

学 位 論 文 題 名

Histochemical Localization of NADPH Diaphorase  
Activity in the Rat Brain by *in Situ* Blotting Method

(*in Situ* Blotting Method (組織蛋白転写法) による NADPH  
ジアファラーゼ活性のラット脳内における組織化学的分布)

学位論文内容の要旨

本論文において申請者は NADPH diaphorase の酵素活性がラット脳の海馬の錐体細胞と小脳のプルキンエ細胞に存在することを組織蛋白転写法により初めて明らかにした。

本論文の構成は以下の通りである。

序論では、本酵素の性質、過去の研究の経緯、組織化学的な本酵素活性の検出法とそれに伴う方法論的な問題点について述べた。

研究方法では、申請者らによって考案された組織蛋白転写法の原理と利点について説明した。

結果では、ラット脳内の本酵素活性の分布状態を検索し、今まで報告されていなかった海馬の錐体細胞、及び小脳のプルキンエ細胞にも NADPH diaphorase 活性が存在することを明らかにした。

考察では、海馬の錐体細胞と小脳のプルキンエ細胞に NADPH diaphorase 活性が存在することの意義をのべた。

NADPH diaphorase は NADPH 依存性脱水素酵素、又は NADPH 依存性色素酸化還元酵素として知られており、最初のフラビン酵素として報告された。本酵素は電子伝達作用を有し、生体内において NADPH を酸化し、シトクロム<sub>c</sub>、酸素を還元することより物質の酸化還元に基本的かつ重要な役割を果たすことが生化学的な研究より推測されている。

一方、組織化学の分野では、NADPH diaphorase 活性は、ニトロブルーテトラゾリウムなどの色素に NADPH からの電子を伝達し発色させる作用として定義されている。この発色反応が組織切片中での本酵素活性の検出に利用されており、多くの研究者によって本酵素活性の生体内分布の検索がおこなわれた。現在までの研究に共通して報告されている知見は、1. 本酵素活

性は神経系において他の臓器よりも特によく検出されること。2. 脳内においては本酵素活性の検出が極めて限局された部位かつ特徴的な分布パターンとして示されること。3. 中枢神経系における海馬の錐体細胞や小脳のプルキンエ細胞には NADPH diaphorase 活性が検出されないこと。以上の3点であった。

本酵素活性の脳内分布に関する研究はその多くが化学固定された脳組織を用いて行われてきた。しかし近年、この酵素活性の組織化学的検出状態が組織固定の条件により大きく変化することが報告されており、本酵素活性は化学固定によって活性の低下を被ることが推測されている。

通常の組織化学的研究方法では組織、及び細胞の形態を保ち細胞内蛋白の外液への漏洩を防ぐために試料組織にピクリン酸等の極めて強い酸化作用をもつ酸、もしくはグルタルアルデヒドなどの強力な蛋白質架橋作用のある化学物質を作用させてその組織中の蛋白質を変性、凝固させ不溶化させた後、組織内の酵素活性の検出を行うのが常法である。しかし試料切片に対するこのような化学処理は組織内酵素の活性の低下もしくは失活を招く可能性が高いことが多く研究者により指摘されてきた。さらに、未固定組織切片を試料として用い、組織中の酵素活性の検出を行う場合においても、標的酵素の切片断面から酵素反応溶液中への漏洩、もしくは酵素基質、または活性検出分子の細胞内への浸透性の困難さなどの重大な方法論的問題点が存在することも指摘されている。

上記の手法がもつこれらの問題点より、従来の組織化学的方法で検出された NADPH diaphorase 活性が真の生体内分布を反映しているのかどうかは不明であった。以上の理由より本研究において、組織蛋白転写法を用いて NADPH diaphorase 活性の検出をニトロセルロース転写膜上で行い、特に、海馬の錐体細胞と小脳のプルキンエ細胞に NADPH diaphorase 活性が存在するかどうかを検討することを目的とした。

本研究で用いられた組織蛋白転写法 (*in Situ* Blotting Method) は最近申請者らによって考案された方法であり、組織切片中の蛋白を直接ニトロセルロース膜、ポリビニリデンジフルオライド膜又は陽帯電性ナイロン膜等の多孔質蛋白結合シートに転写し、吸着させた後、酵素活性の検出を行う方法である。この方法の利点は以下の3つが考えられた。1. 組織中の蛋白がその分布局在を保ったまま吸着膜に転写されること。2. 蛋白の変性なしに酵素活性が検出できること。3. 酵素蛋白分子は直接転写シートに吸着させるため、酵素活性測定条件が任意に設定できること。これらの利点より化学固定により活性の低下をまねきやすい NADPH diaphorase 活性の検出はもっとも適した方法であると考えられた。

上記の組織蛋白転写法を用いて、ニトロセルロース膜上で転写された本酵素活性の検索を行っ

た結果、本研究によって初めて海馬のアンモン角の錐体細胞層の CA<sub>1</sub> から CA<sub>3</sub> に及ぶ部位、および小脳のプルキンエ細胞、さらに両細胞群に付属する樹状突起にも NADPH diaphorase 活性が検出された。他方、本研究によって従来から NADPH diaphorase 活性が検出されていた部位、例えばきゅう脳、大脳皮質、視床下部、線状体、上丘表層灰白質及び小脳の分子層にも *in Situ* Blotting 法によって NADPH diaphorase 活性が検出された。

海馬の錐体細胞と小脳のプルキンエ細胞は脳内で極めて重要な役割、例えば錐体細胞は記憶、学習などの高次機能、プルキンエ細胞は運動における身体の運動制御などの学習、記憶に関与し、両細胞種は活発に神経電位を発火していることが知られている。さらに、中枢神経系において海馬の錐体細胞と小脳のプルキンエ細胞は虚血などによる酸素欠乏に極めて弱い細胞種であること、及び、グルコースの消費両が大きいことが報告されており、重要な神経機能を有し、活発な神経電位の発火を行っている両細胞種の酸素消費量が大きいことが推測されている。しかし、いままで両細胞種に酸化還元酵素のひとつである NADPH diaphorase 活性が見いだされておらず、これが疑問点として残されていた。しかしながら、本研究において、前述の両細胞群に NADPH diaphorase 活性が検出された事実より、これらの細胞において本酵素活性による物質の酸化還元反応が行われている可能性が示唆された。

## 学位論文審査の要旨

主査	教授	小島	豊
副査	教授	齋藤	和雄
副査	教授	保原	喜志夫
副査	教授	道幸	哲也
副査	教授	黒柳	俊雄

本論文において申請者は NADPH diaphorase 活性をラット脳の海馬の錐体細胞と小脳のプルキンエ細胞内で組織蛋白転写法により初めて検出した。NADPH diaphorase は最初のフラビン酵素として報告された。本酵素は電子伝達作用を有し、生体内において NADPH を酸化し、シトクロム<sub>c</sub>、酵素を還元することより物質の酸化還元に基本的かつ重要な役割を果たすことが生化学的な研究より推測されていた。

この NADPH diaphorase はニトロブルーテトラゾリウムなどの色素を NADPH 存在下で発色させる作用を有している。この発色反応が組織切片中での本酵素活性の検出に利用されており、ラット脳内での詳細な活性分布状態が検索され報告されていた。しかし現在までの報告では海馬の錐体細胞と小脳のプルキンエ細胞には NADPH diaphorase 活性が検出されないことが共通した知見として報告されている。

海馬の錐体細胞と小脳のプルキンエ細胞は脳内で極めて重要な役割、例えば錐体細胞は記憶、学習などの高次機能、プルキンエ細胞は運動における身体の運動制御などの学習、記憶に関与していることが知られている。一方、中枢神経系において海馬の錐体細胞と小脳のプルキンエ細胞はグルコース欠乏及び酸素欠乏に極めて弱い細胞種であることが多数報告されており、これらの重要な神経機能を有する両細胞種の酸素消費量が大きいことが推測されているにもかかわらず、前述のようにいままで両細胞種に NADPH diaphorase 活性が検出されておらず、これが疑問点として残されていた。

組織化学的研究方法では組織、及び細胞の形態を保つために試料組織にピクリン酸等の極めて強い酸化作用をもつ酸、もしくはグルタルアルデヒドなどの強力な蛋白質架橋作用のある化学物質を作用させてその組織中の蛋白質を変性、凝固させ不溶化させた後、酵素活性の検出を行うのが常法である。しかし試料切片に対するこのような化学処理は組織内酵素の活性の低下もしくは失活を招く可能性が高いことが多くの研究者により指摘されてきた。これらの問題点より、従来の組織化学的方法で検出された NADPH diaphorase 活性が真の生体内分布を反映しているかどうかは不明であった。

以上の理由より本研究において、組織蛋白転写法を用いて NADPH diaphorase 活性の検出をニトロセルロース転写膜上で行い活性存在部位を再検索し、海馬の錐体細胞、及び小脳のプルキンエ細胞の NADPH diaphorase 活性を調べることを目的とした。

組織蛋白転写法 (*in Situ* Blotting Method) は最近申請者らによって考案された方法であり、組織切片中の蛋白を直接ニトロセルロース膜に転写し、吸着させた後、酵素活性の検出を行う方法である。この方法の利点は以下の3つが考えられた。1. 組織中の蛋白がその分布局在を保ったまま吸着膜に転写されること。2. 蛋白の変性なしに酵素活性が検出できること。3. 酵素活性測定条件が任意に設定できること。これらの利点より NADPH diaphorase 活性の検出にはもっとも適した方法であると考えられた。

ラット脳の前額断切片、水平断切片及び矢状断切片をそれぞれ作成し、ニトロセルロース膜上に組織切片中の蛋白をブロッティングした。ニトロセルロース膜上に転写された本酵素活性の検

索を行った結果、本研究によって海馬のアンモン角の錐体細胞層の CA<sub>1</sub> から CA<sub>3</sub> に及ぶ部位、および小脳のプルキンエ細胞、さらに両細胞群に付属する樹状突起に NADPH diaphorase 活性が検出された。これらの細胞は脳内の他の部位より樹状突起を経て伝達された情報を加工し他の神経細胞へ伝達する重要な役割を有することが知られている。一方、従来から本酵素活性が検出されていた部位、例えば嗅脳、大脳皮質、視床下部、線状体、上丘表層灰白質及び小脳の分子層にも *in Situ* Blotting 法によって NADPH diaphorase 活性が検出された。

本研究において錐体細胞とプルキンエ細胞に NADPH diaphorase 活性が検出された事はこれらの細胞において本酵素活性が関与した物質の酸化還元反応が行われていることを示唆するものであり、また、両細胞群には NADPH diaphorase 活性は検出されなかったという従来の組織化学的知見に変更を加えるものである。

本論文は、NADPH diaphorase 活性が海馬の錐体細胞と小脳のプルキンエ細胞に検出されることを初めて明らかにしたものであり、脳内における本酵素の役割を解明する上で、多大な貢献をなすものと考えられる。

審査員一同は、これらの成果を高く評価し、また研究者として誠実かつ熱心であり、大学院課程における研鑽や取得単位なども併せ申請者が博士（環境科学）の学位を受けるのに十分な資格を有するものと判定した。