

氏 名 (本籍)	吉 ^{よし} 田 ^だ さちね (東 京 都)		
学 位 の 種 類	博 士 (神経科学)		
学 位 記 番 号	博 甲 第 4748 号		
学位授与年月日	平成 20 年 3 月 25 日		
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 1 項該当		
審 査 研 究 科	人間総合科学研究科		
学 位 論 文 題 目	The ontogenic expressions of multiple vesicular glutamate transporters (VGLUT) during postnatal development of rat pineal gland (ラット松果体の生後発達過程では複数種の小胞性グルタミン酸輸送体が発現する)		
主 査	筑波大学教授	医学博士	設 楽 宗 孝
副 査	筑波大学教授	Ph. D	小 川 園 子
副 査	筑波大学准教授	博士 (心理学)	山 田 一 夫
副 査	筑波大学教授	薬学博士	熊 谷 嘉 人

論 文 の 内 容 の 要 旨

(目的) 松果体はメラトニンを分泌する内分泌器官である。主細胞の松果体細胞にはシナプス小胞様小胞があり、この小胞に2種類の小胞性グルタミン酸輸送体 (VGLUT1 と VGLUT2) 及び、松果体と網膜に特異的な 75 塩基挿入型の VGLUT1 バリエント (VGLUT1v) が存在する。松果体にはグルタミン酸受容体や細胞膜型輸送体も発現しており、グルタミン酸をシグナルとする松果体機能が推測される。その実態を解明するために、各 VGLUT 発現の詳細な解析を行った。

(対象と方法) 生後 0 日 (P0), P7, P14, P21 及び P63 の SD 系ラットを用いた。灌流固定と松果体採取は 13 時から 15 時に行った。但し、昼と夜での VGLUT mRNA 発現レベルの定量解析には P7, P21 において 15 時と 24 時に松果体を採取した。mRNA 発現解析には in situ ハイブリダイゼーション法、定量 PCR 法、RT-PCR 法を用いた。免疫染色法により免疫陽性反応を検出した。松果体細胞マーカーにはシナプトフィジン抗体を用いた。但し、VGLUT1 cRNA プロローブは VGLUT1 と VGLUT1v mRNAs の共通配列、そして VGLUT1 抗体は VGLUT1 と VGLUT1v の共通部位をそれぞれ認識するため切片上では VGLUT1 と VGLUT1v は区別されない。

(結果) VGLUT1 mRNA は P0 で松果体辺縁部にのみ強く発現した。P7 になると VGLUT1 強発現細胞は松果体全体に分布し、この分布パターンがこれ以降の日齢でも見られた。この変化は定量 PCR の結果と一致した。VGLUT1 免疫陽性反応も、P0 では松果体辺縁部に限局し、P7 以降は松果体全体で観察された。陽性反応は全て松果体細胞で見られた。また小胞輸送関連蛋白質のダイナミン 1 や VGLUT1 との結合が示唆されるエンドフィリン 1 も VGLUT1 同様、生後初期に mRNA 発現レベルが増加することが示された。昼と夜の VGLUT1 mRNA 発現レベルは P7 及び P21 とともに変化しなかった。

定量 PCR 解析から VGLUT1v mRNA 発現レベルは P0 で低く、P7 にかけて増加した後、P14 以降減少することが示された。VGLUT1v mRNA 発現は昼と夜で変化しなかった。

VGLUT2 mRNA 強発現細胞は P0 と P7 では器官全体で見られたが、P14 以降は減少し、さらに P63 では少

数の細胞に限り強発現が認められた。定量 PCR 解析からも同様の変化が確認された。VGLUT2 染色は P0 から P14 まで松果体細胞とシナプトフィジン陰性細胞に見られ、P21 以降は松果体細胞にのみ観察された。P21 松果体の VGLUT2 mRNA 発現レベルは昼よりも夜の方が高く、この変化は P7 では検出されなかった。(考察) 松果体生後発達過程での VGLUT1 の発現変化は松果体細胞の分化の過程とよく一致する。また VGLUT1 免疫陽性反応は松果体細胞でのみ観察された。これらのことから VGLUT1 は成熟松果体細胞でグルタミン酸輸送を担うと考えられる。

P14 以降 VGLUT1v mRNA 発現レベルは減少した。ラット松果体には生後 2 週の間まで、光受容能があり、その後この能力は消失する。松果体は網膜と同じく間脳背側部から発生する。松果体と網膜に特異的に発現するという特質を考慮すると、VGLUT1v は生後早期の松果体の光受容能に関連したグルタミン酸を輸送している可能性がある。

生後初期、VGLUT2 mRNA 発現レベルは高く、免疫陽性反応は松果体細胞とシナプトフィジン陰性細胞に見られた。日齢に伴い mRNA 発現レベルは減少し、その染色も松果体細胞のみになった。しかし P21 では夜の mRNA 発現レベルが昼よりも高くなっていた。これらのことから VGLUT2 は発達段階に応じて異なる生理作用をもつグルタミン酸を輸送する可能性が考えられる。特に P21 ではメラトニン分泌抑制に関与するグルタミン酸の輸送が示唆される。

審 査 の 結 果 の 要 旨

本研究は、ラット松果体生後発達過程でのグルタミン酸の働きを解明するために、小胞性グルタミン酸輸送体 (VGLUT) の発現を解析したものである。松果体には VGLUT1 とそのバリエーション (VGLUT1v)、及び VGLUT2 が発現している。生後 3 週間の器官発達過程で、各 VGLUT の発現様式はそれぞれ互いに異なることを明らかにした。また生後 21 日の松果体では、VGLUT2 mRNA だけ夜の発現レベルが昼より有意に高かった。これらの結果は、松果体では各 VGLUT がそれぞれ異なるグルタミン酸の生理作用発現に関与することを示唆しており、松果体でのグルタミン酸の働きの解明に重要な知見を与えるものであり、価値ある研究と考えられる。

よって、著者は博士 (神経科学) の学位を受けるに十分な資格を有するものと認める。