Osaka University Knowledge Archive

Title	Neurotrophin-dependent neurotransmitter release from cultured CNS neurons
Author(s)	沼川, 忠広
Citation	大阪大学, 2000, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/41893
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、大阪大学の博士論文についてをご参照ください。

Osaka University Knowledge Archive : OUKA

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

Osaka University

氏　　名	沼　川　忠　広（ぬま　かわ　ただ　ひろ）
博士の専攻分野の名称	博　士（理　学）
学　位　記　番　号	第　15183　号
学位授与年月日	平成12年3月24日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当 理学研究科生物科学専攻
学　位　論　文　名	Neurotrophin-dependent neurotransmitter release from cultured CNS neurons （ニューロトロフィンによる培養中枢ニューロンからの急速なグルタミン酸放出）
論　文　審　査　委　員	（主査） 教　授　畠中　寛 （副査） 教　授　河村　悟　　教　授　小倉　明彦 新潟大学脳研究所助教授　武井　延之

論　文　内　容　の　要　旨

ニューロトロフィンは、脳神経系においてニューロンの分化や生存を制御する一群の蛋白質として知られる神経栄養因子である。ニューロトロフィンのうち、特に脳由来神経栄養因子（BDNF）は、学習・記憶のモデルである長期増強現象（LTP）を促進し、ニューロトロフィンがシナプス可塑性に重要な関与をしており、ニューロンの情報伝達機能の制御にも関わってくるとされている。私は、シナプス可塑性におけるニューロトロフィンの役割を分子レベルで明らかにするために、以下の研究を行った。

BDNFによるLTP促進のメカニズムの一つとして、BDNFがプレシナプス細胞からの神経伝達物質放出を調節している可能性がある。そこで、中枢ニューロンでは特に重要な神経伝達物質であるグルタミン酸の培養ニューロンからの放出量をHPLCで測定する系を確立し、ニューロトロフィン添加後のグルタミン酸放出量を測定した。その結果、大脳皮質、海馬、小脳顆粒細胞において、BDNF添加後一分以内にグルタミン酸の放出が一過的に引き起こされることを見いだした。特に小脳顆粒細胞においては、神経成長因子（NGF）でもグルタミン酸の放出が観察された。また、培養細胞にカルシウム指示薬Fluo－3を取り込ませ共焦点レーザー顕微鏡下で観察するとBDNFおよびNGFが、ともに顕著な細胞内カルシウムの上昇を引き起こすことを確認した。

小脳顆粒細胞からのBDNF及びNGFによるグルタミン酸の放出作用にはその細胞内シグナルに違いがみられた。BDNFによるグルタミン酸放出は、Trkレセプターの特異的阻害剤であるK252aで抑制され、また、TrkB-IgGによっても完全に抑制された。このことは、BDNFによる放出がTrkBを介していることを示唆している。このグルタミン酸放出作用はカルシウム依存性であるが、細胞外カルシウムには依存しなかった。一方で、BAPTA-AMおよびthapsigargin添加で放出が抑えられることから細胞内ストアからのカルシウムに依存していると考えられる。また、BDNFによるカルシウム上昇はIP3レセプター阻害剤、heparinにより完全に抑制され、この現象にはIP3レセプターの活性化が必須であると考えられる。また、PLC-γの阻害剤、U-73122でもカルシウム応答は抑制された。BDNFのグルタミン酸放出作用に対してもheparin、U-73122は同様な阻害効果を発揮した。すなわちBDNFはTrkB活性化の下流であるPLC-γ経路の活性化によるIP3産生を介して細胞内カルシウムの上昇を引き起こし、グルタミン酸の放出を行っていると考えられる。

一方、NGFでは異なる結果が得られた。小脳顆粒細胞ではNGFに特異的なTrkAの発現はほとんどみられない。にもかかわらず、NGFで顕著なグルタミン酸放出が観察された。また、NGFによるグルタミン酸の放出はK252a

で抑制されなかった。そこでニューロトロフィンの低親和性レセプターp75の関与の可能性を検討した。まず、培養した小脳顆粒細胞にp75を過剰発現させ、その条件下でのNGFによるグルタミン酸の放出をBDNFを用いた場合と比較した。その結果、NGFによるグルタミン酸放出作用のみが更に増強され、BDNFではみられなかった。また、用量依存性の解析によりNGFによるグルタミン酸放出作用にはBDNFの場合と比較して高い濃度が必要であった。

もし、NGFがp75を介しているとすればその下流の細胞内のシグナルとしてSphingomyelinaseの活性化が伴うと考えられる。そこでセラミドによる直接のグルタミン酸の放出がみられるかどうか解析した。その結果、セラミドのアナログ、C2-ceramideにより一過的なグルタミン酸放出が起こることを見出した。また、NGFはセラミドの産生を介したシグナルによりグルタミン酸放出を引き起こしているのか、セラミド産生を抑制するISP-1（mynocine）の効果を調べてみると、NGFによるグルタミン酸放出作用はISP-1により顕著に抑制された。C2-ceramideによるグルタミン酸放出もNGFの場合と同様、細胞内カルシウム依存性を示す。細胞内カルシウムシグナルの解析にheparinおよびruthenium red（リアノジンレセプター阻害剤）を用いた。グルタミン酸放出への影響、及び細胞内カルシウムのレベル変化を測定したところ、NGF、C2-ceramideはruthenium redにより細胞内カルシウム上昇が顕著に阻害され、グルタミン酸放出作用も同様に抑制された。以上の結果はNGFがセラミド産生を介し、リアノジンレセプターからのカルシウム上昇を必要としたグルタミン酸放出作用を行っていることを示唆している。

論文審査の結果の要旨

本研究は、最近注目されてきている、神経栄養因子によるシナプス可塑性の制御に関連し、ニューロトロフィンによる培養中枢ニューロンからの急速なグルタミン酸の放出を明らかにし、その分子機構についても解析し、その結果興味ある知見を見いだしており、博士（理学）の学位論文として十分価値のあるものと認める。