

論文審査の結果の要旨

氏名 渋谷 啓介

この論文では、チャイニーズ・ハムスター卵巣細胞（CHO 細胞）に N-メチル-D-アスパラギン酸（NMDA）受容体遺伝子と神経型一酸化窒素合成酵素（nNOS）遺伝子の両者を共に発現させた CHO nNOS/NMDAR 細胞、及び、CHO 細胞に NMDA 受容体遺伝子のみを発現させた CHO NMDAR 細胞の二種の人工的に構築された細胞を利用して、逆行性神経伝達物質として知られる一酸化窒素（NO）の細胞内産生に関する解析を行なっている

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すなわちシナプス可塑性には、NMDA 受容体や NO が重要な役割を果たしており、nNOS による NO の細胞内産生とその NMDA 受容体との関連性を明らかにすることは神経生物物理学と神経細胞生物学における重要な問題である。nNOS は Ca^{2+} 依存的に活性化されるので、グルタミン酸の刺激があると NMDA 受容体からの Ca^{2+} 流入が起こり、この流入した Ca^{2+} によって nNOS が活性化され NO が産生されると期待される。このようにして産生された NO がシナプス前細胞に作用して、神経伝達物質の放出量を変え、シナプス可塑性がもたらされると考えられている。さらに、近年、後シナプス肥厚部に PSD-95 蛋白質が発見され、次のようなモデルも提案されている。すなわち、PSD-95 は nNOS と NMDA 受容体との双方に結合できるので、nNOS が PSD-95 を介して NMDA 受容体の近傍に局在化し、NMDA 受容体から流入する Ca^{2+} に直接刺激されて効率よく NO を産生するというモデルである。しかしながら、このような nNOS の細胞膜近傍への局在化が NO の細胞内産生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、本論文では、CHO 細胞由来の人工的構築細胞を利用して、(1) 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が明らかにされている。次に、細胞質内および細胞膜近傍の Ca^{2+} 濃度を調べ、(2) Ca^{2+} 依存的に活性化される nNOS のこのような細胞膜への局在化が NO 産生にどのように影響するか、また、(3) 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期待されている神経ステロイド、硫酸プレグネノロンが NO 産生にどのように影響するかが調べられている。

本論文の実験では、神経細胞の代わりに CHO 細胞に由来する人工的構築細胞を用いていることが一つの特徴である。神経細胞では、nNOS 発現時期と初代培養可能期間が一致しないため nNOS を発現している細胞を調製することが実質上不可能であったが、ここでは、人工的構築細胞を用いることによって初めて nNOS による NO の細胞内産生を定量的に解析することを可能にしている。NO 産生の測定には NO 感受性色素 DAF-FM を、細胞質 Ca^{2+} 濃度の測定には Ca^{2+} 感受性色素 fura-2 を用いている。また、細胞膜近傍での Ca^{2+} 濃度測定では、PSD-95 と Ca^{2+} 感受性蛍光蛋白質である Yellow Cameleon3.1(YC3.1)との融合蛋白質を発現する cDNA を作成し、これを構築細胞内に発現させ、イメージングによる可視化解析を行っている。

本論文では以下の結果が述べられている。(1) PSD-95 により nNOS が NMDA 受容体の発現する細胞膜近傍に局在化することが明らかにされた。(2) CHO

nNOS/NMDAR 細胞に PSD-95 を発現させると NMDA 刺激時の NO 産生が PSD-95 を発現していない細胞に比べ約 2 倍増加し、細胞膜近傍の高濃度 Ca^{2+} で活性化された nNOS によって効率的に NO が産生される。(3) 硫酸プレグネノロン存在下で NMDA 刺激を与えると、硫酸プレグネノロンの濃度に応じて NO 産生と Ca^{2+} 濃度がともにシグモイド状に増大し、PSD-95 の発現によって、NO 産生に関する硫酸プレグネノロンの効果が硫酸プレグネノロンの生理濃度に近い低濃度 (数百 nM) でも十分発揮されることが明らかになった。

本研究の結果、nNOS の細胞膜への局在化によって NMDA 受容体からの Ca^{2+} 流入を契機とする NO 産生を効果的に引き起こすシグナル伝達機構が存在している可能性が初めて明らかにされた。さらに、 Ca^{2+} に対する硫酸プレグネノロンの効果を見る限り生理的には効かないと考えられていたが、本論文では、NO 産生に対する硫酸プレグネノロンの効果を調べることによって、生理濃度でも硫酸プレグネノロンが効くことが明らかになった。これらの結果は神経伝達の分子メカニズムの解明に多大な寄与をなすものである。

なお、本論文は、川戸佳、木本哲也、向井秀夫、古川愛造、北條泰嗣、高橋泰城らとの共同研究であるが、論文提出者が主体となって分析及び検証を行ったものであり、論文提出者の寄与が十分であると判断する。

したがって、博士 (理学) の学位を授与できると認める。