

論文審査の結果の要旨

論文提出者氏名 高田則雄

本研究は、海馬スライスを刺激した時の一酸化窒素 (nitric oxide; NO) 産生の二次元直接測定を行うことを目的として行われた。初めに NO 感受性蛍光色素 DAF-FM を用いて海馬における NO 産生の蛍光測定法を確立し、ニューロステロイドである硫酸プレグネノロンの NO 産生に与える効果を測定した。さらに、改良型 NO 感受性蛍光色素 DAR-4M を用いて NMDA 刺激時の海馬各領域における NO 産生量を比較するとともに、テタヌス刺激時の海馬 CA1 領野の NO 量を測定した。また、海馬のカルシウム信号も計測することでカルシウム信号の大きさと NO 量の対応を調べた。

海馬において NO は、一酸化窒素合成酵素 (nitric oxide synthase; NOS) によって産生される。NOS はカルシウムに依存して NO を産生する蛋白質であることが知られている。海馬の主要な神経細胞は NOS を持つことが示されている。NO の測定法には海馬神経組織をすり潰すなどして海馬全体の平均の NO 量を測る手法などしかなかったために、NO 量の空間分布を知ることはできなかった。NO は海馬で多様な作用を持ち、NO の濃度によって異なる生理作用を発揮することすらあると報告されている。そのため、NO 量の空間情報を知ることは NO の生理を理解するうえで重要であることが本論文で指摘されている。

海馬スライスにおける NO 産生の二次元分布の測定を目的として、本研究ではまず初めに NO 感受性蛍光色素 DAF-FM を用いている。一般の測定方法では海馬を刺激した時に DAF-FM の蛍光強度が低下してしまうという問題があった。本研究では海馬スライスを保存する人工脳脊髄液中のグルコースをピルビン酸に置き換えるという手法を用いて、DAF-FM 蛍光強度の低下を防ぎ、海馬における NO 産生の蛍光測定に成功している。DAF-FM を用いた研究では、ニューロステロイドの一種である硫酸プレグネノロンの海馬における NO 産生に与える効果を測定した。その結果、硫酸プレグネノロンは NMDA 受容体経路のカルシウム流入を増やすことで海馬における NO 産生量を増強することを発見した。

本研究では次に改良型 NO 感受性蛍光色素 DAR-4M を用いた測定を行っている。その結果、DAR-4M を用いて NMDA で刺激した時の海馬 CA1、CA3、DG 各領域における NO 産生量の比較を行った。NMDA とは NMDA 型グルタミン酸受容体だけを開口する刺激薬である。その結果、CA3 と DG における NO 産生量は同程度であること、および CA1 にお

ける NO 産生量が他の領域に比べて 2 倍程度大きいことを示した。更に、各領域におけるカルシウム信号を計測した。その結果、CA1 と DG のカルシウム信号が同程度に大きいこと、CA3 のカルシウム信号が他の領域と比べて半分程度に小さいことを示した。海馬を刺激した時の DG の NO 産生量は CA1 の半分程度であるにもかかわらず、DG のカルシウム信号が CA1 と同程度に大きいことから、海馬の領域ごとにカルシウム信号の大きさと NO 産生量との対応関係が異なることが示唆された。

本研究では次に、海馬をテタヌス電気刺激した時の CA1 における NO 産生量の二次元蛍光測定を行った。テタヌス電気刺激は海馬のシナプス長期増強を引き起こすために用いられる刺激方法である。実験の結果、テタヌス電気刺激時の NO 産生量は刺激電極から遠ざかるにつれ少なくなること、および CA1 内の放射状層における NO 産生量が特に大きいことが判明した。更に、テタヌス電気刺激時のカルシウム信号を計測した。その結果、海馬錐体細胞層では NO 産生量が放射状層より少ないにもかかわらず、カルシウム信号の大きさは放射状層と同程度に大きいことが示されている。この結果は、海馬の CA1 領域内ですら NO 産生量とカルシウム信号の大きさが必ずしも比例しないことを示している。また、テタヌス電気刺激の情報をカルシウムは細胞体まで伝えるのに対して、NO はシナプスの存在する放射状層にのみ情報を伝えていることが示唆される。

以上要約すると、本研究では、海馬スライスにおける NO 産生の蛍光測定法を確立し、NO 産生の二次元測定に成功した。その結果、海馬各領域における NO 産生量が異なることが明らかとなった。海馬各領域における NO 産生量の比較は今まで誰も成功できなかった成果である。また、海馬のカルシウム信号も測定して、海馬ではカルシウム信号の大きさと NO 産生の大きさが必ずしも対応しないという、今まで想定されてこなかった新知見を示した。

よって審査委員一同、論文提出者高田則雄は東京大学博士（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 2002 年に Bioimages 誌に公表することになっている。これは共著論文であるが、論文提出者はそのすべ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。