

平成 22 年 3 月 31 日現在

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2007～2009

課題番号：19591355

研究課題名（和文）

Pericentrin 変異マウスを用いた中枢神経系 1 次繊毛の機能解析

研究課題名（英文）

Functional analysis of primary cilia in the CNS using pericentrin mutant mice

研究代表者

三好 耕 (MIYOSHI KO)

岡山大学・大学院医歯薬学総合研究科・助教

研究者番号：90362996

研究成果の概要（和文）：

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。

研究成果の概要（英文）：

Mice homozygous for a mutation in pericentrin gene displayed malformation of primary cilia in the CNS and olfactory cilia of olfactory receptor neurons. There was no significant difference in locomotion, anxiety-related behavior and neurogenesis in the subgranular zone of hippocampal dentate gyrus between homozygous mutant mice and wild-type mice. On the other hand, the mutant mice displayed behavioral alterations of an anti-depressive phenotype in addition to reduced olfactory performance, suggesting malformation of primary cilia in the CNS led to an anti-depressive effect.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2008年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2009年度	1,100,000	330,000	1,430,000
年度			
年度			
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・精神神経科学

キーワード：繊毛、中心体、中枢神経系

1. 研究開始当初の背景

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、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。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。

2. 研究の目的

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 (Miyoshi K et al. Biochem Biophys Res Commun. 351:745-749 (2006))、胎生期マウス的大脑皮質等で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 (Miyoshi K et al. Dev Genes Evol. 216:537-542 (2006))。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。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、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。

3. 研究の方法

(1) pericentrin変異マウスの神経系繊毛の観察

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) の中枢神経系の1次繊毛および嗅覚神経細胞の嗅繊

毛の形成を免疫蛍光染色により観察し、野生型マウスと比較検討する。またホモ変異マウスの脳組織をNissl染色により観察する。

(2) pericentrin変異マウスの行動解析

神経系の繊毛の低形成が及ぼす影響を、ホモ変異マウスの自発運動、嗅覚機能、不安、うつに関連した行動に焦点を当てて解析する。なお各行動解析では、オス、8-10週齢のホモ変異マウスと野生型マウスを用いる。

(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、pericentrin変異マウスと野生型マウスについて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する。

4. 研究成果

(1) 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脑皮質の層構造、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。

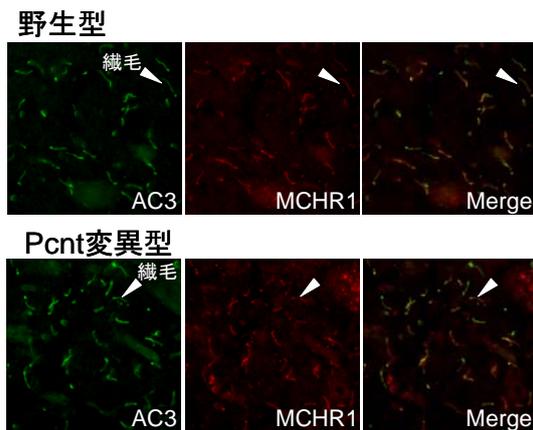


図1 線条体の繊毛

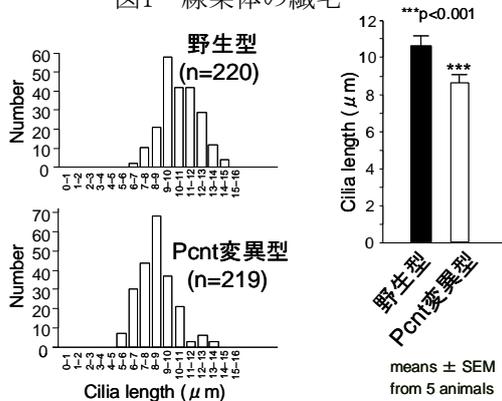


図2 線条体における繊毛長のヒストグラムおよび平均長の比較

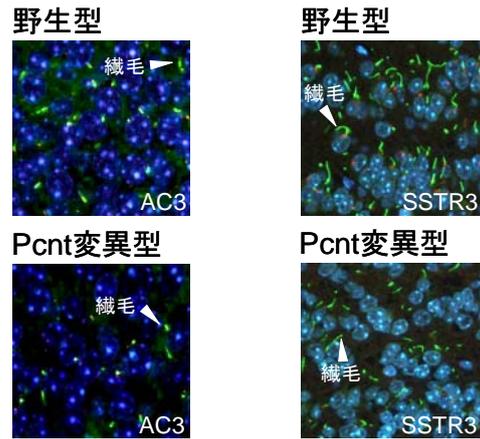


図3 海馬歯状回の繊毛 図4 嗅球の繊毛

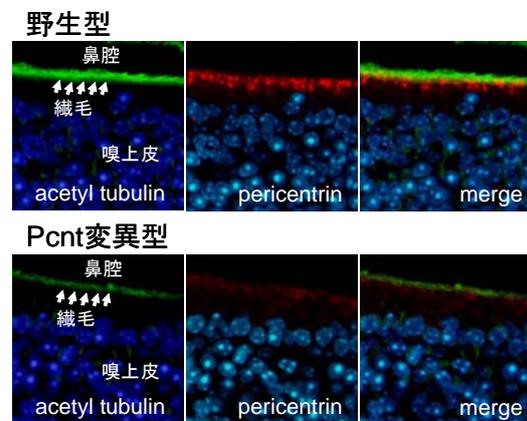


図5 嗅覚神経細胞の繊毛

(2) 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。

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 (30 mg/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 (Antal-Zimanyi I, Khawaja X. J Mol Neurosci. 39:86-98 (2009)) 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。

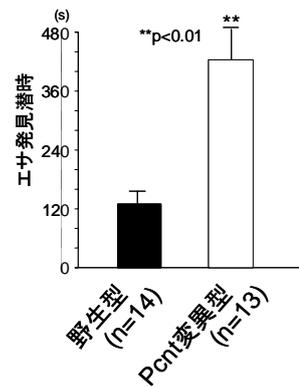


図6 嗅覚機能試験

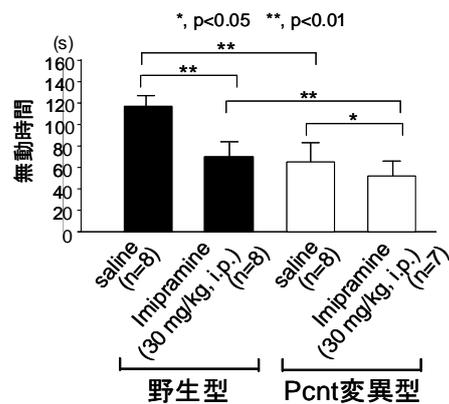


図7 強制水泳試験

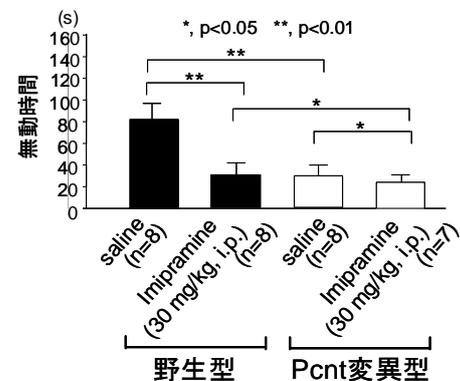


図8 尾懸垂試験

(3) 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(100 mg/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 (30 mg/kg)、fluoxetine (20 mg/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。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計9件)

① Pericentrin, a centrosomal protein related to microcephalic primordial dwarfism, is required for olfactory cilia assembly in mice.

Miyoshi K, Kasahara K, Miyazaki I, Shimizu S, Taniguchi M, Matsuzaki S, Tohyama M, Asanuma M.

FASEB J. 23(10):3289-3297 (2009) 査読有

② Lithium treatment elongates primary cilia in the mouse brain and in cultured cells.

Miyoshi K, Kasahara K, Miyazaki I, Asanuma M.

Biochem Biophys Res Commun. 388(4):757-762 (2009) 査読有

[学会発表] (計13件)

① 三好 耕 他 「成熟神経細胞の1次繊毛」 第115回日本解剖学会総会・全国学術集会 2010年3月29日 岩手県民会館(岩手県)

② 三好 耕 他 「向精神薬およびペリセントリン変異が神経細胞1次繊毛に及ぼす影響」 第19回日本臨床精神神経薬理学会・第39回日本神経精神薬理学会合同年会 2009年11月14日 京都国際会館(京都府)

③ 三好 耕 他 「Pericentrin変異マウスを用いた神経細胞繊毛の機能解析」 第31回日本神経科学大会 2008年7月10日 東京国際フォーラム(東京都)

④ 三好 耕 他 「神経細胞1次繊毛の精神疾患への関与」 第51回日本神経化学学会大会 2008年9月13日 富山国際会議場(富山県)

⑤ 三好 耕 他 「神経細胞1次繊毛は情動や摂食に関与する」 第30回日本生物学的精神医学会・第2回アジア・太平洋生物学的精神医学会 2008年9月13日 富山国際会議場(富山県)

⑥ 三好 耕 他 「Pericentrin変異マウスを用いた神経細胞1次繊毛の機能解析」 第30回日本神経科学大会・第50回日本神経化学学会大会・第17回日本神経回路学会大会合同学会 2007年9月10日 パシフィコ横浜(神奈川県)

⑦ 三好 耕 他 「神経細胞1次繊毛の生物学的意義の検討」 第29回日本生物学的精神医学会・第37回日本神経精神薬理学会合同年会 2007年7月12日 札幌コンベンションセンター(北海道)

[その他]

ホームページ等

<http://www.okayama-u.ac.jp/user/brainsci/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

三好 耕 (MIYOSHI KO)

岡山大学・大学院医歯薬学総合研究科・助教

研究者番号: 90362996

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし