

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 24 日現在

機関番号：12601

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2013

課題番号：24790207

研究課題名(和文) アストロサイトにおける情報伝達物質放出制御機構の解析

研究課題名(英文) Mechanisms of gliotransmitter release from astrocytes by imaging analysis

研究代表者

坪井 貴司 (Tsuboi, Takashi)

東京大学・総合文化研究科・准教授

研究者番号：80415231

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円、(間接経費) 1,020,000円

研究成果の概要(和文)：アストロサイトは、細胞内カルシウム濃度の上昇によってグリア情報伝達物質を放出する。様々なグリア情報伝達物質の中でもATPの放出量の低下は、適切な神経活動の抑制機能の低下を引き起こし、神経細胞の過剰な興奮を引き起こす。そこで本研究では、細胞内カルシウム濃度上昇依存的に起こるアストロサイトからのATP放出機構を明らかにすることを目的とした。解析の結果、アストロサイト内のリソソームやシナプス様小胞、そしてペプチドホルモンを含む分泌顆粒には、ATPが貯蔵されていた。また、分泌刺激に応じてリソソームや分泌小胞からATPが放出される可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：Astrocytes release variety of gliotransmitters and modulate the activity of synapse. Although gliotransmitter release from astrocytes is important for the maintaining the synaptic function, the release mechanism of gliotransmitter, especially ATP from astrocytes are not well understood. To clarify the mechanism of ATP release from astrocytes, I have performed immunocytochemical and live cell imaging analysis. I found that vesicular nucleotide transporter existed on lysosome and secretory vesicles in both primary cultured cortical astrocytes and glioma cell line C6 cells. Depletion of endogenous vesicular nucleotide transporter by small interference RNA decreased the amount of ATP release from the cells. Therefore, these data suggest that ATP-containing lysosome and secretory vesicles stored by vesicular nucleotide transporter provokes exocytosis by the increase of intracellular Ca<sup>2+</sup> elevation in astrocytes.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・生理学一般

キーワード：開口放出 アストロサイト 細胞内小器官 イメージング

## 1. 研究開始当初の背景

アストロサイトは、シナプス間に放出された神経伝達物質の回収を行い、シナプス間での神経伝達物質の濃度調節を行う。また、神経栄養因子やニューロペプチドYなどのペプチドホルモンを放出するだけでなく、グルタミン酸やD-セリン、そしてATPなどの情報伝達物質(グリア情報伝達物質)も分泌する。これらにより、アストロサイトは、ニューロンやグリア細胞間の情報伝達を調節し、神経突起の伸長やシナプス形成を促進して、神経回路形成を制御しているのではないかと考えられている。

ニューロンから放出された神経伝達物質やアストロサイト自身が放出するグリア情報伝達物質をアストロサイトが感受すると、細胞内カルシウム濃度の上昇が起こり、アストロサイトからATPが細胞外へ放出される。ATPは、細胞が利用することのできる共通のエネルギー源として細胞内に高濃度で存在するが、細胞外に放出されると、ニューロンやグリア細胞の活動を抑制する。そのため、アストロサイトから放出されるATP量が低下すると、恒常的な神経活動の抑制機能が低下するため、てんかん様の症状が引き起こされる(Halassa and Haydon, *Annu Rev Physiol* 2010, 72, 335-55)。

これまでアストロサイトからのATP放出メカニズムについては、コネキシン、塩素イオンチャンネル、マキシアニオンチャンネルなどによる拡散が主な経路だと考えられてきた(Arcuino et al., *Proc Natl Acad Sci USA* 2002, 99, 9840-5, Anderson et al., *J Neurochem* 2004, 88, 246-56)。しかし近年、細胞内小器官内にATPを輸送する小胞型ヌクレオチドトランスポーターが発見され(Sawada et al., *Proc Natl Acad Sci USA* 2008, 105, 5683-6) ATPが小胞型ヌクレオチドトランスポーターを含む分泌小胞から開口放出されるという可能性(Pangrsic et al., *J Biol Chem* 2007, 282, 28749-58)や、リソソームから放出される可能性(Zhang et al., *Nat Cell Biol* 2007, 9, 945-53)などが報告されている。しかしながら、細胞内カルシウム濃度上昇依存的に起こるATP放出メカニズムの全容解明までには、至っていないのが現状である。

## 2. 研究の目的

本研究課題では、アストロサイト内のどの細胞内小器官にATPが貯蔵されているのか、また、どのような刺激によってアストロサイトからATP放出が起こるのかを共焦点蛍光顕微鏡や全反射蛍光顕微鏡を用いて解析を試みた。また、アストロサイトにおけるATPを貯蔵する細胞内小器官と細胞膜との融合反応がどのような分子群によって調節されているのかについても、解析を試みた。これらの解析により、細胞内カルシウム濃度上昇依存的にどのようにアストロサイトからATPが

放出されるのか、その放出メカニズムを明らかにすることを目的とした。

## 3. 研究の方法

(1) アストロサイトには、グリア情報伝達物質を貯蔵するシナプス様小胞とペプチドホルモンを貯蔵する有芯小胞の2種類が存在する。そこで、シナプス様小胞の局在を可視化するために、抗小胞型グルタミン酸トランスポーター1抗体を、有芯小胞を可視化するためにニューロペプチドYに赤色蛍光タンパク質を融合させたプラスミド(NPY-mCherry)を用いた。また、リソソームを可視化するために抗lysosomal-associated membrane protein 1 (LAMP-1)抗体やLysoTracker、そしてTexasRed-dextranやカテプシンDに赤色蛍光タンパク質を融合させたプラスミド(CATH-D-mCherry)を用いた。

上記試料でアストロサイト内の細胞内小器官を蛍光標識後、抗小胞型ヌクレオチドトランスポーター抗体を用いて2重染色を行い、小胞型ヌクレオチドトランスポーターで可視化される細胞内小器官が、シナプス様小胞、有芯小胞、あるいはリソソームのうち、どの細胞内小器官なのかを蛍光免疫染色法によって検証を試みた。

(2) アストロサイトから、細胞内カルシウム濃度上昇依存的に、ATPを貯蔵する細胞内小器官からATP放出反応が起こるのかどうかを、全反射蛍光顕微鏡を用いた放出反応イメージング解析を行った。具体的には、キナクリンや蛍光標識ATPといった蛍光色素をアストロサイトに取り込ませ、イメージング解析を行った。また、小胞型ヌクレオチドトランスポーター(SLC17A9)に緑色蛍光タンパク質(GFP)を直接融合したプラスミド(GFP-SLC17A9)をアストロサイトに遺伝子導入することで、特異的なATP放出反応のイメージング解析も並行して試みた。また、アストロサイトから細胞外に放出されたATP量は、ルシフェリン・ルシフェラーゼアッセイを用いて、測定した。

## 4. 研究成果

(1) 小胞型ヌクレオチドトランスポーター(SLC17A9)に緑色蛍光タンパク質(GFP)を直接融合したプラスミド(GFP-SLC17A9)を初代培養したマウス大脳由来アストロサイトおよびラットグリオーマ由来C6細胞に遺伝子導入し、その細胞内局在を蛍光免疫染色と共焦点蛍光顕微鏡により解析した。強制発現させたGFP-SLC17A9は、細胞内で直径約300~500nm程度の蛍光輝点として観察された。ATPを貯蔵している小胞を染色できるキナクリンを用いてアストロサイトを可視化したところ、GFP-SLC17A9と共局在を示した。また、抗小胞型ヌクレオチドトランスポーター抗体で染色された細胞内小器官は、GFP-SLC17A9と共局在を示した。この

GFP-SLC17A9 は、抗小胞型グルタミン酸トランスポーター1 抗体で染色されるシナプス様小胞や NPY-mCherry で可視化される有芯小胞とも一部 共局在を示したが、主に LysoTracker や TexasRed-dextran、そして CATH-D-mCherry で蛍光染色されるリソソームと高い共局在性を示した。

(2) リソソームからの ATP 放出反応をイメージング解析するために、まずリソソーム内に存在するプロテアーゼであるカテプシン D の放出反応を CATH-D-mCherry を用いて解析した。その結果、カルシウムイオノフォア刺激により、リソソームから CATH-D-mCherry の放出反応が観察された。しかし、mCherry を N 末や C 末に融合させた小胞型ヌクレオチドトランスポーター(mCherry-SLC17A9)は、カルシウムイオノフォア刺激を与えても細胞膜へと完全に移行する放出反応は、観察できなかった。そこで、小胞型ヌクレオチドトランスポーターの内部に mCherry を融合させたプラスミドを作製し (SLC17A9-intra-mCherry)、カルシウムイオノフォア刺激を与えたところ、CATH-D-mCherry で観察されたリソソームからの CATH-D-mCherry の放出反応よりもさらに遅い数十秒間程度持続する細胞膜との融合反応が観察された。また、リソソームからの CATH-D-mCherry の放出反応や SLC17A9-intra-mCherry の細胞膜との融合反応は、カルシウムイオノフォアや ATP、そしてグルタミン酸の投与によって起こることが分かった。

(3) mCherry-SLC17A9 を過剰発現させたアストロサイトに ATP を貯蔵している細胞内小器官を蛍光標識できる蛍光標識 ATP (MANT-ATP) を負荷し、その細胞内局在を解析した。その結果、MANT-ATP で蛍光標識される細胞内小器官は、mCherry-SLC17A9、つまりリソソームと高い共局在を示した。また、小胞型ヌクレオチドトランスポーターの機能を阻害する Evans Blue をアストロサイトに投与すると、MANT-ATP で標識される蛍光輝点が観察できなかった。このことから、リソソームに存在する小胞型ヌクレオチドトランスポーターは、リソソーム内へ ATP を輸送する可能性が示唆された。

(4) アストロサイトに発現している内在性の小胞型ヌクレオチドトランスポーターを RNA 干渉法を用いて遺伝子発現を抑制し、細胞外に放出される ATP 量をルシフェリン・ルシフェラーゼアッセイによって測定した。その結果、カルシウムイオノフォア刺激によって放出される ATP が抑制された。また、Evans Blue 投与によっても同様に ATP 放出量が抑制された。一方、スクランブル siRNA は、ATP 放出量に何の影響も与えなかったが、小胞型ヌクレオチドトランスポーターを過剰発現

させた場合は、細胞外に放出される ATP 量が増加した。これらの結果から、アストロサイトからの ATP 放出は、小胞型ヌクレオチドトランスポーターが存在するリソソームから放出されることが示唆された。

#### 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 3件)

Oya M, Kitaguchi T, Yanagihara Y, Numano R, Kakeyama M, Ikematsu K, Tsuboi T. Vesicular nucleotide transporter is involved in ATP storage of secretory lysosomes in astrocytes. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 438, 145-151 (2013)、査読有  
doi: 10.1016/j.bbrc.2013.07.043

Kitaguchi T, Oya M, Wada Y, Tsuboi T, Miyawaki A. Extracellular calcium influx activates adenylate cyclase 1 and potentiates insulin secretion in MIN6 cells. *Biochemical Journal*, 450, 365-373 (2013)、査読有  
doi: 10.1042/BJ20121022

Oya M, Kitaguchi T, Pais R, Reimann F, Gribble F, Tsuboi T. The G-protein-coupled receptor family C group 6 subtype A (GPC6A) receptor is involved in amino acid-induced glucagon-like peptide-1 secretion from GLUTag cells. *Journal of Biological Chemistry*, 288, 4513-4521 (2013)、査読有  
doi: 10.1074/jbc.M112.402677

[学会発表](計 3件)

坪井貴司、大屋愛実、北口哲也. 「小胞型ヌクレオチドトランスポーターによるリソソームを介した ATP 分泌制御機構の解析」、第91回日本生理学会大会、2014年3月17日、鹿児島大学郡元キャンパス、鹿児島県鹿児島市

大屋愛実、北口哲也、坪井貴司. 「アミノ酸依存性グルカゴン様ペプチド-1 ホルモン分泌メカニズムの解析」、第36回日本神経科学大会、2013年6月20日、国立京都国際会館、京都府京都市

坪井貴司. 「小腸内分泌細胞および膵細胞機能のライブイメージング解析」、第118回日本解剖学会総会、2013年3月29日、サンポートホール高松・かがわ国際会議場、香川県高松市

[図書](計 0件)

〔産業財産権〕

出願状況（計 0 件）

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
国内外の別：

取得状況（計 0 件）

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年月日：  
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

坪井 貴司 (TSUBOI TAKASHI)  
東京大学・大学院総合文化研究科・准教授  
研究者番号：80415231

##### (2) 研究分担者

( )

研究者番号：

##### (3) 連携研究者

( )

研究者番号：