

論文審査の結果の要旨

氏名 中嶋隆浩

本論文は以下の4章より成る。

第1章は序論であり、本研究の背景、動機と目的が簡潔に述べられている。生体系において、一酸化窒素 (NO) は細胞間の情報伝達物質として働いている。NO を可視化検出する蛍光プローブ分子はいくつか開発されているが、それらは細胞内のNO を可視化検出するものであり、細胞外へ放出されたNO を測定することは出来ない。本研究では、細胞から放出されたNO を超高感度に可視化するセンサーを開発し、それをを用いて、血管内皮細胞や神経細胞からのNO 放出の動態を分析することを目的とすることが述べられている。

第2章は、細胞から放出されたNO を超高感度に可視化するセンサーの開発について述べている。NO の受容体蛋白質である可溶性グアニル酸シクラーゼ (sGC) は、GTP からサイクリック GMP (cGMP) を生成する酵素である。sGC の酵素活性は、NO が結合することで上昇し、活性化したsGC は~6000 分子/min のcGMP を生成する。本センサーは、sGC を持つ細胞に、cGMP 可視化蛍光プローブ分子 (CGY) を導入することにより構築されている。CGY は蛍光蛋白質 (CFP, YFP) およびcGMP 結合蛋白質から成り、cGMP を結合すると、蛍光共鳴エネルギー移動 (FRET) を起こすプローブ分子である。本センサーは以下の原理でNO を検出している。すなわち、(1) NO がsGC に結合し、これを活性化させる。(2) 活性化したsGC が、細胞内で大量のcGMP を生成する。(3) CGY がcGMP と結合し、FRET を起こす。その結果、CFP とYFP の蛍光強度比が変化する。(4) 蛍光強度比の変化を蛍光顕微鏡で検出する、である。このように構築した本センサーは、その検量線より、20 pM から1 nM の濃度領域のNO を検出する超高感度性を持つことが示されている。また、生成したcGMP は、cGMP 分解酵素により分解されるため、本センサーは可逆的応答性を持つことが示されている。NO 添加後、本センサーが最大応答に達するまでの時間 (応答時間) は 26 ± 10 秒であることを示している。細胞から成る本センサーの空間分解能は、細胞の大きさによって決まり、 $21 \pm 6 \mu\text{m}$ であることが示されている。本センサーのこの可逆的応答の再現性は良く、連続10回の繰り返し刺激に対して、応答性は全く損なわれず、安定して測定出来るこ

とが示されている。また、本センサーを生体系で応用する際に、考えられる妨害物質として、sGCを弱く活性化しうる一酸化炭素、細胞内にcGMPを産生しうるナトリウム利尿性ペプチド、CGYに弱く結合するcAMPを産生しうるグルタミン酸が挙げられると述べている。本センサーは、これらの妨害物質候補に全く応答しないことから、NOに対して特異性を持つことが示されている。

第3章は、血管内皮細胞および海馬神経細胞が放出したNO動態の可視化分析について述べている。本センサーを、NOを産生する細胞と共培養し、隣接したNO産生細胞からのNO放出を可視化検出している。まず、血管内皮細胞がATP刺激によって放出したNOを検出している。100 nMのATP刺激に対して、40 pMのNOを、1 μ MのATP刺激に対して、100 pMのNOを血管内皮細胞が放出していることを示している。次に、海馬神経細胞が、刺激を与えない生理的条件下で、自発的に、100 pMのNOを5分周期で放出していることを見い出している。この周期的NO放出は、グルタミン酸受容体を介した神経伝達によって起こっていることを明らかにしている。さらに、本センサーとCa²⁺蛍光プローブ分子を併用することで、海馬神経細胞からのNO放出と細胞内Ca²⁺濃度変化を同時に検出している。その結果、この周期的NO放出の周期および持続時間は、海馬神経細胞内のCa²⁺振動によって決まっていることを明らかにしている。生きている細胞から成る本センサーを単層状に培養することで、平面状の検出器を作製している。これを用いて、ATPで刺激した血管内皮細胞が放出した100 pMのNOが、60 μ m拡散することを示している。第4章は総合的結論である。

以上のように、本研究では、細胞から放出されるNOを、20 pMの検出限界で、特異的かつ可逆的に検出するセンサーを開発した。さらに、本センサーを、実際に生体系に応用した。その結果、海馬神経細胞が自発的かつ周期的に、100 pMのNOを放出していることを見い出し、その周期および持続時間は海馬神経細胞内のCa²⁺振動によって決まっていることを明らかにした。また、本センサーを単層状に培養することで、血管内皮細胞が放出したNOを多点同時に検出し、拡散範囲の分析を行った。これらの研究は理学の発展に大きく寄与する成果であり、博士（理学）取得を目的とする研究として十分であると審査員一同が認めた。なお、本論文は各章の研究が複数の研究者との共同研究であるが、論文提出者が主体となって行ったものであり、論文提出者の寄与は十分であると判断する。

従って、博士（理学）の学位を授与できると認める。