

論文審査の結果の要旨

論文提出者氏名 向井秀夫

本研究では、神経ステロイドの脳の神経情報伝達に対する効果を明らかにすることを目的として、N-メチル-D-アスパラギン酸 (NMDA) 型グルタミン酸受容体 (NMDA 受容体)、中でも出生以前の胎児期から発現している GluR ϵ 2 サブユニットを持つ GluR ϵ 2/ ζ 1 型の受容体に作用してカルシウム流入を制御している可能性をカルシウムイメージングで解析した。さらに、NMDA 受容体からのカルシウム信号に依存する神経細胞の重要な機能として、近年注目を集めている新しい伝達物質一酸化窒素 (NO) の産生が如何に制御されるかをイメージングによる解析で明らかにした。

本研究では、神経ステロイドの NMDA 受容体に対する直接の効果を検出するために、熱ショックにより、NMDA 受容体サブユニットの特定の組み合わせを発現する CHO 細胞を作成し用いた。神経ステロイドは、核内受容体を通しての遺伝子転写ではなく、急性的にその効果を発揮するという作用が最近明らかになりつつある。例えば、脳内に最も多く存在する神経ステロイドの 1 つである硫酸プレグネノロンは、老齢ラットの記憶を改善することが知られている。しかし機構の詳細は未だ知られておらず、NMDA 受容体はその作用部位の最も重要な候補の一つである。NMDA 受容体のサブユニット分布は脳の発達の時期及び部位特異的にダイナミックに変化するため、どのサブユニットの組み合わせに神経ステロイドが効果をもつかは重要である。培養神経細胞では、一般に NMDA 受容体のサブユニットを複数種類発現しているため、このような検討はできない。この CHO 細胞は、5%CO₂ 下で 43℃、2 時間の熱ショックをかけると、9~15 時間後に NMDA 受容体を発現する。

NMDA 受容体に対する神経ステロイドの効果は、カルシウム感受性蛍光色素の Fura-2 を細胞に負荷し、個々の細胞を蛍光顕微イメージングすることで測定した。

神経ステロイドのうち、硫酸プレグネノロン (Pregnenolone Sulfate, PREGS) が GluR ϵ 1 と GluR ζ 1 サブユニットから成る NMDA 受容体だけではなく、GluR ϵ 2 と GluR ζ 1 サブユニットから成る受容体にも作用して NMDA 受容体からのカルシウム流入を増強しうることを初めて見出した。増強の効果は濃度依存的 (1 μ M~100 μ M) に現れた。はじめの NMDA のみによるカルシウム信号を 100%としたとき、1 μ M、10 μ M、50 μ M、100 μ M の PREGS によってそれぞれ信号は、101%、118%、132%、141%に増強された。この結果は、PREGS が、GluR ϵ 2/ ζ 1 型受容体にも作用し得ることを示している。

次に、他の硫酸基をもつステロイドが NMDA 受容体への硫酸プレグネノロンの作用にどの

ような影響を及ぼすかをカルシウム信号で検討した。倍濃度 (100 μ M) の硫酸デヒドロエピアンドロステロンを硫酸プレグネノロン (50 μ M) と同時に加えた結果、硫酸プレグネノロンの増強効果を抑える (132%→105%) ことがわかった。また同様に、倍濃度 (100 μ M) の硫酸エストラジオールも硫酸プレグネノロンに対し抑制的な効果 (94%) をもつことが判明した。これらの結果から、硫酸プレグネノロンの硫酸基は受容体との相互作用に参与している可能性が示唆された。また、3 α -ol-5 β -pregnan-20-one sulfate (3 α 5 β S) は、濃度 100 μ M で硫酸プレグネノロンのみならず、NMDA の効果も抑える (52%) ことが明らかになった。このことは、3 α 5 β S は他の硫酸化ステロイドと違う様式で NMDA 受容体と作用していることを示している。

最近、川戸研究室でラット海馬神経細胞に、チトクロム P450_{scc} をはじめとする、ステロイド産生機構が局在していることが発見された。このことにより、神経細胞が自ら神経ステロイドを合成している可能性が強く示唆されている。また、胎児期の硫酸プレグネノロン濃度は、生後よりも 10 倍程度高いことが知られている。本研究で対象とした GluR ϵ 2/1 受容体の一方をなす GluR ϵ 2 サブユニットは、生後数日で初めて GluR ϵ 1 サブユニットと異なり、胎児期から発現しているため、本研究で、神経細胞によって合成されている硫酸プレグネノロンが脳の発生時期にも働いている可能性が示唆された。

NO の二次元イメージングは、NO が活性分子種であり、適当な蛍光指示薬がなかったため、今まで非常に困難であった。本研究では、神経型一酸化窒素合成酵素 (nNOS) を上記の CHO 細胞に発現し、最近新たに作成された NO 感受性蛍光色素である DAF-2DA を用い、NMDA 受容体からのカルシウム信号が単一細胞レベルで NO の産生に変換される様子を可視化した。NMDA 受容体からのカルシウム流入による NO 産生は、NMDA (100 μ M) のみの時よりも硫酸プレグネノロンを加えた時の場合が産生が大きいことが見出された。これは NMDA 受容体チャネルからのカルシウム流入の大きさが NO 産生の違いとして現れてくることを意味しており、神経ステロイドの効果の一端が NO 産生にあることを示唆している。

以上を要約すると、本研究では、神経ステロイドである硫酸プレグネノロンが GluR ϵ 2/1 型の NMDA 受容体を介する Ca²⁺信号を増強することを初めて明らかにした。また、NO 信号が硫酸プレグネノロンによる増強を受けることを NO のイメージングで初めて観測した。これらの発見により、生物物理学的手法を用いて神経科学上有意義な貢献をしたものと認められる。

よって審査委員一同、論文提出者向井秀夫は東京大学博士 (学術) の学位を受けるに十分な資格があるものと認めた。なお、本論文の内容は Neuroscience Letters 誌にて公刊されている。これは共著論文であるが、論文提出者はその全てにおいて研究の主要部分に寄与したものであることを確認した。