

## 論文の内容の要旨

論文題目 **The spatial regulation of Ca<sup>2+</sup> signaling in astrocytes**

(アストロサイトにおける Ca<sup>2+</sup>シグナルの空間的制御機構)

氏名 有菌美沙

### [序文]

脳は主にニューロンとグリア細胞で構成されている。グリア細胞の一種であるアストロサイトは、細胞体とそれをとりまく複数の突起からなる星型の形態に特徴づけられ、長い間イオン環境の維持や神経細胞への栄養分の補給といった、脳のホメオスタシスのみを担う消極的な細胞として認識されてきた。しかし Ca<sup>2+</sup>イメージング技術の開発によってアストロサイトの活発な Ca<sup>2+</sup>シグナルが可視化されたことを機に、神経活動の制御、局所脳血流の調節といったアストロサイトの積極的な脳機能への関与が次々と明らかにされている。

アストロサイトは複数の突起を通して十萬個以上ものシナプスと同時に血管と接しているため、一つの細胞でも大きな影響力をもちうる。アストロサイトによる神経細胞、血管細胞の積極的な制御は、主にアストロサイトの代謝型グルタミン酸受容体 (mGluR) 活性化による細胞内 Ca<sup>2+</sup>上昇が介している。したがってアストロサイトの他の細胞への影響力は、mGluR が引き起こす Ca<sup>2+</sup>シグナルの波及する範囲に依存すると考えられる。突起における局所的な Ca<sup>2+</sup>シグナルはその突起の周辺のみを制御する一方、細胞体も含む全体的な Ca<sup>2+</sup>シグナルは複数の突起の周辺細胞に影響し、それらの活動を同期してしまう可能性がある。アルツハイマー病やてんかんのモデルマウスの大脳皮質では時空間的に異常な Ca<sup>2+</sup>シグナルが報告されており、健常な脳機能にはアストロサイトの mGluR 依存的 Ca<sup>2+</sup>シグナルの精確な空間的制御が必要であることが示唆される。しかしながらアストロサイトの Ca<sup>2+</sup>シグナルは、主に細胞体の Ca<sup>2+</sup>シグナルしか検出できない Ca<sup>2+</sup>指示薬を用いて研究されており、突起を含むアストロサイト細胞内での詳細な Ca<sup>2+</sup>シグナルについてはほとんど知られていない。そこで本研究においては、mGluR 依存的 Ca<sup>2+</sup>シグナルを空間的精度のよい Ca<sup>2+</sup>イメージング法を用いて可視化し、その空間的制御機構を解明することを目的とした。

## **[結果]**

### **1. 蛋白質性 Ca<sup>2+</sup>センサーはアストロサイトの詳細な Ca<sup>2+</sup>シグナルを検出できる**

単一細胞における詳細な Ca<sup>2+</sup>シグナルを観察するために、ラットの海馬の神経細胞と共培養した突起を保持するアストロサイト (DIV 7~13) に蛋白質性 Ca<sup>2+</sup>センサーGCaMP2 を発現させた。このアストロサイトを用いて自発的 Ca<sup>2+</sup>動態を観察したところ、突起の Ca<sup>2+</sup>シグナルにいたるまで詳細に可視化され、この Ca<sup>2+</sup>シグナルパターンが脳スライスで報告されているものと同じ性質をもっていることが分かった。

### **2. mGluR 依存的 Ca<sup>2+</sup>シグナルはアストロサイトの突起から開始される**

上記の Ca<sup>2+</sup>イメージングの系を用いて mGluR 刺激に対するアストロサイトの反応の空間的性質を調べた。mGluR アゴニスト (DHPG) で GCaMP2 を発現させたアストロサイトの細胞全体を同時に刺激したところ、ほぼ全ての細胞で突起から Ca<sup>2+</sup>上昇が始まった。蛋白質性 Ca<sup>2+</sup>センサーGCaMP3 を gene gun で導入したラットの脳スライスのアストロサイトにおいても、ほとんどの細胞で DHPG 刺激に伴い突起から Ca<sup>2+</sup>上昇がみられた。これらの実験によって突起が mGluR 依存的 Ca<sup>2+</sup>シグナルの開始点であることが明らかになった。

### **3. アストロサイトの突起では mGluR5 の密度が高い**

次にアストロサイトの mGluR 依存的 Ca<sup>2+</sup>シグナルの開始点を突起に限局している要因を同定することを試みた。まず Ca<sup>2+</sup>貯蔵庫である小胞体と、小胞体膜上の Ca<sup>2+</sup>チャネルである IP<sub>3</sub> 受容体の分布を免疫染色法により調べたところ、両者とも細胞に一樣に分布していた。また caged IP<sub>3</sub> を用いて Ca<sup>2+</sup>放出を促したところ、Ca<sup>2+</sup>放出能力は細胞体でも突起でも同様に備わっていることが分かった。一方で Ca<sup>2+</sup>放出を引き起こす引き金になる細胞膜上の mGluR5 の分布を調べたところ、突起に有意に高い密度で分布していることが明らかになった。以上により、mGluR5 が突起に偏在することによって、突起が mGluR 依存的 Ca<sup>2+</sup>シグナルの開始点となっている可能性が示唆された。

### **4. mGluR5 の突起-細胞体間の移動は阻止されている**

流動モザイクモデルによれば、細胞膜上の分子は側方拡散によって移動することができる。これに対して細胞によっては分子の局在を維持させるために拡散障壁を築いているものがある。そこで私はアストロサイトにおける mGluR5 の偏在維持に mGluR5 の拡散制御が関わっているかを検討した。mGluR5 の側方拡散運動を可視化するために、内在性の mGluR5 をその細胞外ドメインを認識する抗体を介して、量子ドット (QD) という半導体からなるナノ結晶で標識した (mGluR5-QD)。量子ドットは従来の有機色素よりも明るく光安定性が高いという利点から長時間

一分子の動態を追うのに非常に有用である。13 Hz で取得した内在性の mGluR5-QD の動態を解析したところ、突起の mGluR5-QD は細胞体の mGluR5-QD に比べて拡散係数が大きく、自由拡散している分子の割合が大きいことが明らかになった。次に長時間（10 分間）mGluR5-QD の拡散を観察したところ、mGluR5-QD は突起—細胞体間の移動が一切できないことが明らかとなった。この結果から突起—細胞体の境界に mGluR5-QD の移動を阻止している障壁が存在することが示唆された。続いて他の分子も同様の動態を示すかを調べた。その結果、検証した mGluR5 以外の分子（リン脂質である DOPE、アストロサイトに発現している ATP 受容体である P2X7 受容体）は突起と細胞体における動態に差はなく、突起—細胞体間も移動することができた。これらの結果から、mGluR5 の動きを突起—細胞体間を阻止している障壁は mGluR5 選択的に作用することが明らかになった（mGluR5 選択的障壁）。

#### **5. mGluR5 またはその細胞内 C 末端の過剰発現は、mGluR5 の偏在の消散と細胞全体で開始する mGluR 依存的 Ca<sup>2+</sup>シグナルを引き起こす**

mGluR5 が mGluR5 選択的拡散障壁を乗り越えられる条件を探索したところ、mGluR5 を過剰発現したアストロサイトにおいては突起と細胞体における mGluR5-QD の動態の差が消失し、mGluR5-QD が突起—細胞体間を移動できることが明らかになった。また、複数の分子との相互作用部位であると報告されている mGluR5 の細胞内 C 末端領域を過剰発現した場合も mGluR5 の全長を発現した場合と同様に、mGluR5-QD が細胞区画間を移動できることが分かった。これらの結果から mGluR5 選択的拡散障壁の機能発現には mGluR5 の細胞内 C 末端における他の分子との相互作用が必要であることが示唆された。さらに mGluR5 またはその C 端を過剰発現した細胞において mGluR5 の分布を調べたところ、突起への mGluR5 の偏在が消失していた。これらの細胞の mGluR 刺激に対する反応性を観察したところ、突起と細胞体で同時に Ca<sup>2+</sup>上昇が起こる細胞の割合が飛躍的に増えた。mGluR5 が突起—細胞体間を移動できる細胞においては mGluR5 の偏在が消失し、mGluR 依存的 Ca<sup>2+</sup>シグナルの開始点が突起に限局しなくなるということが明らかになった。mGluR5 選択的拡散障壁は突起への mGluR5 の偏在を介して mGluR 依存的 Ca<sup>2+</sup>シグナルの開始点を突起に限定していることが示唆された。

#### **[考察]**

本研究によりアストロサイトは、mGluR5 選択的拡散障壁をもうけることで入力に突起に限局していない場合でも mGluR 依存的 Ca<sup>2+</sup>シグナルを突起から開始する性質があることが示唆された。突起における mGluR 依存的 Ca<sup>2+</sup>シグナルの生じやすさはアストロサイトと神経細胞または血管細胞との情報伝達効率を高め、細胞体における Ca<sup>2+</sup>シグナルの生じにくさは突起から突起への細胞内の異常な Ca<sup>2+</sup>シグナルの伝播を妨げていると考えられる。また、アストロサイトの活動

を時空間的に正確に評価するためには、アストロサイトの突起の  $\text{Ca}^{2+}$  シグナルを検出できる系を用いることが非常に重要であることが分かった。

mGluR5 を過剰発現したアストロサイトにおいて mGluR5 は突起-細胞体間を移動でき、突起における mGluR5 の偏在と突起特異的な mGluR 依存的  $\text{Ca}^{2+}$  シグナルを開始する性質が失われることが示された。これらの結果は、実際にアストロサイトにおいて mGluR5 の過剰発現がみられるてんかんやアルツハイマーなどの実験モデルで観察される異常な  $\text{Ca}^{2+}$  シグナルパターンもまた、mGluR5 選択的拡散障壁の機能不全を介している可能性を示唆している。今後 mGluR5 選択的拡散障壁の構成要素を同定し、拡散障壁の欠損した個体の表現型を解析することで、アストロサイトの  $\text{Ca}^{2+}$  シグナルの空間的制御の *in vivo* における生理的意義が明らかになることが期待される。