

比較内分泌学における新しい展開 —ホルモンの脳科学—

ホルモンと脳の関わりについては古くから多くの研究がなされてきました。その研究の主な視点は「内分泌系を調節する脳神経系」と「脳神経系を調節する内分泌系」に向けられたものでしたが、最近の内分泌系と脳神経系の境界領域における研究により、「脳の新たな側面」がみえてきました。ホルモンの概念は大きく変わり、比較内分泌学においても「Science of chemical mediation」の視点からの脳研究が今後はより一層重要になると思われまます。「ホルモンの脳科学」シリーズは、内分泌系と脳神経系の境界領域における最新の研究成果から「脳の新たな側面」を見いだし、みなさんと一緒に「脳とは何か」を改めて考えてみる試みです。良い作品には「起承転結」があるといわれています。「ホルモンの脳科学」シリーズも今回で4回目の掲載になります。その1(筒井)・その2(前多)「起」とその3(西原先生、岡先生)「承」が既に掲載され、今回はその4(川戸先生、松島先生)「転」です。比内分泌学とは異なる研究分野で活躍されている川戸先生(生物物理学)と松島先生(神経生物学)による脳研究の展開は、比較内分泌学における「ホルモンの脳科学」の新展開を考える良い機会になると思ひます。

(K. T. & K. M.)

ホルモンの脳科学 その4

脳と副腎に於けるステロイドの合成と作用を可視化解析する

川 戸 佳 (東大・院・総合文化)

kawato@phys.c.u-tokyo.ac.jp

<http://seimei3.c.u-tokyo.ac.jp/labs/kawato/kawato.html>

我々は、生物物理学の手法でステロイド合成と作用などに関わる情報変換過程を、脳のグリアや神経細胞及び副腎皮質細胞の中で追いかけている。ビデオ蛍光顕微鏡(浜松ホトニクス ARGUS50)や共焦点レーザー顕微鏡(Bio-Rad MRC-1024)を用いて、細胞中に取り込ませた Ca^{2+} 信号/エンドソーム配送/P450活性の指示薬の蛍光強度が変化することを顕微イメージすると、これら信号とその役割を直接捉える事ができる。ビデオ蛍光顕微鏡では、蛍光色素をキセノンランプで励起して、倒立蛍光顕微鏡に取り付けた超高感度 CCD カメラで捉えてビデオテープで録画し、リアルタイムで細胞1個や細胞内部の蛍光の

画像を記録することができる。一方、共焦点レーザー顕微鏡では細胞の光学断層撮影ができる。励起光はArレーザーで、断層撮影でエンドソームなどの位置情報が精度良くわかるという利点がある。光路を切り替えることでビデオ蛍光顕微鏡と共焦点レーザー顕微鏡のどちらでも観測できるようにしてある(複合顕微イメージング装置)ことも重要な点である(図1参照)。時間経過をビデオ蛍光顕微鏡で追い、特別な時点で共焦点レーザー顕微鏡を使って細胞を輪切りにして調べる、という具合に用いると大変便利である。レーザー顕微鏡の励起波長は限られているので、多重染色観察をするときなどこの複合顕微イメージン

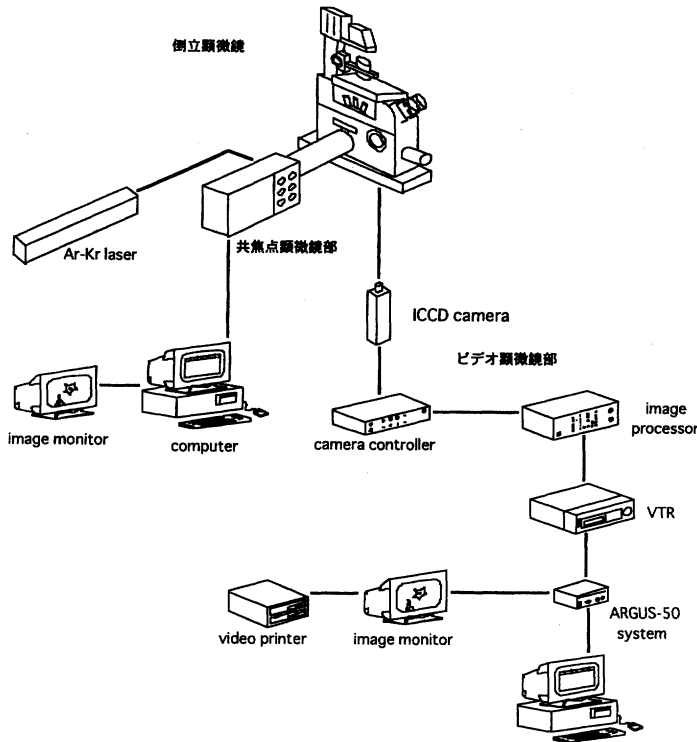


図1 複合イメージング装置。

ビデオ蛍光顕微鏡と共焦点レーザー顕微鏡のどちらでも観測できるシステム。

グ装置が威力を発揮する。

(1) 副腎細胞に於けるステロイド合成の可視化

副腎皮質は生体防御のステロイドホルモンを合成している。副腎皮質束状層ではペプチドホルモンACTH(脳下垂体から分泌される副腎皮質刺激ホルモン)が細胞に作用すると、ACTH短期効果として、20分以内に大体次のような経路で情報伝達・変換が進むと思われる。「(1)ACTHがレセプターに結合してレセプターからG蛋白などを経てタンパクキナーゼが活性化される。→ (2)細胞のCa²⁺濃度が上昇するか、またはcAMP濃度が増加する。→ (3)短寿命蛋白StARなどが合成され、これがコレステロールをミトコンドリア内膜へ運搬されるのを促進する。→ (4)ミトコンドリアでチトクロムP450_{scc}がコレステロールをプレグネノロンに変換する。→ (5)ミクロソーム中のP450_{17α}やP450_{C21}など

の各チトクロムP450が関与する多段階の反応を経て最終的なステロイドホルモンの形になる。」(図2参照)。

上記の(1)のステップで、副腎皮質細胞ではセカンドメッセンジャーが20年以上にわたり不明であり、近年までcAMPセカンドメッセンジャー説が信じられてきた。確かに1nMや1μM ACTHという薬理学的な高濃度ではcAMP濃度が上昇し、この場合cAMPがセカンドメッセンジャーである可能性は大きい。しかしACTHの生理濃度1pMはこれより遥かに低濃度で、この様な低濃度のACTHではcAMPが動かないことが証明されてきた。一方、細胞外液に1mM程度のCa²⁺がないとステロイドホルモンが合成されないことから、かなりの研究者が、もしかしてCa²⁺がセカンドメッ

センジャーではないかということを考え、沢山の研究を行ってきた。しかしCa²⁺信号は長い間発見されなかった。我々は、過去のCa²⁺測定自身がへたくそだったせいではないかと思ひ、この問題に挑戦した。しかしさんざん苦勞した。やはり、他人の言うようにCa²⁺信号はなかなかでないのである。まず、細胞が蛍光指示薬Fura-2やCalcium Green-1などでなかなか染色されない。わずか5%程度の細胞しか染まらず、これは他の臓器の細胞(神経細胞、グリア細胞、免疫細胞、肝細胞、等々)と全く異なる。最終的に我々はこの難問を、蛍光Ca²⁺指示薬の分散を良くすることによって解決し、蛍光指示薬をほぼ全部の細胞に導入できた。するとACTHは生理濃度の1pMで、Ca²⁺オシレーション信号を発生させることが観測できた。更にこのCa²⁺オシレーション信号を外液にEGTAを加えることで止めると、ステロイドホルモン産生が1/10以下に落ち

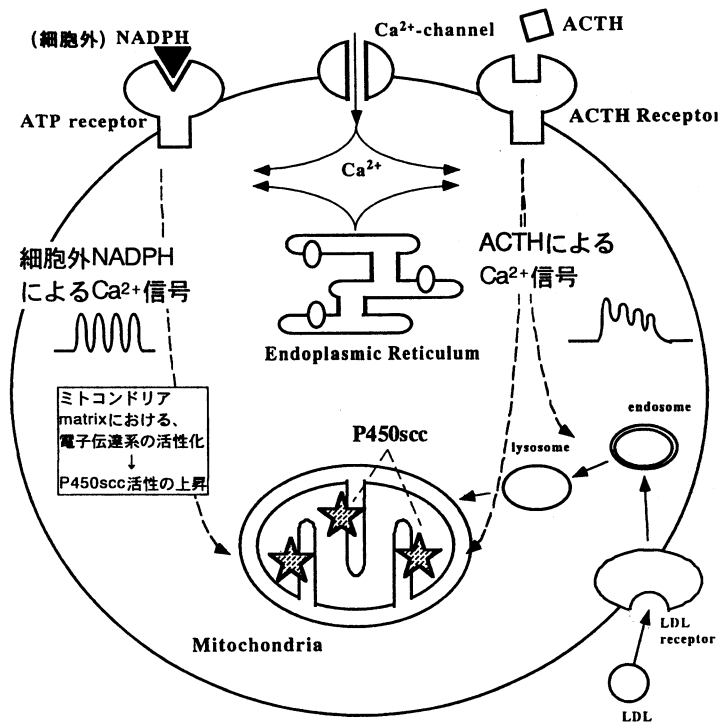


図2 副腎皮質細胞内でのステロイド合成の分子機構図。

ACTHと細胞外NADPHはCa²⁺信号を誘導する。ミトコンドリアではチトクロムP450sccがコレステロールをプレグネノロンに変換する。コレステロールはLDLエンドソームとして細胞内を運ばれる。

て、Ca²⁺がセカンドメッセンジャーであることが証明できた。詳しく見るとCa²⁺スパイク列、段階的Ca²⁺濃度上昇、これら2つの混合信号という三種類の信号が見つかった^{1, 2)}。

Ca²⁺信号の標的はなんだろう？我々は、「ACTHの引き起こすCa²⁺オシレーションはミトコンドリアに伝播し、Ca²⁺依存的にNADPHを作り→周期的な電子伝達が起こり→チトクロムP450sccが周期的に活性化されて→コレステロール→プレグネノロン変換というステロイドホルモン合成の律速反応が加速されるのでは？」という仮説を建てて研究を進めている。この仮説の検証のためには、実時間で細胞中のミトコンドリアのP450sccの活性イメージングを行う必要があり、コレステロール・レゾルフィンという蛍光基質を用いて測定を進めた³⁾。コレステロール・レゾルフィン

はプレグネノロンになり、遊離レゾルフィンの生成で蛍光強度が500倍にもなる。これを利用して細胞内ミトコンドリアでのP450sccの代謝活性を観測している。この方法により、異なるCa²⁺信号を発生するACTH、細胞外NADPHではP450scc活性化の様子が大きく異なることが分かってきた。細胞外NADPHは細胞膜中のATPレセプターに作用してCa²⁺スパイク列を発生し、これがミトコンドリア内に伝わってミトコンドリア内NADPH合成という反応を引き起こす。ACTHの引き起こすという下駄をはいたCa²⁺スパイク列はミトコンドリア中には余り効率よく働かない。最近ACTH誘導Ca²⁺信号の標的はエンドソームの輸送であることを発見した。副腎皮質ステロイド合成反応の基質のコレ

ステロールは、低密度リポ蛋白質LDLに結合して運ばれる。LDLは細胞表面のLDLレセプターに結合し→コーティッドピッツ→エンドソームというエンドサイトシスによって細胞内に取り込まれる。我々は、エンドソームに取り込まれて更にリソソームに輸送される様子をDiIという蛍光色素で標識したLDLを細胞に加えて、時間分解して撮影している。LDLは5~20分くらいでエンドソームに取り込まれるが、中期エンドソームが形成される迄に1時間かかり、それから細胞中を核方向に輸送されリソソームに到達するのはLDLが取り込まれてから3時間くらいかかることが、直接撮影で分かった。この核方向への輸送が、ACTHを加えることによって、1時間に短縮された(図3)。また1個のエンドソームの運動を追跡すると、瞬間的には0.1~1.0 μm/秒という、非常に速いスピードで、微小管上を

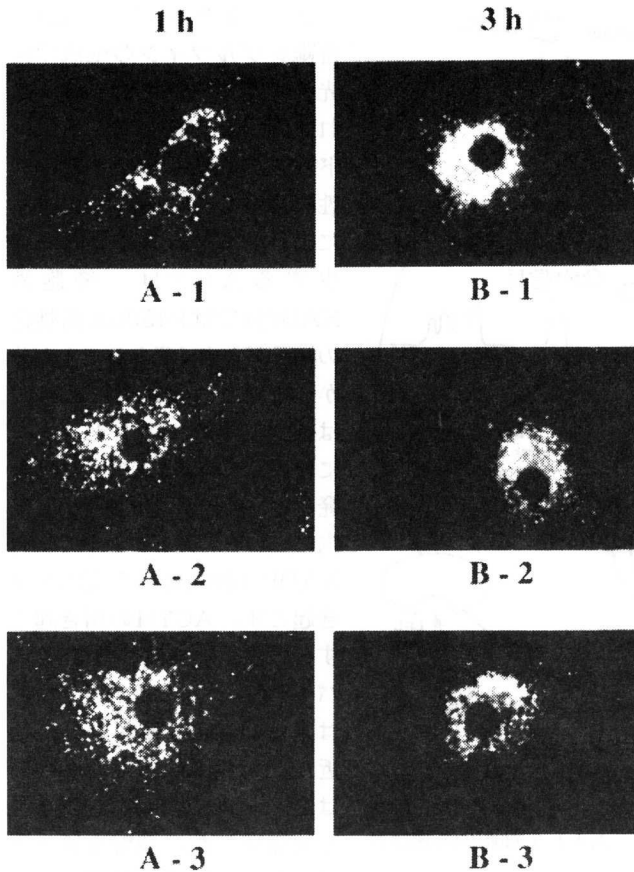


図3 副腎皮質細胞の中期エンドソームの形成と輸送。

LDLは蛍光脂質アナログDiIで標識し、37℃、7分間副腎皮質細胞とインキュベーションして取り込ませた後、1時間(A1-A3)と3時間(B1-B3)経過後ビデオ蛍光顕微鏡で観察した。A1-A3では細胞質にほぼ一様にLDLエンドソームが分布している。B1-B3では核の周りに、LDLエンドソームが局在している。ACTHを加えると1時間後に既にB1-B3のようなエンドソームの集合が見られる。

滑走していた。エンドソームにはダイニン(核方向輸送)とキネシン(細胞表面方向輸送)というモーター蛋白質が結合して動いているので、核方向と細胞表面方向の両方向に前進/後退/停止を数秒ごとに繰り返して滑走しており、その為長時間観察をすると、実時間では分からないほどゆっくりと移動していることがわかった。ACTHのCa²⁺信号はこのキネシンを抑制するかダイニンを活性化するかで、エンドソーム輸送を早めているのではないか。

(2) 脳に於けるステロイド合成

筆者等は、副腎皮質の研究を通して確立した計測法を用いて、Ca²⁺信号・ステロイド信号・NO信号など脳細胞の情報変換過程の実時間可視化を行い、脳の情動に基づく記憶学習機能の本質に迫ろうとしている。脳には神経細胞とグリア細胞がある。神経細胞は電気パルスを出して交信していることは誰もが知っているが、グリアはずっと沈黙の細胞として神経の栄養補給など補助的な仕事をしていると考えられてきた。しかし最近の研究で、グリアはCa²⁺信号を発して活発に活動しており、神経伝達物質を介して神経細胞と直接交信していることが明らかにされつつある。Ca²⁺波動信号がグリアネットワークを伝わり、最終的に神経細胞を興奮させて交信するらしい。グリア細胞は、脳内でのステロイド信号であるニューロステロイドを合成する有力な候補である。ニューロステロイドは興奮性グルタミン酸レセプターの一つNMDAレセプター、抑制性GABAレセプター等に作用することで、神経細胞間の情報伝達効率を制御している。ニューロステロイドは精神状態に密接に関係していて、各種の情動行動(怒り→攻撃、恐怖→逃避、不安)を制御していると予測されている。グリア細胞でのニューロステロイド

合成の機構が副腎皮質のステロイドホルモン合成と良く似ていると仮定すると、「(1)刺激ホルモン(グルタミン酸など)が細胞膜上のレセプターに作用して細胞質へCa²⁺が流入する。→(2)Ca²⁺信号はミトコンドリアや核に達する。→(3)ミトコンドリアでのチトクロムP450_{scc}系の電子伝達に駆動された基質コレステロールのプレグネノロンへの変換→(4)できたニューロステロイド(プレグネノロンの誘導体)の放出→(5)神経細胞のNMDAレセプターに作用し興奮性信号を促進(長期増強)し

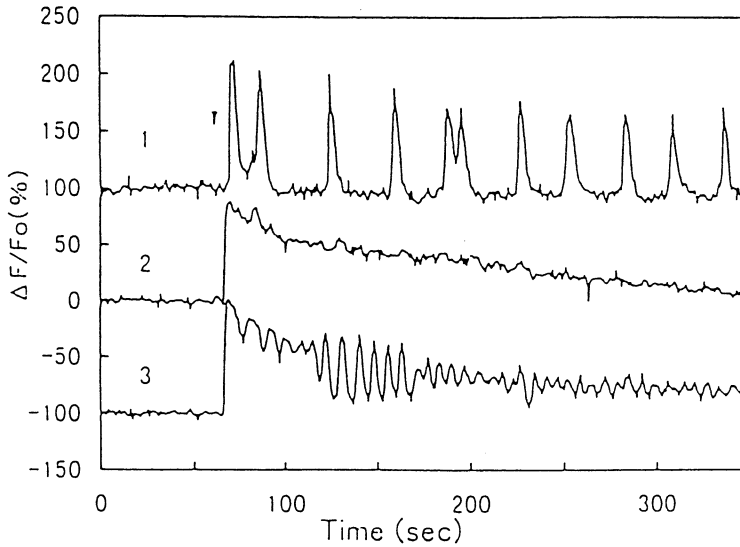


図4 セロトニン刺激で引き起こされる、アストログリア細胞内の Ca^{2+} 濃度のオシレーションを、 Ca^{2+} 指示薬Calucium Green-1の規格化した蛍光強度の変化率 $\Delta F/F_0(\%)$ を縦軸に取って、時間経過を示したものの。単一の振動波形ではなく、図に示した様に、曲線1、2、3の3種類の代表的なパターンがある。曲線1： Ca^{2+} オシレーション、曲線2： Ca^{2+} 濃度の段階的な上昇、曲線3： Ca^{2+} オシレーションが Ca^{2+} 濃度の段階的な上昇に重なったもの。図の矢印の所で $1\mu\text{M}$ のセロトニンを加えている。

て、神経ネットワークの電気信号を制御する」という流れになる。我々はラット胎児の脳から調製したグリア培養細胞を用いて、まず上記(1)、(2)の刺激物質による Ca^{2+} 信号の発生過程をイメージしたところ、グルタミン酸刺激でアストログリアやオリゴデンドログリアで Ca^{2+} オシレーションと階段状の Ca^{2+} 濃度上昇とその混合された信号という三種類の信号が発生することを観察することができた(図4)。この三種類の信号の比率は神経伝達物質(セロトニン、グルタミン酸、ヒスタミン)の種類によって大きく変わる⁴⁾。グリア細胞もLDLを取り込んで活発なエンドソーム輸送を行っているが、LDLが取り込まれてから核周辺に到達する迄には、副腎皮質の2倍の6時間もかかる(図5)。エンドソームの滑走自体は、微小管上を前進/後退/停止を繰り返す、副腎皮質と良く似た性質を示す。しかしこれまでに作用させた神経伝達物質のうちで、エンドソーム輸送を促進させるような

Ca^{2+} 信号を発するものは見つかっていない。

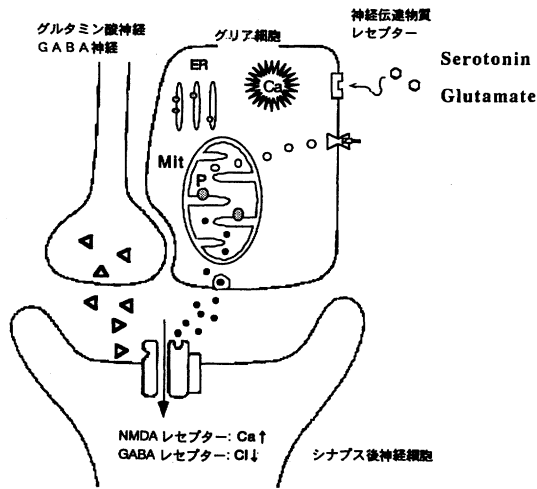
副腎皮質と比べると、 Ca^{2+} 信号の下流における、ニューロステロイド合成過程の分子論は、脳の各部分の海馬/小脳/視床/網膜のいずれをとっても未だ大変お寒い状況にある。StAR蛋白は海馬や小脳に低濃度見つかっているが⁵⁾、肝心のチトクロムP450sccが副腎皮質の1万分の1~100万分の1と極端に少ないという報告が多く、世界中の脳のチトクロムP450学者は足踏みを余儀なくされている。我が川戸研では、現在記憶学習中枢の海馬に的を絞って、奮闘しているところである。我々もチトクロムP450sccがオリゴデンドロ

グリアやアストログリアに局在すること等を観察したが、存在量は副腎皮質の1000分の1と極端に少ないので、活性測定など生化学解析は大変難しく、高感度の方法を開発する必要がある。一方グリアばかりでなく、広島大の筒井グループが小脳プルキンエ細胞にP450sccが存在することを示すなど、脳神経細胞にニューロステロイド合成能があることも示されつつある⁶⁾。

(3) ステロイド作用を海馬神経細胞で見る

我々はニューロステロイドの合成過程を追うとともに、一方でステロイドが脳神経伝達に及ぼす作用に関しても研究を進めている。

ニューロステロイドや副腎皮質ステロイドホルモンは、グルタミン酸レセプターの種類であるNMDAレセプターの Ca^{2+} 流入信号を大きく変化させることで情報伝達を変えてしまう。実際、ニューロステロイドである硫酸プレグネロン(PREGS)を海馬や扁桃体に注



- 神経ステロイド ○ コレステロール ▲ グルタミン酸 or GABA
 - 神経伝達物質 (グルタミン酸・セロトニン・ヒスタミン)
- Mit: ミトコンドリア
ER: ミクロソーム
P: テトクロム P450

図5 脳での神経細胞とグリア細胞のニューロステロイドを介した交信モデル。

グリアで合成されたニューロステロイドが後シナプス細胞の神経伝達物質レセプターに作用して、その効率を変化させる。ニューロステロイドは神経細胞自身の中でも合成される。

入ると、10-18モルという低濃度で foot-shock avoidance (電気ショック逃避) の記憶学習能がはっきりと向上する⁷⁾。

さて、脳におけるニューロステロイドや副腎ステロイドの作用を可視化するのは、どうやって行うのか？ これはPREGS、デヒドロエピアンドロステロン、硫酸デヒドロエピアンドロステロン等がNMDAレセプターを介したCa²⁺流入を大きく変化させるので、Ca²⁺信号を測定することで可視化できる。海馬の神経細胞にPREGSを加えて10分後には、NMDAによるCa²⁺信号を発生する細胞が2倍くらいに増加する。PREGSはNMDAレセプターの開閉確率を増大させるのである。又面白いことに、ストレスにさらされると、多く分泌されるコルチコステロン(CORT、副腎皮質ホルモンの一種)が、海馬神経細胞のNMDAレセプターに10分程度で急速に作用

し、NMDAレセプターが一度開いたらそのまま開き放しにする作用があることを見つけた。これ迄、ストレスの影響は4~21日という長期間経過して始めて海馬のCA3錐体細胞を死に至らしめる、という結果しかなく、これ程短時間に影響を及ぼすとは驚きであった。教科書に書いてあるようにステロイドホルモンは細胞内核レセプターを介してしか働かないというのは、誤りであった。ステロイドの作用するもう一つの代表的レセプターであるGABAレセプターはCl⁻を流入させる。このCl⁻信号の可視化はCa²⁺信号と比べて大変に難しく、未だに電極による検出にたよらざるを得ない状況が続いている。PREGSはNMDAレセプター活動を増強させ、更にGABAレセプターの活動を抑制するので、両者を合わせると海馬神経を著しく興奮性にさせることがわかる。海馬は記憶学習の中核であり、CA1錐体細胞のNMDAレセプターは空間記憶学習を担っている。従って、海馬神経細胞のNMDAレセプターがPREGSで増強されるのは記憶学習能を上昇させると考えられるし、CORTで機能不全に陥るのはストレスで記憶学習能が落ちることと関連があると考えられる。

一方、核レセプターを介して働く低濃度(ナノモルオーダー)のCORTは海馬神経の維持に必須で、これがないと歯状回の神経細胞が死んでしまう。このように、ステロイドは、脳では核レセプターを介して作用を発揮する慢性効果だけではなく、神経伝達物質レセプターを制御することで急性的に作用を発揮することが多く、情動に依存する記憶学習を本質的に制御している可能性が高い。

〔謝 辞〕

本稿で紹介した研究は、東大川戸研究室の木本哲也、山田慎、高橋泰城、市川智光氏が主に行ったものである。また広島大学総合科学部の小南思郎、山崎岳、東京都立老人研究所の阿相皓晃の諸氏との共同研究を含んでいる。

〔参考文献〕

- 1) Kimoto T, Ohta Y, Kawato S (1996) Biochem Biophys Res Commun 221: 25-30.
- 2) Yamazaki T, Kimoto T, Higuchi T, Ohta Y, Kawato S, Kominami S (1998) Endocrinology 139: 4765-4771.
- 3) Kimoto T, Mukai H, Homma R, Bettou T, Nishimura D, Ohta Y, Kawato S (1997) In Oxygen Homeostasis and Its Dynamics (1997) pp252-259, Springer-Verlag, Tokyo.
- 4) Kimoto T, Asou H, Ohta Y, Mukai H, Chernogolov AA, Kawato S (1997) J. Pharm. Biomed. Anal. 15: 1231-1240
- 5) Furukawa A, Miyatake A, Ohnishi T, Ichikawa Y. (1998) J. Neurochem. 71: 2231-2238.
- 6) Ukena K, Usui M., Kohchi C., Tsutsui K. (1998) Endocrinology 139: 137-147.
- 7) Flood JF, Morley JE, Roberts E (1992) Proc Natl Acad Sci USA 89: 1567-1571.

心とは何か：雛鳥の学習の記銘内容と神経機構

松島俊也 (名古屋大・院・生命農)
matusima@agr.nagoya-u.ac.jp

What is mind? 心とは何か?
No matter. 物質ではない(問題ではない)
What is the matter?
その物質とは何なんだ?
(なにが問題なんだ?)
Don't mind 気にするな
(山鳥 重@東北大学・医, 1994年8月東京で開かれた日本物理学会主催の講演会の冒頭のスライドより)

心とは何か。この問いに対して、我々動物学者には二つの問い方がある。

一つは系統発生的な問いである。着床する場所を探すホヤのオタマジャクシ幼生に心はあるか。母川を遡るサケに心はあるか。ミミズの後を追うカエルに心はあるか。貯食するアメリカカケスに心はあるか。モリス・プールを泳ぎ回るネズミに心はあるか。モンキーチェアに座って実験者を見つめるサルに心はあるか。この文を書く私とそれを読むあなたに、心はあるか……その流れの中で、そもそも「心とは何であったのか」を問いた

すやり方と言って良い。心の進化的起源を問うものである。

もう一つが個体発生的な問いである。受精卵に心はあるか。孵化7日の鳥のembryoに心はあるか。孵化14日ではどうか。親鳥の羽の中にうづくまる孵化直後の雛鳥に心はあるか。distress callから雄叫びを分化させ始めた6週齢の若鳥の雄に心はあるか……いつ、何が、どの様に動物の心的現象として顕現するかを追跡し、相同行動の繰り込みに伴う神経的乗っ取りを記述することにより、心の構造的起源を問うものである。

これら二つのアプローチを一つの現象を通して統一することを目指して、one-trial passive avoidance learning^(注1)と「刷込み」(classical imprinting)の仕事 시작했다。本稿では前者のpassive avoidanceを扱う。従来研究者達の膨大な知見と共に、我々の歩んだ数歩を紹介したい。この学習課題は一回の経験により形成される長期的な記憶である。まず、その記銘内容をめぐる議論から始めよう。