

浸透圧ストレス応答におけるグリア／ニューロン機能

大阪市立大学 複合先端研究機構
中台（鹿毛） 枝里子

1. 目的

体液浸透圧の調節は、多細胞生物が持つ最も根源的な生理現象の一つである。全身の体液浸透圧は、脳の浸透圧受容器により緻密にコントロールされる。近年、浸透圧受容器におけるグリア細胞の働きがニューロンの活動を制御することが、主に生理学的手法により明らかとなってきた。一方でその分子的基盤については未解決の課題が多く残されている。

ところで、わずか1,000細胞からなる単純な多細胞生物、線虫*C.elegans*にも、浸透圧調節システムが存在する。線虫の浸透圧受容を担う頭部感覚器にはamphid sheath glia と呼ばれるグリア細胞が1対（2個）存在し、1対（2個）の浸透圧受容ニューロンの神経突起を取り巻いている。本研究は、線虫をモデル動物として用い、浸透圧受容および調節におけるグリア細胞機能を担う分子実体を明らかにすることを目的とする。

2. 方法

グリア細胞マーカー*hmit-1.2*遺伝子¹⁾の発現を制御する遺伝子の探索により、ショウジョウバエ*Prospero* / 哺乳類*Prox1*の線虫ホモログである*ceh-26*を同定した。次にfeeding RNAi法により、他のグリア細胞マーカーの発現への影響を検討した。また隣接する浸透圧受容ニューロンやその他の感覚ニューロンの機能や形態への影響があるか否かについて検証した。さらに安定的な遺伝学的解析のため、*ceh-26*遺伝子欠損変異体を作製するとともにレスキュー実験を行った。またコンディショナルノックアウト線虫作製のための基盤技術開発を行い、*ceh-26*コンディショナルノックアウト線虫を作製した。

3. 結果

*ceh-26*ノックダウンによりグリア細胞マーカー*fig-1*の発現はほぼ完全に消失することがわかった。一方で別のグリア細胞マーカー*vha-8*の発現に変化はみとめられなかった。また*ceh-26*ノックダウンによる顕著なグリア細胞形態異常はみとめられなかった。*ceh-26*ノックダウンにより高浸透圧受容による忌避行動が顕著に低下することを見出した。またジアセチルに対する誘引行動もほぼ完全に消失することがわかった。感覚ニューロンの感覚子の形態についても評価したところ、AWBニューロンおよびASEニューロンの感覚子の形態が異常になることがわかった。CEH-26はグリア細胞とexcretory cellの核に局在した。*ceh-26*は浸透圧受容ニューロンをはじめとする感覚ニューロンには発現しないことも確認した。

*ceh-26*遺伝子欠損変異体を作製した結果、幼虫期においてホモ致死となることがわかった。致死性は*ceh-26*遺伝子の導入により回復した。またヒトホモログである*Prox1*の導入によっても回復した。

個体の生存に必須な遺伝子の解析を行う際には、コンディショナルノックアウトの手法が欠かせない。線虫*C.elegans*は遺伝学的解析を行うための優れたモデル動物であるが、これまでに体系的なコ

ンディショナルノックアウト法は確立されていなかった。線虫の全遺伝子は約2万個存在するが、うち約半数の変異体は既に世界中で分離されている。したがって、外来遺伝子をシングルコピーでゲノムに挿入するトランスジェニック法を開発すれば、既存の変異体ライブラリと組み合わせたコンディショナルノックアウト法が確立できる。そこでまず、*vps-45*遺伝子（欠損すると高温で生存できない）と*ben-1*遺伝子（この遺伝子を持つと、ベノミル含有培地で生存できない）をそれぞれポジティブ / ネガティブ選択マーカーとして用いるシングルコピー挿入法を開発した²⁾。次にCreリコンビナーゼとLoxP配列を利用した手法の開発を行った。まず、Cre/LoxP依存的な切り出し反応を可視化するため、全身発現性GFP遺伝子の両端をLoxPで挟むようなコンストラクトを作製し、線虫ゲノムにシングルコピーで挿入した。得られたトランスジェニック線虫を用いて、種々の時期、組織特異的発現プロモーターの制御下にCreリコンビナーゼを発現させたところ、対応する時期、組織においてLoxP間の配列の切り出し(GFPの消光)が起こることを確認した^{3),4)}。本手法を用いて*ceh-26*遺伝子のコンディショナルノックアウト線虫を作製した。

4. 考察

*ceh-26*は線虫においてグリア細胞マーカーの発現を部分的に制御するが、グリア細胞産生そのものを制御するわけではないことが示唆された。*Prospero*はショウジョウバエにおいてグリア細胞発生に必須なホメオボックス転写因子であるが、*ceh-26*は線虫のグリア細胞においてはより後期の分化や機能維持に働く可能性が考えられる。*ceh-26*はグリア細胞において発現し、浸透圧受容ニューロンや他の感覚ニューロンの機能や感覚子の形態形成／維持に重要な役割を果たすことが示唆された。

*ceh-26*遺伝子欠損変異体における致死の表現型がヒト*Prox1*によりレスキューされたことから、*ceh-26*はヒト*Prox1*の機能的なホモログであると考えられる。グリア細胞は生存には必須ではないことが既に示されており、一方で*excretory cell*（体液浸透圧を制御する細胞）は線虫の生存に必須である。よって*ceh-26*欠損変異体における致死は*excretory cell*の発生／機能異常によるものと推察される。哺乳類の*Prox1*はリンパ管内皮細胞の運命決定に働く転写因子であることから、生物種を超えて浸透圧制御器官において働く可能性が示唆され興味深い。

*ceh-26*のグリア細胞における機能が、感覚ニューロンの正常な機能に重要であるか否かについては、作製したグリア特異的*ceh-26*コンディショナルノックアウト線虫の表現型の解析により明らかにできると考えている。

5. 参考文献

- 1) Kage-Nakadai, E. *et al.* : *Biochem Biophys Res Commun.*, **410** : 471-477 (2011)
- 2) Kage-Nakadai, E. *et al.* : *BMC Biotechnol.*, **12** : 1 (2012)
- 3) Kage-Nakadai, E. *et al.* : *Methods*, **68** : 397-402 (2014)
- 4) Kage-Nakadai, E. *et al.* : *PLoS One*, **9** : e114680 (2014)