

Title	グルタミン酸による神経伝達におけるクロライドイオンの役割に関する研究
Author(s)	小山, 豊
Citation	大阪大学, 1993, 博士論文
Version Type	
URL	<a href="https://hdl.handle.net/11094/38441">https://hdl.handle.net/11094/38441</a>
rights	
Note	著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、 <a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed">〈a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed"〉</a> 大阪大学の博士論文について <a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed">〈/a〉</a> をご参照ください。

***Osaka University Knowledge Archive : OUKA***

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

Osaka University

氏名	小 山 豊
博士の専攻分野の名称	博 士 (薬 学)
学 位 記 番 号	第 1 0 5 5 7 号
学 位 授 与 年 月 日	平 成 5 年 3 月 11 日
学 位 授 与 の 要 件	学 位 規 則 第 4 条 第 2 項 該 当
学 位 論 文 名	グルタミン酸による神経伝達におけるクロライドイオンの役割に関する研究
論 文 審 査 委 員	(主査) 教 授 馬 場 明 道 (副査) 教 授 近 藤 雅 臣 教 授 三 村 務 教 授 三 浦 喜 温

### 論 文 内 容 の 要 旨

Cl<sup>-</sup>は、神経や筋などの興奮細胞で、その膜電位の発生、維持に大きな役割を持つ。神経伝達におけるCl<sup>-</sup>の役割はこれまでGABA、グリシンなどの抑制性アミノ酸の受容体反応、およびそれらの高親和性輸送機構との関連で主に論じられてきた。一方、Rothman, Babaらは興奮性伝達物質であるグルタミン酸(Glu)の神経毒性、あるいは、受容体を介したcAMP産生が細胞外のCl<sup>-</sup>に依存することを報告している。著者は、Gluによる神経伝達におけるCl<sup>-</sup>の役割を明らかにするため、その伝達の終了過程である神経膜のGlu輸送および、受容体を介した作用としてアストログリアの膨化を取り上げ、それぞれについてCl<sup>-</sup>の関与に検討した。

神経膜Glu輸送について、ラット脳神経膜小胞への<sup>35</sup>S-CAの取り込みの性質を検討した結果、この取り込みが小胞外のCl<sup>-</sup>に依存するものであることが明らかとなった。また<sup>35</sup>S-CA取り込みのCa<sup>2+</sup>およびNa<sup>+</sup>に対する感受性、基質特異性は、既に報告されているCl<sup>-</sup>依存<sup>3</sup>H-Glu取り込みの性質と一致した。更に、膜小胞への<sup>3</sup>H-Glu取り込みに対しCAはAPBと同様の最大阻害値を示したが、Cl<sup>-</sup>非存在下の<sup>3</sup>H-Glu結合に対しては作用がなかった。以上の結果よりCAが神経膜Cl<sup>-</sup>依存Glu輸送系の特異的な基質であること示された。このことより、CAがCl<sup>-</sup>依存Glu取り込み機構の研究において、有用な化合物であると考えられる。

次に、<sup>35</sup>S-CAを用いて本Glu輸送機構におけるCl<sup>-</sup>の役割についての検討を行った。アニオン輸送阻害薬であるSITSおよびDIDSは、用量依存的に膜小胞への<sup>35</sup>S-CAの取り込みを抑制した。そして、SITSの阻害は<sup>35</sup>S-CAに対する競合ではなく、Cl<sup>-</sup>の効果を減弱させるための阻害であった。このことは、本輸送系に基質認識部位とは異なるアニオンの作用部位が存在することを示す。また、<sup>35</sup>S-CA取り込みは膜小胞内へ本輸送体の基質を負荷することその活性が増加した。しかし、膜を隔てたCl<sup>-</sup>濃度勾配の変化はその取り込みに影響を与えなかった。従って、神経膜Cl<sup>-</sup>依存Glu輸送は、抑制性アミノ酸伝達物質の輸送とは異なりアミノ酸の交換反応により生じ、Cl<sup>-</sup>濃度勾配の化学ポテンシャルはその輸送のエネルギーではないことが明らかとなった。

Cl<sup>-</sup>依存Glu輸送の調節機構を解明するため、脳切片を脱分極剤で処置しその活性の変化を検討した。ベラトリン、高K<sup>+</sup>液での切片の処置は、膜小胞への<sup>3</sup>H-Glu取り込みを増加させた。一方、ウアバイン、K<sup>+</sup>-free液、ストロファンチジンのNa<sup>+</sup>、K<sup>+</sup>-ATPaseの阻害剤による処置はこれを減少させた。これらの変化は、共に輸送体数の変化に起因し、発生の時間経過、および可逆性の点で共通の性質を持つものであった。更に、脱分極剤による<sup>3</sup>H-Glu取り込み増加は低濃度のNa<sup>+</sup>、K<sup>+</sup>-ATPase阻害剤の共存で認められなくなった。これらの結果は神経膜Cl<sup>-</sup>依存Glu取り

込みの活性変化に  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -ATPase が関与していることを示す。 $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -ATPase は、神経の興奮時にその活性が大きく変化する。従って、他のアミノ酸伝達物質輸送系とは異なり、本 Glu 輸送系が神経の活動に応じて活性調節を受けることが示唆された。海馬、小脳の Glu 神経伝達において、その伝達効率が神経の興奮により可塑的に変化することが知られているが、この  $\text{Cl}^-$  依存 Glu 輸送の調節も、成熟動物脳におけるシナプスの可塑性を示すものかも知れない。

アストログリアの膨化は、脳傷害の際に認められる脳浮腫の成因である。アストログリアには Glu 受容体があり、この過剰な活性化は膨化を惹起する。Glu によるアストロサイト膨化の機構について培養細胞を用いて検討した結果、これが初期膨化と遅発性膨化の二つの時間経過で生じることが示された。初期膨化は、細胞外  $\text{Cl}^-$  除去で抑制され、Glu による  $\text{Cl}^-$  流入で引き起こされると考えられる。遅発性膨化については外液  $\text{Ca}^{2+}$  および  $\text{Cl}^-$  除去あるいは  $\text{Ca}^{2+}$  チャンネル阻害薬の添加でそれぞれ抑制された。従ってその発生に、 $\text{Cl}^-$  に依存した膨化が細胞内に流入した  $\text{Ca}^{2+}$  により増強されるという機構が考えられる。また、遅発性膨化に伴い、アストログリアは自ら持つ細胞容積の調節機能を著しく低下させることが明かとなった。脳虚血や頭部損傷の傷害時には Glu 伝達に異常が生じ、これが神経細胞壊死を起こす。これらの結果は、この神経細胞の変性にアストログリアの膨化による機能低下が関与することを示唆すると共に、脳浮腫の薬物療法の開発に有用な知見であると思われる。

以上本研究により、Glu の神経伝達の調節、あるいは病態のその細胞傷害発現において  $\text{Cl}^-$  が重要な役割を持つことが示された。

#### 論文審査の結果の要旨

本論文はグルタミン酸神経伝達における  $\text{Cl}^-$  イオンの役割について、神経膜小胞における  $\text{Cl}^-$  イオン依存性グルタミン酸取込みと培養アストロサイトにおけるグルタミン酸作用の2つについて検討し、新しい知見を明らかにしている。前者の取込みについてはその機構を明らかにすると共に、神経活動により調節されることを見出した。又、グリア細胞に対する作用についてはグルタミン酸が  $\text{Cl}^-$  の取込みを介してグリア細胞に  $\text{Ca}^{2+}$  依存性遅発性膨化をひき起こすことを見出した。

これらの知見は全く新しいものであり博士（薬学）の称号を与えられるに値するものとする。