

論文審査の結果の要旨

氏名 井村 泰子

本論文は 3 章からなり、第 1 章では発達期大脳皮質体性感覚野における NO イメージング法の確立、第 2 章では NMDA 受容体の活性化によるカルシウム応答と NO 産生の相関関係、第 3 章では大脳皮質の発達に伴う NO 産生領域の変化、について述べられている。

第 1 章において、免疫組織染色の結果、二種類の nNOS 発現細胞が確認された。一つは神経突起の末端に至るまで、細胞全体が強く染色された神経細胞、もう一つは細胞膜様の形状のみが弱く染色された神経細胞であった。強く染色された神経細胞の数は非常に少なく、大脳皮質の皮質層の深層側で観察され、弱く染色された細胞は皮質層全体で観察された。次に、発達期大脳皮質において生理条件下での NO の産生を直接可視化できるリアルタイムイメージング法の確立を進めた。近年開発された DAR-4M は、細胞の自家蛍光と重ならない赤色の蛍光を発するため、background が非常に低く、少量の NO でも検出できる優れた色素である。そこで、本研究ではこの性質を生かし、DAR-4M を用いた NO イメージング法を開発した。P0 の体性感覚野の脳スライスを用いて、NMDA 刺激による NO イメージングを行った結果、大脳皮質の浅層側ではほとんど NO の産生が観察されなかったが、深層側では観察され、阻害剤を用いた実験結果から、検出された NO は nNOS によることが明らかになった。

第2章において、NMDA受容体を活性化させた際のカルシウムの動態をカルシウムイメージング法により解析した。その結果、予想に反してNMDAによるカルシウム流入は深層だけでなく浅層においても観察された。このことをさらに確かめるために、NOとカルシウムを同時にイメージングする方法を開発し、同条件でカルシウムとNOの動態を観測した。しかし、この結果においても、カルシウム応答は脳皮質の層全体で見られたが、強いNO産生は深層側でのみ検出され、統計処理の結果からも、有意にNO産生が深層側に限局して観察されることが示された。一般にカルシウム流入が起こっているnNOS陽性細胞ではNOが産生されると考えられてきたが、浅層側においてはnNOSの活性化に必要なある種の調節因子が不足しているために、nNOSの活性化に用いられているカルシウムの細胞質内流入だけではNOは産生できないということではないかと考えられた。

第3章において、発達段階を追ってNOイメージングを行い、さらにイメージングに用いた切片を、層構造を解析するための後染色をすることで、NOの産生部位を詳細に解析した。P0でNO産生はV、VI層で観察された。さらに発達が進んだP10では、NOの産生部位はIV層にまで拡大した。これは、P10においてNMDA受容体活性化により、IV層に発現しているnNOSは活性化されNOを産生することが可能になったことを示している。P10の体性感覚野のIV層において、IV層が同一平面状になるように、脳表面に対して平行な切片を作成し、NOイメージングを行った。その結果、バレル状にNOが検出された。これは、NMDA受容体を活性化させた場合、NOが三次元的に広がったことを示している。さらに、シングルセルイメージングを行い、NMDA受容体活性化によりIV層の神経細胞がNOを確かに産生していることを明らかにした。さらに発達が進んだP30

では、皮質層全体にわたりNOの産生はほとんど観察されなかった。

これらの研究は、神経発生過程の新しい原理を提唱しており、脳科学的に判断して十分に価値がある。したがって、論文提出者は、博士(生命科学)の学位を授与できると認める。