

氏名	古川 由里子
学位の種類	博士（理学）
学位記の番号	乙第81号
学位授与年月日	2021（令和3）年2月25日
学位授与の要件	学位規則第5条第2項該当
学位論文題目	神経細胞の活性化およびシナプス伝達におけるマグネシウムイオンの生理的機能の解析
論文審査委員	主査 宮本武典（物質・生物機能科学専攻 教授） 副査 佐藤香枝（物質・生物機能科学専攻 教授） 深町昌司（物質・生物機能科学専攻 教授） 和賀 祥（物質・生物機能科学専攻 教授） 鳥光慶一（東北大学大学院 教授）

論文の内容の要旨

【要旨】

神経細胞は情報伝達に特化した細胞であり、末端に形成されているシナプスの結合を介して情報伝達をしている。活動電位が電気信号として神経細胞終末であるシナプスに到達すると、 Ca^{2+} の流入によりシナプス小胞に格納されている神経伝達物質が放出され、次の神経細胞に情報が伝達される。シナプス伝達効率は可塑的に変化し、このシナプス可塑性が記憶・学習のメカニズムと言われている。 Ca^{2+} は神経細胞においてアポトーシス、情報伝達物質の放出、興奮性伝達など重要な役割を担っており、膜電位の脱分極が起これば電位依存性 Ca^{2+} チャネルを通して細胞内に大量に流入するため検出しやすく、これまでに数多くの研究が報告されている。一方、 Mg^{2+} は、神経細胞において Na^{+} と K^{+} の能動輸送（ Na^{+} - K^{+} ATPase）の調節や Ca^{2+} 流入の制御など情報伝達に重要な役割を持っているにも関わらず、その研究報告はあまり多くない。本論文では Mg^{2+} に焦点をあて、 Mg^{2+} が神経活動に及ぼす影響について検討した。

大脳皮質および海馬は、記憶・学習において重要な脳領域であり、大脳皮質は古い記憶、海馬は新しい記憶を貯蔵する場所と言われている。第2章では、大脳皮質および海馬培養神経細胞、海馬切片を試料とし、低濃度 Mg^{2+} が神経活動に及ぼす影響について検討を行った。64チャンネル微小電極アレイ（Micro-electrode array ; MEA）を用いた活動電位計測およびMEAを酵素修飾することによるアレイ型オンラインセンサを用いたグルタミン酸放出量計測を行ったところ、細胞外 Mg^{2+} の減少によって活動電位数は増加し、グルタミン酸放出量の増加も認められた。さらに、膜電位感受性蛍光色素DiBAC₄(3)を用いたフローサイトメトリーによる膜電位計測および Ca^{2+} の蛍光プローブであるFluo4-AMを用いた共焦点レーザー蛍光顕微鏡観察により、細胞内 Ca^{2+} の挙動に対して低濃度 Mg^{2+} が及ぼす影響を検討した

ところ、大脳皮質および海馬とで Mg^{2+} 感受性に違いがあることが示唆された。

第3章では大脳皮質神経細胞を試料とし、細胞内 Mg^{2+} を可視化できる蛍光プローブのKMG-20-AM および Ca^{2+} 蛍光プローブのFluo4-AMを用い、共焦点レーザー蛍光顕微鏡およびフローサイトメトリーで蛍光変化を測定した。主要な興奮性神経伝達物質であるグルタミン酸および膜電位の脱分極を誘発するKCl添加により細胞内 Mg^{2+} 濃度 ($[Mg^{2+}]_i$) は一過性に増加するが、低濃度 Ca^{2+} および低濃度 Mg^{2+} 溶液中で測定したところ $[Mg^{2+}]_i$ は減少した。さらに Mg^{2+} の生理機能について検討するため、グルタミン酸受容体 (NMDA受容体、非NMDA受容体、代謝型受容体) の阻害剤および活性剤、イノシトール三リン酸 (Inositol trisphosphate ; IP3) 受容体の阻害剤、ミトコンドリア膜透過性遷移孔 (Mitochondrial permeability transition pore ; mPTP) の開口阻害剤を用い、 $[Mg^{2+}]_i$ および細胞内 Ca^{2+} 濃度 ($[Ca^{2+}]_i$) の蛍光測定を行った。その結果、グルタミン酸およびKCl添加による $[Mg^{2+}]_i$ の一過性な増加には、 $[Ca^{2+}]_i$ 同様、細胞外からの流入と細胞内小器官 (小胞体やミトコンドリア) からの流出の2つ経路があることが確認された。ただし、そのメカニズムは $[Ca^{2+}]_i$ とは異なり、細胞内小器官からの流出が支配的であることが示唆された。

第4章では、神経幹細胞 (Neural stem cells ; NSCs) を試料とし、生体親和性の高い導電性高分子であるPEDOT-PSS (poly(3,4-ethylenedioxythiophene)-poly(styrenesulfonate)) を修飾した微小電極アレイ (MEA) を用い、NSCsの分化・成長過程における電気活動を計測した。また、共焦点レーザー蛍光顕微鏡および生細胞タイムラプス顕微鏡を用い、NSCsの分化・成長に伴う神経回路の蛍光観察を試みた。その結果、PEDOT-PSSを修飾したMEAでの活動電位計測において細胞間での相関関係が確認され、神経回路が形成されたことが示唆された。また、蛍光観察 (免疫染色および $[Ca^{2+}]_i$ 変化の計測) においてもNSCsから神経細胞に分化し、神経回路が形成されたことが認められ、PEDOT-PSSを修飾したMEAが神経活動の評価において有用であることが確認された。この方法は非侵襲・非破壊的であり生体親和性も高いため、製薬分析などの初期および予備段階での有用なツールとなることが期待される。

大脳皮質および海馬培養神経細胞において、 Mg^{2+} 濃度に依存する電気活動や $[Ca^{2+}]_i$ 変化、グルタミン酸添加による $[Mg^{2+}]_i$ 変化の計測により、 Mg^{2+} が神経活動に影響を及ぼすことが確認され、その代謝メカニズムについても検討を進めることができた。最近では、セカンドメッセンジャーとしての Mg^{2+} の機能や、 Mg^{2+} が学習や記憶を増強するなどの報告、さらに多発性硬化症などの脱髄疾患や心疾患・精神疾患にも Mg^{2+} が関与しているという報告もあり、 Mg^{2+} の重要性が次第に明らかになりつつある。本研究は、 Mg^{2+} の生理的機能解析を進める上でこれまでにない新たなアプローチであり、その有用性から、今後さらに研究を進めることで創薬や疾病治療への貢献が期待できると考える。

論文審査結果の要旨

神経細胞は情報伝達に特化した細胞であり、末端に形成されているシナプスの結合を介して情報伝達をしている。活動電位が電気信号として神経細胞終末であるシナプスに到達すると、 Ca^{2+} の流入によりシナプス小胞に格納されている神経伝達物質が放出され、次の

神経細胞に情報が伝達される。シナプス伝達効率は可塑的に変化し、このシナプス可塑性が記憶・学習のメカニズムと言われている。Ca²⁺は神経細胞においてアポトーシス、情報伝達物質の放出、興奮性伝達など重要な役割を担っており、膜電位の脱分極が起こると電位依存性Ca²⁺チャネル通して細胞内に大量に流入するため検出しやすく、これまでも数多くの研究が報告されている。一方、Mg²⁺は、神経細胞においてNa⁺とK⁺の能動輸送 (Na⁺-K⁺ATPase) の調節やCa²⁺流入の制御など情報伝達に重要な役割を持っているにも関わらず、その研究報告はあまり多くない。本論文では主にMg²⁺に焦点をあて、Mg²⁺が神経活動に及ぼす影響について検討した。

大脳皮質および海馬は、記憶・学習において重要な脳領域であり、大脳皮質は古い記憶、海馬は新しい記憶を貯蔵する場所と言われている。第1章の第2章では、大脳皮質および海馬培養神経細胞、海馬切片を試料とし、低濃度Mg²⁺が神経活動に及ぼす影響について検討を行った。64チャンネル微小電極アレイ (micro-electrode array: MEA) を用いた活動電位計測およびMEAを酵素修飾することによるマルチアレイセンサを用いたグルタミン酸放出量計測を行ったところ、細胞外Mg²⁺の除去によって活動電位数は増加し、グルタミン酸放出量の増加も認められた。さらに、膜電位感受性蛍光色素DiBAC4(3)を用いたフローサイトメトリーによる膜電位計測およびCa²⁺の蛍光プローブであるFluo4-AMを用いた共焦点レーザー蛍光顕微鏡によって、細胞内Ca²⁺ ([Ca²⁺]_i) の挙動に対して低濃度Mg²⁺が及ぼす影響を検討したところ、大脳皮質および海馬とでMg²⁺要求性に違いがあることが示唆された。

第3章では大脳皮質神経細胞を試料とし、細胞内Mg²⁺を可視化できる蛍光プローブ (KMG-20-AM) およびCa²⁺蛍光プローブFluo4-AMを用い、共焦点レーザー蛍光顕微鏡およびフローサイトメータで蛍光変化を測定した。主要な興奮性神経伝達物質であるグルタミン酸および膜電位の脱分極を誘発するKCl添加による細胞内Mg²⁺濃度 ([Mg²⁺]_i) を、低濃度Ca²⁺および低濃度Mg²⁺溶液中で測定したところ[Mg²⁺]_iは減少した。さらにMg²⁺の生理機能について検討するため、グルタミン酸受容体 (NMDA (N-methyl-D-aspartate) 受容体、非NMDA受容体、代謝型受容体) の阻害剤および活性剤、イノシトール三リン酸 (Inositol trisphosphate: IP3) 受容体の阻害剤、ミトコンドリア膜透過性遷移孔 (Permeability transition pore: PTP) の開口阻害剤を用い、[Mg²⁺]_iおよび[Ca²⁺]_iの蛍光測定を行った。その結果、グルタミン酸およびKCl添加により[Mg²⁺]_iは一時的に増加し、[Ca²⁺]_i同様、細胞外からの流入と細胞内小器官 (小胞体やミトコンドリア) からの流出の2つ経路があることが確認された。ただし、そのメカニズムは[Ca²⁺]_iとは異なり、細胞内小器官からの流出が支配的であることが示唆された。

第4章では、神経幹細胞 (neural stem cells: NSCs) を試料とし、生体親和性の高い導電性高分子ポリマー (poly(3,4-ethylenedioxythiophene)-poly(styrenesulfonate): PEDOT-PSS) を修飾した微小電極アレイ (MEA) を用い、NSCsの分化・成長過程における電気活動を計測した。また、共焦点レーザー蛍光顕微鏡および生細胞タイムラプス顕微鏡を用い、NSCsの分化・成長に伴う神経回路網の蛍光観察を試みた。その結果、PEDOT-PSSを修飾したMEAでの電気活動計測において細胞間での相関が確認され、神経回路が形成されたことが示唆された。また、蛍光観察 (免疫染色および[Ca²⁺]_i変化の計測) においてもNSCsから神経細胞に分化し、神経回路網が形成されたことが認められ、PEDOT-PSSを修飾したMEAが神経活

動の評価において有用であることが確認された。この方法は非侵襲性・非破壊的であり生体親和性も高いため、製薬分析などの初期および予備段階での有用なツールとなることが期待され、今後、神経細胞の活性化における Mg^{2+} 要求性に伴う電気活動計測などにも応用できると思われる。

大脳皮質および海馬培養神経細胞において、 Mg^{2+} 濃度に依存する電気活動や $[Ca^{2+}]$ 変化、グルタミン酸添加による $[Mg^{2+}]$ 変化の計測により、 Mg^{2+} が神経活動に影響を及ぼすことが確認され、その代謝メカニズムについても検討を進めることができた。最近では、セカンドメッセンジャーとしての Mg^{2+} の機能や、 Mg^{2+} が学習や記憶を増強するなどの報告、さらに多発性硬化症などの脱髄疾患や心疾患・精神疾患にも Mg^{2+} が関与しているという報告もあり、 Mg^{2+} の重要性が次第に明らかになりつつある。本研究は、 Mg^{2+} の生理的機能解析を進める上でこれまでにない新たなアプローチであり、その有用性から、今後さらに研究を進めることで創薬等薬物応用や疾病治療への貢献が期待できると考える。

以上、論文提出者が見出した神経の活性化および学習や記憶、知覚や認知に重要な脳部位におけるシナプスの過疎性における Mg^{2+} の重要性は、認知神経科学分野やその関連分野の研究に新しい視点を開いたものと高く評価することができる。よって、審査委員会は論文提出者古川由里子が博士（理学）を受けるのに十分な資格をもつものと認めた。なお、本論文第2、3章は共著論文として公表され、それ以外の部分については公表予定であるが、論文提出者が主体的に研究を遂行したものであり、共著者よりこれらの論文を博士請求論文として使用することについて承諾を得ている。

最終試験の結果の要旨

成績 合格

審査委員会は論文提出者に対し、2021（令和3）年1月25日、学位論文の内容および関連事項について、口述試験を行った。

その結果、論文提出者は生物学、とくに神経生物学について博士（理学）の学位を受けるにふさわしく十分な学識をもつものと認め、合格と判定した。

以上