

審査の結果の要旨

氏名 上 條 諭 志

本研究は発生期神経細胞の神経突起内部における自発的なカルシウム上昇の動態とその意義をイメージングにより明らかにするため、発生期マウス大脳皮質2/3層興奮性神経細胞を選択的にラベリングする子宮内電気穿孔法と突起内部でのカルシウム動態を優れたS/N比で可視化する膜結合型蛍光プローブを用いた系において、キモグラフを用いた新規解析手法と薬理学実験を組み合わせ、下記の結果を得ている。

1. 子宮内電気穿孔法により選択的にラベルした発生期マウス神経細胞において、膜結合型プローブLck-GCaMP7は突起内部でのカルシウム動態を既存のプローブより優れたS/N比で可視化できることを見出した。発生期神経細胞では突起の至る所において多源性の自発的なカルシウム上昇が起きており、その時空間パターンを解析するためにキモグラフを用いた解析手法を導入した。

2. キモグラフを用いた解析により、異なる突起間、異なる地点間でのカルシウム上昇の比較が可能となった。樹状突起、軸索別のROIを設定したところ、発生期神経細胞の突起内部においては、樹状突起に比べて軸索内でのカルシウム上昇が、累積上昇、最大カルシウム上昇値ともに大きいことが明らかになった。また、自発的なカルシウム上昇は時間的に固まって発生する傾向があることが示唆された。

3. 自発的なカルシウム上昇は細胞外のカルシウムに依存しており、細胞膜電位を上昇させる実験、および内向き整流性カリウムチャンネルKir2.1を用いた実験により、細胞膜電位依存的事であることがわかった。また、薬理的なスクリーニングにより、発生期神経細胞における主たるカルシウム上昇の源はL型の電位依存性カルシウムチャンネルであることを明らかにした。

4. 発生期のマウス大脳皮質神経細胞にはL型電位依存性カルシウムチャンネルサブタイプとしてCav1.2, Cav1.3の両方が発現していることを免疫染色により確認し、その局在様式に違いがあることを示した。ジヒドロピリジン非感受性カルシウムチャンネルを外来性に発現させることにより、Cav1.2, Cav1.3の両方が発生期神経細胞においてカルシウム流入能力を持つことを構成的に示した。

5. 蛍光カルシウムプローブLck-GCaMP7と赤色蛍光タンパク質mCherry-KRasCTを

P2A自己開裂ペプチドでつないだコンストラクトを作製し、蛍光輝度比を測定することにより、細胞間での細胞体平均カルシウム濃度の比較を行った。発生期神経細胞の細胞体カルシウム濃度には細胞間で明らかな差があることが明らかになった。L型カルシウムチャネルを介したカルシウム流入を抑制、促進する薬剤の添加により、細胞体平均カルシウム濃度に変化することから、発生期神経細胞の細胞体平均カルシウム濃度はL型カルシウムチャネルにより制御されていることがわかった。

以上、本論文はカルシウムイメージング方法の改良により、発生期神経細胞における自発的カルシウム上昇の時空間パターンの解析を可能にし、樹状突起、軸索などの突起間でもカルシウム上昇の動態には差があることを明らかにした。また、その主たる源が電位依存性L型カルシウムチャネルであることをつきとめ、細胞体の平均カルシウム濃度の維持においても大きな役割を果たしていることを明らかにした点で、発生期神経細胞におけるカルシウムシグナリングの解明に大きく貢献したと考えられ、学位の授与に値するものと考えられる。