

140. 神経細胞の繊毛異常が引き起こす繊毛病の発症機構解明

茶屋 太郎

大阪大学 蛋白質研究所 分子発生学研究室

Key words : 繊毛, 繊毛病, GPCR, 肥満

緒言

繊毛は、細胞表面から突出した微小管を軸にもつ細胞小器官であり、幅広い生物種に渡って存在している。近年、繊毛には様々な受容体分子が局在し、「アンテナ」の役割を担うことが明らかとなり注目されている。また、ヒトにおいて繊毛の形成や機能に関わる遺伝子の変異により、網膜視細胞の細胞死による視覚障害（網膜色素変性症）や、肥満、嚢胞腎、精子や卵管の異常による不妊等の「繊毛病」（Ciliopathy）と呼ばれる一群の疾患を引き起こすことが知られている。しかし、繊毛病の発症機構については、不明な部分が多い。

神経細胞の繊毛の形成あるいは機能不全により過食や肥満が引き起こされることが知られているが、繊毛の異常による肥満の分子メカニズムは明らかになっていない。本研究では、繊毛病における肥満発症の分子機構を解明することを目的として培養細胞やマウスモデルを用いて解析を行った。

方法および結果

繊毛に局在する G 蛋白質共役型受容体（GPCR）を新たに同定するために、嗅覚受容体を除く 138 個の GPCR の C 末端側に Flag あるいは mCherry タグを付加したコンストラクトを作製した。これらを NIH3T3 細胞に発現させ、繊毛のマーカーであるアセチル化チューブリンと共染色することにより、細胞内局在を観察した。このスクリーニングにより、そのリガンドが摂食行動に関わることが知られるプロラクチン放出ホルモン受容体（PRLHR）（図 1A）、ニューロメジン U 受容体 1（NMUR1）（図 1B）、ニューロペプチド FF 受容体 1（NPFFR1）（図 1C）、ニューロペプチド Y2 受容体（NPY2R）が繊毛に局在することを見出した。今回はこれらの中、Npy2r に着目して研究を進めた。

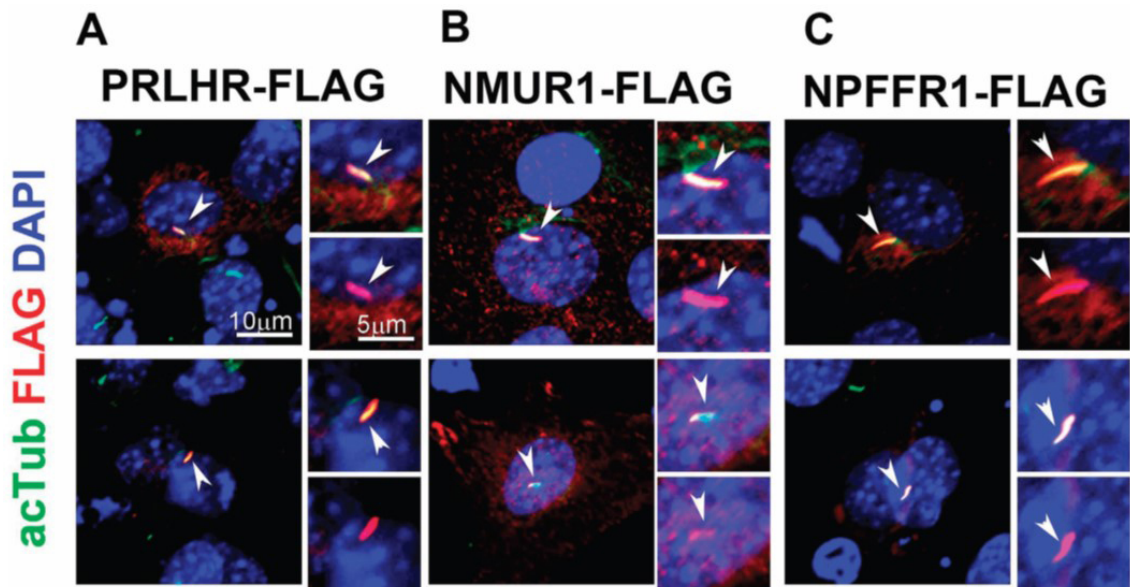


図1. GPCR の繊毛への局在化の解析

3種類のGPCR、PRLHR (A)、NMUR1 (B)、NPFFR1 (C) は繊毛に局在する。C末端側にFlag タグを付加したGPCR をトランスフェクションにより、NIH3T3 細胞に発現させた。GPCR は抗Flag タグ抗体 (赤) で染色し、繊毛は抗アセチル化チューブリン抗体 (緑) で染色した。細胞核は DAPI (青) で染色した。Flag のシグナルとアセチル化チューブリンのシグナルの共局在 (矢頭) が観察された。

Npy2r に対する抗体を作製し、免疫組織化学染色を行ったところ、視床下部弓状核において Npy2r が繊毛に局在することが観察された (図 2A)。次に Npy2r プロモーター下で Cre を発現する BAC-Npy2r-Cre マウスと繊毛内輸送構成因子 Ift80 を Cre 発現下で欠損可能な Ift80 flox マウスを作製し、これらを掛け合わせて、Ifit80 flox/flox; Npy2r-Cre⁺ (CKO) マウスを誕生させた。このマウスにおいては視床下部弓状核において Npy2r 陽性の繊毛が減少していた (図 2A, B)。しかし、Ifit80 CKO マウスとコントロールマウスの Npy2r の mRNA 発現量を比較すると、有意な差は検出されなかった (図 2C)。また、繊毛のマーカであるアデニル酸シクラーゼ 3 を染色すると、繊毛の数も変化が認められなかった (図 2D, E)。これらのマウスの体重を測定すると、Ifit80 CKO マウスではコントロールマウスと比較して体重の増加が見られた (図 2F)。以上の結果から Npy2r は繊毛に局在することによって体重コントロールに関与することが示唆された¹⁾。

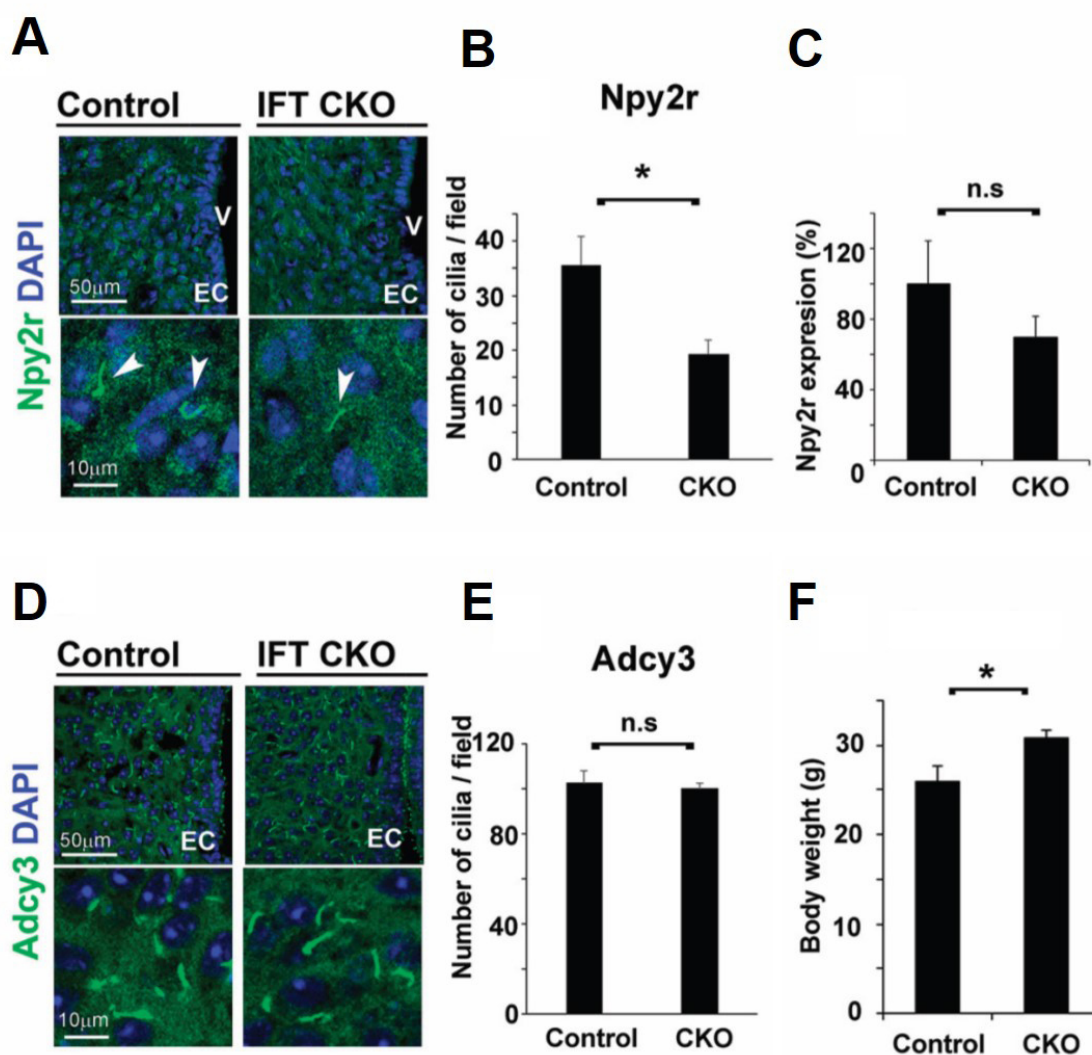


図2. *Ift80* flox/flox; *Npy2r*-*Cre*⁺ (CKO) マウスは体重増加を引き起こす

(A) コントロールと *Ift80* CKO マウスの視床下部弓状核の繊毛を抗 *Npy2r* 抗体で免疫染色した (矢頭)。細胞核は DAPI (青) で染色した。(B) A で染色された繊毛の数 (25,600 μm^2 あたり) を定量化した。抗 *Npy2r* 抗体で染色された繊毛の数は *Ift80* CKO マウスで有意に低下した ($n = 3$, $*p < 0.03$, Student's *t*-test)。(C) *Ift80* CKO マウスの視床下部における *Npy2r* の mRNA 発現レベルを定量的 PCR により解析した ($n = 3$, Student's *t*-test)。(D) コントロールと *Ift80* CKO マウスの視床下部弓状核の繊毛を抗アデニル酸シクラーゼ 3 抗体で免疫染色した。細胞核は DAPI (青) で染色した。(E) D で染色された繊毛の数 (25,600 μm^2 あたり) を定量化した。抗アデニル酸シクラーゼ 3 抗体で染色された繊毛の数はコントロールと *Ift80* CKO マウスで有意な差は認められなかった (Student's *t*-test)。(F) *Ift80* CKO マウスでは体重の増加が認められる。コントロールと *Ift80* CKO の 19 週齢のオスマウスの体重を測定した。*Ift80* CKO マウスではコントロールマウスと比較して有意に体重の増加が認められた (コントロール, $n = 6$, *Ift80* CKO, $n = 4$, $*p < 0.03$, Student's *t*-test)。EC: 上衣細胞、V: 第三脳室。

考 察

Npy2r 欠損マウスは過食となり、体重増加が認められる²⁾。Ift80 CKO マウスでは視床下部弓状核において、繊毛の数や Npy2r の発現に変化は見られなかったが、Npy2r 陽性の繊毛の数は減少していた。また、Ift80 CKO マウスではコントロールマウスと比較して体重の増加が見られた。このことから Npy2r は繊毛に局在することによって摂食を制御すると考えられる。

今回、私たちは Npy2r の他に PRLHR、NMUR1、NPFFR1 が繊毛に局在することを見出した。これらの GPCR の繊毛における機能は未知であるが、今回の Npy2r と同様の解析を行うことにより、繊毛の摂食行動や体重制御に対する役割をより詳細に明らかにすることができると期待される。

共同研究者

本研究の共同研究者は、大阪大学蛋白質研究所分子発生学研究室の大森義裕准教授および古川貴久教授である。また本稿を終えるにあたり、本研究にご支援を賜りました上原記念生命科学財団に深く感謝いたします。

文 献

- 1) Omori Y, Chaya T, Yoshida S, Irie S, Tsujii T, Furukawa T. Identification of G Protein-Coupled Receptors (GPCRs) in Primary Cilia and Their Possible Involvement in Body Weight Control. PLoS One. 2015 Jun 8;10(6):e0128422. doi: 10.1371/journal.pone.0128422. eCollection 2015. PMID: 26053317
- 2) Naveilhan P, Hassani H, Canals JM, Ekstrand AJ, Larefalk A, Chhajlani V, Arenas E, Gedda K, Svensson L, Thoren P, Ernfors P. Normal feeding behavior, body weight and leptin response require the neuropeptide Y Y2 receptor. Nat Med. 1999 Oct;5(10):1188-93. PMID: 10502824