

論文審査の結果の要旨

氏名 高橋 泰城

本研究の目的はステロイドホルモンが記憶学習能にあたる影響の神経機構を研究することである。論文提出者は、シナプス可塑性を調節する NMDA 受容体経路の Ca 信号の時間変化が、ステロイドホルモンのうち特にコルチコステロン（ストレスステロイドの一種）によってどのように制御されているかを、神経細胞内 Ca やミトコンドリアの膜電位の蛍光顕微イメージングによって解析した。

単一神経細胞での解析を行うため、論文提出者は、誕生後 3-5 日目のウィスターラットより調製した海馬神経細胞を用い、培養開始後 7-10 日経過後に蛍光測定をおこなった。

Ca 感受性蛍光色素 fura-2 を負荷した海馬神経細胞に $100\ \mu\text{M}$ の NMDA を投与したところ一時的な細胞内 Ca 濃度上昇が 94.6% の海馬神経細胞において発生し、上昇した細胞内 Ca 濃度は一分以内に NMDA 刺激前の値に戻った。所が $1\ \mu\text{M}$ 以上のコルチコステロンで神経細胞を処理した後、 $100\ \mu\text{M}$ の NMDA を投与することにより、10 分以上にわたる非常に延長された神経細胞内 Ca 濃度上昇が 88.1% の海馬神経細胞において生じることを発見した。コルチコステロンによって Ca 信号が延長された神経細胞の割合は、前処理に用いたコルチコステロンの濃度上昇につれて増加することも見出した。

海馬神経細胞を $10\ \mu\text{M}$ のコルチコステロンで処理した後、 $100\ \mu\text{M}$ の NMDA を投与し、延長型の Ca 信号が発生している状態で、NMDA 受容体を阻害すると、すみやかに Ca 信号が消失したことから、コルチコステロンによる効果は NMDA 受容体経路の Ca 信号に対して作用していることと、神経細胞の Ca の排出能は阻害されていないことが解明された。さらに、コルチコステロンの存在により延長型 Ca 信号が発生している状態でコルチコステロンを洗い流すと、Ca 信号が消失し、その後 NMDA を加えると再び一時的な Ca 信号が発生したことから、コルチコステロンの作用は可逆的であることが示唆された。次に、細胞内 Ca ストアの寄与を調べるために細胞内 Ca ストアを枯渇させた条件下で、Ca 信号を計測した。その結果、今回見出した、コルチコステロンによって延長された Ca 信号には、細胞内 Ca ストアの寄与はほとんどないことが分かった。さらに、神経細胞膜上の電位感受性 Ca チャネル経路の Ca 流入が本研究で測定している Ca 信号に寄与しているのかを調べるため、L-type 電位依存性 Ca

チャンネルを阻害した条件で、コルチコステロンの効果を解析した結果、電位感受性チャンネルの寄与は否定された。

次に、海馬神経細胞を、コルチコステロンと同時にシクロヘキシミド(タンパク合成の阻害剤)で処理した後に $100\mu\text{M}$ の NMDA を投与しても、85.1%の神経細胞で延長型の Ca^{2+} 信号が観察された。この結果やコルチコステロンの効果が可逆的である事などから論文提出者はコルチコステロンが NMDA 受容体経由の Ca 信号に与える延長効果が古典的ステロイド作用によるものではないと結論した。

次に、Ca 信号が海馬神経細胞機能に与える影響を調べるために、神経細胞に $0.2\mu\text{M}$ の rhodamine 123 を負荷してから $100\mu\text{M}$ の NMDA を作用させ、rhodamine 123 の蛍光を測定することにより一時的な蛍光強度の低下がおこることを見出した。神経細胞を、20 分間コルチコステロンで処理してから NMDA を投与すると、rhodamine 123 の蛍光は低下し、そのままミトコンドリアはもとの膜電位を回復しない状態が継続した。このように、コルチコステロン存在下と非存在下におけるミトコンドリア膜電位の時間変化のパターンの違いは、Ca 信号の場合と一致していた。

また、コルチコステロンのアゴニストであるデキサメサゾンやコルチゾールも海馬神経細胞において、Ca 信号の延長効果を引き起こすことを発見した。さらに、プロゲステロンをコルチコステロンとともに海馬神経細胞に対して処理してやると、コルチコステロンによる Ca 信号への作用は阻害されるが、プロゲステロンそれ自体は NMDA 投与による Ca 信号には影響しないことも論文提出者は見出した。一方、ラットの空間学習能を向上させる硫酸プレグネノロンで海馬神経細胞を処理した後、NMDA を投与したところ、約 1.5 倍の Ca 信号が海馬神経細胞において観察されたがこの Ca 信号はコルチコステロンの場合と異なり、延長型ではなかった。

以上を要約すると、論文提出者は、ストレスステロイドは膜上の受容体を介する全く新しい経路で急性的に Ca 信号を延長させ、神経細胞のミトコンドリア膜電位を持続的に低下させるということを見出した、という点において、神経生物物理学上有意義な貢献をしたものと認められる。よって審査員一同、博士(理学)にふさわしい研究であると判断した。

したがって、博士(理学)の学位を授与できると認める。