

審査の結果の要旨

氏名 有菌 美沙

本研究は神経細胞、血管細胞の積極的な制御を主に担うアストロサイトの代謝型グルタミン酸受容体 (mGluR) 依存的  $\text{Ca}^{2+}$ シグナルの空間的制御機構の解明を試みたものであり、以下の結果を得ている。

1. 単一細胞における詳細な  $\text{Ca}^{2+}$ 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アストロサイト (DIV 7~13) に蛋白質性  $\text{Ca}^{2+}$ センサーGCaMP2 を発現させたところ、先行研究では検出が困難であった突起の  $\text{Ca}^{2+}$ シグナルにいたるまで検出できた。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  $\text{Ca}^{2+}$ 上昇が突起から始まった。蛋白質性  $\text{Ca}^{2+}$ 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  $\text{Ca}^{2+}$ 上昇がみられた。これらの実験によってアストロサイトの突起が mGluR 依存的  $\text{Ca}^{2+}$ シグナルの開始点であることが明らかになった。

2.  $\text{Ca}^{2+}$ 貯蔵庫である小胞体と、小胞体膜上の  $\text{Ca}^{2+}$ チャネルである  $\text{IP}_3$  受容体の分布を免疫染色法により調べたところ、両者とも細胞に一様に分布していた。また caged  $\text{IP}_3$  を用いて  $\text{Ca}^{2+}$ 放出を促したところ、 $\text{Ca}^{2+}$ 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  $\text{Ca}^{2+}$ 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 がアストロサイトの突起に偏在することによって、突起が mGluR 依存的  $\text{Ca}^{2+}$ シグナルの開始点となっている可能性が示唆された。

3. 量子ドット (QD) で標識した内在性の mGluR5 (mGluR5-QD) の動態を調べたところ、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 10 分間 mGluR5-QD の拡散運動を観察したところ、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 mGluR5 以外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 選択的拡散障壁)。

4. 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、複数の分子と相互作用することが知られている 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。mGluR5 またはその C 端を過剰発現した細胞においては、突起への mGluR5 の偏在が消失していた。さらに、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  $\text{Ca}^{2+}$  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  $\text{Ca}^{2+}$  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。アストロサイトにおける 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  $\text{Ca}^{2+}$  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。

以上、本論文ではアストロサイトの機能に重要な mGluR 依存的な  $\text{Ca}^{2+}$  シグナルの開始点が突起にあることを明らかにし、この性質は mGluR5 選択的拡散障壁による mGluR5 の突起への偏在によって維持されているという示唆を得た。本研究はこれまで全く未知に等しかったアストロサイトの  $\text{Ca}^{2+}$  シグナルの空間的制御機構解明に重要な貢献をなすと考えられ、学位の授与に値するものと考えられる。