

論文の内容の要旨

論文題目 海馬における一酸化窒素産生の可視化解析

氏名 高田 則雄

本研究は、ラットの海馬スライスにおける一酸化窒素 (nitric oxide; NO) 産生を NO 感受性蛍光色素を用いて可視化解析するとともに、神経ステロイドのひとつである硫酸プレグネノロン (pregnenolone sulfate; PREGS) の NO 産生に与える作用を調べた。その結果、PREGS が海馬 NO 産生量を増大する作用を持つことを発見した。

海馬は記憶に重要な働きを持つことが知られている。ヒトの事例では、H.M. というユニシャルで知られる、てんかんの治療のため海馬を両側性に切除された患者が有名である。H.M. は 1953 年の手術以前の記憶は保持しているが、海馬を切除した後は物事を憶えることができなくなった。1973 年に Bliss と Lømo らによってラットの海馬に於いてシナプス伝達効率の長期増強 (long term potentiation; LTP) が報告されると、LTP は記憶の素過程ではないかと注目を集めた。LTP とは、海馬を高頻度に電気刺激すると、刺激後数 10 分以上シナプス伝達効率が上昇したままになる現象を言う。その後の研究によって、LTP の発現には海馬神経細胞の細胞膜に存在する NMDA 受容体が重要であることが知られている。NMDA 受容体は神経細胞が強く興奮した時にだけ、細胞外のカルシウム (Ca^{2+}) を細胞内に流入させる。NMDA 受容体からの Ca^{2+} 流入を阻害すると LTP が阻害されてしまうことも報告されている。

海馬において一酸化窒素 (NO) は、一酸化窒素合成酵素 (nitric oxide synthase; NOS) によって作られる。NO は他の多くの神経情報伝達物質と異なり、細胞膜を自由に

透過できる拡散性の情報伝達物質である。生体内での NO の半減期は数秒と言われている。NO はシナプス後膜からシナプス前膜へと細胞膜を透過する逆行性情報伝達物質と予想されて注目を集めた。海馬に存在する神経型一酸化窒素合成酵素 (nNOS) は Ca^{2+} 依存的に NO を作る。nNOS は NMDA 受容体に結合することが知られているので、nNOS は NMDA 受容体から流入する Ca^{2+} に非常に敏感に応答して NO を作ると考えられている。海馬における NO 産生を阻害すると LTP も阻害されてしまうので、NMDA 受容体から Ca^{2+} が流入して一酸化窒素合成酵素が NO を産生することが、海馬における LTP の発現に必要であるとの報告がある。

硫酸プレグネノロン (PREGS) をネズミの海馬にごく微量注入すると、記憶力が非常に良くなることが知られている。PREGS の作用の分子機構としては、PREGS は NMDA 受容体に作用して、NMDA 受容体経路の Ca^{2+} 流入を増大することが知られている。最近、東京大学の川戸研究室によって、海馬を NMDA で刺激して NMDA 受容体から Ca^{2+} を流入させると、海馬自身が PREGS を作ることを示された。PREGS は NMDA 受容体に作用して NMDA 受容体経路の Ca^{2+} 流入量を増大させるが、この Ca^{2+} 流入量の増大がその後の神経細胞内の情報伝達にどのような影響を持つかは知られていない。本研究では、NMDA 受容体に結合している、 Ca^{2+} 依存的に NO を作る蛋白質である神経型一酸化窒素合成酵素 (nNOS) に着目した。PREGS による NMDA 受容体経路の Ca^{2+} 流入量の増大が NO 産生を増量する程十分なものであるかどうかを検証した。そのために、近年開発された NO 感受性蛍光色素 DAF-FM を用いて、海馬スライスにおける NO 産生の蛍光測定を行った。

PREGS の研究は分散培養細胞を用いたものが多かったので、まず初めに、海馬スライスの場合でも NMDA 刺激時の Ca^{2+} 応答が PREGS によって増強されるかどうかを Ca^{2+} 感受性蛍光色素 fura-2 を用いて確認した。PREGS がない場合には、1 mM の NMDA で海馬を刺激すると細胞内カルシウム濃度に対応する fura-2 蛍光強度の比 f340/f380 は 0.53 から 30 秒の間に 0.79 に上昇した。その後 f340/f380 は 0.66 にまで減少した。NMDA 刺激 20 分前から海馬スライスに 10 μM の PREGS を投与した場合は NMDA 刺激によって、f340/f380 は 0.53 から 20 秒間の間に急上昇して 1.01 になり、その後 0.72 まで減少した。このことから、PREGS が海馬スライスにおいても NMDA 刺激時のカルシウム応答を増強することが明らかとなった。

次に、PREGS による海馬スライスのカルシウム応答の増大が、海馬における NO 産生を増大できるかどうかを検証した。PREGS がない場合に、1 mM の NMDA で海馬を刺激すると NO 産生量に対応する DAF-FM 蛍光強度が 26% 上昇した。NMDA 刺激 20 分前から海馬スライスに 100 μM の PREGS を投与した場合には、NMDA 刺激による DAF-FM 蛍光強度の上昇が 48% に増大することが判明した。NMDA 刺激による DAF-FM 蛍光強度の上昇は NO 合成酵素の阻害剤である L-NMMA や NMDA 受容体の阻害剤である MK801 によって抑制された。以上の結果から、PREGS は NMDA 刺激時の NO 産生を増

強することが判明した。

NMDA 刺激によって海馬自身が PREGS を産生することを考慮すると、生体内における PREGS の作用機構として、以下のようなモデルが考えられる。シナプス前終末からグルタミン酸が放出され後シナプス神経細胞が強く興奮すると NMDA 受容体が活性化されて Ca^{2+} が流入する。流入した Ca^{2+} は NO を産生するとともに PREGS の産生を引き起こす。産生された PREGS は NMDA 受容体に作用して Ca^{2+} 流入を増大する。その結果 NO の産生が増強される。以上のように、NMDA 受容体を開くほど強く興奮した海馬神経細胞にとって、PREGS は神経情報の増幅物質として働いていると考えられる。なお、PREGS による神経情報増幅の発散を防ぐであろう、以下のような機構が知られている。まず、NMDA 受容体からの Ca^{2+} 流入による PREGS の産生は一過性であり、いつまでも産生されている訳ではない。また、産生された PREGS は順次、PREGS 以降のステロイドに変換されて行くので、時間と共に PREGS の濃度は下がってゆく。さらに、産生された NO 自身が NMDA 受容体に作用して Ca^{2+} 流入を抑制することが知られている。

本研究によって、硫酸プレグネノロン (PREGS) が NMDA 刺激時の海馬における NO 産生を増強することが明らかとなった。NO の産生が LTP の成立に必要なであるとの報告を考え合わせると、PREGS の記憶増強作用は PREGS による NO 産生の増大が原因であるのかもしれない。