

# 脊椎動物の脳におけるニューロステロイドの生合成と作用に関する研究

浮穴 和義

## Biosynthesis and Function of Neurosteroids in the Vertebrate Brain

Kazuyoshi UKENA

要 旨

### 第1章 序 論

末梢内分泌腺が分泌するステロイドは、その脂溶性という物理化学的性状により、脳を保護する血液-脳関門を通過して、脳にホルモンとして作用することができる。これまでステロイドは、末梢内分泌腺がつくるもので、脳はこのホルモンの標的器官として位置づけられてきた。例えば、生殖腺が分泌する「性ステロイド」は、攻撃、求愛、交尾などの一連の生殖行動を誘起する。ところが最近、脳も独自にコレステロールをもとにステロイドを合成していることが明らかになった。この脳が合成するステロイドは、従来の「古典的ステロイド」と区別して「ニューロステロイド」と名付けられた。近年、ニューロステロイドに関する研究は世界的レベルで活発になされるようになったが、得られる情報は断片的である。本研究では、脊椎動物の脳におけるニューロステロイドの生合成と作用の解明を目的とした総合的かつ系統的解析を行った。

### 第2章 ラットの小脳プルキンエ細胞におけるニューロステロイド (プレグネノロンとプレグネノロン硫酸エステル) の生合成と作用

脳がニューロステロイドを合成することが明らかとなり、ニューロステロイドを合成する脳細胞を同定することがこの分野の最重要課題となった。まず、Baulieuらの哺乳類を用いた生化学的解析により、ニューロステロイドの主な合成部位はグリア細胞であることが示された。一方、Tsutsuiらの鳥類のウズラを用いた研究により、ステロイド合成の第一段階でコレステロールからプレグネノロンへ変換する酵素であるコレステロール側鎖切断酵素 (P450<sub>scc</sub>, チトクロームP450分子種の一つ) に対する抗体を用いた免疫組織化学的解析により、グリア細胞のみならずニューロンでもニューロステロイド合成がなされることが示された。そこで本章の研究では、哺乳類のラットを材料としニューロンにおけるニューロステロイドの生合成の証明を行った。ウシの副腎から精製されたP450<sub>scc</sub>に対する抗体を用いた免疫組織化学的解析により、ラットの脳の連続切片上で最も強く染色されたのは、小脳皮質の分子層と顆粒層の間に並ぶ大型の細胞であった。この細胞は形態染色とマーカー染色によりプルキンエ細胞であると同定された。本研究により初めて哺乳類のニューロンにおけるニューロステロイド合成酵素の存在が証明された。さらに、小脳プルキンエ細

胞に局在するP450sccの発達過程における変動を明らかにするために、免疫組織化学的解析、ウェスタンブロット解析、RT-PCR法による遺伝子発現の解析を行った。その結果、P450sccは新生期、思春期、成熟期のいずれの時期においてもプルキンエ細胞に発現していることがわかった。また、P450sccの作用により合成されるプレグネノロンとその硫酸エステルが小脳に蓄積されていることもラジオイムノアッセイ法により確認した。

続いて、プルキンエ細胞が合成するニューロステロイドの作用を、新生期のラットとウズラを用い電気生理学的に解析した。その結果、プルキンエ細胞から傍分泌されたプレグネノロン硫酸エステルは、プルキンエ細胞に投射しているGABAニューロン[抑制性伝達物質の $\gamma$ -アミノ酪酸(GABA)を含有するニューロン]に作用し、GABAニューロンの活動を高めることが見いだされた。プレグネノロン硫酸エステルは、このシナプスにおいてGABAによる情報伝達を修飾することが示唆された。

### 第3章 発達過程のラットの脳プルキンエ細胞におけるニューロステロイド (プロジェステロン)の一過的な生合成

これまで、末梢ステロイド合成器官では、コレステロールをもとにプレグネノロンが合成されると、プロジェステロンなどへの代謝が進むことが知られている。そこで、小脳のニューロステロイド合成経路を明らかにするためには、P450sccに加え、他の合成酵素の発現を調べる必要がある。第2章で述べたようにP450sccは生後の発達過程で常に小脳のプルキンエ細胞に発現していることがわかった。そこで本章の研究では、プレグネノロンからプロジェステロンを合成する酵素の $3\beta$ -水酸基脱水素/ $\Delta^5$ - $\Delta^4$ 異性化酵素 ( $3\beta$ -HSD)の発現と酵素活性を発達過程のラットを用い解析した。RT-PCR解析の結果、 $3\beta$ -HSDのmRNAは新生期に発現が著しく高まることがわかった。さらに小脳スライスを用いて酵素活性を測定した結果、酵素活性も新生期に高まることが明らかになった。さらに、ラジオイムノアッセイ法により、新生期に小脳内のプロジェステロン濃度が高いことも確認された。続いて、*in situ*ハイブリダイゼーション法を用い、 $3\beta$ -HSD mRNAの発現部位を解析した。その結果、プルキンエ細胞と外顆粒層の細胞にmRNAが発現していることがわかった。この新生期の小脳では顕著な形態変化が起こっており、プルキンエ細胞を中心とした神経回路網が形成されることが知られている。 $3\beta$ -HSDが新生期特異的に発現するという結果から、プロジェステロンが小脳内のニューロンの分化・誘導やシナプス形成に関与していることが示唆された。

### 第4章 ラットの各脳領域と発達過程におけるニューロステロイド合成酵素の遺伝子発現

本章の研究では、ラットの脳でのニューロステロイド合成経路の全容を解析するため、ステロイド合成におけるもう1つの要の酵素であるP450c17 (チトクロームP450分子種の一つ)の遺伝子発現を解析した。このP450c17は、プレグネノロンからデヒドロエピアンドロステロンを、プロジェステロンからアンドロステンジオンを合成する酵素である。小脳においては、いずれの発達段階でもP450c17の発現は認められなかった。小脳ではプレグネノロンやその硫酸エステルとプロジェステロンが主要なニューロステロイドであり、デヒドロエピアンドロステロンやアンドロステンジオンの合成は少ないことが示唆された。

本章の研究では、さらに小脳に加え、他の脳領域である大脳、間脳、中脳について、ニューロステロイド合成における要の酵素であるP450scc,  $3\beta$ -HSD, P450c17の遺伝子発現を生後の発達段階で

RT-PCR法により解析した。その結果、P450sccはいずれの脳領域において全ての発達段階で発現していることがわかった。3 $\beta$ -HSDは、新生期に小脳と大脳で発現が認められた。P450c17は、恒常的に中脳にのみ発現が認められた。なお、これらの遺伝子発現には、性差は認められなかった。以上の結果から、脳において部位特異的、時期特異的なニューロステロイド合成が示唆された。本研究成果は、ニューロステロイドの生理機能を解析する上で、重要な手がかりを提供するものである。

## 第5章 鳥類の脳におけるニューロステロイドの生合成

本章の研究では、脳におけるニューロステロイド合成は高等脊椎動物に一般化できる重要な現象であることを証明した。まず鳥類のウズラを用いニューロステロイドの生合成を検討した。先行研究により、ウズラの脳には、P450sccが発現しており、コレステロールをもとにプレグネノロンがつくられることを報告している。そこで、それ以降の代謝経路を解明するために、3 $\beta$ -HSDの発現と酵素活性を各脳領域で調べた。その結果、ウズラの脳には3 $\beta$ -HSDの遺伝子発現が確認され、さらに酵素活性は大脳と間脳で強く中脳で弱いことがわかった。3 $\beta$ -HSDの酵素反応によりつくられるプロジェステロンの濃度も大脳と間脳で高いことが明らかになった。

## 第6章 両生類の脳におけるニューロステロイドの生合成とその季節変動

本章の研究では、下等脊椎動物である両生類のゼノパスを用い、ニューロステロイドの生合成を検討した。まず、プレグネノロンとプレグネノロン硫酸エステル、脳、生殖腺、血漿中の濃度をラジオイムノアッセイ法により測定した。その結果、脳において高濃度にこれらのニューロステロイドが蓄積されていることがわかった。さらに、P450sccの脳内局在を解析した結果、間脳の視床下部の細胞や小脳のプルキンエ細胞などにP450sccの免疫陽性反応が検出された。従って、脳におけるニューロステロイド合成は下等脊椎動物でも証明され、脊椎動物に一般化できる重要な現象であることが示された。さらに、野生両生類のトノサマガエルを用い、ニューロステロイドの脳内季節変動を調べた結果、繁殖期にプレグネノロン硫酸エステル濃度が高くなることが明らかになった。野生動物が示すニューロステロイドの季節変動は、初めて発見されたニューロステロイドの生理的変動である。

## 第7章 総合考察

本研究により、哺乳類、鳥類、両生類の脳が独自にニューロステロイドを合成していることを証明し、脳におけるニューロステロイド合成は脊椎動物に一般化できる重要な現象であることを明らかにした。また、これまで、ニューロステロイドの合成細胞はグリア細胞であると考えられていたが、本研究により、小脳皮質ニューロンであるプルキンエ細胞が活発にプレグネノロン、プレグネノロン硫酸エステル、プロジェステロンなどのニューロステロイドを合成することを発見した。プルキンエ細胞は記憶能力を有するニューロンであり、このニューロンで起こる長期増強や長期抑圧といったシナプスの可塑性により学習・記憶がなされると考えられている。この記憶ニューロンがつくるニューロステロイドが、学習・記憶の制御に関与している可能性がある。本研究では、プレグネノロン硫酸エステルが情報伝達を調節していることを明らかにした。今後は、ニューロステロ

イドの作用を長期増強や長期抑圧との関連から電気生理学的に解析を進める予定である。また、遺伝子操作により人為的に小脳内のニューロステロイドレベルを操作し、ニューロステロイドの学習・記憶機構に対する効果を行動レベルからも解析する予定である。

一方、プレグネノロンからプロジェステロンに変換する酵素の $3\beta$ -HSDがラットの小脳で新生期の限られた時期にその発現と活性が高まるということを明らかにした。新生期に活発に生合成されるプロジェステロンは、小脳内のニューロンの分化・誘導やシナプス形成を導く可能性が高い。今後は、新生期のラットの小脳スライスの培養細胞を確立し、プロジェステロン濃度を人為的に変化させシナプス形成と神経回路形成を調べる予定である。

さらに本研究では、野生脊椎動物の脳内ニューロステロイドレベルが季節変動を示すことを明らかにした。繁殖期にプレグネノロン硫酸エステル濃度が増加する生理的意義の解明やニューロステロイド合成を制御する環境因子の同定などについて、研究を進める予定である。