

小脳プルキンエ細胞が合成する ニューロステロイドのオーガナイジング作用

坂本 浩隆

広島大学大学院生物圏科学研究科

Organizing Actions of Neurosteroids Synthesized *De Novo* in the Cerebellar Purkinje Neuron

Hiroataka SAKAMOTO

*Graduate School of Biosphere Sciences, Hiroshima University,
Higashi-Hiroshima 739-8521, Japan*

要 旨

序 論

高次情報中枢である脳は末梢内分泌腺が合成するステロイドの標的器官として捉えられてきた。ところが、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。脳は末梢ステロイドの標的器官であると同時に、ステロイド合成器官でもあるという事実は、これまでの常識を覆すものである。脳のステロイド合成は、哺乳類を用いた Baulieu らの研究と Tsutsui らの鳥類・両生類の研究により見いだされた。この新しい概念の脳分子は、末梢内分泌腺がつくる従来の「古典的ステロイド」と区別して、「ニューロステロイド (neurosteroids)」と名付けられた。これまでの研究により、広く脊椎動物の脳では、コレステロールをもとにプレグネノロン、プレグネノロン硫酸エステル、プロゲステロン、プロゲステロン代謝ステロイドなどの多くのニューロステロイドが合成されることが明らかになっている。このように、脳におけるニューロステロイドの合成に関する知見は集積されつつあるが、ニューロステロイドの作用についてはほとんどが未解明である。

ニューロステロイドの作用を解析するには、脳のニューロステロイド合成細胞を明らかにする必要がある。最近、高等脊椎動物を用いた Tsutsui らの研究により、運動学習を担う記憶ニューロンとして知られる小脳のプルキンエ細胞が活発にニューロステロイドを合成することが見いだされた。これはニューロンによるニューロステロイド合成の最初の発見である。本研究では、プルキンエ細胞が脳の代表的なニューロステロイド合成細胞であることを脊椎動物に普遍化するために、下等脊椎動物のプルキンエ細胞におけるニューロステロイド合成を生化学的手法と免疫組織化学的手法により証明した。さらに、本研究では、ニューロステロイドの作用を明らかにする目的から、脳の代表的ニューロステロイド合成細胞として同定されたプルキンエ細胞を実験系にして一連の解析を行った。まず、小脳皮質が形成される新生期のプルキンエ細胞が活発に合成するニューロステロイドであるプロゲス

テロンの作用に着目して超微形態学的に解析した。その結果、プロゲステロンにはプルキンエ細胞の発達、シナプス形成、小脳神経回路網構築を促進するオーガナイジング作用があることが発見された。さらに、オーガナイジング作用を導くプロゲステロンの作用機構を生化学的手法と分子生物学的手法により解析した。その結果、新生期のプルキンエ細胞の核内にはプロゲステロン受容体が局在していることが見いだされ、プロゲステロンはこの受容体を介したゲノミック作用により、プルキンエ細胞の発達、シナプス形成、小脳神経回路網構築を促進することが明らかになった。プルキンエ細胞というニューロステロイドの作用を解析する優れた細胞モデルを用いた本研究により、ニューロステロイドのオーガナイジング作用という重要な発見がなされた。

第1章：小脳プルキンエ細胞におけるニューロステロイド合成

脳におけるニューロステロイドの作用を解析するには、ニューロステロイドを合成する細胞を明らかにする必要がある。まず、Baulieuらの哺乳類を用いた生化学的な研究から、オリゴデンドロサイトやアストロサイトなどのグリア細胞によるニューロステロイドの合成が証明された。一方、Tsutsuiらのラットやウズラなどの高等脊椎動物を用いた研究により、記憶ニューロンとして知られる小脳のプルキンエ細胞が活発にニューロステロイドを合成することが見いだされ、ニューロンによるニューロステロイド合成が証明された。これらの高等脊椎動物のプルキンエ細胞には、コレステロールからプロゲネロンを合成するコレステロール側鎖切断酵素（略してP450_{scc},チトクロームP450分子種の一つ）やプロゲネロンからプロゲステロンを合成する3 β -水酸基脱水素/ Δ^5 - Δ^4 異性化酵素（略して3 β HSD）が発現していることが確認されている。そこで、本研究ではプルキンエ細胞におけるニューロステロイド合成を脊椎動物に普遍化するために、下等脊椎動物である魚類のゼブラフィッシュを材料とし、ニューロステロイド合成の証明を行った。まず、脳のニューロステロイド合成に重要となる3 β HSDの発現をウエスタンブロット解析から明らかにした。次に、脳スライスを用いた生化学的解析から、ゼブラフィッシュの脳から3 β HSD活性を検出した。さらに、免疫組織化学的手法により3 β HSDが発現している脳細胞を同定したところ、最も強く免疫陽性反応した細胞は小脳皮質のプルキンエ細胞であった。

以上の解析から、プルキンエ細胞が脳の代表的なニューロステロイド合成細胞であることは高等脊椎動物から下等脊椎動物の魚類までの脊椎動物に一般化できる重要な発見であることがわかった。

第2章：小脳プルキンエ細胞が合成するニューロステロイドのオーガナイジング作用

脳の代表的なニューロステロイド合成細胞として同定されたプルキンエ細胞を用いた実験系は、ニューロステロイドの作用機構を解析する優れた細胞モデルである。TsutsuiとUkenaらの研究から、新生期ラットのプルキンエ細胞では3 β HSDの発現が高まり、プロゲネロンからプロゲステロンの合成が著しく増加すること、さらにその代謝ステロイドである3 α , 5 α -テトラヒドロプロゲステロン（略して3 α , 5 α -THP）も合成されることが明らかになっている。

小脳の皮質は生後まもない新生期に形成される。この時期の小脳ではニューロンの発達やシナプス形成が活発になされ、運動学習を担うハードウェアである神経回路網が構築される。本研究では、脳の代表的なニューロステロイド合成細胞であるプルキンエ細胞を実験系にして、小脳皮質が形成される新生期のプルキンエ細胞が活発に合成するニューロステロイドであるプロゲステロンとその代謝ス

テロイド ($3\alpha, 5\alpha$ -THP) の作用をニューロンの発達とシナプス形成に着目して組織形態学的に解析した。

プロゲステロンを添加した培地で新生期ラットの小脳をスライス培養すると、プルキンエ細胞の樹状突起の伸長とシナプス形成の場である樹状突起スパインの形成が濃度依存的に促進された。これらの効果はプロゲステロン受容体のアンタゴニストであるRU486を投与することにより完全に抑制された。一方、プロゲステロン代謝物である $3\alpha, 5\alpha$ -THP はプルキンエ細胞の発達には効果を示さなかった。

次に、*in vitro* 系で明らかになったプロゲステロンの作用を *in vivo* 系で検証した。小脳において内因性のプロゲステロン合成が活発になる前の出生直後のラットにプロゲステロンを連続投与し、その後のプルキンエ細胞の形態変化を解析した。その結果、*in vivo* 系においても、プロゲステロンによるプルキンエ細胞の樹状突起の伸長と樹状突起スパイン形成などへの促進作用が確認された。本研究では、さらに *in vivo* 系を用い、透過型電子顕微鏡下で超微形態学的にシナプス数の定量化を行った。その結果、プロゲステロンはプルキンエ細胞の樹状突起上のシナプス密度を有為に増加させることが明らかになった。

以上の解析から、新生期のプルキンエ細胞が合成するニューロステロイドであるプロゲステロンにはプルキンエ細胞の発達とシナプス形成を促進するオーガナイジング作用があることがわかった。このプロゲステロンのオーガナイジング作用により新生期の小脳では運動学習を担う神経回路網が構築されると考えられる。

第3章：オーガナイジング作用を導くニューロステロイドの作用機構

これまでの研究により、新生期のプルキンエ細胞が合成するニューロステロイドであるプロゲステロンにはプルキンエ細胞の発達、シナプス形成、神経回路網構築を促進するオーガナイジング作用があることを明らかにした。本研究では、オーガナイジング作用を導くプロゲステロンの作用機構を明らかにするため、小脳におけるプロゲステロン受容体の発現と局在を解析した。まず、Reverse transcription (RT)-PCR/Southern 法を用いて、小脳におけるプロゲステロン受容体の発現とその発達段階における変動を解析した。その結果、プロゲステロン受容体の 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、プロゲステロン受容体を特異的に認識する抗体を用いた免疫組織化学的解析により、プルキンエ細胞の核内にはプロゲステロン受容体が局在していることがわかった。

以上の解析から、新生期の小脳プルキンエ細胞が一過的に合成するプロゲステロンはプルキンエ細胞自身の核内に存在するプロゲステロン受容体を介して、樹状突起の伸長、シナプス形成、神経回路網構築を促すことがわかった。小脳プルキンエ細胞を実験モデルにして明らかとなったプロゲステロンのオーガナイジング作用は、脊椎動物で初めて発見されたニューロステロイドのゲノミック作用である。

まとめ

脊椎動物の小脳プルキンエ細胞ではさまざまなニューロステロイドが合成されており、ニューロステロイドの作用を解析する優れた細胞モデルである。本研究により、新生期の小脳プルキンエ細胞が合成するニューロステロイドであるプロゲステロンの小脳における作用が明らかとなり、その作用機

構は次のように要約される。小脳皮質が形成される新生期のプルキンエ細胞ではプロゲステロンの合成に加え、プロゲステロン受容体の発現がともに高まる。プルキンエ細胞で合成されたプロゲステロンは核内のプロゲステロン受容体を介したゲノミック作用により、特定のタンパク質の合成を促進する。このタンパク質は、プルキンエ細胞の樹状突起の伸長、スパイン形成、シナプス形成などを誘導することにより、小脳神経回路網の構築を導くものと考えられる。