

遺伝薬理学的手法による中枢セロトニン神経の除去と睡眠覚醒への影響

岩崎 加奈子 (筑波大学 生物学類) 指導教員: 柳沢 正史 (筑波大学 医学医療系)

背景と目的

生理活性アミンの一種であるセロトニン (5-HT) は 全身で様々な働きに関わっているが、中枢神経系においては神経伝達物質のひとつとして知られている。セロトニン神経の大部分は縫線核に集中しており、中脳・橋・延髄にまたがって存在する。その役割は摂食や体温調節など多岐に渡る事が知られており、特に中脳の背側縫線核(DR)と内側縫線核(MR)は覚醒経路の一部として視床下部などから入力を受け、脳の広範囲に投射している。またセロトニンの受容体は7つのサブファミリー、14種のサブタイプに分類されている。

睡眠覚醒リズムとセロトニン神経の関係については、先行研究によって受容体ごとのアゴニスト、アンタゴニストによる影響が報告されているが、レセプターのサブタイプによって変化は様々だった。セロトニン神経全体としてどのように睡眠覚醒に関与しているのかは明らかにされておらず、これを知る手法の一つとしてノックアウトマウスによる研究が考えられるが、通常のノックアウトマウスでは他の神経による代償機構が働きセロトニン神経除去による変化が現れないという懸念がある。

そこで本実験では、遺伝薬理学的手法により成体マウスで中枢セロトニン神経を後天的に除去し、それが睡眠覚醒に及ぼす影響を調べた。今回神経の除去に用いたジフテリアトキシン (DTA) はジフテリア菌 (*Corynebacterium diphtheriae*) が合成するタンパク質性毒素であり、タンパク質合成の転移を触媒する伸長因子 EF2 の側鎖アミノ酸を ADP リボシル化する事でタンパク質合成を阻害する。この DTA はジフテリアトキシンレセプター (DTR) に結合しエンドサイトーシスによって細胞内に取り込まれるが、ヒトに発現している hDTR が高い DTA 感受性を持つものに対して、マウスに発現している mDTR は DTA 耐性である。この性質を利用し、セロトニン神経特異的に hDTR を発現させたトランスジェニックマウスに DTA を投与する事によって、成体マウスにおいてセロトニン神経のみ除去する事を目指した。

方法

(1) Pet1/DTR マウスの作成

セロトニン産生細胞特異的に発現している *Pet1* 遺伝子のエンハンサー下流に Cre 発現配列を持つ ePet-cre マウスと、*ROSA26* 遺伝子座に *Floxed stop cassette*, *hDTR*, *tdTomato* を含むコンストラクト (図1) が挿入された DTR マウスを交配させる事で、Cre-loxP 系によりセロトニン産生細胞特異的に hDTR が発現する Pet1/DTR マウスを作成した。



図1. *Rosa-LSL-DTR-tdTomato*

(2) カニューラ・電極の取り付け

雄の *Pet1/DTR* マウスに、側脳室に DTA を直接投与するためのカニューラと、脳波と筋電図測定用の電極を麻酔下で取り付けた。カニューラはブレグマから尾側に 0.2 mm、側方に 1.0 mm の位置に装着し、ガイドの深さは頭骨表面から 2.0 mm とした。

(3) 脳波・筋電図測定と解析

まず DTA 投与なしの状態でもコントロールを測定した。その後 DTA 投与から 9 日後、16 日後、23 日後にそれぞれ連続 48 時間測定を行った。測定室の明暗周期は 12 時間明期、12 時間暗期で設定された。測定された脳波・筋電図を、マウス脳波の一般的な基準と照らし合わせて 20 秒ずつのエポックでノンレム睡眠、レム睡眠、覚醒の3つの状態に振り分けた。

(4) DTA の投与

DTA は人工脳脊髄液 (aCSF) を溶媒にして濃度を調節した。投与する液量は 1 μ l に設定し、DTA 濃度を 2.5 ng/ μ l から 20 ng/ μ l の間で振り、適切な濃度を検討した。DTA の投与はカニューラを通じて行った。

(5) 深部体温、体重、血糖値の測定

セロトニン神経は摂食や体温など様々な機能の調節に関与しているため、カニューラ電極手術後から週に 2 回直腸温と体重を測定し、健康状態を確認した。また *Pet1* 遺伝子は膵臓のランゲルハンス島 β 細胞での発現も見られるため、脳波・筋電図を測定した翌日に血糖値を測定し、膵臓への影響も観察した。

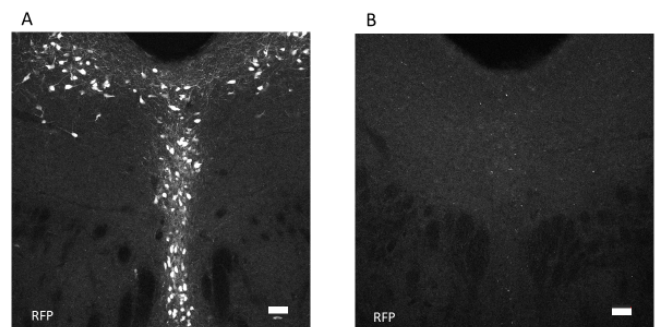
(6) 免疫組織化学

マウス全脳の凍結サンプルを作成し、そこから厚さ 40 μ m の冠状断面の切片を作成した。anti-5HT、anti-RFP 抗体と DAPI を用いて免疫組織化学を行い、共焦点レーザー顕微鏡で観察した。

DTA 投与なしの *Pet1/DTR* マウス、DTA 投与後の *Pet1/DTR* マウスの同一冠状断面の切片上で観察された細胞数をカウントし、DTA 投与による細胞数の変化を観察した。

結果と考察

免疫組織化学によって、DTA 投与による RFP 陽性細胞の減少が観察された (図2)。この他の詳細な結果については測定・解析中のため、発表会にて示す。



Bregma -4.96におけるDRのanti-RFP免疫組織化学像 (A)DTA投与なし (B)DTA投与後 スケール=50 μ m

図2. ジフテリア投与による RFP 陽性細胞の減少