

The zebrafish purpurin gene and its expression in the retina during optic nerve regeneration

メタデータ	言語: jpn 出版者: 公開日: 2017-10-04 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: メールアドレス: 所属:
URL	http://hdl.handle.net/2297/9745

ゼブラフィッシュプルプリン遺伝子クローニングと 視神経再生網膜における発現

金沢大学大学院医学系研究科脳医学専攻脳情報分子学
(旧講座名：分子神経情報)
(主任：加藤 聖教授)

田 中 聖 之

我々は既に金魚視神経再生のトリガー分子として神経再生初期に発現が増加するプルプリン cDNA をクローニングしている。本研究では、金魚プルプリン cDNA と高い相同性 (90%) を示した 591 bp のオープンリーディングフレームを含む全長 854 bp のゼブラフィッシュプルプリン cDNA を同定した。視神経損傷後のゼブラフィッシュ網膜でプルプリン mRNA レベルは損傷後 1-3 日で急激に増加し、その後急激に減少し 10 日目には正常レベルに戻った。mRNA 変化の細胞局在は視細胞に限局していた。プルプリンタンパク質レベルは損傷後 3-5 日で急激に増加し、その後急激に減少し 10 日目には正常レベルに戻った。以上の結果は、プルプリンがゼブラフィッシュでも視神経再生のトリガー分子であることを強く示唆する。更に、金魚プルプリン cDNA をプローブとして、ゼブラフィッシュ脳 DNA から作製したゲノミック DNA ライブラリーをスクリーニングし、4.2 kbp のプルプリンゲノミック DNA をクローニングした。そのクローンは 2.3 kbp の転写領域とその 5' 上流領域 1.9 kbp から構成されていた。プルプリン遺伝子は 6 つのエクソンと 5 つのイントロンから成っていた。エクソン 1 は非翻訳領域のみで、タンパク質をコードする翻訳領域はエクソン 2-6 に含まれていた。推定される 5' 上流 1.9 kbp の転写調節領域には、オプシン遺伝子上流に存在が知られている、OTX-1, NRE, CRX, E-opsin-1, Ret1/PCE-1 などの網膜特異的な遺伝子のコンセンサス配列が存在した。このようにゼブラフィッシュの視神経再生開始の分子メカニズムをより詳細に解明するためには、網膜または視細胞特異的な遺伝子のゲノム情報とそれに基づくプロモーター解析が必須になるであろう。

Key words zebrafish, purpurin gene, cloning, retina, optic nerve regeneration

哺乳類とは異なり、魚類の中樞神経系 (central nervous system, CNS) ニューロンの軸索は神経損傷後においても再生可能であり、軸索は標的部位に向かって再伸長し CNS の機能も回復することが知られている。例えば、金魚の網膜神経節細胞 (retinal ganglion cells, RGCs) は視神経損傷後 5-7 日で軸索再伸長を開始し、4-6 週間経つと標的部位である視蓋にまで到達し、4-6 ヶ月で視覚機能が完全に回復する^{1,4)}。一方、ラットの RGCs は視神経損傷後アポトーシスにより 1-2 週間ではほぼ完全に死滅する⁵⁾。このように、魚類の視覚システムは長期間にわたる CNS 再生過程の研究において非常によいモデルであり、再生開始や完了を決定する分子メカニズムを解析するためには魚類を利用することは非常に重要である。歴史的にも、金魚は CNS 再生の研究において最もよく使われている実験動物である。我々はその再生メカニズムに興味をもち、金魚視神経再生に関わる分子を探索する研究をはじめた。金魚の視神経損傷後 5 日目の網膜から cDNA ライブラリーを作成し、正常網膜とのディファレンシャルハイブリダイゼーション法にて再生初期に発現の増加する cDNA クローンをいくつかスクリーニングした⁶⁾。

そのうちの一つがプルプリンの全長 cDNA であった⁷⁾。プルプリンは元来、発達期のヒヨコ網膜で発見された分子⁸⁾であり、スクリーニングにより得られた cDNA クローンは、その金魚ホモログであった。この網膜特異的なプルプリンは分子量 22 kDa の分泌型レチノール結合タンパク質で、金魚の網膜においてプルプリン mRNA の発現は視神経損傷後 2-5 日で未処理群と比較して約 2 倍に増加し、損傷後 10 日目には正常レベルに戻った。また、発現の局在は視細胞に限局していた⁷⁾。このようなプルプリン mRNA の早期かつ一過性の増加はプルプリンが金魚視神経再生のトリガー分子になる可能性をしめした。また興味深いことに、網膜組織片培養においてプルプリンとレチノールの共添加が視神経未切断の網膜 (無処理網膜) では軸索の突起伸長を誘発したのに対して、あらかじめ切断 5-7 日後の網膜 (処理網膜) では効果のないことが証明された⁷⁾。この結果から、視神経再生の初期刺激 (プライミング) が生じている切断後網膜では既にプルプリンは発現しており、神経突起伸長には添加による効果がないと考えられた。また、プルプリンはレチノールと結合してレチノイン酸合成を高め、軸索伸長に関わるレチノイ

平成 17 年 11 月 2 日受付, 平成 17 年 11 月 9 日受理

Abbreviations : CNS, central nervous system; DIG, digoxigenin; GCL, ganglion cell layer; IgG, immunoglobulin G; INL, inner nuclear layer; ONL, outer nuclear layer; OS, outer segment; PFA, paraformaldehyde; RBP-4, retinol binding protein-4; RGCs, retinal ganglion cells

ン酸レセプターを転写因子とする様々な遺伝子を活性化することが考えられた。

発生生物学ではゼブラフィッシュは金魚よりも、よく用いられる動物である。その理由として多産で一年中卵が得られること⁹⁾、また現在ゼブラフィッシュのゲノムは全て解読されており、cDNAや遺伝子DNAのデータベースに日々新しい情報が登録され利用等が容易なことが挙げられる。このことから、CNS再生に関与する分子メカニズムを解明するためにはゼブラフィッシュを用いた遺伝学的な手法が不可欠である。そこで本研究では、金魚で見つけた神経再生のトリガー分子プルプリンがゼブラフィッシュでも同様であるか否かを調べて遺伝子発現を精査するために、ゼブラフィッシュのプルプリン全長cDNAとゲノムDNAをクローニングした。その結果、ゼブラフィッシュプルプリン遺伝子の転写領域とその5'上流領域を含む4.2 kbpのゲノミックDNAを世界で初めてクローニングすることができた。更にゼブラフィッシュ視神経損傷後の網膜においてプルプリンmRNAやタンパク質の発現を調べ、金魚同様、ゼブラフィッシュ網膜においても、プルプリンが神経再生の初期から発現していることを確認した。

材料および方法

I. 実験動物

ゼブラフィッシュ(成魚、体長3-4 cm)を使用した。FA100(2000倍希釈; 田辺製薬、大阪)を麻酔薬として用い、視神経は眼球から約1 mmのところを切断した。28±1℃に水温を一定にし、餌は十分与えて飼育した。

II. ノーザンブロット法

視神経未切断群(コントロール)および視神経切断群の網膜全RNAはSepasol-RNA I Super Kit(ナカライテスク、京都)を用いて抽出した。1%アガロース/ホルムアルデヒドゲルの電気泳動で2μgの全RNAを泳動し、ニトロセルロースメンブレン(Schleisler and Schuell, Dassel, Germany)に一晩かけて転写させた。18Sと28S rRNAのエチジウムブロミド染色像をコントロールとした。フィルターに[α-³²P]dCTPでラベルをした金魚プルプリン全長cDNAを42℃、一晩でハイブリダイゼーションさせた。GAPDH cDNAを内部標準として使用した。それを2xSSC/0.1% SDS, 1xSSC/0.1% SDS, 0.5xSSC/0.1% SDS, 0.1xSSC/0.1% SDSの順に60℃、20分の洗浄をした。その後、X線フィルムにてバンドの検出を行なった。バンドの定量はフィルムをスキャナーで取り込んだ後、NIH Imageで行なった。

III. In situ ハイブリダイゼーション法

眼球は摘出後、0.1 M リン酸緩衝液(pH 7.4)と5%スクロースを含む4%パラホルムアルデヒド(paraformaldehyde, PFA)液で4℃、2時間固定した。その後、スクロースの濃度を徐々に5-20%へと上げスクロース置換を行なった。その眼球はOCTコンパウンド(Tissue Tek; Miles, Eikhart, USA)を用いて包埋後、12μmで薄切した。このサンプルを0.5μg/ml プロテイナーゼKで37℃、10分間処理後、4% PFAで再固定した。それから20%ホルムアルデヒド/4xSSCで室温(23℃)、30分間プレハイブリダイゼーションをした。その後、ジゴキシゲニン(digoxigenin, DIG)がラベルされたゼブラフィッシュプルプリン一本鎖cRNAを42℃、一晩でハイブリダイゼーションさせた。50%ホルムアルミド/2xSSCで洗浄後、20μg/ml RNase Aを

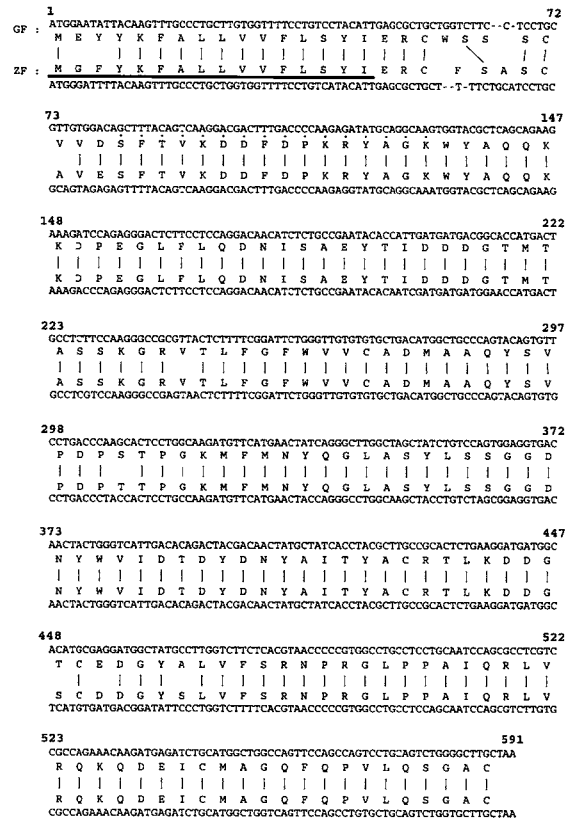


Fig. 1. Homology of deduced nucleotide and amino acid sequence between goldfish purpurin and zebrafish BC059516 clone. Upper trace, GF: goldfish purpurin in sequence. Lower trace, ZF: zebrafish RBP-4 like mRNA in sequence (GenBank accession number BC059516). An underline in the N-terminus of the zebrafish sequence shows signal peptide for secretion. A dotted line in the goldfish amino acid sequence shows site of synthetic peptide for making anti-peptide antibodies⁷⁾. A short vertical bar between goldfish purpurin and zebrafish RBP-4 like mRNA indicates the identical nucleotide.

37℃, 30分反応させた。検出にはアルカリホスファターゼ結合抗DIG抗体を室温、60分反応後ニトロロトランジウム/5-プロモ-4インドリル-3-ホスファターゼによって視覚化した。

IV. ウェスタンブロット法

6-8個の眼球を摘出し水晶体を取り除いた後、ソニケーション緩衝液[50 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, 0.2 mM ふっ化フェニルメチルスルホニル, 0.5% 界面活性剤(Nonidet P-40), 1 mM EDTA]で超音波処理を行なった。遠心後の上清を回収しタンパク量60μgをSDS-ポリアクリルアミドゲル(12.5%)にて泳動した。タンパク定量はブラッドフォード法¹⁰⁾で測定し、標準液としてγ-グロブリンを使用した。メンブレンに転写後、1次抗体として300倍希釈した抗プルプリンのペプチド抗体と反応させた⁷⁾。プルプリンに対する抗ペプチド抗体は以前金魚で作製した⁷⁾(図1)。洗浄後、2次抗体として500倍希釈したペルオキシダーゼ結合抗ウサギ免疫グロブリンG(immunoglobulin G, IgG)(医学生物学研究所、名古屋)と反応させた。バンドの定量はメンブレンをスキャナーで取り込んだ後、NIH Imageで行なった。

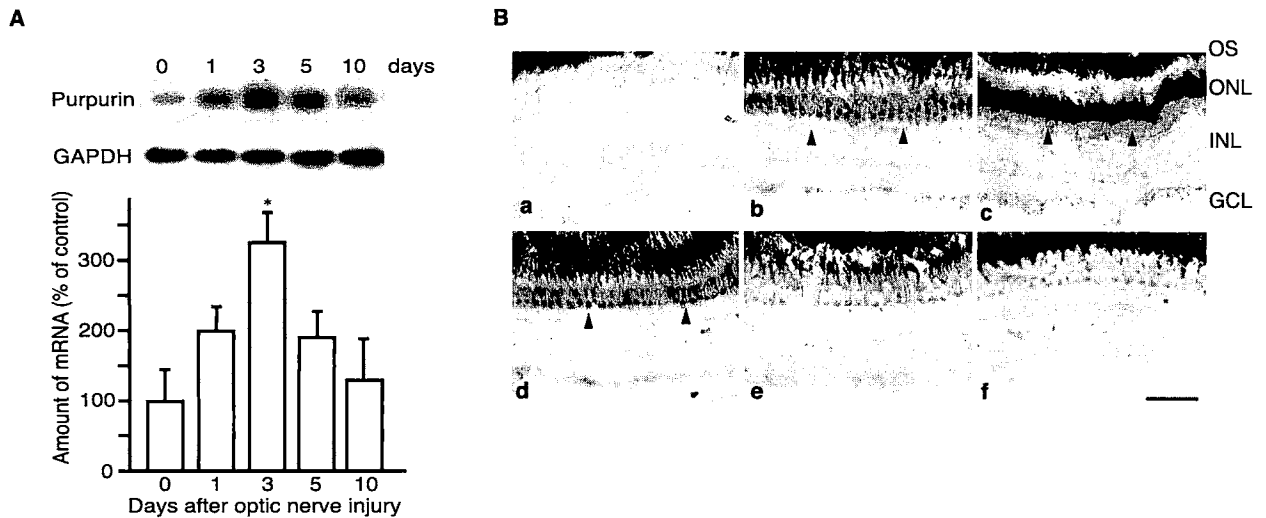


Fig. 2. Northern blot analysis and *In situ* hybridization of purpurin mRNA in the zebrafish retina at various time intervals after optic nerve transection. A) Total RNA ($2\mu\text{g}$) from zebrafish retina were electrophoresed, transferred to nitrocellulose membrane and hybridized with ^{32}P -labeled purpurin cDNA. Vertical bar in each histogram shows the mean \pm S.E.M (n=4). * $p < 0.05$ as compared with control. B) Retinal sections from various days after optic nerve transection were hybridized with anti-sense probe (a-e) and sense probe (f). (a) control; (b) 1 day; (c) 3 days; (d) 5 days; (e) 10 days; and (f) 3 days after axotomy. Arrowheads in b, c, and d indicate positive signal. OS, outer segment; ONL, outer nuclear layer; INL, inner nuclear layer; GCL, ganglion cell layer in this and subsequent figures. Scale bar = $50\mu\text{m}$

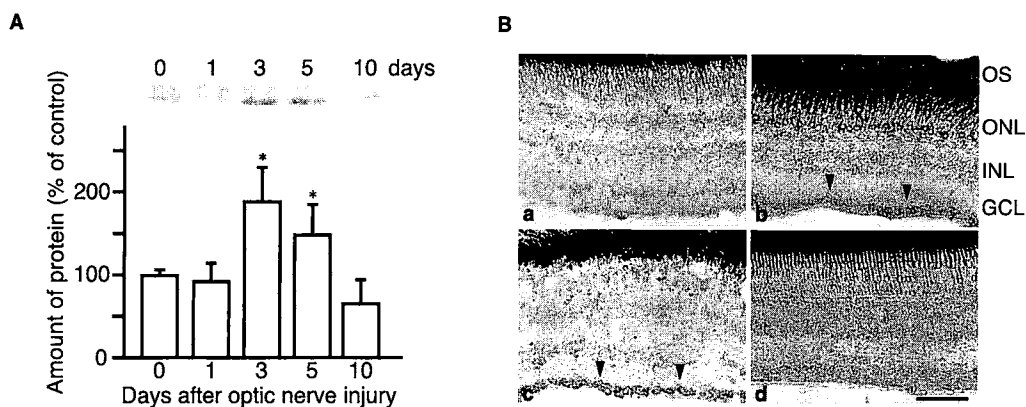


Fig. 3. Change and immunohistochemical staining of purpurin protein in the zebrafish retina after optic nerve transection. A) $60\mu\text{g}$ of retinal proteins from zebrafish retina at various days after axotomy were loaded on SDS gel, transferred to nitrocellulose membrane and reacted with anti-purpurin peptide antibody. Vertical bar in each histogram shows the mean \pm S.E.M (n = 5). * $p < 0.01$ as compared with control. B) Retinal sections from zebrafish retina at various days after optic nerve transection were incubated with the anti-purpurin peptide antibody: (a) control; (b) 3 days; (c) 5 days; (d) 10 days. Arrowheads in b and c indicate positive signal. Scale bar = $50\mu\text{m}$

V. 免疫組織学的染色法

眼球の固定および薄切は *in situ* ハイブリダイゼーション法と同様に行なった。抗原賦活処理のため 10mM クエン酸緩衝液で 121°C 、 15 分のオートクレーブをした。洗浄およびブロッキングした後、 300 倍希釈の抗プルプリンペプチド抗体と 4°C 、一晚反応させた。それから、 500 倍希釈の抗ウサギIgG (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, USA) を室温、 60 分反応させた。検出には西洋ワサビペルオキシダーゼ結合ストレプトアビジンと3-アミノ-9-エチルカルバゾール (Dako Cytomation, Glostrup, Denmark) を使用した。

VI. ゼブラフィッシュプルプリンのゲノミックDNAのスクリーニング法

ゲノミックDNAライブラリーはゼブラフィッシュのゲノミックDNA (Seegene Inc, Seoul, Korea) と Lambda Fix II/Xho I partial Fill-in vector kit (Stratagene Inc, La Jolla, USA) を用いて作製した。スクリーニングは大腸菌 (XL1-Blue MRA) に感染させたゲノミックDNAライブラリーのファージを、金魚プルプリン全長cDNAに $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]$ dCTPをラベルしたプローブとハイブリダイゼーションさせ、 1×10^6 ファージブラックから選別した。金魚プルプリン全長cDNAは視神経切断後5日目の金魚網膜か

-1943 ACCAGTCCCAGGCCTATCTGGCTAACATATGCTGAATTAGCAGTATCAG
NRE

-1893 GATTGGTAGGGCACAGGTAATGTCACACTACAGCACTGAGATCAGTTGGC

-1843 TCAGACGCAACAGTCACCTCAATGAACTTTGCTCTGGTGGGGTAATCCAG

-1793 TATCATATGCATCCATACTGCCATTAGTATATTTGATAAGTTCCATTACA

-1743 TTGTGCATATTTAGGTCCGGTTAAACCTATATTTGGGAATGCTGCCCCCT

-1693 TTTGAATGCTAATATGTTATCACAATGTTACCTTTATTACCTCTCTTGC

-1643 ACAATATTGAGCACAATCTCATGTAAAAGTACTTGTATAGCCTGGCTTAT

-1593 GTGTATAGTTAAGCATCTTATAGTTAATGTTTCGTTAAGCATAGGTTTTTA

GTA--650bp--AGA

-1543 AATAATAGTTTCTATGTCCAGTGTGTGTTTGTATTTCTGATTAATTTAT...
OTX-1

-793 ACATGTAATCATAGATATATTATGGTATATTCTAGATTTTGTGGTAA
CRX

-743 GTCTTTTTTTTAGTACACAAATATGCTATTATAAAAAGGCCCTCTTTA

-693 ACCTTATGAAACTGATCACACCACATAAATCTTCAACAATGTGCCAAGTA

TCT--250bp--CAG

-643 CCTTCTACATAACAGACTCTTATAAAAAAAGCAGCTTTGTAATCACA...
CRX

-343 CAACCTAATAACATTTTCATAATGCAGTGCATAACACAATAACACAAATA
E-opsin-1-like

-293 TGCTAGCAGACTGATTCTTTTAGCTTTGCTTCCAGATGTGATTGGATTGC

-243 TTAACAAAGTCTCACCGTATTCAACTGAGTTGCATAAAGCTTTAATTGT

-193 TTTTTGGCAAGCATGGGAGGTTCAACCGAGAAGCCAGATTACAGTGCAG
Ret1/PCE-1-like

-143 GATTTCTACAAACGGATTAACCGTAGATTTAAGAACCCTATTTAGTCACA

-93 AGAAGTGAAAATAATCAATAAGCCTGTCTGTGGAGTTGG TATAAAA GGCC
CRX TATA box

-43 TCTTGGTCAGTTTAGACAACACAGCCTTGTGGAGAACCACAAA

+1 GAAGGATCCTACACTACTAAAACCATTTCTTCATTCATTCAGGACATCAT
INTRON I GTA--124bp--CAG

+51 CAAAACAAGCAG...AATGGGATTTTACAAGTTTGCCTGTGGTGGTTTTCC
start

+225 TGTCATACATTGAGCGCTGTTTTTCTGCATCCTGCGCAGTAGAGAGTTTT
INTRON II GTA--102bp--TAG

+275 ACAGTCAAGGACGACTTTGACCCCAAGAGG...TATGCAGGCAAATGGTACGC

+427 TCAGCAGAAGAAAGACCCAGAGGACTTTCCTCCAGGACAACATCTCTG

+477 CCGAATACACAATCGATGATGATGGAACCATGACTGCCTCGTCCAAGGGC
INTRON III GTA--1057bp--TAG

+527 CGAGTAACTCTTTTCGG...ATTCTGGGTTGTGTGTGCTGACATGGCTGCCCA

+1634 GTACAGTGTGCCTGACCCTACCACTCCTGCCAAGATGTTTCATGAACTACC
INTRON IV GTC--94bp--AAG

+1684 AAGGCCTGGCAAGCTACCTGTCTAGCGGAG...GTGACAACACTACTGGGTCATC

+1828 GACACCGACTATGACAACATGCCATTACCTATGCTTGGCCGACTCTGAA

+1878 GGATGATGGCTCATGTGATGACGGATATTCCTGGTCTTTTCACGTAACC

+1928 CCCGTGGCCTGCCTCCAGCAATCCAGCGTCTTGTGCGCCAGAAACAAGAT
INTRON V GTA--118bp--CAG

+1978 GAGATCTGCATGGCTGGTCAGTTCAGCCTGTGCTGCAGTCTG...GTGCTTG

+2146 CTAAACTGTTTGGAGAAACAAAAGGGATTCTTTTGCCTGCTGGCATAA
stop

+2196 GAAGCGGATTCTGGGGCCATTCCATTTTCCAGCGCTGTAGAGGTGCATGTGT

+2246 GCATCAGGGAGCCTAAGATCTTTGAAGTTATCTCAAGGGAATGTTGTATT

+2296 CTGTAAGTGTCTATGACAATAAATATTTTTTAAACAAA
poly A signal

Fig. 4. Nucleotide sequence of zebrafish purpurin gene. Total 4.2 kbp genomic DNA for zebrafish purpurin was sequenced. Position at +1 indicates the transcription start site. In this figure, 1.9 kbp 5' flanking DNA and 2.3 kbp transcriptional region were shown. There were many consensus sequences of binding site of transcriptional factors for retina-specific opsin gene (NRE, OTX-1, CRX, E-opsin-1-like, Ret1/PCE-1-like) in the presumed promoter region of 5' flanking region. Note a partial omission of nucleotide sequence at position -1493 to -794 and -593 to -344. A presumed TATA box was positioned at -54 from the cap site. The translation start codon, ATG was positioned at +188, and the stop codon, TAA was positioned at +2147. Note a partial omission of nucleotide sequence of each intron.

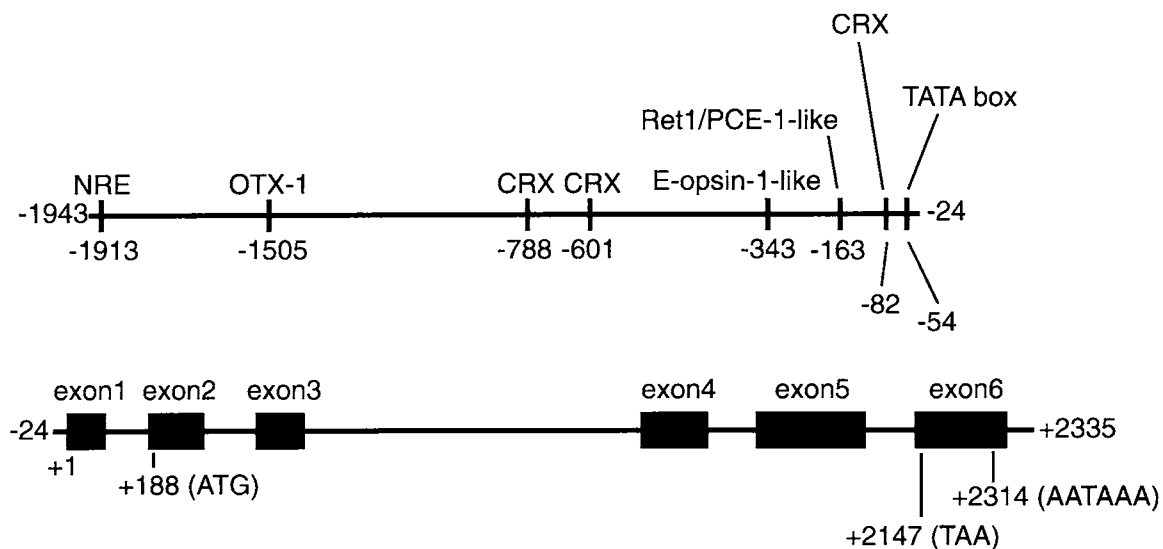


Fig. 5. A structure of zebrafish purpurin gene. Structure of 1.9 kbp 5' flanking DNA and 2.3 kbp transcription region was shown in a reduced length. The transcription start site was positioned at +1. Thin vertical bars in the 5' promoter region show retina specific consensus sequences and TATA box. Closed squares in the transcription region show exons. The purpurin gene had 6 exons and 5 introns. Exon 1 was untranslational. The translation start codon was within exon 2 and the stop codon was within exon 6. Note a long nucleotide sequence (1 kbp) of intron 3. A polyadenylation signal AATAAA was positioned at +2314 in exon 6.

ら cDNA ライブラリーを作製し⁶⁾, そこから 813 bp のそれをクローニングした⁷⁾. ハイブリダイゼーションの手法はノーザンブロット法と同様に行なった. メンブレンは 2xSSC/0.1% SDS, 1xSSC/0.1% SDS, 0.5xSSC/0.1% SDS, 2xSSC の順に 60°C, 20 分洗浄を行ない, X 線フィルムにて検出した. そして, 陽性を示すファージブランクを回収し同様に 3 次スクリーニングまで行なった.

Ⅶ. DNA シークエンス解析

スクリーニングにより得られたクローンの塩基配列は Applied Biosystems PRISM dye terminator kit (Foster City, USA) を用いて DNA シークエンサー (ABI PRISM 310 Genetic Analyzer; Applied Biosystems, Foster City, USA) で解析した.

Ⅷ. 統計学的分析

ノーザンブロット法とウエスタンブロット法において, ゼブラフィッシュのプルプリン mRNA とタンパク質の発現レベルは一元配置分散分析後 Scheffe の方法を用いて群間比較を行なった. 危険率 5% 未満を有意差有り と判定した.

成 績

I. ゼブラフィッシュプルプリンの cDNA クローン

金魚プルプリン cDNA のシークエンスデータを利用して, ゼブラフィッシュの cDNA データベースからプルプリンを検索した. 得られた cDNA は 854 bp で, 転写産物はレチノール結合タンパク質様のタイプ 4 (retinol binding protein-4, RBP-4 like mRNA: BC059516 クローン) であり, 翻訳産物が同定されていない分子と高い相同性を示した. この分子は 591 bp のオープンリーディングフレーム (196 個のアミノ酸) から成っていた. 図 1 に金魚プルプリンとゼブラフィッシュ BC059516 クローンの相同性を示す. RBP-4 like mRNA の分子量は 21.9 kDa で金魚のそれとはほぼ同じであった. RBP-4 like mRNA と金魚およびヒヨコプルプリンのアミノ酸レベルでの相同性はそれぞれ 94% と

80% であった. N 末端に分泌シグナルを持っており (下線で示す), またドットで示した 28 番目のセリンから 43 番目のリジンは金魚の抗プルプリンペプチド抗体の作製に使用した部位であるが⁷⁾, ゼブラフィッシュのその部位は金魚と全く同じであった. そして, ゼブラフィッシュからヒトなど多種にわたって存在が知られているレチノール結合タンパク質のタイプ 4¹¹⁾ と RBP-4 like mRNA は 45% の相同性であった. これらの結果からゼブラフィッシュの RBP-4 like mRNA をプルプリンのゼブラフィッシュホモログとして結論した.

Ⅱ. 視神経切断後のゼブラフィッシュ網膜における早期かつ一過性のプルプリン mRNA の増加

ゼブラフィッシュ網膜の全 RNA は視神経切断後 0, 1, 3, 5, 10 日目を採取し, 金魚全長 cDNA をプローブとしてノーザンブロット法により mRNA の発現変化をみた. プルプリン mRNA の発現レベルは損傷後 3 日で約 3.2 倍に増加し, その後漸減し 10 日目にはほぼ正常レベルに戻った (図 2A). mRNA の細胞局在はゼブラフィッシュ全長 cDNA をプローブとして *in situ* ハイブリダイゼーション法によって検出した. コントロール網膜において, mRNA のシグナルはかろうじて視細胞に検出できた (図 2Ba). 損傷後 1 日でそのシグナルが外顆粒層 (outer nuclear layer, ONL) で劇的に増加し (図 2Bb), 3 日目でピークになった (図 2Bc). そして, 5 日目でその発現は減少し (図 2Bd), 10 日目ではシグナルが消失した (図 2Be). また, センス鎖プローブでは全くシグナルが検出されなかった (図 2Bf).

Ⅲ. 視神経切断後のゼブラフィッシュ網膜における早期かつ一過性のプルプリンタンパク質の増加

プルプリンに対する抗ペプチド抗体の認識配列はゼブラフィッシュでも保存されていたので, この抗体をゼブラフィッシュプルプリンタンパク質の発現や局在の検出に使用した. ウエスタンブロット法で, 約 22 kDa のプルプリンタンパク質の発現は視神経切断後 3 日で約 1.8 倍増加し, その後漸減し 10 日目に

は正常レベルに戻った(図3A)。免疫組織学的染色法では、免疫活性はコントロールにくらべて(図3Ba)、切断後3日目ではONLで弱い活性が、また神経節細胞層(ganglion cell layer, GCL)では強い活性が見られた(図3Bb)。このGCLでの増加は5日目まで続き(図3Bc)、10日目にコントロールレベルに戻った(図3Bd)。免疫前血清ではシグナルは検出されなかった。

Ⅳ. ゼブラフィッシュプルプリン遺伝子の単離とヌクレオチドシークエンス

ゼブラフィッシュプルプリン遺伝子は金魚のプルプリン全長cDNAをプローブにして、我々が今回作製したゼブラフィッシュ脳由来ゲノミックDNAライブラリーから単離した。1x10⁶個のファージプラークから7個の陽性クローンを得た。そのクローンの一つを選び、シークエンス解析を行なった。図4にそのゼブラフィッシュクローンの4.2 kbpのヌクレオチドシークエンスを示す。転写開始部位を+1として表示した。4.2 kbpのDNAシークエンスは2.3 kbpの転写領域と1.9 kbpの5'上流領域から構成されていた。このクローニングしてきたヌクレオチドシークエンスはデータバンクに登録した(DDBJ, access number: AB242211)。5'上流領域において、網膜特異的なオプシン遺伝子の転写調節因子の結合サイト¹²⁾があるか否かを検索した。その結果、多くの結合サイト(NRE, OTX-1, CRX, E-opsin-1-like, Ret1/PCE-1-like)が5'上流領域に存在していた。推定されるTATA boxは転写開始部位から上流54 bpの位置にあった。このプルプリン遺伝子は6つのエクソンと5つのイントロンを有していた。エクソン1は62 bp, エクソン2は118 bp, エクソン3は137 bp, エクソン4は113 bp, エクソン5は213 bp, エクソン6は197 bpであった。また、イントロン3は1057 bpと長く、ほかのイントロンは94-124 bpであった。図5にプルプリン遺伝子の4.2 kbpのDNA断片の構造の簡略図を示す。推定された網膜特異的な転写因子結合サイトやTATA box, ポリAシグナルを示した。翻訳開始コドン(ATG)はエクソン2に、翻訳終了コドン(TAA)はエクソン6に含まれていた。

考 察

I. 視神経切断後網膜におけるゼブラフィッシュプルプリンmRNAとタンパク質の挙動

以前の研究で、我々は金魚視神経再生の初期過程において発現が増加するプルプリンcDNAを単離した⁷⁾。網膜特異的なプルプリンはヒヨコの発達期網膜で細胞接着や生存に関わる分泌型のレチノール結合タンパク質として初めてSchubertら¹³⁾により同定された分子である。金魚やヒヨコの網膜では、プルプリンmRNAは視細胞にのみ発現した^{7), 14)}。我々は金魚プルプリンcDNAのシークエンスデータからゼブラフィッシュのcDNAデータベースを検索し、その結果854 bpのcDNAクローン(RBP-4 like, BC059516)を見つけた。金魚のプルプリンcDNAとアミノ酸レベルでは94%, ヌクレオチドレベルでは90%と非常に高い相同性を示したので、854 bpのRBP4 like mRNAはゼブラフィッシュのプルプリン全長cDNAであると結論した(図1)。金魚と同様、ゼブラフィッシュのプルプリンcDNAは591 bpのオープンリーディングフレームを持っていた。視神経切断後のプルプリンmRNAとタンパク質の発現レベルや局在は金魚プルプリンと同様であった⁷⁾(図2, 3)。金魚とゼブラフィッシュの間でプルプリンmRNAとタンパク質の発現の相違は、ゼブラフィッシュでのmRNAの発現レベルがコントロールでは

低く、視神経損傷後は非常に高い(3.2倍)のに対して、金魚のmRNAの発現レベルはコントロールでは高く、視神経損傷後はそれほど高くなかった(2倍)⁷⁾。ゼブラフィッシュ網膜においてタンパク質の免疫活性は比較的GCLに限局していたが、金魚の場合は網膜全層にわたって拡散していた⁷⁾。mRNAやタンパク質の発現時期が金魚にくらべてゼブラフィッシュの方が1-2日早かった。これらの相違に対する答えとして、我々は以下の点を考えた。金魚と比較してゼブラフィッシュのプルプリンmRNAの元々の発現量が低いのは両者の体長の違いによるのかもしれない。ゼブラフィッシュの体長は4-5 cmで停止するのに対して、金魚はそれ以上に成長することが知られている¹⁵⁾。プルプリンは分泌シグナルを持っているため、視細胞から容易に分泌される。そのため、ゼブラフィッシュで視神経切断後のGCLにおけるプルプリンの免疫活性が強いのは、軸索が損傷した神経節細胞へプルプリンがより効率的に蓄積されることを反映しているのかもしれない。金魚と比較してゼブラフィッシュの網膜ではプルプリンmRNAとタンパク質の発現が1-2日早く見られたのは、ゼブラフィッシュの視神経再生過程が早いであろうことが考えられる(加藤, 未発表データ)。このように、網膜特異的なプルプリンはゼブラフィッシュの視神経損傷後網膜においても再生初期に誘導される分子であり、それゆえゼブラフィッシュでも視神経再生のトリガー分子になりうると考えられる。我々⁷⁾は、プルプリンはレチノールと結合してレチノイン酸合成を高め、軸索伸展に関わるレチノイン酸レセプターを転写因子とする様々な遺伝子を活性化し、損傷した神経節細胞から突起伸展を促進しているのではないかと仮定している。

Ⅱ. ゼブラフィッシュプルプリン遺伝子の特徴

ゼブラフィッシュプルプリンcDNAのヌクレオチドシークエンスは金魚プルプリンと90%の相同性があったので、我々は金魚のプルプリン全長cDNAをプローブとしてゼブラフィッシュのゲノミックライブラリーからプルプリンDNAをクローニングした。1つの陽性クローンは4.2 kbpで2.3 kbpの転写領域と1.9 kbpの5'上流領域を含んでいた。プルプリンの転写領域は6つのエクソンと5つのイントロンから成っていた(図4)。うちイントロン3は1 kbpと長く、その他は94-124 bpと短いものであった。開始コドンのATGはエクソン2に、終止コドンのTAAはエクソン6にあった(図4, 5)。1.9 kbpの5'上流領域には、推定されるRNAポリメラーゼ結合サイト(TATA box)が転写開始部位から上流54 bpに存在した。また5'上流の転写調節領域に様々な転写因子結合サイトの有無を検索した。プルプリンとオプシンは網膜特異的なタンパク質で視細胞に限局しているので、ゼブラフィッシュプルプリン遺伝子にも、オプシン遺伝子に特異的なNRE¹⁶⁾, OTX-1¹⁷⁾, E-opsin-1¹⁸⁾, CRX¹⁹⁾, Ret1/PCE-1²⁰⁾などのコンセンサスな結合サイトがあるか否かを検索した。検索した結果、NRE(TGCTGAATTAGCA; -1913 - -1901), OTX-1(TGATTAA; -1505 - -1499), CRX(TAATCA; -787 - -782, -601 - -597, -81 - -76), E-opsin-1-like(CAACCTAA; -343 - -335), Ret1/PCE-1-like(AGAAGCCAGTTA; -163 - -153)が1.9 kbpのプルプリン遺伝子の5'上流にそれぞれ存在した。更に我々がクローニングした4.2 kbpのヌクレオチドシークエンスはゲノミックDNAシークエンスのzk30k6(The Sanger Institute, Danio rerio sequence project)と98.5%一致し、それは21番染色体に存在していることが報告されている。これらの事実から、我々が得たゲノミッククローンは実際、ゼブラフィッシュプルプリン遺

伝子であることが強く示唆された。将来プルプリンのゲノミックDNA情報はゼブラフィッシュ視神経再生における初期過程の分子メカニズムを理解し、ひいては魚類のCNS再生関連遺伝子の転写調節因子を見つける上で必須の情報となることは疑う余地がない。

結 論

金魚の視神経再生初期過程において発現が増加するプルプリンは視神経再生のトリガー分子の可能性が示唆された⁷⁾。この分子がゼブラフィッシュにおいても同様であるか否かを精査するため、プルプリンmRNAとタンパク質の発現レベルと時期を調べた。更にはプルプリン遺伝子のより詳細な分子メカニズムの解明のため、金魚プルプリン全長cDNAを用いてゼブラフィッシュのゲノミックDNAライブラリーからゼブラフィッシュプルプリン遺伝子のクローニングを行なった。その結果は以下に要約できる。

1. 金魚のプルプリンとアミノ酸レベルで94%、ヌクレオチドレベルで90%の相同性を示すcDNAクローン (RBP-4 like mRNA, BC059516) をゼブラフィッシュのプルプリンcDNAホモログとして初めて同定した。
2. プルプリンmRNAの発現量は、視神経切断後3日目でコントロールと比較して約3.2倍に増加し、10日ではほぼ正常レベルに戻った。また、その発現は視細胞に限局していた。
3. プルプリンタンパク質の発現量は視神経切断後3日目でコントロールと比較して約1.8倍に増加し、10日ではほぼ正常レベルに戻った。免疫活性は切断後3日目ではONLで弱く、GCLで強く見られた。
4. 視神経切断後のゼブラフィッシュ網膜におけるプルプリンmRNAとタンパク質の発現時期は、金魚のそれと比較して1-2日早かった。
5. 金魚のプルプリンcDNA全長をプローブとして、ゼブラフィッシュゲノミックライブラリーから2.3 kbpの転写領域と1.9 kbpの5'上流領域を含む4.2 kbpのDNAヌクレオチド断片をクローニングできた。転写領域部位には6つのエクソンと5つのイントロンがあった。5'上流領域には網膜特異的なオプシン遺伝子の5'上流に存在が知られている様々な転写調節因子の結合サイトが存在した。

謝 辞

稿を終えるにあたり、御指導と御高閲を賜りました金沢大学大学院医学系研究科脳医学専攻脳情報分子学の加藤聖教授に深甚なる謝辞を表します。また、有益なご指導、ご助言、ご協力を賜りました同教室の松川通講師を始め、浦野たみさん、加野朝子さん、太田景子さん、金沢大学大学院医学系保健学専攻の馬渡一浩助教授に深く感謝します。そして、多くの支援ならびに協力を頂いた金沢大学大学院医学系研究科脳医学専攻脳情報分子学の皆様に感謝いたします。

文 献

- 1) Attardi DG, Sperry RW. Preferential selection of central pathways by regenerating optic nerve fibers. *Exp Neurol* 7: 46-64, 1963
- 2) Bähr M, Bonhoeffer F. Perspectives on axonal regeneration in the mammalian CNS. *Trends Neurosci* 17: 473-479, 1994
- 3) Kato S, Devadas M, Okada K, Shimada Y, Ohkawa M, Muramoto K, Takizawa N, Matsukawa T. Fast and slow recovery

phases of goldfish behavior after transection of the optic nerve revealed by a computer image processing system. *Neuroscience* 93: 907-914, 1999

- 4) Matsukawa T, Arai K, Koriyama Y, Liu ZW, Kato S. Axonal regeneration of optic nerve after injury. *Biol Pharm Bull* 27: 445-451, 2004
- 5) Villegas-Perez MP, Vidal-Sanz M, Rasminsky M, Bray GM, Aguayo AJ. Rapid and protracted phases of retinal ganglion cell loss follow axotomy in the optic nerve of adult rats. *J Neurobiol* 24: 23-36, 1993
- 6) Liu ZW, Matsukawa T, Arai K, Devadas M, Nakashima H, Tanaka M, Mawatari K, Kato S. Na, K-ATPase α 3 subunit in the goldfish retina during optic nerve regeneration. *J Neurochem* 80: 763-770, 2002
- 7) Matsukawa T, Sugitani K, Mawatari K, Koriyama Y, Liu ZW, Tanaka M, Kato S. Role of purpurin as a retinol-binding protein in goldfish retina during the early stage of optic nerve regeneration: its priming action on neurite outgrowth. *J Neurosci* 24: 8346-8353, 2004
- 8) Schubert D, LaCorbiere M. Isolation of an adhesion-mediating protein from chick neural retina adherons. *J Cell Biol* 101: 1071-1077, 1985
- 9) Streisinger G, Walker C, Dower N, Knauber D, Singer F. Production of clones of homozygous diploid zebra fish (*Brachydanio rerio*). *Nature* 291: 293-296, 1981
- 10) Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72: 248-254, 1976
- 11) Strausberg RL, Feingold EA, Grouse LH, Derge JG, Klausner RD, Collins FS, Wagner L, Shenmen CM, Schuler GD, Altschul SF, Zeeberg B, Buetow KH, Schaefer CF, Bhat NK, Hopkins RF, Jordan H, Moore T, Max SI, Wang J, Hsieh F, Diatchenko L, Marusina K, Farmer AA, Rubin GM, Hong L, Stapleton M, Soares MB, Bonaldo MF, Casavant TL, Scheetz TE, Brownstein MJ, Ustin TB, Toshiyuki S, Carninci P, Prange C, Raha SS, Loquellano NA, Peters GJ, Abramson RD, Mullahy SJ, Bosak SA, McEwan PJ, McKernan KJ, Malek JA, Gunaratne PH, Richards S, Worley KC, Hale S, Garcia AM, Gay LJ, Hulyk SW, Villalón DK, Muzny DM, Sodergren EJ, Lu X, Gibbs RA, Fahey J, Helton E, Kettelman M, Madan A, Rodrigues S, Sanchez A, Whiting M, Madan A, Young AC, Shevchenko Y, Bouffard GG, Blakesley RW, Touchman JW, Green ED, Dickson MC, Rodriguez AC, Grimwood J, Schmutz J, Myers RM, Butterfield YS, Krzywinski MI, Skalska U, Smailus DE, Schnerch A, Schein JE, Jones SJ, Marra MA. Generation and initial analysis of more than 15, 000 full-length human and mouse cDNA sequences. *Proc Natl Acad Sci U.S.A.* 99: 16899-16903, 2002
- 12) Kennedy BN, Vihtelic TS, Checkley L, Vaughan KT, Hyde DR. Isolation of a zebrafish rod opsin promoter to generate a transgenic zebrafish line expressing enhanced green fluorescent protein in rod photoreceptors. *J Biol Chem* 276: 14037-14043, 2001
- 13) Schubert D, LaCorbiere M, Esch F. A chick neural retina adhesion and survival molecule is a retinol-binding protein. *J*

Cell Biol 102: 2295-2301, 1986

14) Kato S, Negishi K, Teranishi T, Ishita S. The use of the carp retina in neurobiology: its uniqueness and application for neural network analyses of the inner retina. *Prog in Neurobiol* 37: 287-327, 1991

15) Berman P, Gray P, Chen E, Keyser K, Ehrlich D, Karten H, LaCorbiere M, Esch F, Schubert D. Sequence analysis, cellular localization, and expression of a neuroretina adhesion and cell survival molecule. *Cell* 51: 135-142, 1987

16) Kumar R, Chen S, Scheurer D, Wang Q, Duh E, Sung C, Rehemtulla A, Swaroop A, Adler R, Zack DJ. The bZIP transcription factor Nrl stimulates rhodopsin promoter activity in primary retinal cell cultures. *J Biol Chem* 271: 29612-29618, 1996

17) Chen S, Wang QL, Nie Z, Sun H, Lennon G, Copeland NG,

Gilbert DJ, Jenkins NA, Zack DJ. Crx, a novel Otx-like paired-homeodomain protein, binds to and transactivates photoreceptor cell-specific genes. *Neuron* 19: 1017-1030, 1997

18) Ahmad I. Mash-1 is expressed during rod photoreceptor differentiation and binds an E-box, E (opsin) -1 in the rat opsin gene. *Brain Res Dev Brain Res* 90: 184-189, 1995

19) Mitton KP, Swain PK, Chen S, Xu S, Zack DJ, Swaroop A. The leucine zipper of NRL interacts with the CRX homeodomain. A possible mechanism of transcriptional synergy in rhodopsin regulation. *J Biol Chem* 275: 29794-29799, 2000

20) Kennedy BN, Goldflam S, Chang MA, Campochiaro P, Davis AA, Zack DJ, Crabb JW. Transcriptional regulation of cellular retinaldehyde-binding protein in the retinal pigment epithelium. *J Biol Chem* 273: 5591-5598, 1998.

The zebrafish purpurin gene and its expression in the retina during optic nerve regeneration Masayuki Tanaka, Department of Molecular Neurobiology, Graduate School of Medicine, Kanazawa University, Kanazawa 920-8640 — *J. Juzen Med. Soc.*, **115**, 2 – 9 (2006)

Key words zebrafish, purpurin gene, cloning, retina, optic nerve regeneration

Abstract

Recently, we cloned goldfish purpurin cDNA, whose expression is upregulated during the early stage of optic nerve regeneration, as a trigger molecule for fish optic nerve regeneration. Here, we identified an 854 bp complete zebrafish purpurin cDNA containing 591 bp open reading frame (196 amino acids residues) from high sequence homology (>90%) to goldfish purpurin cDNA. The increase of purpurin transcripts was confirmed in the zebrafish retina after optic nerve injury. The level of purpurin mRNA rapidly increased 1-3 days and then rapidly declined by 10 days after nerve injury. The cellular localization of the increased mRNA levels was limited to the photoreceptors. The level of purpurin protein rapidly increased 3-5 days and then rapidly declined by 10 days after optic nerve transection. These results strongly suggest that the purpurin is also a candidate molecule for triggering the optic nerve regeneration in zebrafish. Furthermore, we cloned for the first time a 4.2 kbp genomic DNA for zebrafish purpurin with the goldfish cDNA probe. The 4.2 kbp genomic DNA was constructed 1.9 kbp 5'flanking upstream region and 2.3 kbp transcriptional region. The purpurin gene had 6 exons and 5 introns. Exon 1 was untranslated and the others, exons 2 to 6 contained protein coding region. In the presumed transcription regulatory site of 1.9 kbp 5'flanking region, there were many consensus sequences of retina-specific opsin gene such as OTX-1, NRE, CRX, E-opsin-1 and Ret1/PCE-1. To further elucidate the molecular mechanism for the initiation of fish optic nerve regeneration, such a genomic information of the interesting gene in zebrafish might be essential.