

平成21年 3月31日現在

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2006～2008

課題番号：18700346

研究課題名(和文) 網膜におけるグリアが産生するセリンの生理機能と神経再生への応用

研究課題名(英文) Glial expression of 3-phosphoglycerate dehydrogenase for L-serine biosynthesis in the retina

研究代表者

境 和久 (SAKAI KAZUHISA)

独立行政法人理化学研究所・先端技術開発グループ・研究員

研究者番号：20391956

研究成果の概要：非必須アミノ酸 L-セリンにはニューロンの生存や分化を促す効果があることが報告されている (Furuya et al, 2000,PNAS 97:11593-11597)。本研究では網膜での L-セリンの産生・供給の分子細胞機構を解明し、神経再生への応用の可能性を探るために計画した。その結果、L-セリンの合成酵素である 3-ホスホグリセリン酸脱水素酵素(Phgdh)は網膜のグリアであるミュラー細胞とアストロサイトに選択的発現を示した。また産生した L-セリンの輸送に関与していると思われる中性アミノ酸トランスポーターASCT1 もミュラー細胞とアストロサイトに強く発現しているのが示された。網膜のグリアで産生された L-セリンは ASCT1 を介してニューロンの生存や分化のためにニューロンへ供給されていると考えられる。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2006年度	1,300,000	0	1,300,000
2007年度	900,000	0	900,000
2008年度	700,000	210,000	910,000
年度			
年度			
総計	2,900,000	210,000	3,110,000

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：神経科学・神経解剖学・神経病理学

キーワード：網膜、グリア、ミュラー細胞、L-セリン、3-ホスホグリセリン酸脱水素酵素、

1. 研究開始当初の背景

L-セリンは、解糖系の中間体 3-ホスホグリセリン酸を出発材料として合成される非必須アミノ酸である。これまでの研究から、この L-セリンが、培養小脳プルキンエ細胞の生存や分化を促す強力な神経栄養因子であることがわかっている (Furuya et al., 2000, PNAS 97:11593-11597)。しかも、L-セリン合成に不可欠な合成酵素 (3-ホスホグリセリン酸脱水素酵素:Phgdh) は、脳において神経細胞には発現せず、特定のグリアに選択的発現

をしている事実も明らかになった (Yamasaki et al., 2001, J. Neurosci 21: 7691-7704)。また、中性アミノ酸トランスポーターASCT1 は、脳において L-セリン合成グリア細胞に一致して発現することから L-セリン輸送担体の有力な候補として明らかになった (Sakai et al., 2003, J. Neurosci. 23:550-560)。さらに、末梢神経の損傷後、軸索周囲のニューロン以外の支持細胞において Phgdh の発現増強が観察されている (Yamashita et al, 2003, Arch. Histol. Cytol. 66:429-436)。これら

の事実、神経細胞の生存や機能にとって不可欠な L-セリンを、周囲のグリア細胞が ASCT1 を介して産生供給することにより、ニューロン機能の恒常性を維持している可能性を示唆している。

2. 研究の目的

本研究では網膜での神経栄養因子としての L-セリンの産生・供給の分子細胞機構を解明し、神経再生への応用展開の可能性を探るために形態基盤の解明を目的として企画した。

3. 研究の方法

実験には C57BL/6J 系統マウスを使用して観察方法によって以下の固定方法、組織切片を作製して観察した。

(1) 光学顕微鏡および共焦点レーザー顕微鏡による免疫組織化学染色の観察。

胎仔はブアン固定、生後以降は 4%パラホルムアルデヒドで固定後、常法によりパラフィン包埋し、4-7 μm 厚のパラフィン切片を免疫染色した。

(2) 免疫電顕観察法

4%パラホルムアルデヒド+0.1-0.5%グルタルアルデヒド固定処理し、免疫染色後、通常の電顕標本作製法に準じて、電顕用組織超薄切片を作製し、電子顕微鏡で観察した。

(3) 電子顕微鏡による微細構造の観察

2%パラホルムアルデヒド+2%グルタルアルデヒド固定後、通常の電顕標本作製法に準じて、電顕用組織超薄切片を作製し、電子顕微鏡で観察した。

4. 研究成果

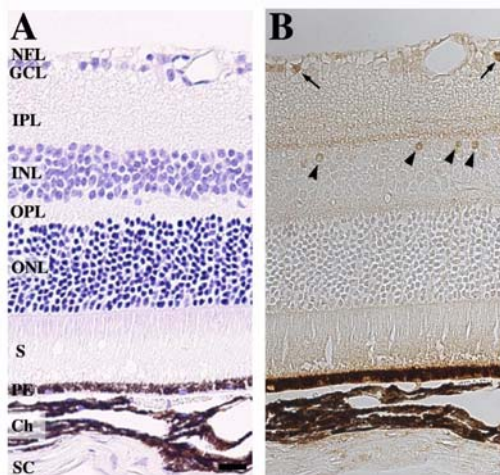


図1 成熟マウス網膜のヘマトキシリン核染色(A)と抗 Phgdh 抗体による免疫染色(B)

NFL: 神経繊維層, GCL: 神経節細胞層, IPL: 内網状層, INL: 内顆粒層, OPL: 外網状層, ONL: 外顆粒層, S: 杆状体錐状体層, PE: 色素上皮, Ch: 脈絡膜, SC: 強膜

(1) 成熟したマウスの網膜を用いて抗 Phgdh 抗体を用いて免疫染色をした(図 1B)。その結果、外顆粒層 (ONL) から神経繊維層 (NFL) にかけて全体的に染色され、特に内顆粒層 (INL) の細胞体(図 1B の矢頭)と神経節細胞層 (GCL) の細胞体(図 1B の矢印)に強い発現が示された。これは、内顆粒層に存在するミューラー細胞と神経節細胞層に存在するアストロサイトが発現していると推察された。

(2) 次に(1)で推測された Phgdh の発現がミューラー細胞とアストロサイトでの発現であるか確認するために抗 Phgdh 抗体といくつかのニューロンおよびグリアのマーカーの抗体で免疫蛍光抗体法を行った。

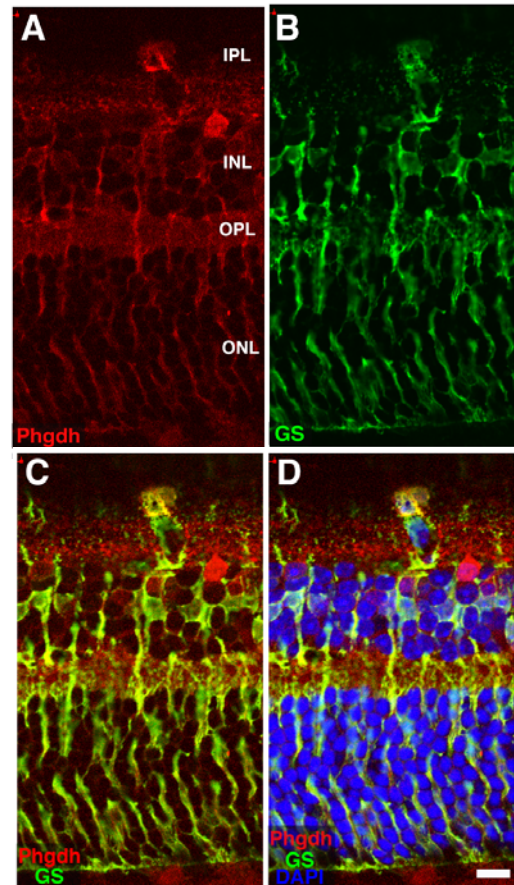


図2 共焦点レーザー顕微鏡による蛍光抗体の多重染色

Phgdh[赤: A, C, D]、GS(グルタミンシクターゼ)[緑:B, C, D]、DAPI[青:D](核染色)その他の略語は図1参照。

図2では抗 Phgdh 抗体(赤)と網膜のグリアのマーカーである抗グルタミンシクターゼ

(GS) 抗体 (緑) で免疫染色し、さらに、DAPI による核染色した組織画像を示した。Phgdh の発現は、GS で示される外顆粒層から内網状層で伸びているミュラー細胞の突起などと共発現しているのが確認できた。なお、Phgdh は神経細胞のマーカーの抗体との多重染色では、共発現は示さなかった。

(3) Phgdh の発現細胞を免疫電顕により調べた (図 3)。外顆粒層領域ではニューロンの細胞体と細胞体の間隙を通過しているミュラー細胞の突起に陽性反応が示された (図 3A の矢頭)。また、神経節細胞層領域では血管内皮細胞の周囲に隣接するアストロサイトに Phgdh の陽性反応が示された (図 3B)。

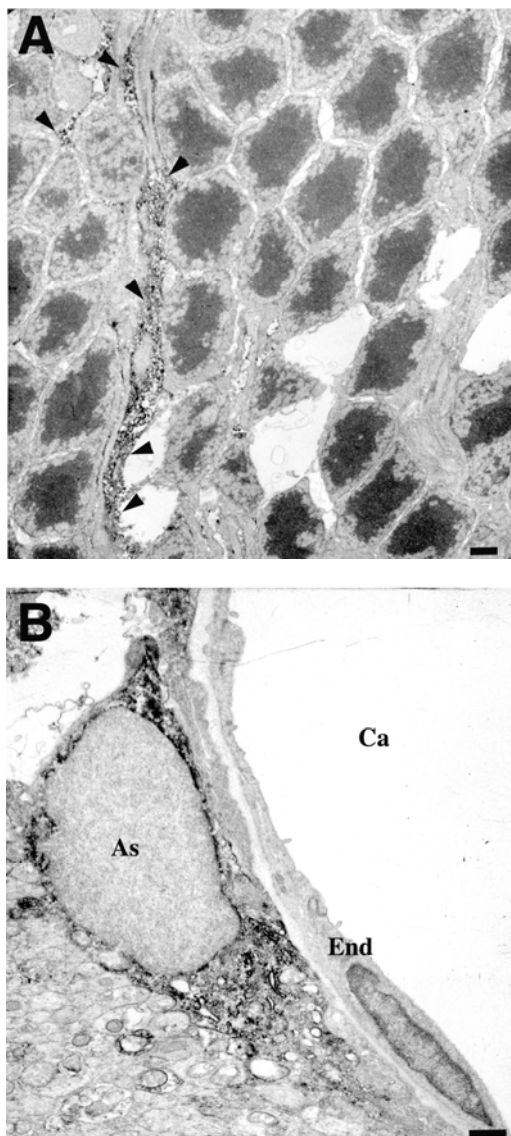


図 3 抗 Phgdh 抗体による網膜の免疫電顕
A) 外顆粒層 (ONL) 領域におけるミュラー細胞の Phgdh の発現 (矢頭) と B) 神経節細胞層領域でのアストロサイトの Phgdh の発現が確認できる。
Ca : 血管, End : 血管内皮細胞, As : アストロサイト

(4) また、L-セリンの輸送に関与していると思われる中性アミノ酸トランスポーター ASCT1 の発現細胞についても免疫電顕によって調べた (図 4)。外網状層領域では網膜のシナプスであるシナプスを被覆しているように存在するミュラー細胞の突起に陽性反応が示された (図 4 の矢頭)。

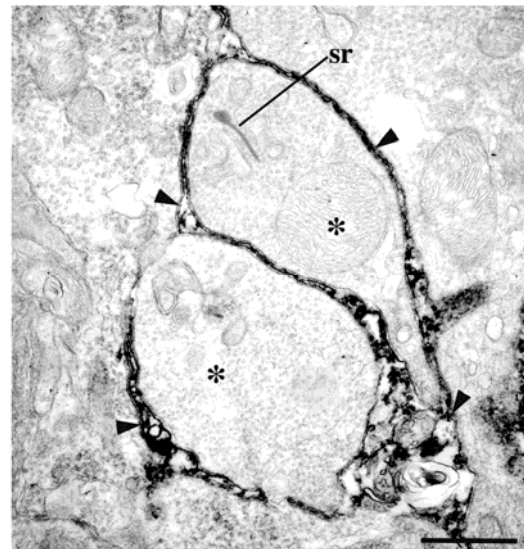


図 4 抗 ASCT1 抗体による網膜の免疫電顕
外網状層 (OPL) 領域におけるシナプス周囲に存在するミュラー細胞の突起に ASCT1 の発現が確認できる (矢頭)。
sr: シナプスリボン, *: シナプス (杆体小球または錐体小足)

(5) 発生段階中の胎仔期の眼球における Phgdh の発現についても調べた。胎仔期 13 日目では角膜上皮、水晶体上皮細胞、水晶体一次繊維、神経網膜に強い発現が示された。その後、Phgdh の発現は減少するが、水晶体上皮、神経網膜の外層領域と神経節細胞層領域は比較的強い発現を維持し続けた。このことから Phgdh は眼球の発生段階中に重要な働きをしていることが示唆される。

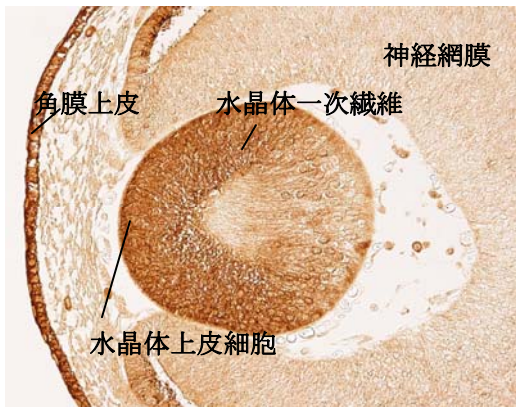


図5 胎仔期13日目の眼球における抗Phgdh抗体での免疫染色

(6)Phgdh ノックアウトマウスの網膜の形態を調べた。Phgdh ノックアウトマウスは胎生致死であるため胎生期13.5日で調査した。Phgdh ノックアウトマウスは野生型に比べ個体が著しく小さく、眼球は正常な場合と著しく異常な場合がみられた。図6では異常な形態の眼球の1つを表示した(図6下図)。将来網膜となる眼杯は正常な野生型のように杯型の形態になるが、一部に異所性の神経網膜が形成されていた。さらに、本来形成されているはずの水晶体が全く形成されていない。また、電子顕微鏡で野生型とPhgdh ノックアウトマウスの網膜を比較観察したところ、このノックアウトマウスでは個々の細胞が規則正しく層状の組織形態を形成するはずが、ランダムに配置され、層状の組織形態をしないこともあった。このことは眼の発生での網膜や水晶体を形成するための誘導や分化に影響を及ぼしているとし唆される

以上の結果を通じて、網膜において、ニューロンでは、解凍系の中間体3-ホスホグリセリン酸脱水素酵素を出発材料として合成されるセリンの合成系は行われておらず、専らL-セリンの合成は、ミューラー細胞、アストロサイトのグリア細胞で合成されている。グリア細胞で合成されたL-セリンはグリア細胞上に存在するアミノ酸トランスポーターASCT1によって放出されニューロンへ供給されると考えられる。ニューロンは解糖系のセリン合成を失うことにより、自身のグルコースの大部分をエネルギー代謝に用いているのでは推察される。今後の展望として、Phgdh ノックアウトマウスでのいろいろな発生に関与するタンパク質の発現の動向を調べることで、L-セリンの重要性を進めていく必要がある。また、網膜の疾患や損傷時でのPhgdhの発現がどのようになるか調べ、網膜の神経再生に寄与できる可能性があるか探る必要があると考える。

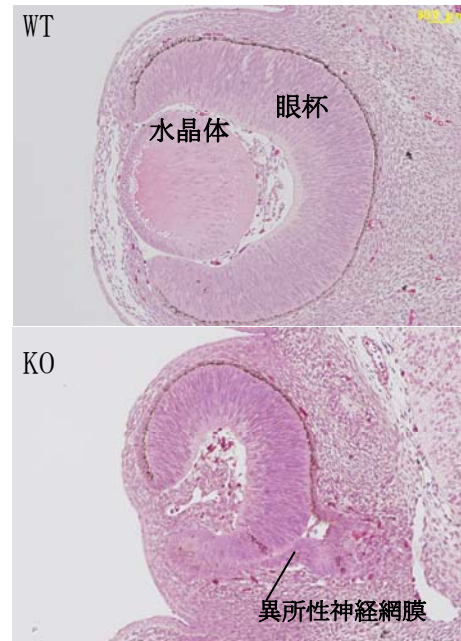


図6 胎仔期13.5日目の野生型(WT:上図)とPhgdh ノックアウトマウス(KO:下図)の網膜のヘマトキシレン・エオジン染色

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計2件)

- ① Kinoshita, O.M., Shinoda, Y., Sakai, K., Hashikawa, T., Watanabe, M., Machida, T., Hirabayashi, Y., Furuya, S. (2009) Selective up-regulation of 3-phosphoglycerate dehydrogenase (Phgdh) expression in adult subventricular zone neurogenic niche. *Neurosci. Lett.* in press 査読有
- ② Kawakami Y, Yoshida K, Yang JH, Suzuki T, Azuma N, Sakai K, Hashikawa T, Watanabe M, Yasuda K, Kuhara S, Hirabayashi Y, Furuya S. Impaired neurogenesis in embryonic spinal cord of Phgdh knockout mice, a serine deficiency disorder model. *Neurosci Res.* 2008 63(3):184-193

[学会発表] (計5件)

1. 国際学会・

- ① Sakai, K., Furuya, S., Hashikawa, T. Differential expression of L-serine synthetic enzyme 3-phosphoglycerate

dehydrogenase in the fetal and adult mouse eye. The Seventh Joint Meeting of The Japan Society of Histochemistry and Cytochemistry and The Histochemical Society, Hawaii, 2006 (USA) Aug 23-27

- ② Sakai, K., Furuya, S., Hashikawa, T. Distribution of 3-phosphoglycerate dehydrogenase (Phgdh) in the mouse retina. The 16th International Microscopy Congress (IMC16), Sapporo, 2006 (Japan) Sep 3-8
- ③ Sakai, K., Furuya, S., Hashikawa, T. Glial localization of 3-phosphoglycerate dehydrogenase for L-serine biosynthesis in the mouse retina. IBRO World Congress of Neuroscience (7th IBRO), Melbourne, 2007 (Australia) Jul 12-17

2. 国内学会

- ① 境和久、古屋茂樹、端川勉
網膜ミュラー細胞での L-セリン合成酵素 3-ホスホグリセリン酸脱水素酵素の局在
第29回日本神経科学学会, Neurosci Res., Suppl. 55, Supplement 1:S111, 2006. 7. 19-21、国立京都国際会館 (京都)
- ② 境和久 (9名中4番目)
Generation of brain-specific conditional *Phgdh* knockout mouse: A human serine deficiency model
第31回日本神経科学学会, Neurosci Res., Suppl. 61, Supplement 1:S227 2008. 7. 9-11、東京国際フォーラム (東京)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

境 和久 (SAKAI KAZUHISA)
理化学研究所・先端技術開発グループ・研究員
研究者番号：20391956

(2) 研究協力者

•Phgdh ノックアウトマウスの提供
古屋 茂樹 (FURUYA SHIGEKI)
九州大学 バイオアーキテクチャーセンター 生物機能デザイン・教授
研究者番号：00222274