

学 位 論 文 題 名

Functions of the two glutamate transporters
GLAST and GLT-1 in the retina

(網膜におけるグルタミン酸トランスポーター
GLAST および GLT-1 の機能)

学位論文内容の要旨

目的

グルタミン酸は中枢神経系の興奮性伝達の大部分を担う、重要な神経伝達物質である。また学習・記憶など高次機能を支える分子として、シナプス可塑性などにも密接に関与すると考えられている。一方、過剰濃度のグルタミン酸には神経毒性があり、虚血時などの病的状態における急激なグルタミン酸濃度上昇は、不可逆的な神経細胞死を引き起こす。しかしグルタミン酸作動性シナプスにおいてはグルタミン酸を酵素的に不活化する機構が備わっていないため、①シナプス伝達を終結させる、②神経細胞をグルタミン酸興奮毒性から保護する、という2つの目的から、放出されたグルタミン酸を除去し、細胞外のグルタミン酸濃度をコントロールする機構が必要になる。近年、このグルタミン酸濃度を調節する機構としてグルタミン酸トランスポーターが注目を集めている。申請者らは、網膜におけるグルタミン酸トランスポーターの機能について、遺伝子欠失マウスを用いて検討した。

実験結果と考察

I. 網膜におけるグルタミン酸トランスポーターの種類と発現

これまでにヒト、マウスなどで、5種類のグルタミン酸トランスポーターが同定され、GLAST (EAAT1, GluT-1), GLT-1 (EAAT2), EAAC1 (EAAT3), EAAT4, EAAT5 と名づけられ、その分子構造も明らかにされている。グルタミン酸の取り込みはいずれのグルタミン酸トランスポーターにおいてもナトリウム依存性で、細胞内のグルタミン酸濃度を1万倍以上に濃縮することで、細胞外のグルタミン酸濃度を1 μ M以下に保つことができる。神経細胞における各グルタミン酸トランスポーターの発現には特徴がある。脳内ではGLAST・GLT-1はグリア細胞に、EAAC1・EAAT4は神経細胞に選択的に発現することから、それぞれグリア型、神経細胞型とよばれる。神経細胞型に比べて、グリア型は総じて発現レベルが高い。中でも大脳皮質・海馬など、脳内に広く発現するGLT-1の遺伝子欠損マウスでは、てんかん・海馬の神経細胞脱落・脳細胞防護力の低下という、強いグルタミン酸興奮毒性の所見が認められた。申請者らの研究では網膜のグリア細胞（主にミュラー細胞）に強く発現するのはGLASTのみであり、GLT-1は視細胞・双極細胞に発

現する神経細胞型の1つと考えられた。

II. 網膜のシナプス伝達とグルタミン酸トランスポーター

一般的な脳のグルタミン酸作動性シナプスにおいては、刺激に応じてグルタミン酸が放出される。しかし網膜の視細胞と双極細胞間のシナプスでは、暗黒下で常に視細胞の側からグルタミン酸が放出され続けており、光刺激によって逆にその放出が停止する。視覚情報伝達においてはグルタミン酸濃度の適切なコントロールが常に要求されており、グルタミン酸トランスポーターの網膜のシナプス伝達における役割は、他の組織よりも一層重要であると考えられる。

申請者らがGLT-1およびGLASTの遺伝子欠失マウスを用いて網膜電位の解析を行ったところ、GLAST欠損マウスでは律動様小波とb波の減弱がみられたが、GLT-1欠損マウスでは正常であった。これらの結果は、視細胞と双極細胞間にある余剰なグルタミン酸を取り込み、シナプス間隙のグルタミン酸濃度を調節する主要な分子がGLASTであることを示唆している。したがってGLAST欠損マウスでは光刺激後もシナプス間隙のグルタミン酸濃度が高すぎ、視細胞以降の網膜電位が減弱したものと推定された。

III. 網膜虚血とグルタミン酸トランスポーター

網膜に虚血を負荷すると一定の潜時をおいて網膜内層の神経細胞死が出現し、網膜内層のひ薄化が観察されることが知られている。この神経細胞死は一過性の細胞外グルタミン酸濃度上昇に伴う（主にNMDA型グルタミン酸受容体を介した）グルタミン酸の興奮毒性によるものと考えられている。

GLT-1およびGLASTの遺伝子欠失マウスの網膜を用いて同様の虚血負荷実験を行ったところ、GLT-1欠損マウスでは正常マウスの約2倍、GLAST欠損マウスでは正常マウスの約3倍におよぶ網膜内層のひ薄化（網膜神経細胞死）が観察された。したがってGLASTおよびGLT-1欠損マウスの網膜では、虚血負荷後にみられる細胞外グルタミン酸濃度の上昇を抑制することができず、より強いグルタミン酸興奮毒性が発現してしまったものと推定された。

一般に脳虚血や低酸素状態においては、グルタミン酸トランスポーターがグルタミン酸能動輸送のための推進力を失って停止または逆流し、細胞外グルタミン酸濃度を上昇させてしまうという仮説がある。各遺伝子欠失マウスにおいて他のグルタミン酸トランスポーターの代償作用は否定できないものの、前述の実験結果からは、網膜のグルタミン酸トランスポーターが虚血状態でも細胞保護的に働いている可能性が示唆された。

結論

遺伝子欠失マウスを用いた今回の研究から、①網膜におけるグリア型グルタミン酸トランスポーターはGLASTのみであること、②GLASTが網膜のシナプス伝達を適正化していること、③GLASTおよびGLT-1が網膜虚血時にみられる神経細胞死の抑制に重要なはたらきをもつこと、の3点が明らかとなった。グルタミン酸トランスポーターの機能を眼疾患に応用する場合の手法や効果に関する研究が今後必要と思われる。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 松 田 英 彦

副 査 教 授 西 信 三

副 査 教 授 渡 辺 雅 彦

学 位 論 文 題 名

Functions of the two glutamate transporters GLAST and GLT-1 in the retina

(網膜におけるグルタミン酸トランスポーター
GLAST および GLT-1 の機能)

グルタミン酸は中枢神経系の興奮性伝達の大部分を担う、重要な神経伝達物質である。一方、過剰濃度のグルタミン酸には神経毒性があり、虚血時などの病的状態における急激なグルタミン酸濃度上昇は、不可逆的な神経細胞死を引き起こす。しかしグルタミン酸作動性シナプスにおいてはグルタミン酸を酵素的に不活化する機構が備わっていないため、①シナプス伝達を終結させる、②神経細胞をグルタミン酸興奮毒性から保護する、という2つの目的から、放出されたグルタミン酸を除去し、細胞外のグルタミン酸濃度をコントロールする機構が必要になる。近年、このグルタミン酸濃度を調節する機構としてグルタミン酸トランスポーターが注目を集めている。これまでにヒト、マウスなどで、4種類のグルタミン酸トランスポーターが同定され、GLAST、GLT-1、EAAC1、EAAT4と名づけられている。脳内ではGLAST・GLT-1はグリア細胞に、EAAC1・EAAT4は神経細胞に選択的に発現することから、それぞれグリア型、神経細胞型とよばれる。しかし申請者らによる免疫組織化学的検討により、網膜のグリア細胞（主にミュラー細胞）に強く発現するのはGLASTのみであり、GLT-1は視細胞・双極細胞に発現する神経細胞型であることが明らかとなった。次に申請者らがGLT-1およびGLASTの遺伝子欠失マウスを用いて網膜電位の解析を行ったところ、GLAST欠損マウスでは律動様小波とb波の減弱がみられたが、GLT-1欠損マウスでは正常であった。この結果は、視細胞と双極細胞間にある余剰なグルタミン酸を取り込み、シナプス間隙のグルタミン酸濃度を調節する主要な分子がGLASTであることを示唆している。したがってGLAST欠損マウスでは光刺激後もシナプス間隙のグルタミン酸濃度が高すぎ、視細胞以降の網膜電位が減弱したものと推定された。更にGLT-1およびGLASTの遺伝子欠失マウス網膜を用いた虚血負荷実験では、GLT-1欠損マウスで正常マウスの約2倍、GLAST欠損マウスで正常マウスの約3倍におよぶ網膜内層のひ薄化（網膜神経細胞死）が観察された。したがってGLASTおよびGLT-1欠損マウスの網膜では、虚血負荷後にみられる細胞外グルタミン酸濃度の上昇を抑制することができず、より強いグルタミン酸興奮毒性が発現してし

まったものと推定された。遺伝子欠失マウスを用いた今回の研究から、①網膜におけるグリア型グルタミン酸トランスポーターは GLAST のみであること、②GLAST が網膜のシナプス伝達を適正化していること、③GLAST および GLT-1 が網膜虚血時にみられる神経細胞死の抑制に重要なはたらきをもつこと、の3点が明らかとなった。

学位論文の公開発表に際し、副査の渡辺雅彦教授から、ミューラー細胞内での GLAST の染色性に濃淡がある理由、グルタミン合成酵素の機能、更にグルタミン酸トランスポーターの逆作動の影響についての質問があった。申請者は、虚血状態ではグルタミン酸トランスポーターが停止または逆流し、細胞外グルタミン酸濃度を上昇させてしまうという仮説があるものの、網膜のグルタミン酸トランスポーターは虚血状態でも神経細胞保護的に働いている可能性について述べた。副査の西信三教授からは、神経型グルタミン酸トランスポーター（EAAC1, EAAT4）の解析状況について質問があった。申請者は、本研究はグリア型グルタミン酸トランスポーター（GLAST, GLT-1）の高いグルタミン酸の取り込み能力に注目したこと、また他の遺伝子欠損マウスはまだ発表されていない旨を説明した。主査の松田英彦教授からは、網膜神経細胞死、特に神経節細胞死と網膜電位との関わりについて質問があった。申請者は、マウスでは神経節細胞の活動を反映するパターン刺激網膜電位を測定するのは困難だが、測定すれば比較的早い時期から電位が減弱する可能性について述べた。申請者はいずれの質問に対しても自己の研究結果ならびに文献による最新の知見をもとに適切な回答を行った。

この論文は、網膜における生理的および病理的状态下でのグルタミン酸トランスポーターの機能を解明した点で高く評価され、今後の網膜虚血性疾患への応用も期待される。

審査員一同は、これらの成果を高く評価し、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。