

氏 名	まつ 松 永 渉
学位(専攻分野)	博 士 (学 術)
学 位 記 番 号	博 甲 第 234 号
学位授与の日付	平成13年3月26日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当
研究科・専攻	工芸科学研究科 機能科学専攻
学位論文題目	The role of microtubule proteins for morphological plasticity in neurohypophysial astrocytes
審 査 委 員	(主査) 教 授 清 原 壽 一 教 授 遠 藤 泰 久 教 授 宗 川 吉 汪

論 文 内 容 の 要 旨

申請論文は6章から構成されており、第一章の序論と第六章の総論を除いて、要旨は以下の通りである。

第二章は、急性および慢性高浸透圧刺激が、視床下部の視索上核におけるFos発現と細胞体の形態変化に与える影響を、コントロールおよび第三脳室前腹側部 (AV3V) を電気破壊したラットで調べた。コントロールラットでは、慢性および急性の高浸透圧刺激後、視索上核とAV3Vで多数のFos陽性細胞が観察された。しかし、AV3Vを電気破壊したラットでは、高浸透圧刺激後のFos発現は観察されなかった。また、慢性高浸透圧刺激は、コントロールラットにおいて、オキシトシン性およびバソプレッシン性大細胞ニューロンの細胞体のサイズの著しい増大を引き起こしたが、AV3Vを破壊したラットでは、刺激後も細胞体のサイズの変化はなかった。これらの結果は、AV3Vからの神経入力、視床下部の大細胞性ニューロンのFos発現や形態変化に重要な役割を果たしていることを示しており、AV3Vが浸透圧調節機構で重要な役割を果たしていることを示唆している。

第三章では、微小管結合タンパクの一つ、MAP2の視床下部-下垂体後葉系における局在を、ウエスタンブロッティングと免疫染色を用いて調べている。高分子型MAP2は、実験に用いた全ての脳の部位から検出されたが、低分子型MAP2は、成熟脳では下垂体後葉からしか検出されなかった。ウエスタンブロッティングの結果を比較すると、下垂体後葉の低分子型MAP2のバンドは胎児脳のそれよりもわずかに高分子側に位置していたことから、下垂体後葉の低分子型MAP2のisoformはMAP2dであると考えられた。また、免疫染色の結果、下垂体後葉のMAP2は主としてグリア細胞に分布していることがわかった。

低分子型MAP2は、胎児脳には多く発現しているが、成熟した脳では消失している幼若性タンパクとして知られている。本研究は、成熟固体の下垂体後葉のアストロサイトにおいて、低分子型MAP2が発現していることを示した。このような幼若性タンパクの発現は、下垂体後葉のアストロサイトの形態的可塑性と関係しているものと考えられる。

第四章は、画像解析による慢性高浸透圧刺激による下垂体後葉アストロサイトの形態変化を調べることを目的としている。顕微鏡レベルの観察によると、正常ラットでは、MAP2免疫陽性アストロサイトは、細長い突起を多数伸ばした形態であった。慢性高浸透圧刺激後では、下垂体後葉のMAP2染色されたアストロサイトは、正常飲水ラットと比較して突起は短くなり、数も減っていたが、刺激中断後、真水を飲ませることで回復していた。顕微鏡による観察の結果、MAP2免疫反応は下垂体後葉ではアストロサイトのみ分布していることが分かり、一般的なアストロサイトのマーカーであるGFAPよりもMAP2が優れていると

判断されたので、MAP2形態のマーカーに用いて画像解析を行った。その結果、慢性高浸透圧刺激が下垂体後葉アストロサイトのセルサイズ、周囲長、突起の長さを著しく減少させることを証明した。

第五章では、下垂体後葉の形態変化に関与する分子的な背景を調べるため、RT-PCR、ウェスタンブロッティングおよび免疫染色で、成熟ラットの下垂体後葉のアストロサイトのtubulinとMAP2dの発現を調べた。MAP2d mRNAは下垂体後葉、大脳皮質、小脳から検出されたが、タンパクレベルのMAP2d発現が見られたのは下垂体後葉だけであった。また、下垂体後葉でも他の脳の部位と同じくtubulinが検出されたが、その含量は脳の他の部位と比べてかなり少なかった。共焦点レーザー顕微鏡による観察で、下垂体後葉ではGFAP免疫陽性のアストロサイトには強いtubulinの免疫反応が観察されたが、大脳皮質、小脳、視索上核のアストロサイトでtubulinの免疫反応は観察されなかった。しかし、大脳皮質の損傷部周辺の反応性アストロサイトではtubulin免疫反応が観察された。Tubulinで免疫染色した下垂体後葉アストロサイトの電顕レベルの観察では、微小管と思われる細胞質中の直径25nmの繊維上にtubulinの免疫反応物が観察された。この結果、成熟固体の下垂体後葉のアストロサイトは、脳の他の部位に比べて著しく多いMAP2dとtubulinを発現していることを証明した。そして、これらMAP2dとtubulinは、下垂体後葉アストロサイトの形態変化に関与していると思われる。

論文審査の結果の要旨

本論文は、中枢神経系で観察される形態的可塑性の分子的な背景を解明することを目的としており、主としてアストロサイトの微小管タンパクに注目して研究が行われている。まず、浸透圧受容部位を破壊すると、視床下部における高浸透圧刺激時の神経細胞の形態変化が阻害されたことから、ニューロンの形態変化には神経性の入力が必要であることを明らかにした。下垂体後葉のアストロサイトからは、脳内の、一般的な他の部位のアストロサイトでは見られない微小管の構成タンパクであるtubulinと、微小管関連タンパクの一種であるMAP2dの発現が観察され、慢性的な生理刺激によって起こる下垂体後葉の可逆的な形態変化に関連していると考えられる。更に、MAP2をマーカーとした定量的画像解析で、高浸透圧刺激時の下垂体後葉におけるアストロサイトの退縮を初めて証明した。

以上の結果は、中枢神経における形態変化の機能解明において重要な示唆を与えるものである。また、機能に不明な点が多いMAP2dの機能を研究する上での重要なモデルシステムを提供する結果が得られている。

本論文は以下の四篇の論文を基礎としている。

- 1) Matsunaga, W., Miyata, S., Hashimoto, Y., Lin, S-H., Nakashima, T., Kiyohara, T. and Matsumoto, T. Microtubule-associated protein-2 in the hypothalamo-neurohypophysial system: low-molecular-weight microtubule-associated protein-2 in pituitary astrocytes. *Neuroscience*, 88, 1289-1297, 1999
- 2) Matsunaga, W., Miyata, S. and Kiyohara, T. Redistribution of MAP2 immunoreactivity in the neurohypophysial astrocytes of adult rats during dehydration. *Brain Res.*, 829, 7-17, 1999
- 3) Matsunaga, W., Miyama, S., Takamata, A., Bun, H., Nakashima, T. and Kiyohara, T. LPS-induced Fos expression in oxytocin and vasopressin neurons of the rat hypothalamus. *Brain Res.*, 858, 9-18, 2000
- 4) Matsunaga, W., Miyata, S., Itoh, M., Kiyohara, T. and Maekawa, S. Expression of high levels of tubulin and microtubule-associated protein-2d in the neurohypophysial astrocytes of adult rat. *Neuroscience*, 2000 (in press)