

## Protein phosphatase 2C $\epsilon$ (PP2C $\epsilon$ ) 遺伝子欠損マウスの組織学的解析

### [1] 組織

代表者：阪上 洋行 (北里大学医学部)  
 対応者：小林 孝安 (東北大学加齢医学研究所)  
 分担者：深谷昌弘 (北里大学医学部)  
 田村眞理 (東北大学加齢医学研究所)

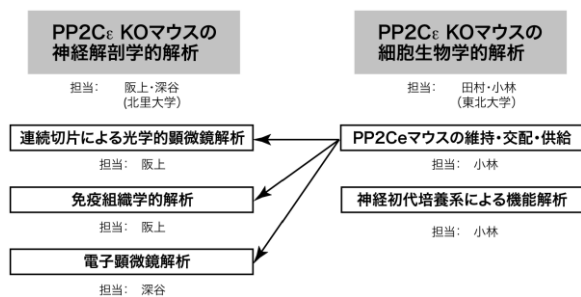
研究費：物件費 17万5千円, 旅費 2万5千円

### [2] 研究経過

Protein phosphatase 2C $\epsilon$  (PP2C $\epsilon$ ) は、哺乳動物の小胞体膜上に局在する Ser/Thr 特異的プロテインホスファターゼで、加齢研遺伝子情報分野・田村眞理教授らにより同定されたものである。同グループの細胞生物学的研究により、stress-activated protein kinase 経路の制御や小胞体上での脂質輸送に関与することが明らかにされている。しかしながら、PP2C $\epsilon$  は神経系に豊富に発現しているが、神経系における PP2C $\epsilon$  の個体レベルでの役割は未だ不明である。本研究は、PP2C $\epsilon$  の神経発達過程における機能解明を目的として、同グループが作製した PP2C $\epsilon$  遺伝子欠損 (KO) マウスを神経解剖学的に検討した。

研究体制は図1に示した通りで、東北大学加齢医学研究所で交配された PP2C $\epsilon$  KO マウスを用いて北里大学医学部で神経解剖学的解析を行った。平成24年10月5日に研究の打ち合わせ及び PP2C $\epsilon$  KO マウスの固定と脳標本の採集を加齢医学研究所で行った。

図1 本研究体制



### [3] 成果

(3-1) 研究成果

PP2C $\epsilon$  KO と野生型マウスの神経構築を神経解剖学的に精査した結果、以下のような成果を挙げた。

#### 1. PP2C $\epsilon$ KO における側脳室の拡大と大脳神経線維束の非薄化

野生型と PP2C $\epsilon$  KO の成熟期の脳矢状断と冠状断切片に対して、ニッスル染色および神経線維の走行を確認するために髄鞘タンパク質(myelin basic

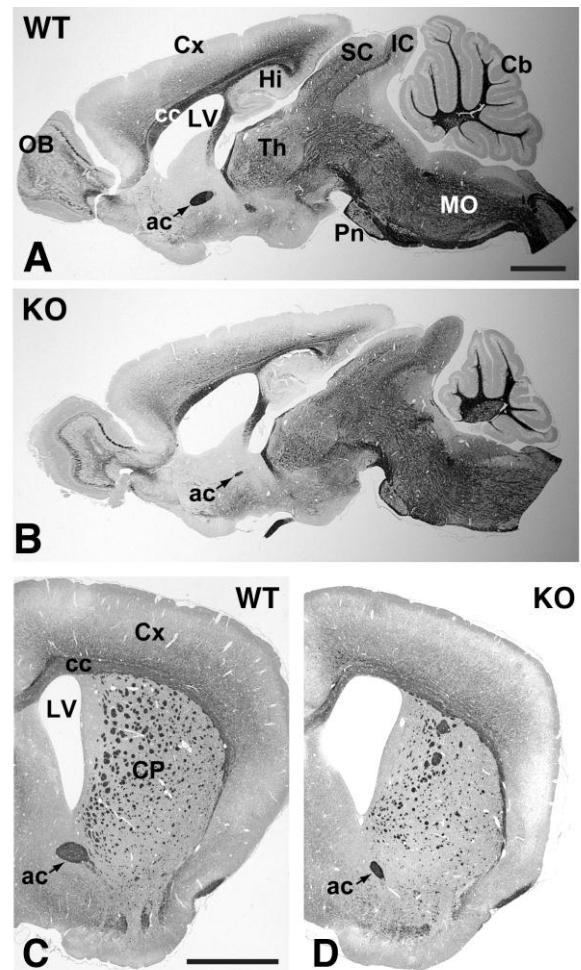


図2 PP2C $\epsilon$  KOマウスの神経構造異常

野生型 (WT) と PP2C $\epsilon$  KO マウスの矢状断面 (A,B) と線条体の通る冠断面 (C, D) における MBP による免疫組織染色法の結果を示す。側脳室 (LV) の拡大と線条体 (CP) 中を走行する内包の減少、さらに前交連 (ac) や脳梁 (cc) の非薄化が認められる。Cb, 小脳; CP, 線条体; Cx, 大脳皮質; Hi, 海馬; IC, 下丘; MO, 延髄; OB, 嗅球; Pn, 橋核; SC, 上丘; Th, 視床。スケールバー, 1 mm

protein, MBP)を用いた免疫組織染色を施した。その結果、図2で示すように PP2Cε KO の側脳室の著明な拡大が明らかになった。さらに、大脳交連線維が走行する脳梁と前交連、大脳皮質の投射神経線維（例えば皮質脊髄路や皮質橋路）が走行する内包における MBP 陽性の神経線維の著明な減少が認められた。一方、脳神経核の配置や大脳皮質や小脳皮質などの皮質層構造の明らかな異常は認められなかった。

## 2. PP2Cε KO の前交連における有髄神経線維の減少

光学的顕微鏡レベルで検出された神経線維束の減少が、神経線維の減少あるいは髄鞘形成の障害のいずれに起因するかを明確にするため、大脳交連線維が走行する前交連の冠状断面に対する電子顕微鏡解析を行った。その結果、図3で示すように、単面積あたりの髄鞘を持つ軸索（有髄神経線維）の著明な減少が明らかになった ( $p < 0.05$ )。したがって、神経線維束の減少は有髄神経線維の数の減少に起因することが示唆された。

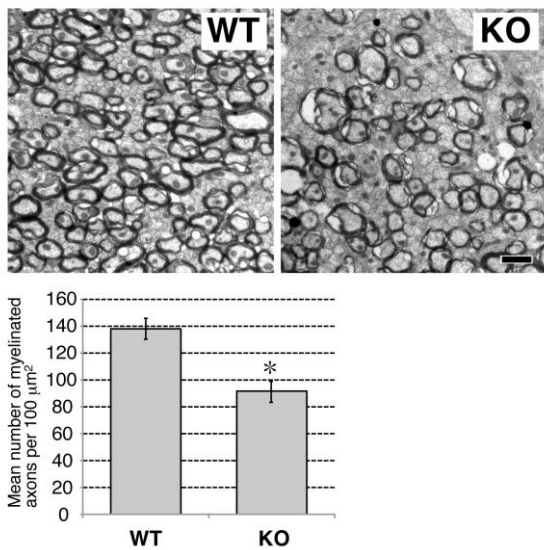


図3 PP2Cε KOマウスの有髄神経線維の減少

野生型 (WT) と PP2Cε KO マウスの前交連の断面の電子顕微鏡像。数に単位面積あたりの有髄神経線維の比較を示す。\*  $p < 0.05$  スケールバー、100μm

さらに、神経線維の減少が、軸索の起始である大脳皮質神経細胞の減少によるものか、神経線維の回路形成の障害によるものかを確認するために、交連線維の起始である大脳皮質 2/3 層のマーカーの Cux1 を用いた免疫組織学的解析により、大脳皮質 2/3 層の神経細胞の密度を検討した。その結果、遺伝子欠損型と野生型との間に明らかな神経細胞の密度の差は認められなかった。これらの結果より、神経線維の減少は、発達過程の細胞死などによる大脳皮質の神経細胞の減少よりはむしろ、神経突起形成や神経

回路形成の異常による可能性が考えられた。今後、Di などのトレーサーを用いて大脳皮質の神経回路形成について、さらに詳細な神経解剖学的検討が必要と考えられる。また、現在、加齢研遺伝子情報分野の研究グループにより、初代神経培養系を用いての PP2Cε の神経突起形成における機能関与および分子機構に関して検討を遂行中である。

## (3-2) 波及効果と発展性など

本共同研究により、PP2Cε の神経回路形成における機能関与が個体レベルで初めて明確になった。従来、リン酸化酵素の神経機能の研究結果が多く蓄積されてきたが、脱リン酸化経路に関する知見は少ない。本研究により PP2Cε を介する脱リン酸化経路の神経回路形成制御機構の解明への進展が大いに期待される。また、本遺伝子欠損マウスの神経行動学的異常として不随運動などのハンチントン病様の症状を示すことが明らかになっており、本マウスが新たな疾患モデルマウスとして発展する可能性を秘めており、今後さらなる本マウスの表現系の解析が望まれる。

## [4] 成果資料

論文発表 なし

## 学会発表

[1] ノックアウトマウスを用いた PP2Cε の新規機能解明、藤田 宏介、篠田 康晴、千田 透子、永浦 裕子、草野 理恵、渡邊 利雄、松居 靖久、相澤 慎一、清成 寛、阿部 高也、阪上 洋行、大西 素子、田村 真理、小林 孝安、第 35 回日本分子生物学会総会、2012 年 12 月 福岡

[2] Targeted disruption of the mouse protein phosphatase 2Cε gene leads to structural abnormalities in the brain. Kousuke Fujita, Yasuharu Shinoda, Toko Chida, Yuko Nagaura, Rie Kusano, Toshio Watanabe, Yasuhisa Matsui, Shinichi Aizawa, Hisoshi Kiyonari, Takaya Abe, Hiroyuki Sakagami, Motoko Ohnishi Shinri Tamura, Takayasu Kobayashi, 10th International Conference on Protein Phosphatase, Feb, 2013, Tokyo