

学位論文題名

Preferential Expression of Neutral Amino Acid Transporter
ASCT1 in Glial Cells and Developing Capillaries
of the Mouse Brain

(マウス脳内グリア細胞及び発達期血管系における
中性アミノ酸トランスポーター ASCT1 の優先的発現)

学位論文内容の要旨

L-セリンは、生体が合成可能な非必須アミノ酸の1つであるが、最近、培養ニューロンに対して顕著な神経栄養効果を示す生理活性物質であることが明らかになった。L-セリンの合成酵素である3-ホスフォグリセリン酸脱水素酵素(3PGDH)の細胞発現解析から、成熟脳では星状膠細胞や嗅神経被覆グリアが、発達脳では神経上皮細胞と放射状グリアがこの合成酵素を選択的に発現し、ニューロンには発現していないことが判明した。従って、ニューロンは、これらグリア細胞が産生したL-セリンの供給を受けるか、もしくは循環系からの供給に依存せざるを得ないことになる。

本研究では、脳におけるL-セリンの細胞輸送機構を探る目的で、L-セリン輸送能を持つ中性アミノ酸トランスポーターASCT1に着目し、マウス脳における発現細胞を同定した。まず、マウスの成熟脳でのASCT1の発現細胞を調べ、次いで、発達過程でのASCT1の発現についても調べた。最後にASCT1の発現細胞と脳内でのL-セリンの分布状況を比較検討した。

成熟脳でのASCT1の発現については従来全く調べられていなかった。発現細胞を特定する目的で、*in situ* hybridization法による遺伝子発現、及び、マウスASCT1の抗体の作製とこれを用いた免疫組織化学法による解析を行った。その結果、タンパク質レベルでASCT1は星状膠細胞と嗅神経被覆グリアに強く発現し3PGDHと共陽性であった。ニューロンでのASCT1の発現はmRNA及びタンパク質レベルにおいて陰性もしくは弱陽性で、血管内皮細胞は陰性であった。これらの結果から、成熟脳でのASCT1は主にセリン合成能を有するグリア細胞にほぼ選択的に発現し、その細胞膜輸送に関与していることが示唆された。

次に、発達期の脳での ASCT1 の発現について発現解析を行った。その結果、胎仔期でも 3PGDH を発現する神経上皮細胞と放射状グリアに ASCT1 が mRNA 及びタンパク質レベルで発現していた。ASCT1 の強い発現は胎仔期の血管内皮細胞の細胞膜にも観察されたが、内皮細胞自体は 3PGDH 陰性であった。その後の生後発達に伴い、放射状グリアでの ASCT1 の発現は星状膠細胞へと引き継がれ、神経上皮細胞に由来するニューロンでは発現レベルが低下し、血管内皮細胞での発現も消失した。これらの結果から、発達期の脳では、神経上皮細胞及び放射状グリアが L-セリン合成及び輸送機能を有し、また血管内皮細胞も L-セリンの輸送能を有していることを示唆する。

ASCT1 は基質となるアラニン、セリン、システイン、スレオニンの交換輸送に関与するトランスポーターである。従って、ASCT1 が L-セリンの細胞外放出に関わるかそれとも細胞内取込みに関わるかは、それを発現する細胞内の L-セリン濃度に依存する。そこで、今回同定した ASCT1 発現細胞における L-セリンの多寡を調べる目的で L-セリンを特異的に認識する抗体を作製し、その分布状況を調べた。その結果、成熟脳では、ASCT1 および 3PGDH が発現している星状膠細胞と嗅神経被覆グリアに高いレベル分布していることが確認できた。この結果は、ASCT1 がグリア細胞で合成されたセリンの細胞外放出に関与していることを示唆する。

以上に述べた一連の研究により、神経上皮細胞、放射状グリア、星状膠細胞、嗅神経被覆グリアは L-セリン合成能だけでなく L-セリン輸送能も有しており、これらの細胞が周囲の細胞に対する L-セリンの供給源となっていることが強く示唆された。また、胎仔期の血管における ASCT1 の強い一過性発現は、循環系からの L-セリンの脳内取込みを示唆し、この分子が脳の発達分化にとって重要な役割を果たしている可能性を示している。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 小 池 達 郎

副 査 教 授 浦 野 明 央

副 査 教 授 渡 邊 雅 彦

学 位 論 文 題 名

Preferential Expression of Neutral Amino Acid Transporter ASCT1 in Glial Cells and Developing Capillaries of the Mouse Brain

(マウス脳内グリア細胞及び発達期血管系における
中性アミノ酸トランスポーター ASCT1 の優先的発現)

L-セリンは、生体が合成可能な非必須アミノ酸の1つであるが、最近、培養ニューロンに対して顕著な神経栄養効果を示す生理活性物質であることが明らかになった。L-セリンの合成酵素である3-ホスフォグリセリン酸脱水素酵素(3PGDH)の細胞発現解析から、成熟脳では星状膠細胞や嗅神経被覆グリアが、発達脳では神経上皮細胞と放射状グリアがこの合成酵素を選択的に発現し、ニューロンには発現していないことが判明した。従って、ニューロンは、これらグリア細胞が産生したL-セリンの供給を受けていると考えられる。本論文では、この仮説を証明する為に *in situ* hybridization 法による遺伝子発現、免疫組織化学、電子顕微鏡観察を主とする一連の実験を初めて詳細に行った。まず、脳におけるL-セリンの細胞輸送機構を探る目的で、L-セリン輸送能を持つ中性アミノ酸トランスポーターASCT1に着目し、マウス脳における発現細胞を同定した。マウスの成熟脳でのASCT1の発現細胞を調べ、次いで、発達過程でのASCT1の発現についても調べた。最後にASCT1の発現細胞と脳内でのL-セリンの分布状況を比較検討した。

成熟脳でのASCT1の発現については従来全く未検討であったため、本論文では、*in situ* hybridization 法による遺伝子発現、及び、マウスASCT1の抗体の作製とこれを用いた免疫組織化学法により発現細胞を同定した。その結果、タンパク質レベルでASCT1は星状膠細胞と嗅神経被覆グリアに強く発現し3PGDHと共陽性であった。ニューロンでのASCT1の発現はmRNA及びタンパク質レベルにおいて陰性もしくは弱陽性で、血管内皮細胞は陰性であった。これらの結果から、成熟脳でのASCT1は主にセリン合成能を有するグリア細胞にほぼ選択的に発現し、その細胞膜輸送に関与していることが示唆された。

次に、本論文では発達期の脳での ASCT1 の発現について発現解析を行った。その結果、胎仔期でも 3PGDH を発現する神経上皮細胞と放射状グリアに ASCT1 が mRNA 及びタンパク質レベルで発現していた。ASCT1 の強い発現は胎仔期の血管内皮細胞の細胞膜にも観察されたが、内皮細胞自体は 3PGDH 陰性であった。その後の生後発達に伴い、放射状グリアでの ASCT1 の発現は星状膠細胞へと引き継がれ、神経上皮細胞に由来するニューロンでは発現レベルが低下し、血管内皮細胞での発現も消失した。これらの結果から、発達期の脳では、神経上皮細胞及び放射状グリアが L-セリン合成及び輸送機能を有し、また血管内皮細胞も L-セリンの輸送能を有していることを示唆した。

ASCT1 は基質となるアラニン、セリン、システイン、スレオニンの交換輸送に関与するトランスポーターである。従って、ASCT1 が L-セリンの細胞外放出に関わるかそれとも細胞内取込みに関わるかは、それを発現する細胞内の L-セリン濃度に依存する。そこで、本論文では L-セリンを特異的に認識する抗体を作製し、その分布状況を調べた。その結果、成熟脳では、ASCT1 および 3PGDH が発現している星状膠細胞と嗅神経被覆グリアに高いレベル分布していることが確認できた。この結果は、ASCT1 がグリア細胞で合成されたセリンの細胞外放出に関与していることを強く示唆するものとなった。

以上に述べた一連の研究により、本論文では、放射状グリア、星状膠細胞、嗅神経被覆グリアは L-セリン合成能及び L-セリン輸送能を有し、さらに L-セリンの高いレベル分布を示すことから、これらのグリア細胞が周囲の細胞に対する L-セリンの供給源となっている可能性を形態学的に明瞭に示した。また、胎仔期の血管における ASCT1 の強い一過性発現を発見し、循環系からの L-セリンの脳内取込みの重要性を示唆した。この分子が脳の発達分化にとって重要な役割を果たしている可能性があり、今後の新しい研究領域を開拓したと考えられる。

以上のように、本論文は、ニューロンはグリア細胞の産生する L-セリンの供給を受けているという仮説を *in situ* hybridization 法による遺伝子発現、免疫組織化学、電子顕微鏡観察などの手法を駆使して、初めて詳細に検討したもので、グリア供給仮説を支持するその成果は高く評価される。この研究成果の一部は既に、境 和久ら：「Neutral amino acid transporter ASCT1 is preferentially expressed in L-serine-synthetic/storing glial cells in the mouse brain with a transient expression in developing capillaries.」 *J. Neurosci.* Vol. 23, pp. 550-560 (2003) として、この分野における世界で最も権威ある学術雑誌に公表されている。よって、審査員一同、本論文が博士（理学）の学位授与に値するものと認定した。