

蛍光イメージング法を用いた神経細胞における  
細胞内マグネシウムイオン濃度調節機構に関する研究

2015 年度

山中 龍

# 主 論 文 要 旨

報告番号	甲 乙 第	号	氏 名	山中 龍
主論文題目： 蛍光イメージング法を用いた神経細胞における 細胞内マグネシウムイオン濃度調節機構に関する研究				
(内容の要旨) マグネシウムイオン ( $Mg^{2+}$ ) は癌，糖尿病，心臓病，呼吸器疾患，骨粗鬆症，神経疾患に関わる重要な 2 価陽イオンである。神経疾患に関しては，パーキンソン病，アルツハイマー病，うつ病，偏頭痛，てんかん，脳損傷との関わりが知られている。また，細胞内 $Mg^{2+}$ は約 600 種類の酵素活性の制御，エネルギー代謝，DNA 及び RNA の構造安定化，イオンチャネル活性の制御を行なうことが報告されており，最近ではセカンドメッセンジャーとしての機能を果たすことも明らかになってきた。しかし，神経細胞における細胞内 $Mg^{2+}$ の調節機構の詳細は未だ明らかではない。本研究では，神経細胞内でいつ・どこで・どのように $Mg^{2+}$ 濃度が変化するかを明らかにすることを目的として，蛍光イメージング法を用いた神経細胞内 $Mg^{2+}$ 動態の解析を行なった。  第 1 章は緒言で，本論文の概要を説明し，細胞内 $Mg^{2+}$ の調節機構とその役割に関する研究背景について述べ，続いて研究目的および論文構成について述べた。  第 2 章では，分散培養したラット胎児海馬神経細胞を用いて，神経伝達物質である一酸化窒素 (NO) によって誘導される細胞内 $Mg^{2+}$ 濃度変化に関して述べた。活性化剤と阻害剤を用いた実験から，NO/cGMP/PKG 経路によるミトコンドリアの ATP 作動性 $K^+$ チャネル (mitoK <sub>ATP</sub> チャネル) の開口を介して，ミトコンドリアからの $Mg^{2+}$ 放出を誘導することを示した。また，このミトコンドリアからの $Mg^{2+}$ 放出は mitoK <sub>ATP</sub> チャネルの開口，ミトコンドリアの脱分極，PKC の活性化から形成されるポジティブフィードバックによって増強されることを明らかにした。mitoK <sub>ATP</sub> チャネル活性化は細胞ストレスに対する保護機能を持っていることが知られていることから，このポジティブフィードバックは細胞内 $Mg^{2+}$ の細胞保護機能への寄与を示唆する。  第 3 章では，生理的条件下での神経活動時における神経細胞内 $Mg^{2+}$ 濃度変化に関して述べた。蛍光イメージング法を用いた実験によって，透明ガラス電極 (ITO 電極) を介した電流刺激によって神経細胞内の $Mg^{2+}$ 濃度上昇を誘導できることを示した。また，神経自発活動に伴って細胞内 $Mg^{2+}$ 濃度上昇が起こることを示した。この細胞内 $Mg^{2+}$ 濃度上昇は， $Mg^{2+}$ を含まない細胞外液中では起こらないため，細胞外からの $Mg^{2+}$ 流入が原因であることを明らかにした。また，神経細胞の脱分極誘導剤と阻害剤を用いた実験によって，神経脱分極による $Mg^{2+}$ 流入の分子メカニズムに関して議論した。生理的条件下における通常の神経活動において細胞内 $Mg^{2+}$ 濃度が変化することは，細胞内 $Mg^{2+}$ が神経機能の調節を行なっていることを示唆した。  第 4 章は本論文の総括で，第 2・3 章で解明した神経細胞における細胞内 $Mg^{2+}$ 濃度変化が細胞機能に与える影響や，神経疾患との関連性について展望を含め議論した。				
				以上

## SUMMARY OF Ph.D. DISSERTATION

Fundamental Science and Technology	Student Identification Number	SURNAME, First name YAMANAKA, Ryu
Title Regulatory System of Intracellular Magnesium Ion in Neurons		
Abstract <p>In nervous system, magnesium ion (<math>Mg^{2+}</math>) is involved in several neuronal diseases: Parkinson's Disease, Alzheimer's Disease and etc. Intracellular <math>Mg^{2+}</math> are associated with regulation of over 600 enzymatic activities, regulation of ion channels, energy metabolism and stabilities of DNA and RNA structures. In addition, recent studies reported the role of intracellular <math>Mg^{2+}</math> as a second messenger. However, it is little known about the regulatory mechanism of intracellular <math>Mg^{2+}</math> in neurons. The purpose of the present dissertation is to unveil modulatory system of intracellular <math>Mg^{2+}</math> in neurons by using fluorescent imaging.</p> <p>In Chapter 1, regulatory system of <math>Mg^{2+}</math> and its roles were overviewed. And, the purpose of the present dissertation was introduced.</p> <p>Chapter 2 presents a study on nitric oxide (NO)-induced <math>Mg^{2+}</math> mobilization in rat hippocampal neurons. In primary isolated and cultured hippocampal neurons from embryonic (E18) rat, intracellular <math>Mg^{2+}</math> dynamics during NO application was measured by using intracellular <math>Mg^{2+}</math> fluorescence indicator, KMG-104. Pharmaceutical experiments using several agonists and inhibitors revealed that mitochondrial ATP-sensitive <math>K^+</math> channel (mitoK<sub>ATP</sub> channel) activation mediated by NO/cGMP/PKG signaling pathway induces <math>Mg^{2+}</math> release from mitochondria <i>via</i> depolarization in mitochondrial membrane potential. In addition, this mitochondrial <math>Mg^{2+}</math> release was potentiated by positive feedback loops composed by mitoK<sub>ATP</sub> channel opening, mitochondrial depolarization and protein kinase C (PKC) activation.</p> <p>Chapter 3 presents a study on neural depolarization-induced <math>Mg^{2+}</math> mobilization by the same methods as used at Chapter 2. Extrinsic electric current stimulation or spontaneous neural activity induced <math>Mg^{2+}</math> influx in hippocampal neurons. And, the regulatory mechanism of <math>Mg^{2+}</math> influx was investigated by several pharmaceutical experiments using a neural depolarizer and an inhibitor.</p> <p>Chapter 4 presents the conclusion and prospective. The findings in the present doctoral dissertation were summarized, and current and future perspectives were discussed.</p>		