Pericentrin 変異マウスにおける神経系繊毛

三好 耕

岡山大学大学院医歯薬学総合研究科 神経情報学

キーワード：神経系繊毛, pericentrin, 嗅覚, 抗うつ

Neuronal cilia in pericentrin mutant mice

Ko Miyoshi

Department of Brain Science, Okayama University Graduate School of Medicine, Dentistry and Pharmaceutical Sciences

要 旨

Pericentrin 遺伝子にホモで変異を持つマウス（ホモ変異マウス）では中枢神経系1次繊毛および嗅覚神経細胞の嗅繊毛の低形成が観察された。自発運動量、不安関連行動および海馬歯状回顆粒細胞下層での神経新生は、ホモ変異マウスと野生型マウスの間で有意な差異を認めなかった。一方、ホモ変異マウスは嗅覚機能の低下に加えて抗うつ行動を示したことから、中枢神経系1次繊毛の低形成は抗うつ効果を持つと考えられた。

緒 言

哺乳類では神経細胞を含む大部分の体細胞が、細胞あたり1本の不動性繊毛（1次繊毛, primary cilia）を持つことは以前から知られていたが、1次繊毛が進化上の残遺物ではなく細胞のアンテナとしての意義を持つことが最近認識されつつあり¹⁾、広範な組織で1

次繊毛から細胞体、核へのシグナル伝達機構が存在し、細胞のホメオスタシスの維持に寄与している可能性が指摘されている。近年セロトニン6型受容体やソマトスタチン3型受容体などが、脳の各部位の神経細胞1次繊毛上に発現していることが見出された²⁾。この知見は神経細胞1次繊毛がこれらの受容体を介して細胞近傍環境を感知していることを示唆し、さらにセンサーとしての神経細胞1次繊毛から細胞体、核へ送られたシグナルが惹起する反応が、神経伝達機構を修飾する可能性を提示している。

中心体タンパクとして知られていた pericentrin は繊毛形成への関与が最近明らかになった分子である。我々は pericentrin のアイソフォームを同定するとともに³⁾、胎生期マウスの大脳皮質等で pericentrin タンパクが1次繊毛の基部に発現していることを見出した⁴⁾。更に我々は pericentrin 遺伝子第1エクソンの非翻訳領域にトラップベクター配列が逆向きに導入されたために pericentrin の発現が低下する遺伝子改変マウスを作成した⁵⁾。これを用いて、神経系繊毛の形成阻害が脳の組織学的構築、不安やうつに関連した行動、ストレスや記憶・学習に関わるとされる海馬歯状回での神経新生に及ぼす影響を明らかにすることを通して

平成22年7月受理
〒700-8558 岡山市北区鹿田町2-5-1
電話：086-235-7410 FAX：086-235-7412
E-mail：miyoshi@cc.okayama-u.ac.jp

プロフィール

昭和43年12月1日生
平成5年3月 大阪大学医学部卒業
平成14年3月 大阪大学大学院医学系研究科博士課程修了
平成14年4月 大阪大学医学部附属病院 医員
平成15年4月 岡山大学大学院医歯薬学総合研究科神経情報学分野 助手
平成17年4月 岡山大学大学院医歯薬学総合研究科神経情報学分野 助手
平成19年4月 助手は助教となった
現在に至る

て、神経系繊毛の生体における機能を解析することを目的とした。

研究成果

1. Pericentrin 変異マウスの神経系繊毛の観察

ソマトスタチン 3 型受容体 (SSTR3) 抗体, メラニン凝集ホルモン 1 型受容体 (MCHR1) 抗体, アデニル酸シクラーゼ 3 型 (AC3) 抗体を用いた免疫蛍光染色により中枢神経系での 1 次繊毛の形成を比較検討した。線条体 (図 1, 2), 海馬歯状回顆粒細胞層 (図 3), 嗅球顆粒細胞層 (図 4) 等で pericentrin 遺伝子

にホモで挿入ベクター配列を持つマウス (ホモ変異マウス) では神経細胞 1 次繊毛の低形成を認めた。嗅粘膜のアセチル化チューブリン抗体を用いた免疫蛍光染色では, 嗅覚神経細胞の嗅繊毛の低形成をホモ変異マウスで認めた (図 5)。また Nissl 染色による観察では大脳皮質の層構造, 海馬の細胞構築, および個々の神経細胞の極性, 軸索や樹状突起の伸展およびネットワークの形成に関して, ホモ変異マウスと野生型マウスの間で有意な差異を認めなかった。以上により, pericentrin 変異マウスは特に神経系繊毛の機能解析に有用であると考えられた。

哺乳類の pericentrin とショウジョウバエの d-plp

野生型

Pcnt 変異型

図 1 線条体の繊毛

図 2 線条体における繊毛長のヒストグラムおよび平均長の比較

野生型

野生型

Pcnt 変異型

Pcnt 変異型

図 3 海馬歯状回の繊毛

図 4 嗅球の繊毛

野生型

Pcnt 変異型

図 5 嗅覚神経細胞の繊毛

は、それらがコードするタンパクが中心体移行に必要なカルボキシ末端のPACTドメインを共有するcoiled-coil構造を持つことから、相同遺伝子であると考えられてきた。初めての生体でのpericentrinの機能解析である本研究は、d-plpの変異によりショウジョウバエの感覚神経細胞の繊毛形成が阻害されるのと同様に、pericentrinの変異により哺乳類の神経細胞の繊毛形成が阻害されることを示すことで、機能面から遺伝子の相同性を確認した。すなわち中心体タンパクのうちPACTドメインを持つものは、非脊椎動物から脊椎動物までconserveされた、神経細胞の繊毛形成に必要な役割を担っていることを明らかにした。

2. Pericentrin 変異マウスの行動解析（各行動解析では、オス、8-10週齢のホモ変異マウスと野生型マウスを用いた。）

1) 自発運動の測定

セロトニンの放出を促進するpara-chloroamphetamine (PCA) およびセロトニンの前駆体5-hydroxytryptophan (5-HTP) の腹腔内投与による自発運動の亢進をactivity monitorを用いて測定した。自発運動の指標としての移動距離は、ベースライン値およびPCA, 5-HTPによる亢進について、ホモ変異マウスと野生型マウスの間で有意な差異を認めなかった。よって、中枢神経系の1次繊毛の低形成は自発運動には影響を与えないことが示された。

2) 嗅覚機能の測定

絶食後のマウスに隠したfood pelletを探索させる嗅覚機能試験では、pelletの発見に要する時間の有意な増大をホモ変異マウスで認めた(図6)。よって、嗅繊毛の低形成が嗅覚機能の低下を惹起したことが示された。

3) 不安に関連した行動解析

高架式十字迷路試験、明暗箱試験において、両群間に有意な差は認めなかった。これより繊毛の低形成は不安行動に影響を及ぼさないと考えられた。

- ・高架式十字迷路試験：X軸には壁を設け、Y軸には壁が無い十字型に交差した高架迷路での滞在時間の偏りを5分間で評価する。Y軸通路の不安レベルが高いとされる。

- ・明暗箱試験：相互に行き来できる隣り合わせの明暗箱での滞在時間の偏りを30分間で評価する。明るい箱の不安レベルが高いとされる。

図6 嗅覚機能試験

4) うつに関連した行動解析

強制水泳試験、尾懸垂試験にて両群を比較検討した。両試験の無動時間は抗うつ薬の投与で短縮するため、うつ状態のモデルとされている。両試験ともに、ホモ変異マウスは野生型マウスと比較して無動時間の有意な短縮を認めた。また試験30分前に抗うつ薬imipramine (30mg/kg) の腹腔内投与を行った場合、ホモ変異マウスの無動時間はさらに短縮した(図7, 8)。これより繊毛の低形成は抗うつ効果を持つと考えられた。

- ・強制水泳試験：円筒の水槽内で6分間泳がせ、後半の4分間内の無動時間を測り、回避意欲の程度を評価する。

- ・尾懸垂試験：尾を固定して7分間ぶら下げ、無動時間を測り、回避意欲の程度を評価する。

MCHR1は1次繊毛上に限局して発現するため、メラニン凝集ホルモン(MCH)系の伝達は繊毛に依存すると言える。マウスにおいてMCHR1の欠損やMCHR1選択的アンタゴニストの投与により抗うつ効果が見られるという報告⁶⁾を踏まえるならば、MCHR1を発現する繊毛の短縮によるMCH系伝達の低下がホモ変異マウスの抗うつ行動を惹起した機序が考えられる。今後、変異マウス脳内にMCHなどの繊毛受容体のリガンドを直接投与して行動学的、生化学的な変化を観察することを通して、神経細胞の非シナプス性の入力経路としての1次繊毛が情動の制御に関わるシグナリングの起点となっている可能性について更に検討することが課題として挙げられる。

図7 強制水泳試験

図8 尾懸垂試験

3. Pericentrin 変異マウスの海馬歯状回における神経新生の計測

成長後も神経幹細胞の増殖・分化が持続する海馬歯状回顆粒細胞下層での神経新生を計測することにより、神経幹細胞の1次繊毛が分泌因子を感知し核への増殖シグナルの起点になっている可能性を検討した。Bromodeoxyuridine (BrdU) は増殖細胞の合成期 DNA に取り込まれるため、新生細胞の標識に広く用いられ

る。ホモ変異マウスと野生型マウス（オス，8週齢）にBrdUを腹腔内投与し（100mg/kg；2時間おきに4回），最後の投与の48時間後に灌流固定し，海馬を含む領域の冠状断連続切片を作成した．切片を2重免疫蛍光染色により観察し，歯状回顆粒細胞層のBrdU，NeuN 両陽性細胞すなわち新生神経細胞の数を計測した．ホモ変異マウス，野生型マウス間で比較したところ，有意な差異を認めなかった．各群についてさらに3群に分け，生理食塩水，抗うつ薬 imipramine (30mg/kg)，fluoxetine (20mg/kg) のいずれかを21日間連続で腹腔内投与したうえで同様の計測を行ったが，各群ともに，新生神経細胞数は抗うつ薬の投与による有意な影響を受けなかった．以上より，繊毛の低形成は神経新生に影響を及ぼさないと考えられた．

文 献

- 1) Singla V, Reiter JF : The primary cilium as the cell's antenna : signaling at a sensory organelle. *Science* (2006) 313, 629-633.
- 2) Berbari NF, Johnson AD, Lewis JS, Askwith CC, Mykityn K : Identification of ciliary localization sequences within the third intracellular loop of G protein-coupled receptors. *Mol Biol Cell* (2008) 19, 1540-1547.
- 3) Miyoshi K, Asanuma M, Miyazaki I, Matsuzaki S, Tohyama M, Ogawa N : Characterization of pericentrin isoforms in vivo. *Biochem Biophys Res Commun* (2006) 351, 745-749.
- 4) Miyoshi K, Onishi K, Asanuma M, Miyazaki I, Diaz-Corrales FJ, Ogawa N : Embryonic expression of pericentrin suggests universal roles in ciliogenesis. *Dev Genes Evol* (2006) 216, 537-542.
- 5) Miyoshi K, Kasahara K, Miyazaki I, Shimizu S, Taniguchi M, Matsuzaki S, Tohyama M, Asanuma M : Pericentrin, a centrosomal protein related to microcephalic primordial dwarfism, is required for olfactory cilia assembly in mice. *FASEB J* (2009) 23, 3289-3297.
- 6) Antal-Zimanyi I, Khawaja X : The role of melanin-concentrating hormone in energy homeostasis and mood disorders. *J Mol Neurosci* (2009) 39, 86-98.