

氏 名 李海雄 (Lee Hae Ung)

学位 (専攻分野) 博士 (理学)

学位記番号 総研大甲第 1263 号

学位授与の日付 平成 21 年 3 月 24 日

学位授与の要件 生命科学研究科 生理科学専攻
学位規則第 6 条第 1 項該当

学位論文題目 Physiological significance of ATP and glutamate release
from astrocytes

論文審査委員 主 査 教授 鍋倉 淳一
教授 池中 一裕
教授 富永 真琴
教授 小泉 修一 (山梨大学)

論文内容の要旨

Astrocytes, the major glial cell type in the CNS, have been considered to be passive bystanders that merely provide support to neuronal networks. However astrocyte is now recognized as one of the active elements that directly modulate brain functions. Astrocytes sense and integrate synaptic activity and, depending on intracellular Ca^{2+} levels, release gliotransmitters (e.g. glutamate, ATP and D-serine) that have feedback actions on neurons. Although these reports provided clues that astrocytes are the active components in the brain, they did not analyze the temporal and spatial pattern of gliotransmitters release from astrocytes. To examine the release of gliotransmitters, such as ATP and glutamate, he applied imaging techniques visualizing ATP and glutamate released from astrocytes.

Luciferin-luciferase solution was applied to the extracellular fluid of astrocytes to visualize ATP release. To visualize glutamate release, glutamate optic sensor (EOS) was applied. This specific probe for detecting glutamate is a hybrid molecule consisting of glutamate-binding protein (AMPA receptor GluR2 subunit extracellular domain as a glutamate-binding protein) and a small-molecule fluorescent dye. He successfully observed ATP or glutamate release from astrocytes and applied these technologies to observe spatial and temporal pattern of gliotransmitters release.

Many researchers found that the astrocytic intracellular calcium responses are co-related with the functions of astrocytes. To reveal the significance of intracellular calcium elevation of astrocytes on the gliotransmitter release, he tried to obtain the spatio-temporal information using these technologies combined with the calcium imaging technology. By ATP (1 μM or higher) stimulation, intracellular calcium elevation was observed in all astrocytes. However, under the same condition, only few astrocytes (ca. 3~7%) released glutamate. A similar phenomenon was observed in glutamate-evoked ATP release from astrocytes; even though all astrocytes showed increased intracellular calcium levels, small proportion of astrocytes released ATP by glutamate stimulation (ca. 1%). It was expected that astrocytes which showed intracellular calcium elevation release gliotransmitters, however, my results were totally different.

Pharmacological approaches revealed that P2X and P2Y receptors showed different patterns of intracellular calcium elevation, however, a similar pattern of glutamate release was evoked by P2X and P2Y stimulations. For the glutamate stimulation, it was suggested that the subtype 5 of metabotropic glutamate receptor was responsible to increase intracellular calcium in astrocytes and to release ATP from

astrocytes. The glutamate stimulation evoked calcium waves among astrocytes, and then astrocytes released ATP around 200 seconds after glutamate application.

His experiments using cultured astrocytes revealed following things: 1) intracellular calcium elevation was not enough to evoke gliotransmitter release, 2) direct relationship between glutamate release and intracellular calcium elevation evoked by ATP stimulation is low, 3) ATP release evoked by glutamate stimulation had relevance to the intracellular calcium elevation which represent the activation of astrocytes. For the first time, gliotransmitter release was successfully visualized and the mechanisms of gliotransmitter release were revealed through these imaging technologies.

論文の審査結果の要旨

提出論文はアストロサイトから放出されることが予測されているグルタミン酸と ATP について、リアルタイムの観察法の確立とこれをもちいて見出した新たな見地をまとめたものであり、詳細は下記のとおりである。

アストロサイトは中枢神経系の主要な細胞の一つであり、神経細胞を機械的に支持し、栄養供給細胞として神経細胞を補助するだけの細胞であると考えられていた。しかし近年になって、アストロサイトは神経活動に対してより積極的な働きを行っていることが明らかになってきた。すなわち、アストロサイトはシナプスの活動性を検出し、統合し、Gliotransmitter (ATP, グルタミン酸, D-serine など) を放出することにより、神経細胞の活動性を調節しているという説である。ただし、この説の基礎となる過去の実験では Gliotransmitter が空間的・時間的にどのような様式でアストロサイトから放出されているか示せていない。そこで申請者はアストロサイトから放出される ATP やグルタミン酸を可視化し、その放出様式を明らかにすることを試みた。ATP の可視化には Luciferin-Luciferase の反応を用い、細胞外に放出される ATP を光子に置換して観察した。グルタミン酸の可視化には Glutamate Optic Sensor(EOS)を使用した。EOS は細胞外グルタミン酸結合部位に蛍光物質を結合した分子であり、グルタミン酸結合による蛍光物質の蛍光強度変化をグルタミン酸放出量に変換できる。以上の2つの技術を用いて培養アストロサイトから放出される Gliotransmitter の空間的、時間的情報を得ることが可能になった。アストロサイトの機能とアストロサイト細胞内カルシウム変化を結びつける優れた研究がある。そこで細胞内カルシウム変化で記載されているアストロサイトの変化と Gliotransmitter の放出で記載されるアストロサイトの変化にどのような時間的な相関があるか調べた。1 μ M 以上の ATP 刺激によって観察したすべてのアストロサイトで細胞内カルシウムの増加が見られたが、同じ濃度の ATP 刺激では観察したうちの 3-7% の細胞からグルタミン酸の放出が見られた。また、1 mM グルタミン酸刺激による ATP の放出に関しても同様の現象、すなわち、すべてのアストロサイトで細胞内カルシウムが増加するが、ATP を放出する細胞はわずかに 1% であったという現象が観察された。細胞内カルシウムが増加したすべての細胞から Gliotransmitter が放出されると考えられてきたが、この結果はそれを覆すものであった。薬理学実験によって、どのような受容体を介してアストロサイトから Gliotransmitter の放出が行われているか検討した。P2X, P2Y 受容体刺激では細胞内カルシウムが増加する時間経過が異なるものの、いずれの刺激もグルタミン酸放出を促した。グルタミン酸受容体刺激では主に代謝型グルタミン酸受容体を介して細胞内カルシウム増加と ATP 放出が起こることが明らかになった。グルタミン酸受容体刺激後にアストロサイト間でカルシウムウェーブがおこり、細胞内カルシウム濃度が最大になる 200 秒後から ATP の放出が観察された。培養アストロサイトを用いたこれからの実験から、細胞内カルシウムの増加だけでは Gliotransmitter が起こらないこと、ATP 受容体刺激によるグルタミン酸放出は細胞内カルシウム増加と関連が低いこと、グルタミン酸受容体刺激による ATP 放出は細胞内カルシウム濃度で表現されるアストロサイトの活性化と関連が高いことが分かった。

提出論文はグリアから神経細胞への情報伝達 Gliotransmitter の新たな見地を開くものであるとともに、グルタミン酸および ATP 放出の可視化技術はグリア以外の細胞にも適応可能であり、技術的にも神経回路機能の研究に大きな貢献をもたらす質の高い研究内容であり、学位論文として十分に受理できるものであると考えられる。