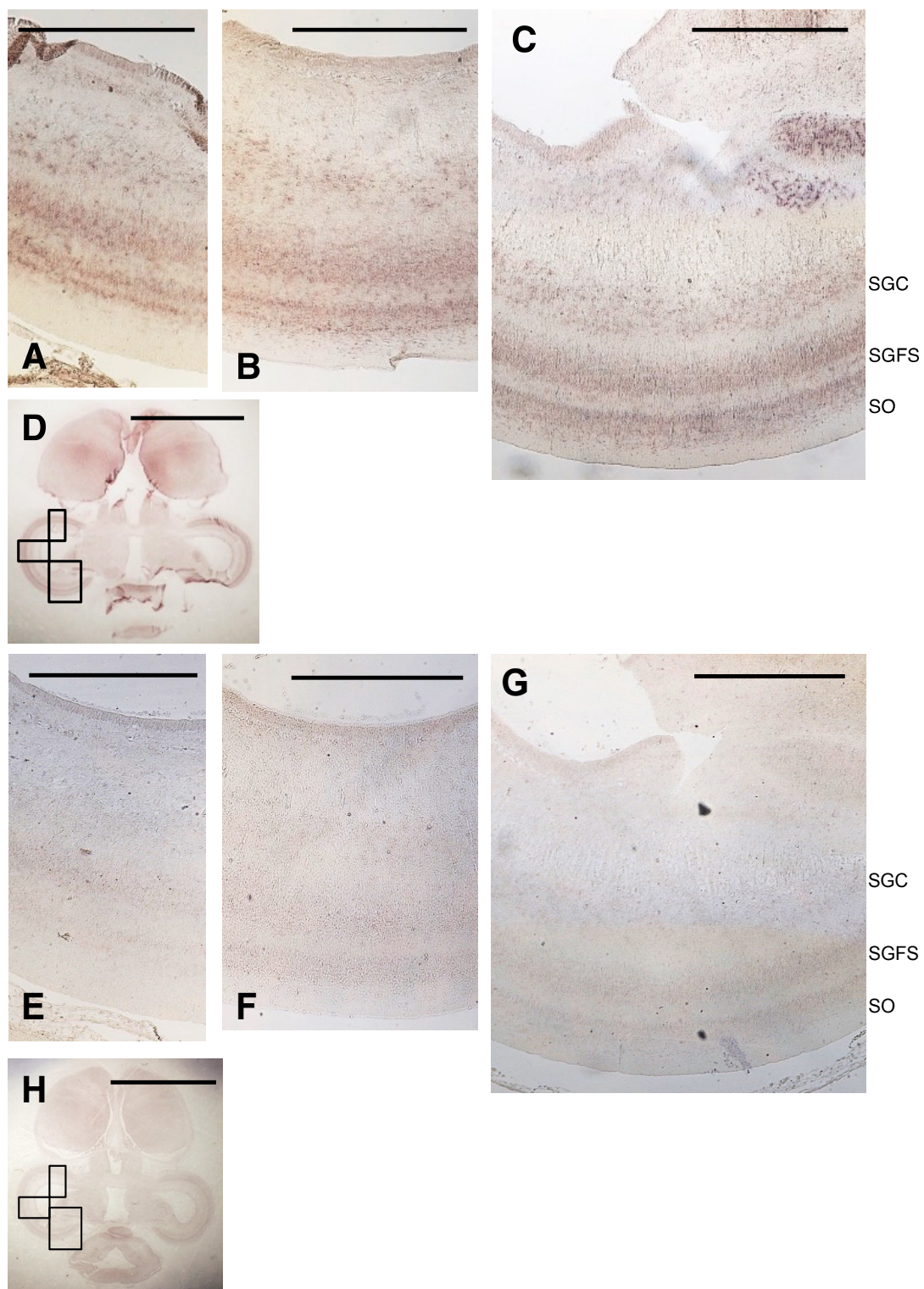


図 2.4.2 ニワトリ E12 胚の脳における *Scratch2* mRNA 及びアンチセンス RNA の分布  
 A, B, C, D が mRNA、E, F, G, H がアンチセンス RNA。写真は A, E が視蓋前部、  
 B, F が視蓋側部、C, G が視蓋後部、D, H が全体像を示す。スケールバーは D, H が  
 5mm、それ以外は 0.5mm である。



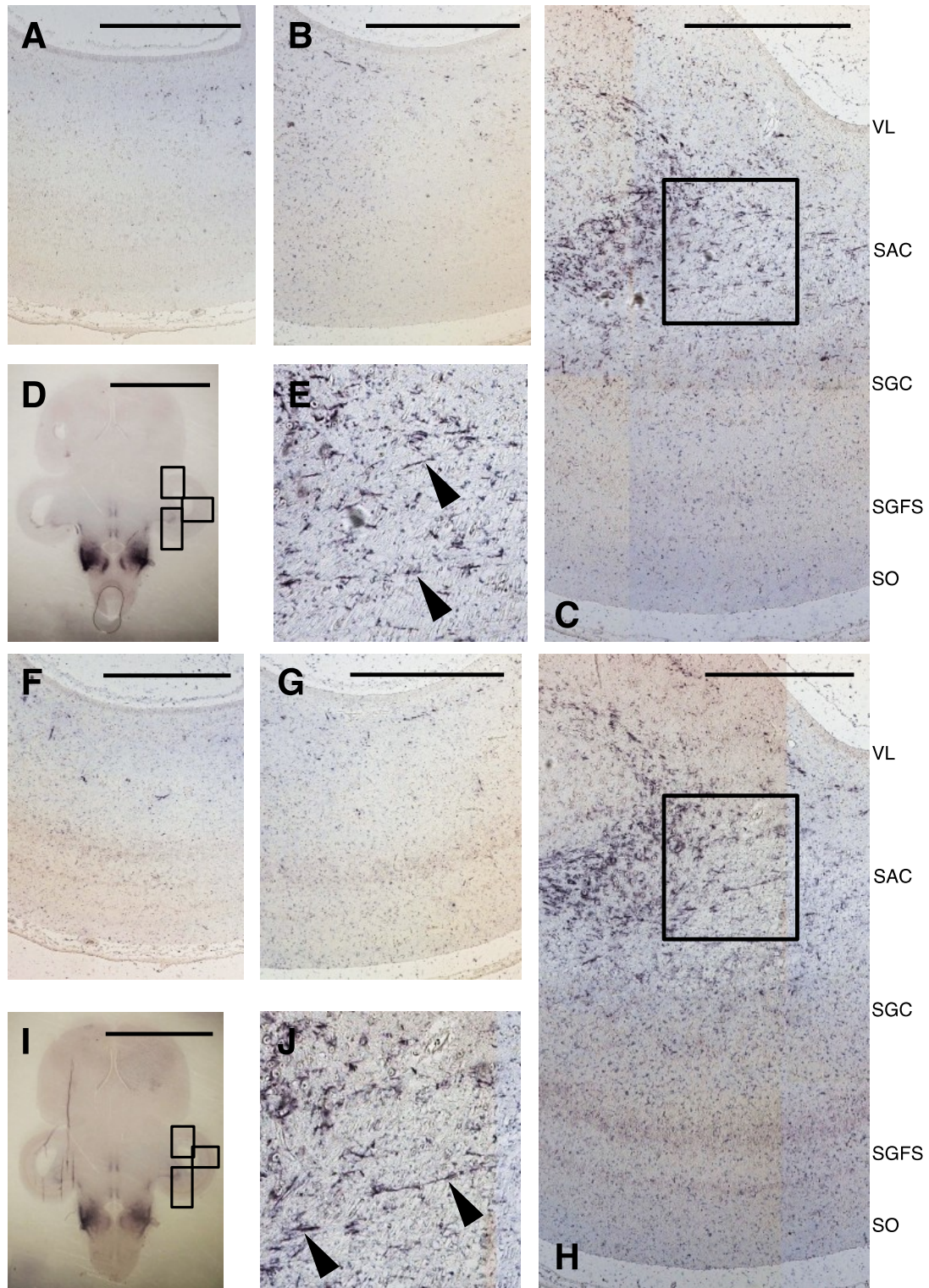


図 2.4.3 ニワトリ E14 胚の脳における *Scratch2* mRNA 及びアンチセンス RNA の分布

A, B, C, D, E が mRNA、F, G, H, I, J がアンチセンス RNA。写真は A, F が視蓋前部、B, G が視蓋側部、C, H が視蓋後部、D, I が全体像を示す。E, J は視蓋後部の拡大写真を示す。スケールバーは D, I が 5mm、それ以外は 0.5mm である。



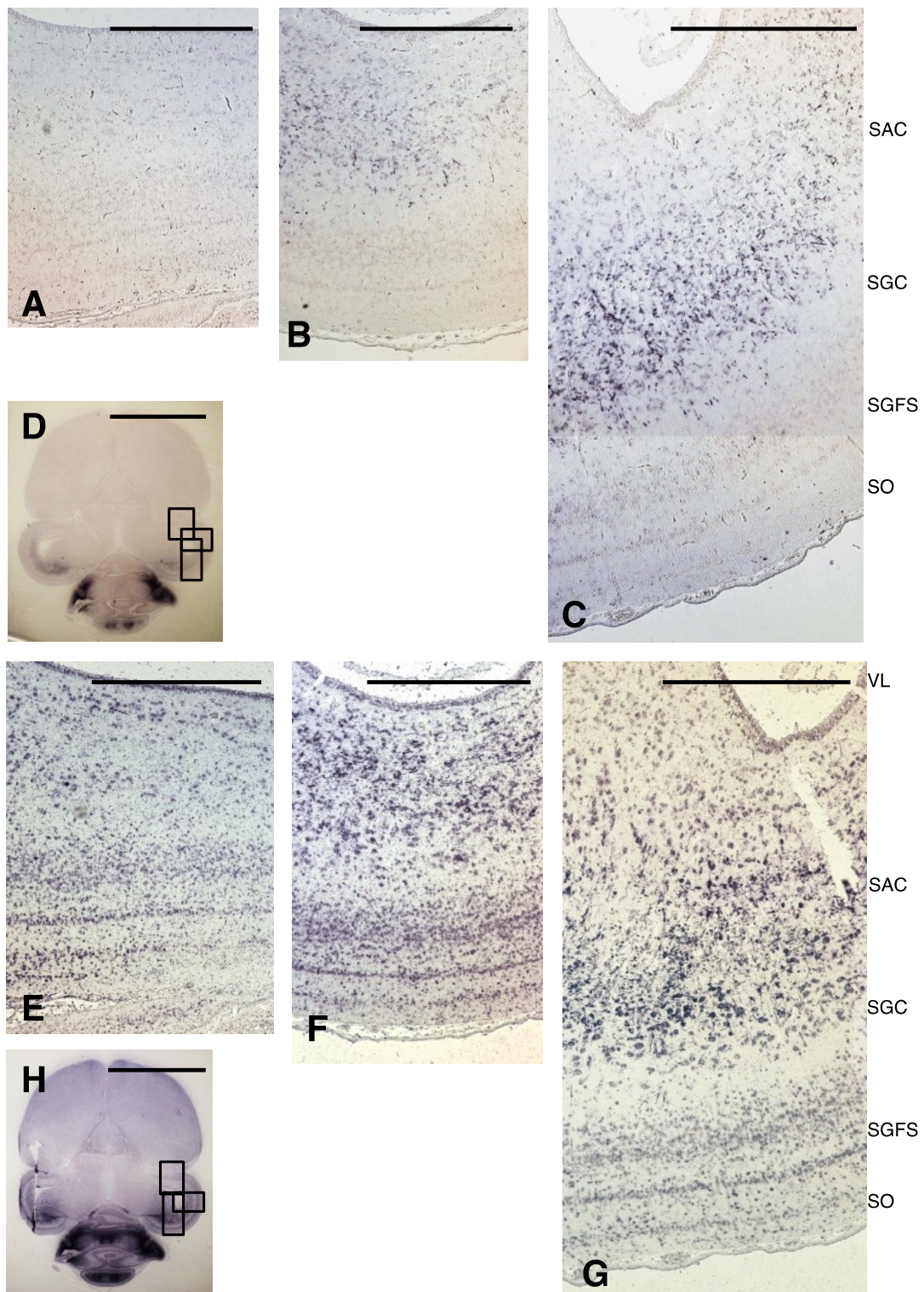


図 2.4.4 ニワトリ E16 胚の脳における Scratch2 mRNA 及びアンチセンス RNA の分布

上段が mRNA、下段がアンチセンス RNA。A, E が視蓋前部、B, F が視蓋側部、C, G が視蓋後部、D, H が全体像である。スケールバーは D, H が 5mm、それ以外は 0.5mm である。

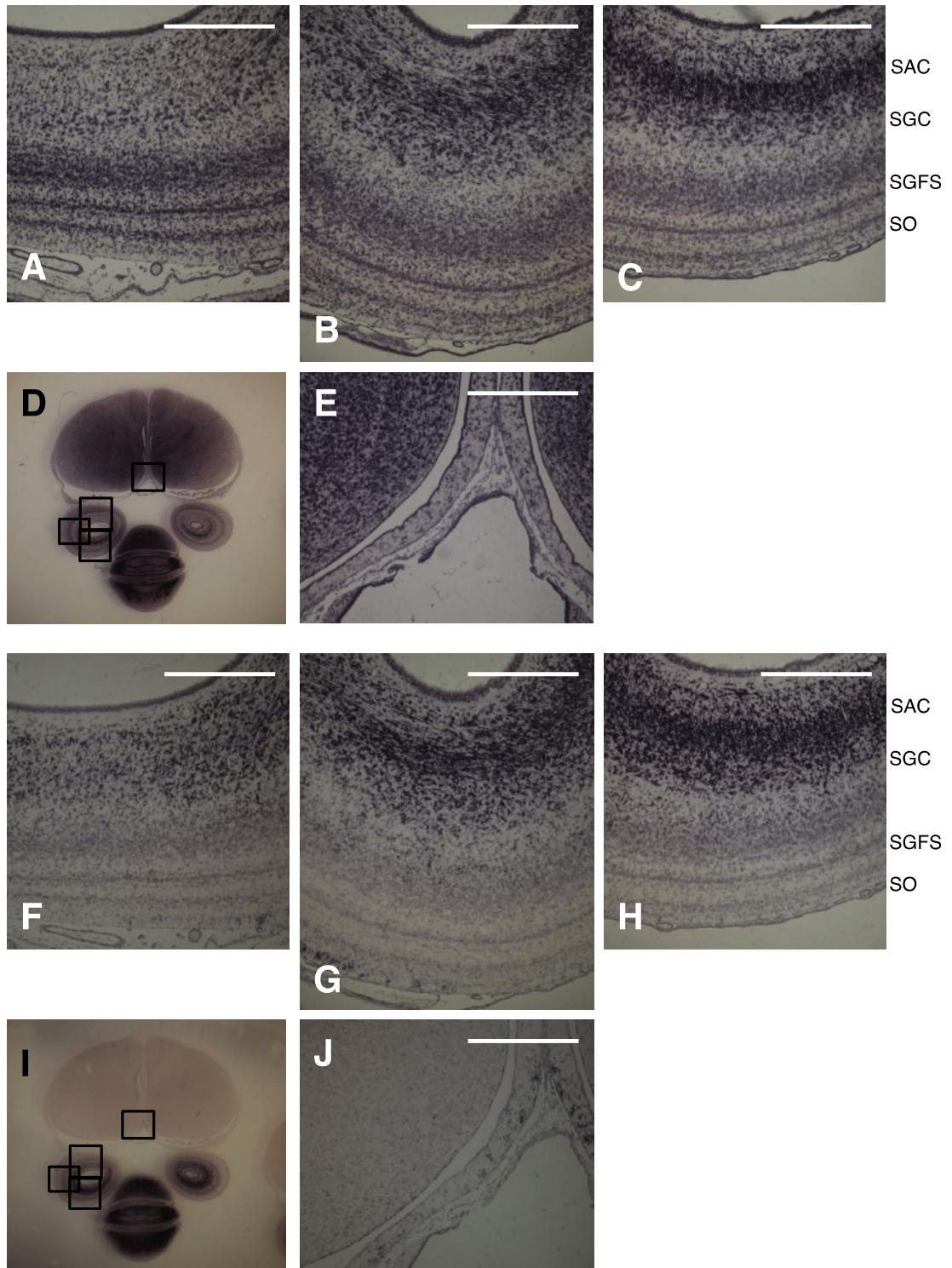


図 2.4.5 ニワトリ E18 胚の脳における Scratch2 mRNA 及びアンチセンス RNA の分布

上段が mRNA、下段がアンチセンス RNA。A, F が視蓋前部、B, G が視蓋側部、C, H が視蓋後部、D, I が全体像、E, J が前脳を示す。スケールバーは 0.5mm である。



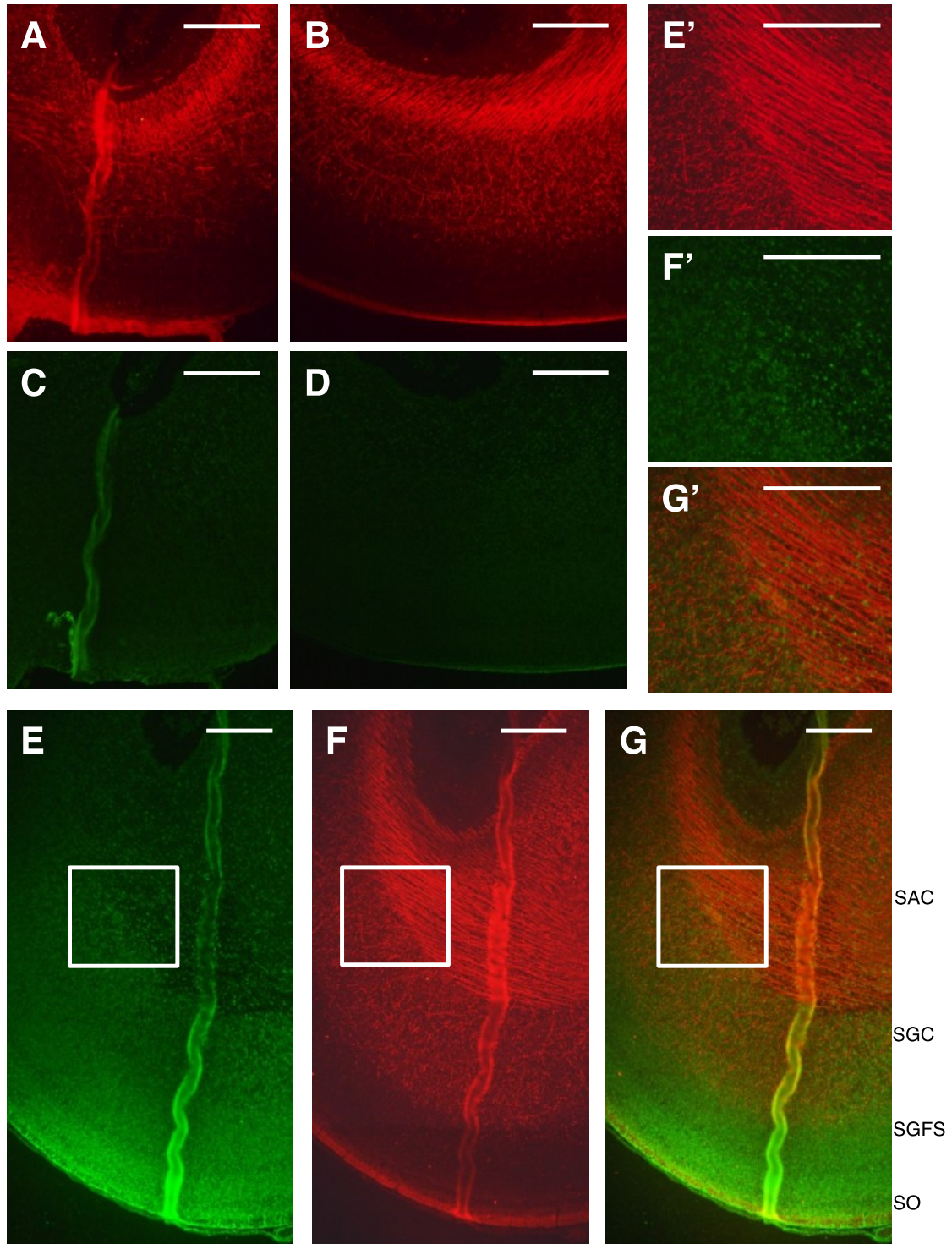


図 2.5.1 ニワトリ E18 胚の脳における Scratch2 タンパク質の分布

赤色は抗 NF-M 抗体、緑色は抗 Scratch2 抗体による蛍光染色を示す。E', F', G' は E, F, G 中の四角で囲まれた領域の拡大写真である。これらを比較すると軸索でタンパク質は見られないことが分かる。この切片では賦活化を行っている。A, C が視蓋前部、B, D が視蓋側部、E, F, G が視蓋後部と合成写真を示す。スケールバーは 0.5mm。

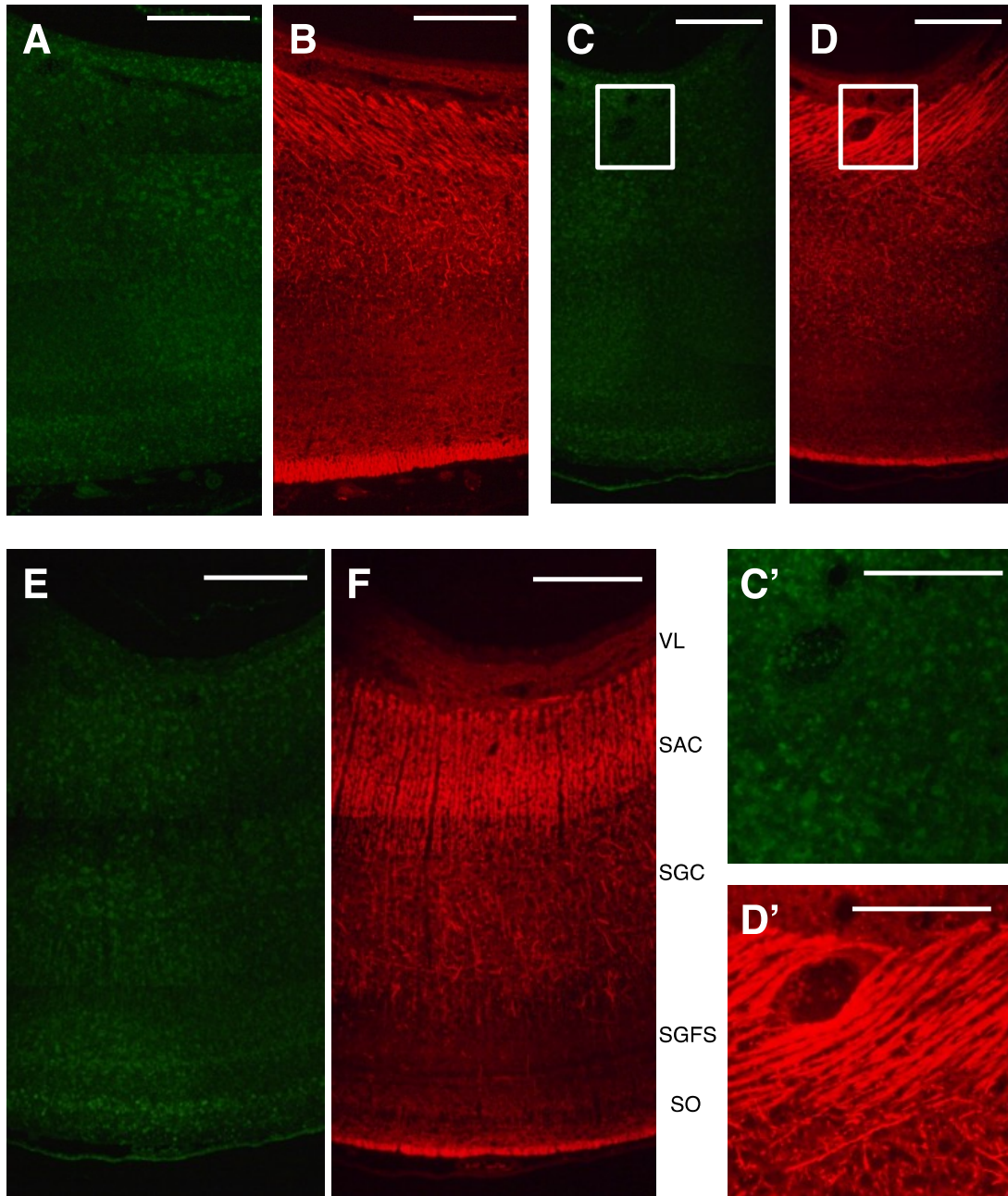


図 2.5.2 ニワトリ E18 胚の脳における APP タンパク質の分布

赤色は抗 NF-M 抗体、緑色は抗 APP 抗体による染色を示す。C', D' は C, D 中の四角で囲まれた領域の拡大写真である。これらを比較すると軸索でタンパク質は見られないことが分かる。この切片では賦活化を行っている。A, B が視蓋前部、C, D が視蓋側部、E, F が視蓋後部を示す。スケールバーは 0.5mm。



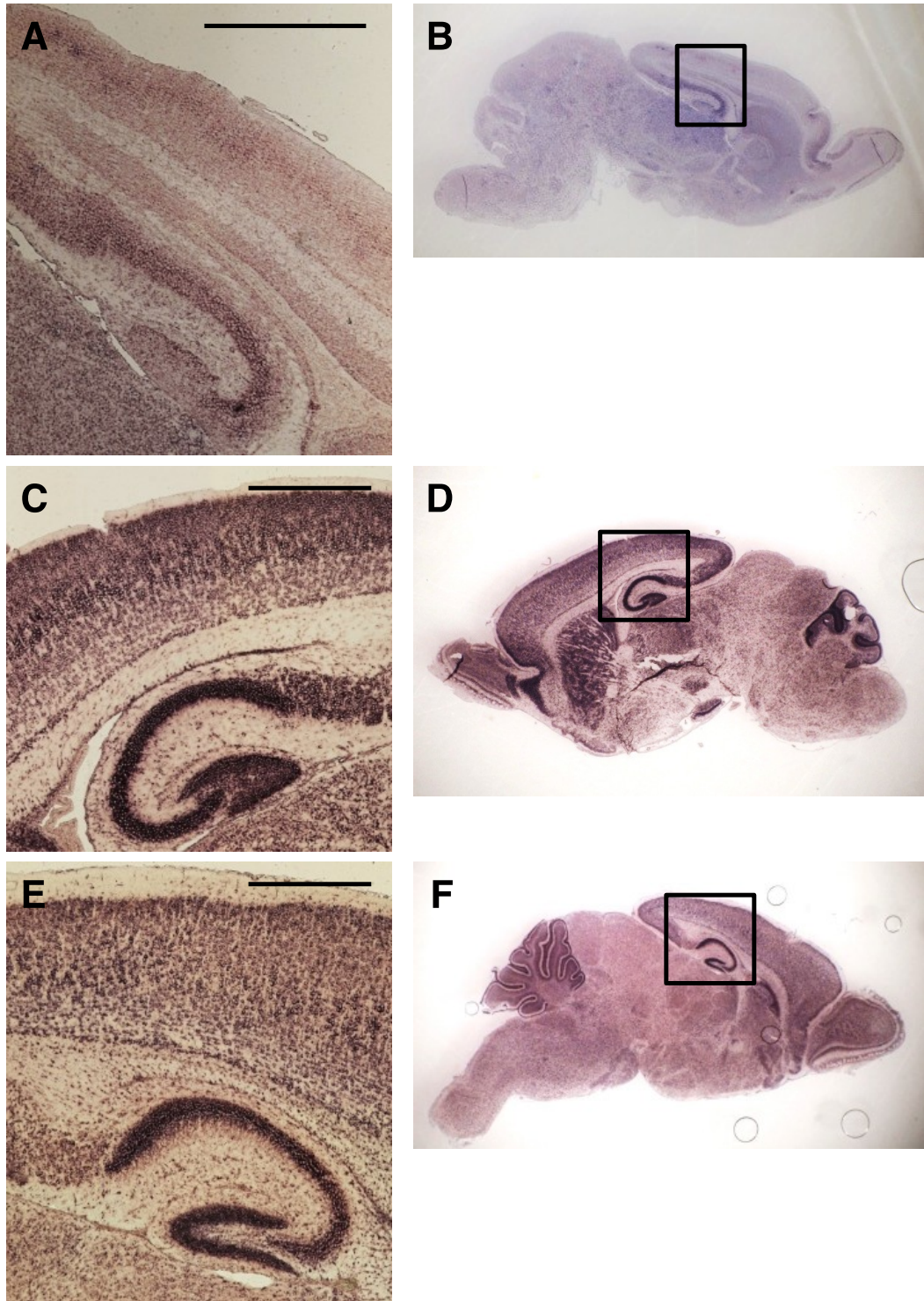


図 2.6.1 マウス幼若個体における  $\beta$ -actin の発現

A, Bは P0、C, Dは P5、E, Fは P10 である。切片 *in situ* ハイブリダイゼーション (矢状切片) スケールバー0.5mm である。



図 2.6.2 ニワトリ E18 胚中脳視蓋における  $\beta$ -actin の発現  
水平断切片を用いて ISH を行った。スケールバーは 0.3mm である

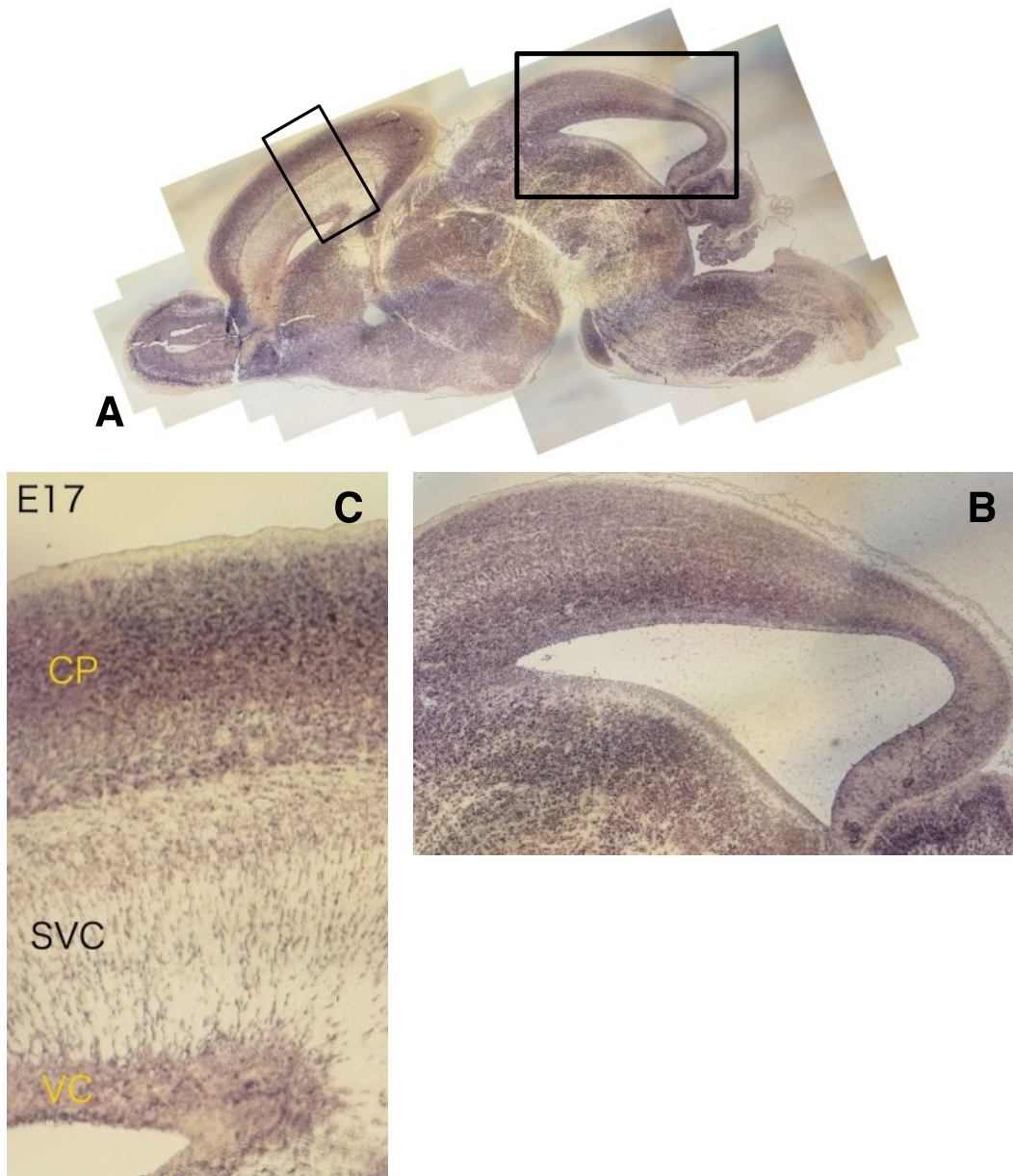


図 2.6.3 マウス E17 胚の脳における *Scratch2* の発現

ニワトリと同様に中脳視蓋で層特異的に発現しているが、軸索における RNA の分布は見られなかった。A が全体像、B が中脳、C が大脳皮質を示す。切片 *in situ* ハイブリダイゼーション (矢状切片)、スケールバーは 0.5mm である。



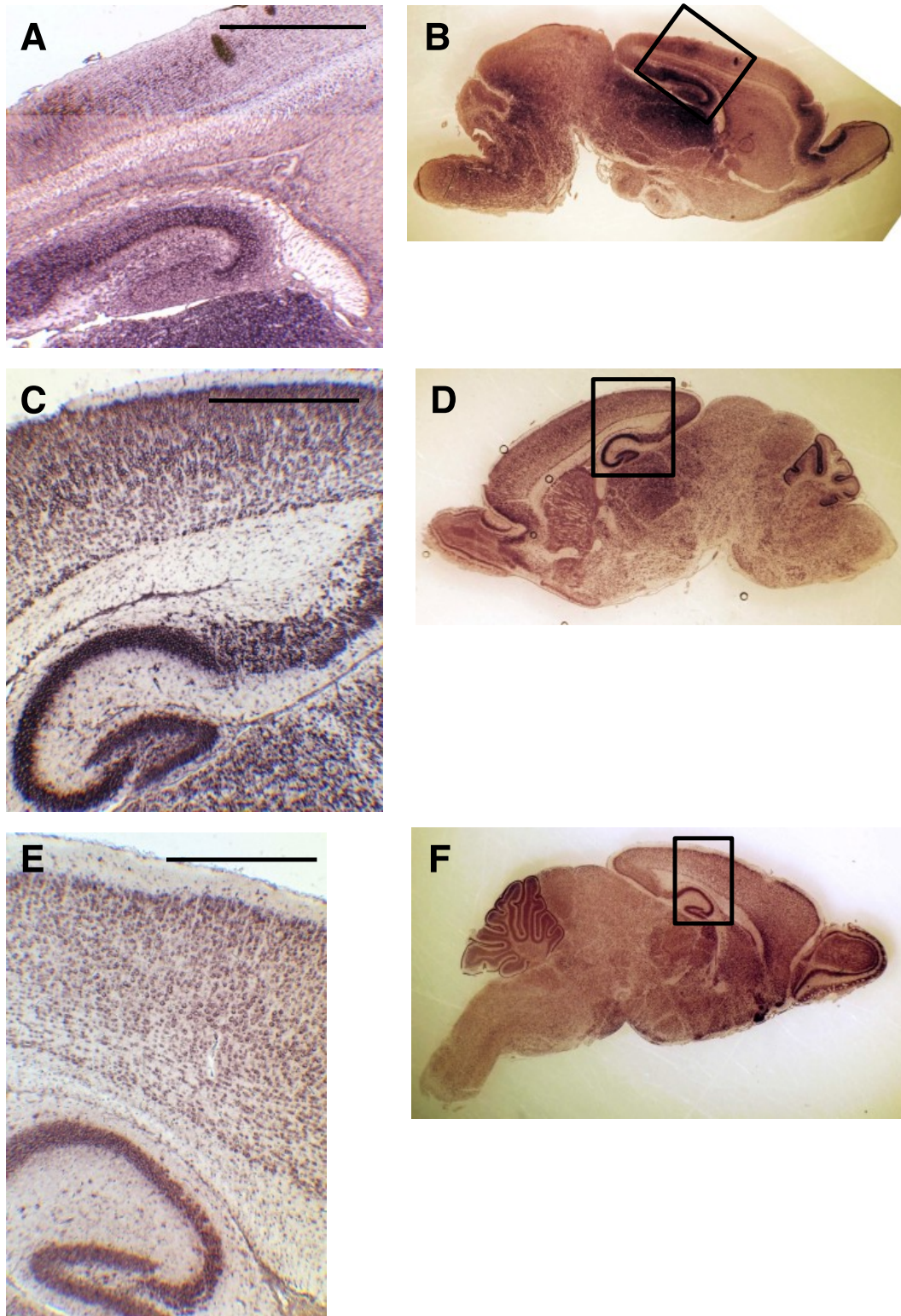


図 2.6.4 マウス幼弱個体における **Scratch2** の発現

上段から P0,P5,P10 マウス胚の切片 *in situ* ハイブリダイゼーション (矢状切片)、スケールバーは 0.5mm である。A, C, E が海馬、B, D, F が全体像を示す。



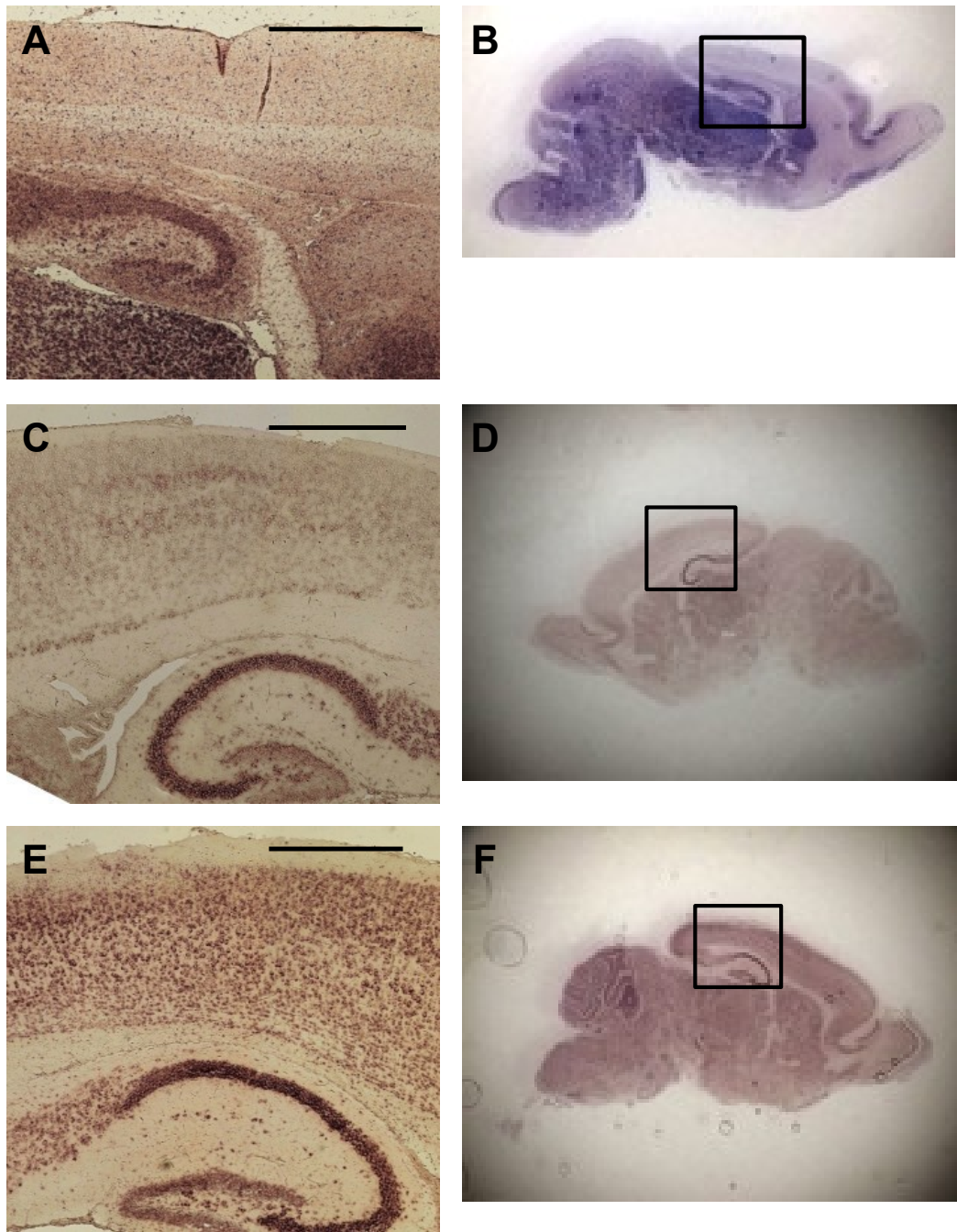
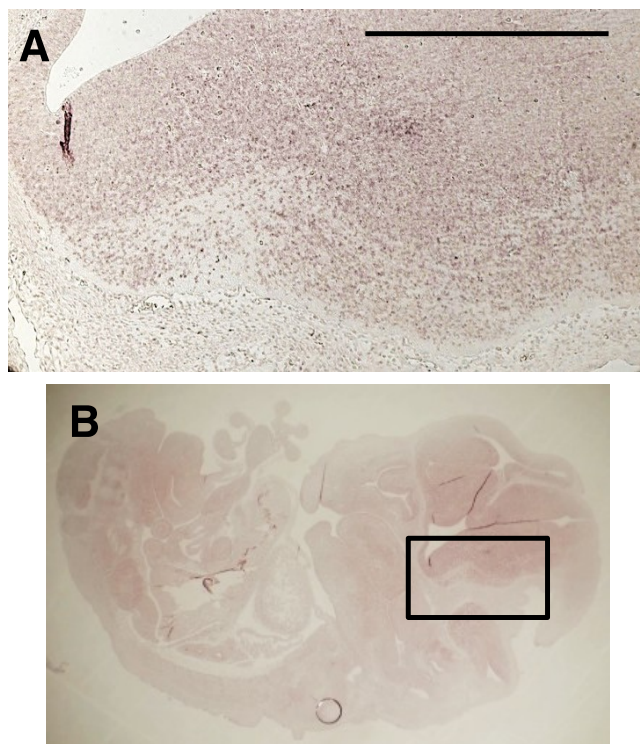


図 2.6.5 マウス幼弱個体における APP の発現

上段から P0,P5,P10 マウス胚の切片 *in situ* ハイブリダイゼーション (矢状切片)、スケールバーは 0.5mm である。A, C, E が海馬、B, D, F が全体像を示す。



**図 2.6.6** マウス E12.5 胚における **Smad1** の発現

先行研究 (Ji & Jaffrey, 2012) と同様の ISH を行った。矢状断、スケールバー0.5mm。

A が三叉神経付近の拡大図、B が全体像を示す。

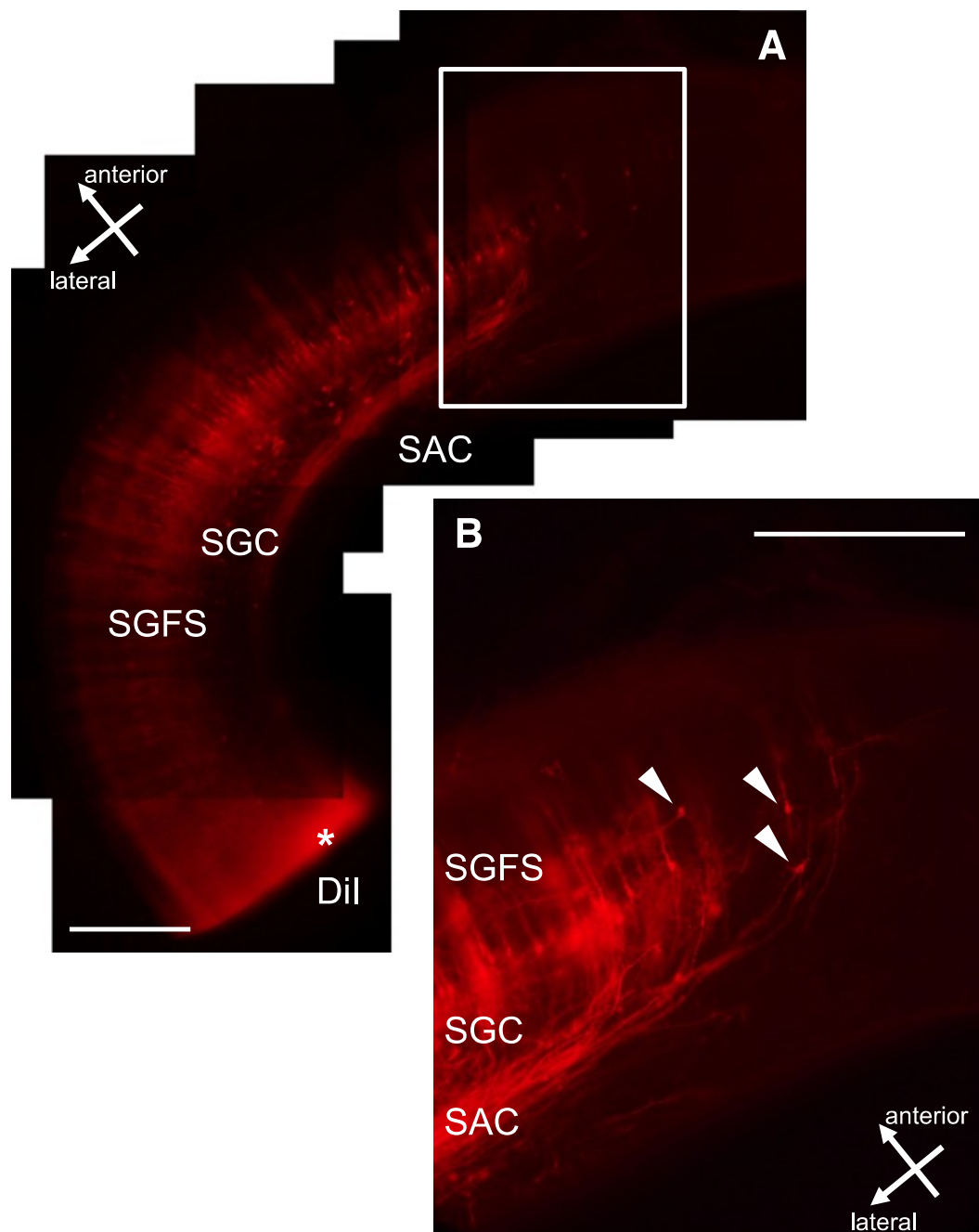


図 2.7.1 脂溶性蛍光色素 DiI による軸索標識

軸索の細胞体の位置を特定する為に軸索が強く染色された中心白層に DiI 結晶を埋め込み、逆行性標識した。矢印は中心灰白質に存在する当該神経軸索の細胞体を示す。スケールバーは 0.5mm である。

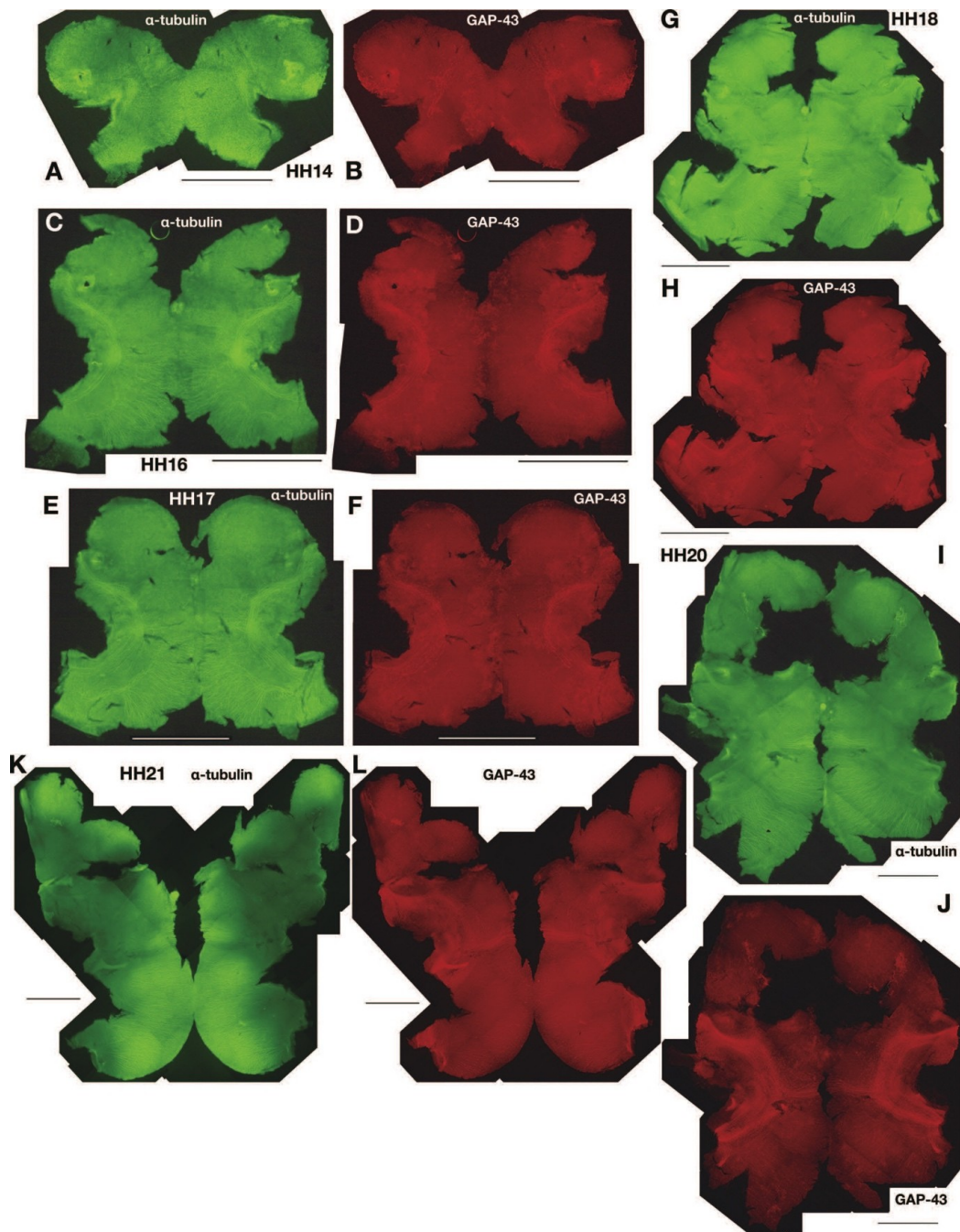


図 2.8.1 ニワトリ胚吻側脳におけるアセチル化 $\alpha$ チューブリンと GAP-43 の発現パターンの比較

抗アセチル化 $\alpha$ チューブリン抗体(緑、A, C, E, G, I, K)および抗 GAP-43 抗体(赤、B, D, F, H, J, L)による二重免疫蛍光染色。発生段階は HH14 (A, B)、HH16 (C, D)、HH17 (E, F)、HH18 (G, H)、HH20 (I, J)、HH21 (K, L) である (Hamburger & Hamilton 1951)。試料は腹側中線に沿って切った後、脳室側をスライドガラスに向けてフラットマウントした。



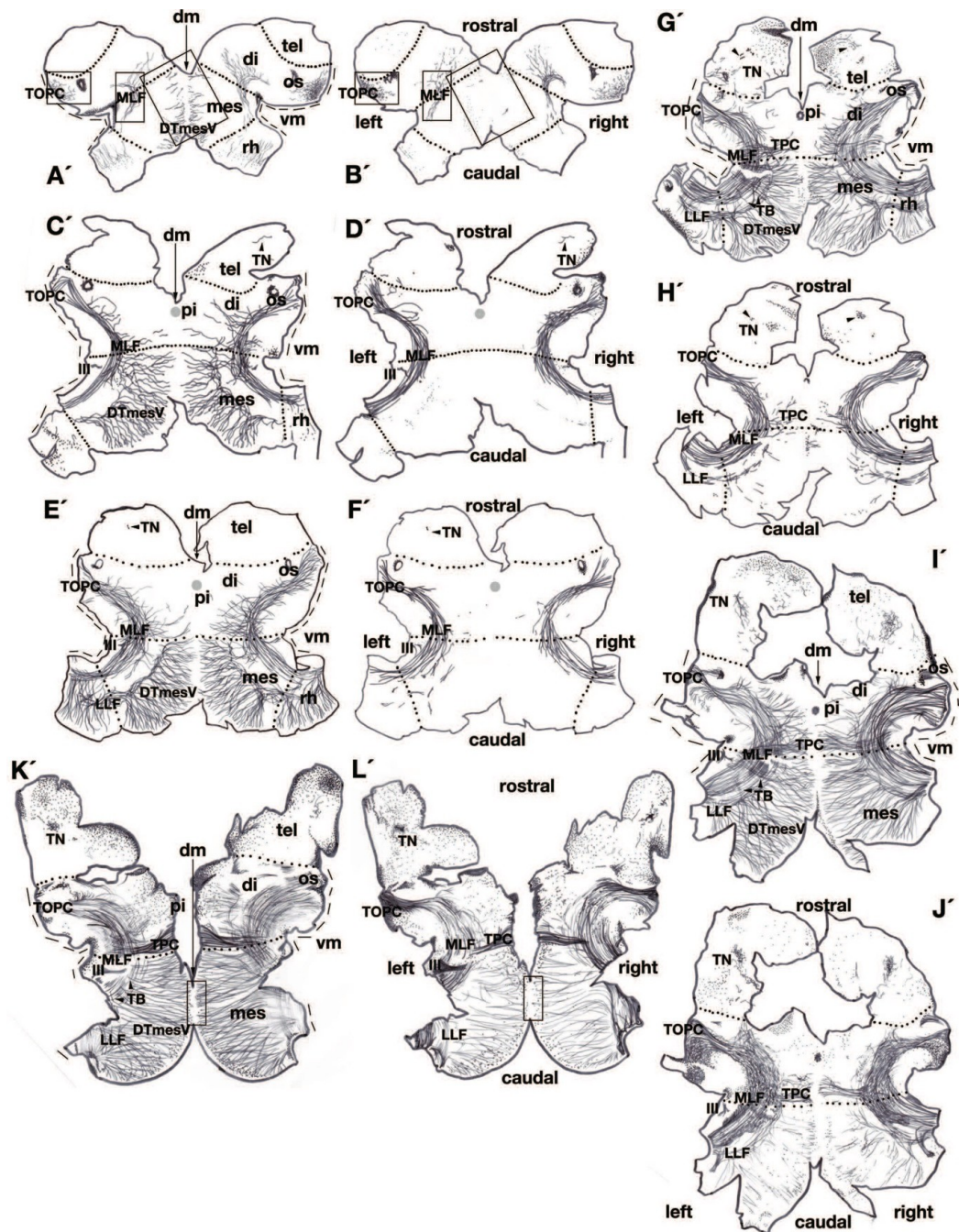


図 2.8.1 (つづき)

A'-L'において点線は、端脳-間脳、間脳-中脳、中脳-菱脳境界を示す。背側中線 (dm) を矢印で示す。破線は腹側中線 (vm) を示す。四角で囲んだ領域を、図 2.8.2 で拡大している。略号 : di, 間脳、III, 動眼神経、mes, 中脳、os, 眼柄、pi, 松果体、rh, 菱脳、tel, 端脳、MLF, 内側縦束 (medial longitudinal fascicle)、TPOC, tract of the postoptic commissure、TN, 終神経 (terminal nerve)、TPC, tract of the posterior commissure、DTmesV, 三叉神経中脳核下行路 (descending tract of the mesencephalic nucleus of the trigeminus)、LLF, 外側縦束 (lateral longitudinal fascicle)、TB, 視蓋延髄路 (tectobulbar tract)。スケールバーは 1mm である。

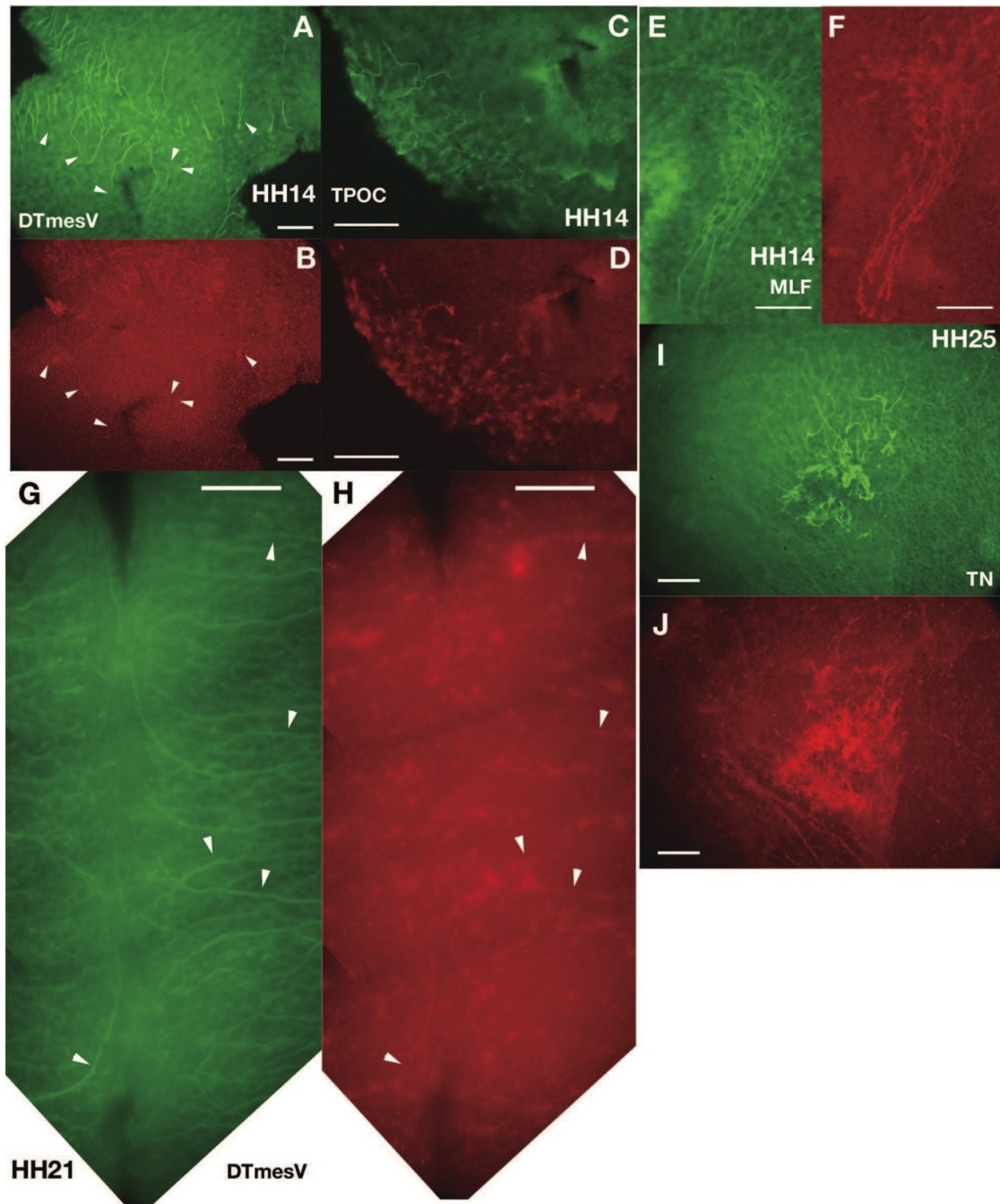


図 2.8.2 ニワトリの発生中の軸索における GAP-43 タンパク質の差別的発現

抗アセチル化 $\alpha$ チューブリン抗体（緑、A, C, E, G, I,）および抗 GAP-43 抗体（赤、B, D, F, H, J,）による二重免疫蛍光染色。HH14 において殆どの DTmesV ニューロンは GAP-43 陰性（A, B）である一方、TPOC（C, D）および MLF（E, F）ニューロンは陽性である。但し、少数の DTmesV ニューロンは弱く GAP-43 を発現する（A, B の矢頭）。HH21 において大多数の DTmesV 軸索は未だ GAP-43 に関し陰性である一方、少数のものは陽性である（G, H の矢頭）。（I, J）推定 TN 細胞は GAP-43 を発現する一方、周りの端脳ニューロンの発現は低いか検出できない（HH25）。スケールバーは 0.1mm である。

表 2.3.1 他の軸索性 mRNA プロファイリング研究でも検出された高レベル軸索性 mRNA を生ずる遺伝子

	Taylor et al. (2009)	Zivraj et al. (2010)	Zivraj et al. (2010)	Gumy et al. (2011)	Gumy et al. (2011)
	E18ラット大脳皮質から単離したニューロンの培養11日目に軸索切断し、その2日後において、有意に存在量に変化する軸索性mRNA	E15マウスから単離した網膜神経節細胞の培養1日後の成長円錐のmRNA	Xenopus のstage 32幼生から単離した網膜神経節細胞の培養1日後の成長円錐のmRNA	4日培養したE16ラット由来背根神経節ニューロンの軸索	4日培養した成体ラット由来背根神経節ニューロンの軸索
Gata3	○				
Scratch2		○			
Histone H1F0				○	○
KIF1B	○			○	
Mef2D			○		
Fgf8			○		
Pax6			○		
Myosin IB	○				
BCAN	○				
Hey1			○		
DBH		○			
APP				○	○



表 4.2.1 鋳型 cDNA 単離に用いたプライマー

Genes	Probes	Name of 5' primer	5' primer	Name of 3' primer	3' primer	Remarks
<b>Chicken genes</b>						
<b>Nuclear Factors</b>						
Gata3	Gata3	Gata3-41f	CCTCTCCCTCCGATTACAAAC	Gata3-1613r	CATCAGACCATAACCACACG	
Teashirt2	Teashirt2	Tshz2-150f	GCCAAAGGAGAAACAGCAAG	Tshz2-1240r	CATTCTGGTAGCCGTAGCG	
Scratch2	Scratch2	Scr2-260f	TCTCCGCCCGCTACTCAAC	Scr2-748r	AGGTCCTTCGCACTGCTTGG	
Ase1/Cash1	Cash1	PCRを使用せず				未発表
Otx2	Otx2	PCRを使用せず				Katahira et al. (2000)
AP2β	AP2β	AP2β-43f	CTCTGGAAACTGGTTGAAATG	AP2β-1355r	TTACTACCTGGTCTTCGCG	
MeF2A	MeF2A	MeF2A(OHF/HindIII)-f	AAGCTTGGCACCATTGGGGAGAAAGA	MeF2A(OHF/BamHI)-r	GGATCCTTATGTCACCCACGTGTCC	鋳型: UD clone, pgn1c.pk019.121
MeF2C	MeF2C	MeF2C-804f	GAGAGAAAAAAAACGGGGACTATG	MeF2C-1722r	AGTTGACTGAGGGCAGACGG	
MeF2D	MeF2D	MeF2D-102f	GCGTAAGTTCGGCTTGATGAAG	MeF2D-985r	TCGGGGTGGCAACAGAAAC	
Pax6	Pax6					Matsunaga et al. (2000)
Sp5	Sp5	Sp5-142f	ACTCGCTCCAGGCTTCTCTC	Sp5-930r	TGTGGCAGACGTGCTGCTTC	
Hey1	Hey1	Hey1-814f	CCAAACTGTCTCCTCCTCTTCTCTC	Hey1-1588r	CGTCTCCAGCAACGAAACTCAC	
Zinc finger protein 488	ZFP488	ZNF488-850f	TCAGAGCTGAAAAAGGCACC	ZNF488-1878r	GGGATAAATGATGGCGTTCTCG	
Histone H1F0	Histone H1F0	HistoneH1F0-38f	CCACATCCGTTGTTGCTG	HistoneH1F0-823r	TTCTTTCATTGTTGCTCTTG	
<b>Transporters</b>						
Choline acetyltransferase	ChAT	ChAT-24f	GCAGAAGAAGGAGAAAGATTCAAG	ChAT-1003r	AATGTTCCACACAGTGCOCG	
Serotonin transporter	SERT	SERT-1200f	CCATAACAACCTGCTACCAAGACGC	SERT-2077r	TTTGACTCTGTGCTTCCCTCTC	
Glycine transporter 2	GlyT2	GlyT2-1578f	TGCTGCCACTCAGATTTCTTCTC	GlyT2-2429r	GAACACACCAACTTCACTCGCTC	
<b>Cell surface receptors</b>						
Substance-P receptor	SP-R	SPR-575f	ACTTCTTGGTGAACCTGGCTTTC	SPR-1312r	CCACACGGAACTGTCAATTGAG	
Amyloid precursor protein	APP-N818	PCRで単離したAPP cDNAを制限酵素(EcoRI-SphI)で切断して鋳型を作製				鋳型配列番号34-618の部分
	APP-C2345	PCRで単離したAPP cDNAを制限酵素(XhoI-SfuI)で切断して鋳型を作製				鋳型配列番号2345-2792の部分
Transferrin binding protein	TfBP	TfBP-71f	TTTTCTCTCAGCATCAGCAGCC	TfBP-1051r	TCTTCTCCTCCTTCAACCG	
<b>Cytoskeletal proteins</b>						
β-actin	β-actin	β-actin-1197f	ACCGGACTGTTACCAACACCCGA	β-actin-1738r	CCCCCTCCCTCCCCACATA	
KIF1B	KIF1B	KIF1B-3743f	CAGAGTGTGAGCAATACGACC	KIF1B-5404r	AAGAAGTGGTTGAAAGGCG	
Myosin1B	Myosin1B	Myosin 1B-1758f	CCAAAATCAAGAAACAGGCTAAC	Myosin 1B-3551r	CCACAGTCCACAACCTCG	
<b>Extracellular signaling proteins</b>						
Fibroblast growth factor 8	Fgf8	PCRを使用せず				Sato et al., 2000
Brain derived neurotrophic factor	BDNF	BDNF-122f	GGACTCTTGAAGCCTAACTGG	BDNF-752r	ACACGAGCCCACTATCTTCC	
Neurotrophin-3	NT-3	NT3-184f	CTTCGTGGCATTACAGTCAAC	NT3-888r	CGCAGGAGGTGTCTATTCTTATC	
<b>Extracellular matrix proteins</b>						
Aggrecan	ACAN	ACAN-101f	TGCCAGGTGTATGGGACTTAGATTC	ACAN-1084r	TGGAATGGGGTAGCGCAAGC	
Brevican	BCAN	BCAN-113f	TGCCAACCTGCTGCCTACTG	BCAN-912r	TGCTCATAGCCGCCAGATAG	
<b>Other intracellular proteins</b>						
Tyrosine hydroxylase	TH	TH-123f	CTCCACGGTTCATTGGTAGACG	TH-825r	TGGGGGATGTTGTTCTCATTGTAG	
atypical protein kinase C ζ	aPKCζ	aPKCζ-37f	AAAGACATCATCAGAGTGAAAGCG	aPKCζ-974r	CGACTTGTGTTGAAAGCAGC	
Partitioning defective 3	Par3	Par3-685f	AGTTTCAGAGAGACAATGCTCGTTC	Par3-1864r	CCCTCCATCTTGTGTGCTTC	
Glutamic acid decarboxylase 65	GAD65	GAD65-124f	GATTTCCACTACCCCAACGAGC	GAD65-1211r	TCAAACACGATTTGATACCTTCTC	
Glutamic acid decarboxylase 67	GAD67	GAD67-1795f	GAGATGGTTTTTGAAGGAGAGCC	GAD67-2734r	TTATCCCGATGTGACACTAAAGG	
Dopamine β-hydroxylase	DBH	DBH-717f	CCAAAGACGACCTACTGTTGTTAC	DBH-1888r	GTTGAATGTTTCCAAAGGACG	
<b>Mouse genes</b>						
Scratch2	Scratch2	mouse Scr2-184f	GGGGACATTGATGATTAGAG	mouse Scr2-868r	CCGTCAGAGATGAAGAAGGC	
β-actin	β-actin	mouse β-actin-1123f	ACTGTCCACCTTCCAGCAGATG	mouse β-actin-1802r	CAGGGAGACCAAGCCTTCATAC	
Amyloid precursor protein	APP	mAPP-469f	CACACACCCACATCGTATTCC	mAPP-969r	TGGCAGTGTGTTGTTCTCTC	
Smad1	Smad1	mouse Smad1-736f	TGTTTCCAAAGCAGAAGGAGTCC	mouse Smad1-1252r	TTCACCCACACGGTTGTTGAG	
注1: 仲村春和研究室からのgift						
注2: 単離の詳細は本研究室、奥平桂子による修士論文「ニワトリ胚培養におけるアミロイド前駆タンパク質 (APP) の発現と機能の解析」を参照						