

論文内容の要旨

論文題目 NO 合成酵素及び NMDA 受容体を発現した人工細胞における
NO 信号の可視化解析

氏名 渋谷 啓介

脳が発揮する、記憶、情動、思考などの高次機能の基礎は、神経細胞の活動にある。神経細胞は複雑なネットワークを形成して、神経細胞間で情報の伝達を行っている。脳の海馬という部位では、高頻度で繰り返す電気刺激（テタヌス刺激）を与えると神経細胞間の伝達効率が長時間にわたって変化する現象が起こる。この現象をシナプス可塑性と呼び記憶の素過程の1つであると考えられ、現在の記憶研究の中心的役割を担っている。シナプスの可塑性にはシナプスにおけるグルタミン酸受容体の役割が、非常に重要である。中でもイオノトロピック型である N-メチル-D-アスパラギン酸(N-methyl-D-aspartate, NMDA) 型グルタミン酸受容体は特に海馬の CA1 領域における長期増強の形成に本質的に不可欠な役割を果たしている。

一酸化窒素(NO)もシナプス可塑性に関与していると考えられている。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注目を集めた。シナプス後膜で放出された NO はシナプス前膜にある可溶性グアニル酸シクラーゼに結合する。NO が結合すると sGC は活性化されて cGMP を産生し、それによって cGMP 依存性酵素が活性化され、最終的に NO は神経伝達物質の放出量を変えると考えられている。

さらに近年、シナプス可塑性に後シナプス肥厚部に存在する PSD-95 蛋白が重要な役割を果たしていることを示唆する研究結果が多く報告されている。PSD-95 は NO を合成する神経型一酸化窒素合成酵素 (nNOS) と相互作用し、さらに NMDA 受容体とも結合できる。これは nNOS は PSD-95 を介して NMDA 受容体に結合できることを示唆している。PSD-95 変異マウスの解析によれば、海馬における NMDA 受容体依存型の長期増強の亢進と空間学

習能の低下が報告されており、PSD-95 もシナプス可塑性を担う分子として精力的な研究が進んでいる。

NMDA 受容体経路による NO 発生機構に関して解析することはシナプス可塑性の分子メカニズムを議論する上で有意義な情報となる。nNOS は PSD-95 を介して NMDA 受容体の近傍に局在していると考えられ、また Ca^{2+} 依存的に活性されることより nNOS が NMDA 受容体の近傍に局在することは NMDA 受容体からの Ca^{2+} 流入を直接うけることができ NO 産生には有利に思える。しかし、nNOS の細胞膜近傍への局在化により NO 産生の量にどの程度影響するのかは未だに明らかにされていない。そこで、本研究では PSD-95 によって nNOS が NMDA 受容体の発現する細胞膜へ局在化すること、また局在によって NO 産生がどの程度上がるのか、そのときの細胞膜近傍の Ca^{2+} 濃度との相関を定量的に調べた。

さらに、神経ステロイドの 1 つである硫酸プレグネノロンは脳神経系で合成され、NMDA 受容体の機能を修飾して記憶・学習に関与している可能性が高い。そこで硫酸プレグネノロンが NO 産生にどのように影響するのかを調べた。

本研究では、CHO(Chinese Hamster Ovary)細胞に NMDA 受容体と nNOS を遺伝子発現させた CHO nNOS/NMDAR 細胞及び NMDA 受容体を発現させた CHO NMDAR 細胞を作成し用いた。神経細胞を用いなかったのは、nNOS の発現時期と初代培養可能な時期が合わないため nNOS を発現している神経細胞を調製することができないことが 1 つ、また NMDA 受容体、PSD-95、nNOS の構成からなる NO 産生の効果あるいは NMDA 受容体に対する硫酸プレグネノロンの効果をみるためには、単純な系の方が有利であるためである。

NO 産生の測定には NO 感受性色素 DAF-FM を使い、細胞質 Ca^{2+} 濃度の測定には fura-2 を、細胞膜近傍での Ca^{2+} 濃度測定には、PSD-95 と Ca^{2+} 感受性蛍光蛋白である Yellow Cameleon3.1(YC3.1)の融合蛋白を発現する cDNA を作成し、細胞に発現させることで測定した。YC3.1 は 430nm の励起光をあて 535nm と 480nm の蛍光の比をとることで Ca^{2+} 濃度の変化をとらえることが出来る蛍光蛋白である。

CHO nNOS/NMDAR 細胞では nNOS は細胞質に分散していたが、CHO nNOS/NMDAR 細胞に PSD-95 を発現させると nNOS は細胞膜近傍に局在した。また、PSD-95 に関しても NMDA 受容体の発現している細胞膜へと局在した。PSD-95 によって NMDA 受容体の近傍に局在することが示された。

CHO nNOS/NMDAR 細胞に PSD-95 を発現させ NO 産生を測定すると NO 産生は PSD-95 を発現していない細胞より 2 倍量の産生を生じた。

以上の結果より NMDA 受容体直下での高 Ca^{2+} 濃度によって NO 産生が効率よくなされていると推測される。このことを実証するためには、NMDA 受容体直下の Ca^{2+} 濃度を測定し、細胞質内の Ca^{2+} 濃度と比較しなければならない。fura-2 などの Ca^{2+} 感受性色素を使った実験では細胞質内の Ca^{2+} しか測れず、細胞内の特定の場所を測ることは困難であった。しかし、本研究では、PSD-95 と YC3.1 を融合させた蛋白を CHO NMDAR 細胞に発現させることにより細胞膜近傍の Ca^{2+} 濃度測定を試みた。

PSD-95+YC3.1 融合蛋白を CHO NMDAR 細胞に発現させると細胞膜へ局在した。YC3.1 蛋白を発現させても細胞膜への局在はみられなかったことより、PSD-95 によって細胞膜へ局在したことがわかる。よって、PSD-95+YC3.1 融合蛋白の蛍光強度比 (F535/F480) を測定することで、細胞膜近傍での Ca^{2+} 濃度を知ることができる。

CHO NMDAR 細胞に PSD-95+YC3.1 蛋白を発現させ測定を行った。NMDA で刺激をおこなうと蛍光強度比 (F535/F480) は細胞膜近傍に高い値を示した。この高い値の蛍光強度比 (F535/F480) は NMDA 受容体の阻害剤である MK-801 で抑えられた。このことより細

胞膜近傍の高い蛍光強度比 (F535/F480) は NMDA 受容体からの Ca^{2+} 流入であることがわかる。キャリブレーションによって細胞膜近傍の Ca^{2+} の濃度を計算すると 100 μM NMDA の刺激では 5 μM であることがわかった。これは、同じ 100 μM NMDA 刺激を与えたときの細胞質 (fura-2 で測定した値) 600 nM よりはるかに高い濃度であることがわかった。CHO nNOS/NMDAR 細胞での細胞内 Ca^{2+} 濃度と NO 産生の関係を測定すると、 Ca^{2+} 濃度に応じてシグモイダル曲線的に NO 産生が増大し、その EC50 は 2.5 μM となった。この結果は、NMDA 刺激を与えても、細胞内の Ca^{2+} 濃度 (600 nM) では NO 産生がほとんどおこらず、細胞膜近傍の高 Ca^{2+} 濃度で活性化された nNOS によって効果的に NO 産生がなされていることがわかる。

さらに、CHO nNOS/NMDAR 細胞の系を用いて硫酸プレグネノロンの効果を調べた。硫酸プレグネノロンを 15 分前処理した後に NMDA 刺激を加えると硫酸プレグネノロンの濃度に応じて NO 産生、 Ca^{2+} 産生がシグモイダル曲線的に増大した。EC50 はともに 25 μM となった。一方、PSD-95 を発現した CHO nNOS/NMDAR 細胞では同様に硫酸プレグネノロンの濃度に応じて NO 産生もシグモイダル曲線的に増大したが、その EC50 は 800 nM と大きく下がった。PSD-95+YC3.1 で細胞膜近傍の Ca^{2+} を測定すると、硫酸プレグネノロンの効果は変わらずシグモイダル曲線的に増大し、EC50 は 20 μM であった。

本研究では、NMDA 受容体を発現した細胞膜近傍での Ca^{2+} 濃度の測定に初めて成功し、nNOS の細胞膜近傍への局在による NO 産生と nNOS 近傍でうける Ca^{2+} 濃度との関係を定量的に明らかにすることに成功した。nNOS が NMDA 受容体近傍に局在することは単に効率よく NO 産生がなされるだけでなく、NMDA 受容体による信号がきたときにだけ NO 産生が起こるようにするためにも必要であることが定量的に解析することで明瞭になった。さらに、 Ca^{2+} に関する硫酸プレグネノロンの効果の結果では生理的には効かないと考えられたが、本研究では NO 産生に関して硫酸プレグネノロンの効果を調べることで、十分に生理濃度で硫酸プレグネノロンが効くことを神経型 NOS と Ca^{2+} の局所的なふるまいを調べることではじめて発見できた。

NO 産生の生理作用には、情報伝達物質として働く反面、細胞毒性の効果も存在するという善玉、悪玉の二面性を持つことが知られている。細胞毒性としては、NO が脳内で異常に大量発生した場合には、NO は O_2 と反応して反応性の高いラジカルである ONOO $^-$ となって DNA に損傷を与え、神経細胞死を引き起こすと言われている。本研究からの結果は、nNOS を細胞膜へ局在化させることで、シグナル伝達を可能にし、かつ NO の細胞毒性からも守る役割をしていると考えられる。

神経伝達物質として知られるドーパミンなどのモノアミンは細胞外への放出、細胞内への取り込みという機構で細胞外モノアミン濃度を調節している。そこで、NO が産生されるとモノアミンを取り込むモノアミントランスポーターを NO が阻害してしまう。そのため、細胞外のモノアミン濃度は高くなり、細胞を興奮させる。硫酸プレグネノロンによる NO 産生の増大はこのようなシナプス伝達に影響を与えらる。