

学 位 論 文 題 名

発達脊髄および小脳における
グルタミン酸トランスポーターの発現と
局在に関する分子細胞化学的解析

学位論文内容の要旨

はじめに

グルタミン酸は、成熟中枢神経系における主要な興奮性神経伝達物質である。神経終末から放出されたグルタミン酸はシナプス後膜上のグルタミン酸受容体を活性化し、シナプス伝達が行われる。また、幼若な中枢神経系においては、受容体の活性化を介してニューロンの生存や移動・神経突起伸展を促す生理作用を有する。しかし、シナプス形成以前の供給や濃度の調節機構は不明である。グルタミン酸トランスポーターは、シナプス間隙に放出されたグルタミン酸を除去する分子であり、シナプス伝達の調節やグルタミン酸による興奮毒性からニューロンを保護する機構として重要な機能を果たしている。また、グルタミン酸濃度やイオン環境に応じて逆輸送する機能も有する。これまでの研究から、成熟中枢神経系において4種のグルタミン酸トランスポーターが単離され、その細胞発現が明かにされている。さらに、これらの mRNA は、シナプス伝達の成立する以前の幼若段階より中枢神経系に発現することが報告されている。これらの事実から、幼若段階に発現しているグルタミン酸トランスポーターが、神経系の発達や分化になんらかの機能を果たしている可能性を想定した。本研究では、この仮説の妥当性を検討する第一段階として、中枢神経系の発達におけるグルタミン酸トランスポーターの機能を探索する目的で、マウス発達神経系における発現と局在を細胞組織化学的に検討した。解析は、構造の発達変化が最もよく知られている脊髄と小脳を材料とし、3種のグルタミン酸トランスポーター (GLAST, GLT-1, EAAT4) について行った。

方法

動物・組織切片作製：胎生9日齢 (E9) から生後120日齢 (P120) の C57/BL6J 系マウスを用い、深麻酔下にて脳および脊髄を摘出した。一部の組織は固定後に摘出した。これらの組織より凍結切片、パラフィン切片およびマイクロスライサー切片を作製した。また、一部の組織はエポン包埋を行い、超薄切片を作製した。

抗体の作製：合成ペプチドでウサギおよびモルモットを免疫し、抗血清から GLAST、GLT-1 および EAAT4 を特異的に認識するポリクローナル抗体を精製した。

イムノブロット法：成熟脳より膜画分を調製し、電気泳動後分離した蛋白をニトロセルロース膜に転写した。さらに作製抗体を用いて免疫反応を行い、抗体の特性を検定した。
免疫組織化学法：作製抗体および種々の細胞マーカー抗体を用いて酵素抗体法／蛍光抗体法／免疫電顕法を行い、トランスポーター発現細胞の形態と細胞種を特定した。
in situ ハイブリダイゼーション法： ^{35}S 標識アンチセンスプローブおよびジゴキシゲニン標識 cRNA プローブを作製して in situ ハイブリダイゼーションを行い、転写レベルでトランスポーター発現細胞の位置とその移動を解析した。
電子顕微鏡法：E13 脊髄と P10 小脳の超薄切片を用いて、超微構造を観察した。

結果

1. 発達脊髄における GLAST

GLAST mRNA 発現細胞は E11 より脳室層に出現し、E15 には外套層にも広がった。生後転写レベルは低下し、中心管周囲と後角に限局化した。E13 の発現細胞は、脳室層に細胞体を有し、放射状突起を軟膜に伸展する放射状グリアであった。E15 より形態変化が始まり、とくに神経層構造の境界となる脊髄辺縁層／外套層の間には、GLAST 陽性の放射状突起から派出した側方突起が区画帯を形成していた。P7 には、発現細胞は GFAP 陽性の突起をもつアストロサイトに分化していた。

2. 発達小脳における GLAST

発現細胞は E13 より脳室層に出現したが、E15 には外套層にも広がり、生後にかけてプルキンエ細胞層に移動した。発現細胞は E15 には放射状グリアの特性を示したが、生後小脳皮質ではプルキンエ細胞に付随する特殊なアストロサイト（バークマングリア）であった。GLAST 陽性のグリア線維は、生後第 2 週に放射状から網状へと分子層深層から表層に漸進的な形態変化を示した。分子層表層ではプルキンエ細胞樹状突起の先端はバークマングリアの放射状突起に接しながら伸展し、深層ではプルキンエ細胞シナプスは網状化したグリア線維に被覆されていた。

3. 発達脊髄における GLT-1

GLT-1 mRNA は、E11 から成熟期に至るまで外套層に発現していた。GLT-1 蛋白は、胎児期には辺縁層に認められ、ニューロンの成長軸索細胞膜に局在していた。E15 以降には外套層（灰白質）にも分布し始め、P7 以降には白質から消失した。P14 には、シナプスを取り囲むアストロサイトの突起に局在していた。

4. 発達小脳における EAAT4

EAAT4 mRNA は E13 より成熟期に至るまで小脳プルキンエ細胞特異的に発現していた。EAAT4 蛋白は、E18 から P7 には尾側プルキンエ細胞に限局していたが、P14 以降には頭側にも広がった。P7 まではプルキンエ細胞の細胞体や樹状突起幹に広く分布したが、P14 以降には棘突起に局在が集中した。

考察とまとめ

1. GLAST は、放射状グリア-アストロサイトの細胞系譜に特異的な分子であり、ニューロン移動の時期に一致して放射状グリアに発現を開始することを示した。

2. GLAST を細胞マーカーとしてこの細胞系譜の形態分化を追究した結果、放射状グリアの形態学的特徴とアストロサイトへの形態変化を可視化できた。とくに、小脳においては、プルキンエ細胞の樹状突起伸展やシナプス形成と連動してバグマングリアの形態変化が進行し、両者は密接な構造的関係を有することが明かとなった。

3. GLT-1 は、胎児期にはニューロンに発現し成長軸索の細胞膜に局在したが、生後にはニューロンでの発現は停止し、アストロサイトへとスイッチすることが明かとなった。

4. EAAT4 は、プルキンエ細胞特異的なグルタミン酸トランスポーターであり、この特性は E13 より観察された。発達段階ではプルキンエ細胞の細胞体や樹状突起幹に広く分布したが、シナプス形成が活発化すると棘突起局在が確立することが示された。

5. 以上の結果より、グルタミン酸トランスポーターは、シナプス形成以前の段階よりそれぞれ特定の細胞種に発現し、特定の部位に局在していることが明かとなった。発達段階に発現するグルタミン酸トランスポーターは、グルタミン酸の輸送や供給を介して神経系の分化や発達に関与している可能性が考えられる。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 井 上 芳 郎
副 査 教 授 田 代 邦 雄
副 査 教 授 渡 辺 雅 彦

学 位 論 文 題 名

発達脊髄および小脳における グルタミン酸トランスポーターの発現と 局在に関する分子細胞化学的解析

マウス脊髄および小脳の発達段階におけるグルタミン酸トランスポーターの発現と局在を細胞組織化学的に検討し、中枢神経系における本機能分子の機能を解析した。3種のトランスポーター (GLAST, GLT-1, EAAT4) について、mRNA の発現を *in situ* ハイブリダイゼーション法で、発現細胞種とその形態を自家作製した抗体とニューロンやグリア細胞のマーカー抗体を用いて免疫組織化学法で解析した。発達脊髄においては、GLAST mRNA 発現細胞は E11 より脳室層に出現し、E15 には外套層にも広がった。生後転写レベルは低下し、中心管周囲と後角に限局化した。E13 の発現細胞は、放射状グリアであった。E15 より形態変化が始まり、とくに神経層構造の境界となる脊髄辺縁層／外套層の間には、GLAST 陽性の放射状突起から派出した側方突起が区画帯を形成していた。P7 には、GLAST 発現細胞は GFAP 陽性のアストロサイトに分化していた。発達小脳においては、GLAST 発現細胞は E13 より脳室層に出現し、E15 には外套層にも広がり、生後にかけてプルキンエ細胞層に移動した。E15 には放射状グリアの特性を示したが、生後小脳皮質ではプルキンエ細胞に付随する特殊なアストロサイト (バークマングリア) であった。GLAST 陽性のグリア線維は、生後第 2 週に放射状から網状へと分子層深層から表層に漸進的な形態変化を示した。P10 の分子層表層ではプルキンエ細胞樹状突起の先端はバークマングリアの放射状突起に接しながら伸展し、深層ではプルキンエ細胞シナプスは網状化したグリア線維に被覆されていた。一方 GLT-1 mRNA は、発達脊髄において E11 から成熟期に至るまで外套層に発現していた。GLT-1 蛋白は、胎児期には辺縁層に認められ、ニューロンの成長軸索細胞膜に局在していた。E15 以降には外套層 (灰白質) にも分布し始め、P7 以降には白質から消失し、P14 にはシナプスを取り囲むアストロサイトの突起に局在していた。EAAT4 mRNA は E13 より成熟期に至るまで小脳プルキンエ細胞特異的に発現していた。EAAT4 蛋白は、P7 まではプルキンエ細胞の細胞体や樹状突起幹

に広く分布したが、P14以降には棘突起に局在が集中した。以上の解析結果から、GLASTは放射状グリア-アストロサイトの細胞系譜に特異的な分子であり、ニューロン移動の時期に一致して放射状グリアに発現を開始することを示した。また、GLASTを用いてこの細胞系譜の形態分化を追究した結果、放射状グリアの形態学的特徴とアストロサイトへの形態変化を可視化できた。とくに小脳においては、プルキンエ細胞の樹状突起伸展やシナプス形成と連動してバグマングリアの形態変化が進行し、両者は密接な構造的関係を有することが明かとなった。一方、GLT-1は、胎児期にはニューロンに発現し成長軸索の細胞膜に局在したが、生後にはニューロンでの発現は停止し、アストロサイトへとスイッチすることが明かとなった。さらに、EAAT4はプルキンエ細胞特異的なトランスポーターであり、シナプス形成が活発化すると棘突起における局在が確立することを示した。これらのトランスポーターはシナプス形成以前の段階より、それぞれ特定のグリアとニューロンに発現し、発育の段階によって局在部位や発現量に変化が見られることを明かにし、グルタミン酸トランスポーターがグルタミン酸の輸送や供給を介して神経系の分化や発達に関与していることを示した。

公開発表において、副査の田代教授より、GLT-1のスイッチについて、GLT-1遺伝子欠損マウスの異常肢位について、およびEAAC1に関する研究の状況について、副査の渡辺教授より、細胞マーカーとしてのグルタミン酸トランスポーター分子の意義、発達段階におけるトランスポーター分子の役割に関して、主査の井上教授より、成熟期におけるGLAST発現制御について、グルタミン酸トランスポーター分子の輸送以外の機能について、さらに、フロアから胎児期のGLT-1の機能について、発達小脳におけるGLT-1解析の意義についての質問があった。いずれの質問に対しても、申請者は自らの所見と参考文献を引用し、明快に解答した。

審査員一同は、本論文が、グルタミン酸トランスポーターの発現過程を組織化学的手法で詳細に探索し、公表した8編の英文論文をまとめた学位申請論文であることを高く評価し、大学院課程における研鑽や取得単位なども併せ、申請者が博士（医学）の学位を受けるのに十分な資格を有するものと判定した。