

# 脳内のガス状伝達物質を見る ～運動上達の仕組みを見る～

岡田大助

## ■ 研究のねらい

一酸化窒素は中枢神経系、循環器系や免疫系で多彩かつ重要な働きを持つ気体状の情報伝達物質です。一般の細胞内情報伝達物質（サイクリックAMPやカルシウムなど）は細胞内の一定の場所で特定の標的酵素にのみ作用するため「限定した時空間内で特定の相手に」情報を伝えます。これに対して、一酸化窒素は低分子量の気体なので、細胞膜を透過して拡散し、周囲の細胞の多くの標的分子に情報を伝達できる点が特色です。

神経型一酸化窒素合成酵素は神経活動で細胞内カルシウム濃度が高まると活性化されますので、一酸化窒素は発生細胞が興奮したという情報を運ぶことができます。脳内の神経細胞間の情報伝達はシナプス結合によって起きるというのが常識ですが、一酸化窒素はシナプス結合の有無に関わらず、周囲の全ての細胞にこの情報を伝達することができます[図1]。以上の観点から一酸化窒素は「興奮場の物質」であって、他の情報伝達物質とは違う働きを持つと考えられます。しかし一酸化窒素の脳内生理作用の実態は全く不明でした。

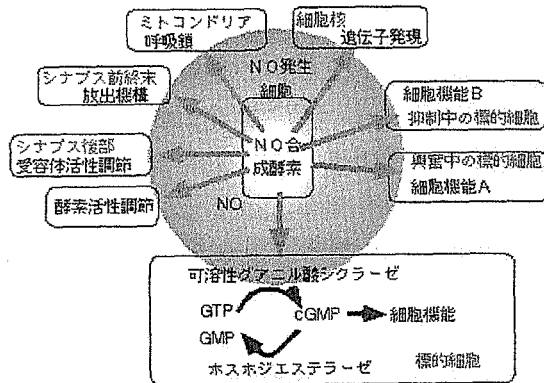


図1 一酸化窒素は拡散して近傍のあらゆる所で作用する。

一酸化窒素は記憶学習やその基盤となるシナプス伝達可塑性に必須です。シナプス伝達の可塑性にはシナプス特異性という性質があり、可塑的变化が起きたときに活動していたシナプスのみに変化が起きます。一方で一酸化窒素は、拡散性のためシナプス特異性を満たさない部分にまで広がってシナプス可塑性を起すことができるのです。この一見矛盾に見える性質がなぜシナプス可塑性や記憶・学習に必要なのでしょうか？この疑問に答えられれば、一酸化窒素が脳内で持つ役割や、記憶・学習とシナプス伝達の可塑性の関係を理解する事ができると思います。

本研究ではこの疑問に対する答えを見いだそうとする試みの第一歩として、一酸化窒素の発生・拡散・作用とシナプス可塑性の分布を計測することにしました。この目的のためには一酸化窒素やシナプス伝達可塑性を2次的に観測できるイメージング手法が必要です。本研究では、一酸化窒素の発生と拡散を特異的に観測するイメージング技術、細胞内情報伝達物質であるサイクリックGMP（一酸化窒素により合成が活性化され小

脳のシナプス可塑性に必須) 合成のイメージング技術、そして、広いダイナミックレンジで神経細胞の興奮を定量できるイメージング手法を開発しました。ここでは一酸化窒素のイメージング技術について詳しく述べ、他2つは要約のみ記します。

■ 研究成果

1 小脳皮質での一酸化窒素発生機構

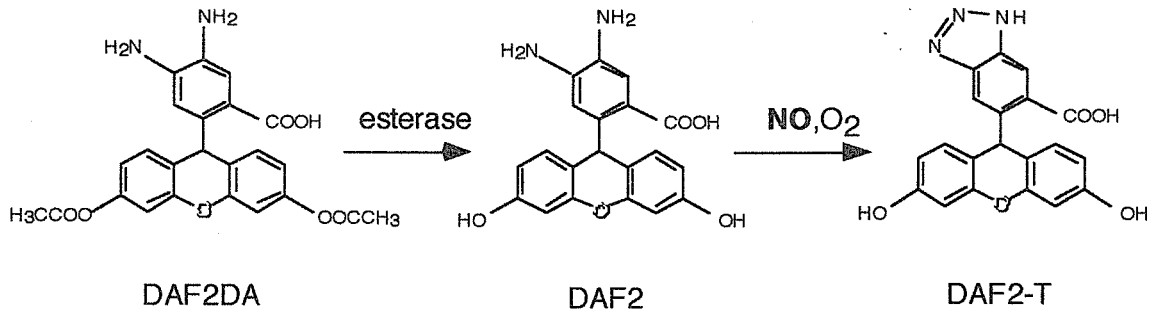


図2 一酸化窒素特異的蛍光プローブ

ジアミノフルオレセイン-2-ジアセテート (DAF2DA) は膜透過性ですが、細胞内でエステラーゼによりジアミノフルオレセイン-2 (DAF2) になると、細胞膜を透過できなくなるため、細胞を簡単に染色することができます。DAF2は酸素存在下で一酸化窒素と反応してリアゾール体 (DAF2-T) になると蛍光強度が約二百倍に増強します[図2]。DAF2と一酸化窒素 (NO<sup>+</sup>) の反応は特異性が高く、これまでに一酸化窒素以外で蛍光を増強させる物質は見つかっていません。また、反応速度は秒のオーダーですから、一酸化窒素の生体内での寿命が数秒ということから、DAF2を用いれば発生や拡散の様子を観察できると思われます。このDAF2DAを用いて、250 μm厚のラット小脳虫部矢状断切片を染色し、発生する一酸化窒素による蛍光の



図3 小脳切片白質連続電気刺激後の一酸化窒素発生を示す蛍光画像

増強を蛍光顕微鏡 (励起波長470-490 nm、蛍光波長515 nm以上) で観察し、画像を冷却CCDカメラで記録しました。

免疫組織化学的研究によれば神経型一酸化窒素合成酵素は小脳皮質では顆粒細胞、星状細胞、籠細胞にあります。これらはすべてグルタミン酸入力を受ける神経細胞です。一方、プルキンエ細胞は一酸化窒素合成酵素を持たず、一酸化窒素の代表的標的酵素であるグアニル酸シクラーゼを持っています。プルキンエ細胞は様々な一酸化窒素発生源に囲まれていることとなります。実際、小脳切片で白質を連続電気刺激

して得られたNO発生を示す蛍光画像[図3]では、一酸化窒素合成能力のないプルキンエ細胞が光って見えますが、これは周りの発生源から拡散した一酸化窒素がプルキンエ細胞内でDAF2と反応したことを示します。ところで、プルキンエ細胞の樹上突起部と細胞体部とでは一酸化窒素は違う作用ををすると思われます。樹状突起部（分子層）は平行線維とのシナプスが密集しており、ここに一酸化窒素が及ぼす影響はこのシナプスの可塑性に深く関わっています。一方、細胞体では一酸化窒素は核に働きかけ遺伝子発現を調節する可能性があります。従って、上述の様々な一酸化窒素発生源は各々異なる役割を担う一酸化窒素をその役割に適した状況で発生させるように調節されているはずで、各発生源が一酸化窒素を発生する仕組みを理解する必要があります。グルタミン酸受容体のうちNMDA、AMPA、およびmGlu-1受容体の活性化で一酸化窒素が発生することが小脳切片を用いた生化学的研究で明らかになっています。そこで、これらの受容体作動薬の効果を調べました。

AMPAによる薬理的刺激によって分子層で斑点状にDAF2蛍光が増強しました[図4]。この蛍光変化はAMPA受容体拮抗薬、一酸化窒素合成酵素阻害剤で抑制されましたので、AMPA受容体が引金となる一酸化窒素発生です。DAF2Tは細胞内で安定ですから、蛍光は一度増強すると下がりません。差分処理で経時変化を解析した結果、蛍光増強は切片がAMPAに接している間のみ一過性に起こったことがわかりました。AMPAに対する応答はテトロドトキシンで脱分極の伝搬を阻止すると見られなくなりました。AMPA受容体と一酸化窒素合成酵素とは密接にリンクしておらず、受容体が引き起こした脱分極が伝搬し、電位感受性カルシウムチャンネルが開くことによりはじめて一酸化窒素合成酵素が活性化されることを示唆しています。

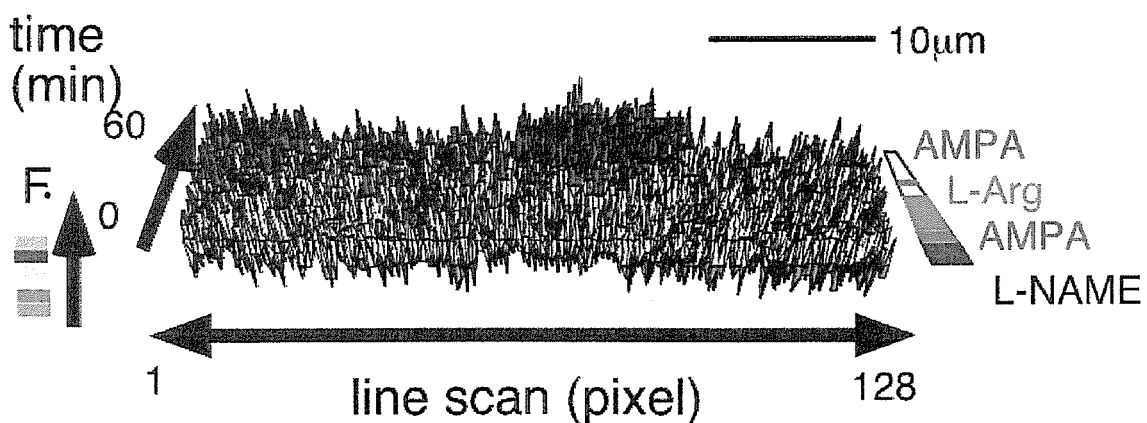


図4 AMPA刺激で小脳分子層で見られた斑点状の一酸化窒素発生。斑点を横切る線上（横軸）の蛍光強度（縦軸）の時間変化（奥向き軸）。L-NAME（一酸化窒素合成酵素の基質競合阻害剤）存在下ではAMPAは何も起さないが、基質（L-Arg）を充填してからAMPAを与えると局所的に蛍光上昇が起きた。

NMDA（Mgなし）刺激でDAF2蛍光は顆粒細胞で増強しました。この蛍光変化はNMDA受容体拮抗薬、一酸化窒素合成酵素阻害剤で抑制されましたのでNMDA受容体が引金となる一酸化窒素発生です。顆粒細胞のNMDA応答はテトロドトキシンに

よっても影響を受けませんでした。このことはNMDA受容体と一酸化窒素合成酵素とが密接にリンクしており、NMDA受容体チャンネルを通して流入したカルシウムが直接一酸化窒素合成酵素を活性化できることを示唆しています。分子生物学的研究から両者はPDZドメインを持つ蛋白質で互いに近い位置に存在することが示唆されており、この実験結果はこの分子生物学的知見を機能面から裏付けるものです。

プルキンエ細胞体周辺で起きる蛍光増強は位置的にバスケット細胞軸索終末叢からの一酸化窒素発生と思われます。この位置からの一酸化窒素発生は、NMDA受容体拮抗薬、一酸化窒素合成酵素阻害剤で抑制されましたのでNMDA受容体が引金となる一酸化窒素発生です。しかし、NMDAのみの刺激では発生確率が低いので、他の受容体の共活性化が必要と考えました。顆粒細胞層深部を50Hzで電気刺激するとこの部位の反応は必ず起こりましたが、10Hzでは起こりませんでした。mGlu-1受容体阻害剤存在下で50Hz刺激すると蛍光変化が阻害されました。また、mGluR-1/5受容体作動薬存在下で10Hz刺激したところ、蛍光増強が起きました。これらの結果から、バスケット細胞軸索終末叢からの一酸化窒素発生には、NMDAとmGlu-1の両受容体の共活性化が必要であると考えられます。このことは一酸化窒素により合成が起きるサイクリックGMP量を生化学的に定量することでも裏付けられました。

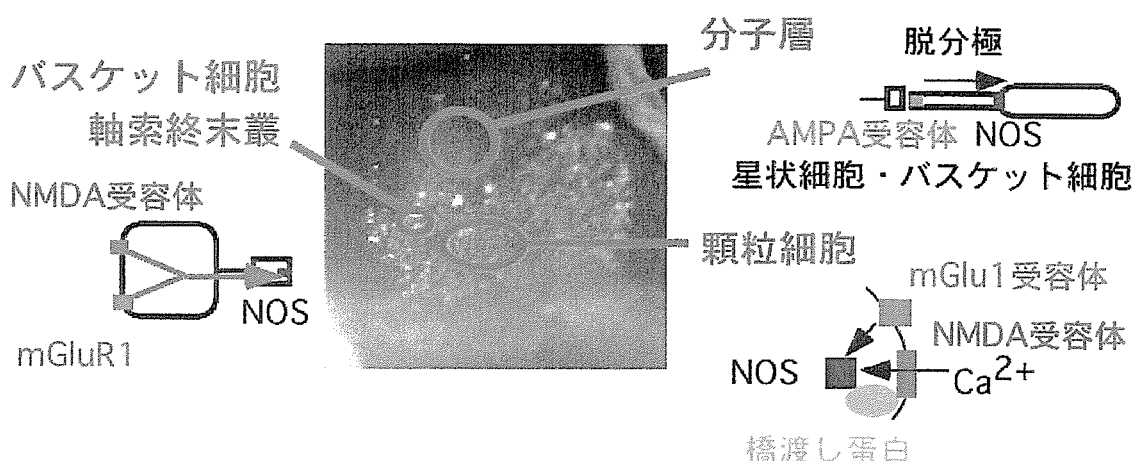


図5 小脳皮質各部位での一酸化窒素発生機構

一方、mGlu-1受容体作動薬は単独で顆粒細胞に蛍光増強を起すことが観察されたので、顆粒細胞ではNMDAとmGlu-1受容体とが独立に一酸化窒素を発生させると考えられます。以上のように、小脳皮質に分布する様々な一酸化窒素発生部位は異なる受容体機構によって制御されていることがわかりました[図5]。各々の発生機構の相対的な強さは残念ながら定量性の問題のため結論はできませんが、一酸化窒素の発生量はその作用を質・量共に変えてしまう重要な因子です。図3の実験で蛍光増強が見られる順番がこの答えを示唆しています。即ち、顆粒細胞、バスケット細胞軸索終末叢、分子層の順番に強いと思われます。即ち、シナプス伝達を調節する部位では発生量が少なく、比較的少数(おそらく千程度)のシナプスに作用すると思われます。

## 2. 細胞内サイクリックGMP合成のイメージング (要約)

プルキンエ細胞にはサイクリックGMP合成酵素のほか、特異的分解酵素の5型ホスホジエステラーゼ(PDE5)があります。従来、この酵素活性のサイクリックGMP依存性の測定は困難でしたが、サイクリックGMP結合でPDE5の活性化が起きることを生化学実験により発見しました。プルキンエ細胞に一酸化窒素を与えるとサイクリックGMP合成が起こってPDE5活性が上昇するので、蛍光基質アナログ(加水分解で蛍光減少)を用いて細胞内のPDE5活性を測定することができます。この手法により、分子層で発生した一酸化窒素が細胞間伝達物質としてプルキンエ細胞に作用し、プルキンエ細胞内でサイクリックGMP合成を起すことを初めて検出しました。細胞内のサイクリックGMP濃度が合成と分解によって厳密に制御される事を示唆しています。

## 3. 広ダイナミックレンジ神経活動モニタープローブの探索 (要約)

神経活動のイメージングには電位感受性色素が用いられてきましたが、細胞への導入が難しく、毒性があり、信号が小さいという欠点がありました。ニュートラルレッド(NR)はこれらの欠点を持たない理想的な蛍光プローブで個体を用いた測定が可能ですが、蛍光変化は1分程度と長く、神経興奮に伴う細胞内pH低下による間接的な方法と考えられてきました。しかし、NRは脂質との親和性が高く、もし神経興奮に伴って脂質との相互作用が強化された結果蛍光が増強するのなら(疎水性プローブ説)電位感受性色素に近い、直接的プローブと言えます。本研究では、pH変化が原因ならば酸性種の蛍光増加に伴って塩基性種の蛍光減少が起きるはずとの考えから、NRで染色した小脳切片に2つの励起波長を交互に当てることにより両種の蛍光を分離して測定しました。すると、薬理的刺激や電氣的刺激で刺激強度が大きいと蛍光変化は長くpH依存性でしたが、刺激強度を適正に絞ると蛍光変化は1秒程度で元のレベルに戻る早さで、かつpHに依存しませんでした。さらに、リン脂質の脂肪酸部分にNRが結合すると蛍光が増強することがわかりました。したがって、弱い刺激を用いればNRは疎水性プローブであり、直接的な高感度神経活動プローブとして用いることがわかりました。

### ■ 今後の展開

本研究によって、一酸化窒素の発生、作用、可塑性のイメージング手法をそれぞれ開発することができました。一酸化窒素特異的蛍光プローブの利用により小脳での一酸化窒素発生受容体機構の分布が初めて明らかになり、各発生部位間の機能的な差異が示唆されました。現在、一酸化窒素の小脳内での拡散距離を測定する試みを行なっています。これまでシナプス伝達の計測には不向きと考えられていたNRが刺激条件によっては神経活動プローブとして用いることを証明しました。NRは毒性が無く、染色が容易で、変化が大きいので理想的な生体プローブ色素と言えます。私は一酸化窒素が拡散する範囲内では何らかの可塑的变化が起こっている、つまり可塑的变化は局在せず分布しており、シナプス特異性を保った可塑的变化を起す領域のまわりに一酸化窒素による変化領域が分布すると考えています。一酸化窒素によりシナプス集団ができ可塑的变化の、即ち記憶や学習の際の、単位となって働くのではないのでしょうか。そこでNRを用いてシナプス伝達可塑性の分布を測定する実験を進めています。

## ■ 成果リスト

### 論文

- Okada, D. (1998) Tetrahydrobiopterin-dependent stabilization of neuronal nitric oxide synthase dimer reduces susceptibility to phosphorylation by protein kinase C in vitro. FEBS letters 434: 261-264.
- Miyata, M., Okada, D., Hashimoto, K., Kano, M. and Ito, M. (1999) Corticotropin releasing factor plays a permissive role in cerebellar long-term depression. Neuron 22: 763-775.
- Okada, D. Neutral red as a hydrophobic probe for neuronal activity monitoring. (submitted)
- Hartell, N.A., Okada, D., Asakawa, S., Jacoby, S. and Furuya, S.: Intercellular action of nitric oxide transiently increases cyclic GMP in cerebellar Purkinje cells. (submitted)
- Okada, D. Nitric oxide releasing mechanisms triggered by subtypes of glutamate receptors visualized by a specific nitric oxide probe. in preparation

### 総説

- 岡田大助 (1997) 「一酸化窒素」、神経精神薬理増刊号、ニューロトランスミッターアップデート: 249-257.
- 岡田大助 (1997) 「中枢神経系とNO」、最新医学、52: 967-973.
- 岡田大助 (1997) 「NO at work」、蛋白質核酸酵素、42: 2575.
- 岡田大助 (1998) 「脳神経系機能とNO」、細胞工学、17: 196-203.
- 岡田大助 (1998) 「小脳シナプス可塑性とNO」、Clinical Neuroscience 16: 748-753.
- 岡田大助 (1998) 「神経性調節とNO」、循環器疾患とNO: 今泉勉 編集、南山堂、pp 46-51.
- 岡田大助 (1999) 「中枢神経シグナル伝達におけるNOの役割」、神経研究の進歩、43: 169-178.
- 岡田大助 「サイクリックGMP画像化法」、生体内一酸化窒素(NO)実験プロトコール: 共立出版 印刷中
- 岡田大助 「サイクリックGMPの分析法」、生体内一酸化窒素(NO)実験プロトコール: 共立出版 印刷中
- 岡田大助 「NOと神経におけるシグナル伝達」、イラスト医学&サイエンス「NOの多彩な機能に迫る」: 羊土社 印刷中

### 口頭発表

国際学会 計4件

- Okada, D.: Nitric oxide formation in rat cerebellar slices visualized by a nitric oxide-specific fluorescent probe. Biology of Nitric Oxide 6th International Meeting. Stockholm, Sweden. 1999. など

国内研究会 1件

- 岡田大助: 小脳シナプス伝達可塑性とNO・cGMP系、イメージングによるアプローチ、生理学研究所研究会「シナプス可塑性の分子実体」 1998年

国内一般学会 計4件