

## 海馬における神経ステロイドの合成と作用

川戸 佳 東京大学・大学院・総合文化研究科・教授

私は海馬における神経ステロイドの合成と作用について紹介します（文献1）。ステロイドホルモンの研究はこれまでは性行動や性分化に集中していましたが、神経ステロイドはいわゆるステロイドホルモン作用とは異なり、核受容体を經由することなく、急性的に作用し、興奮性の NMDA 型グルタミン酸受容体の Ca 信号を増幅したり、抑制性の GABA 受容体の Cl 信号を低下させることで、神経細胞間の情報伝達効率を制御していることがごく最近、明らかになってきました。また、記憶学習にも作用していることが明らかになってきました。神経ステロイドは第4世代の脳情報伝達物質です。第1世代は、普通の神経伝達物質であるグルタミン酸やアセチルコリンなどで、第2世代はドーパミンなどの生体アミン、第3世代は神経ペプチド、第4世代が神経ステロイドということになります。これまでは、神経ステロイドとシナプス伝達の関係を示す明確な証拠が得られなかったためあまり論じられていませんでした。

### 神経ステロイドは記憶・学習や神経伝達に効く

最近の知見をもとに、海馬での神経ステロイドの合成経路をまとめると図1のようになります。コレステロールから P450<sub>scc</sub> の作用でプレグネノロンが生成し、sulfotransferase により硫酸プレグネノロンが生成します。また、成獣ラットでは P450<sub>17α</sub> により DHEA が生成しています。そして、プレグネノロンから生成する硫酸プレグネノロンが神経行動に効果を発揮することはよく知られています。米国の Roberts 教授らは硫酸プレグネノロンを扁桃体や海馬にフェルトモル以下のごく低濃度注入しただけで脚の電気ショックを逃避するテストの成績が向上することを明らかにしています（図2、文献2）。また、フランスの Baulieu 教授らは、海馬における硫酸プレグネノロン量が加齢とともに低下することを明らかにしています。さらに、老化したマウスに硫酸プレグネノロンを投与すると、空間学習能が劇的に回復することを報告しました（図3、文献3）。硫酸プレグネノロンの効果が行動面からも明らかになっています。しかし、多くの研究者が調べているにもかかわらず、脳での神経ステロイド合成酵素系の発現は確認されていませんでした。筒井先

生から小脳のプルキンエ神経細胞によるステロイド合成系が紹介されると思いますが、これまでにグリア細胞にステロイド合成系が存在することは分かっていました。硫酸プレグネロンが NMDA 受容体に作用しているとの電気生理による報告があったことから、我々は NMDA 受容体に硫酸プレグネロンが作用して流入する  $Ca^{2+}$  をとらえることで効果を調べてみました。培養した海馬神経細胞に硫酸プレグネロンを数分から 20 分ほど作用させると、同じ NMDA 刺激をしても NMDA 受容体を介する  $Ca^{2+}$  電流がコントロールの 1.5 倍ほど大きくなりました。これまでの研究を総合すると、硫酸プレグネロンは NMDA 受容体を介した信号の増強に効果を発揮し、GABA 受容体は抑制して、合計で神経伝達の効率を 10 倍ほど上げるようです。

### 抗体染色法による海馬での解析

長い間、ステロイドは副腎皮質や性器官などから分泌され、血流によって運ばれて脳に作用すると考えられていました。ところが、血流によって脳内で作用するためには  $\mu M$  オーダーの濃度が必要となります。記憶・学習に関与しているのであれば、分泌してすぐに作用しないと話になりません。そこで、脳内での合成系を探索するため多くの人たちが努力していましたが、うまく染色ができないため撤退してしまいました。しかし、私どもは筒井先生の小脳での発見に意を強くして、海馬で解析を進めてきました。海馬の特徴は、錐体細胞が層状に規則正しくきれいに並んでいることです(図4)。そのため、どこに何があるのかを判定するのに都合がよく出来ています。私は P450scc からステロイドを合成する研究を続けてきましたが、P450scc は長い間海馬に発現していないと考えられていました。それは、これまでの染色法に問題があったためです。ほとんどの研究者がウシの P450scc の抗体を使ってラットで探索していました。それではうまくいきません。そこで、ラットの抗体を使うようにしました。最初は苦労しましたが、現在は錐体細胞層や顆粒細胞にそってチトクロム P450scc が分布している様子が観察できるようになっています。グリア細胞は染まりません(図5)。そして、共焦点レーザー顕微鏡で二重染色することにより、グリア細胞の分布とは異なることも明らかになりました(図6)。ただし、厳密にみれば、グリア細胞にも多少は発現しているようです。P450scc が関与するのであれば、それに電子をわたす必要があるため、電子を渡すアドレノドキシシンやアドレノドキシシン還元酵素の分布を調べたところ、やはり錐体細胞に局在していました。

### 海馬におけるプレグネロンと硫酸プレグネロンの合成

チトクロム P450scc 系が存在するので、プレグネロンが合成されることはわかりまし

たが、硫酸プレグネノロンの産生を示す必要があります。これについて、Baulieu 教授らも研究していましたが酵素を発見できませんでした。しかし、私どもは共立薬科大学の田村教授との共同研究で、sulfotransferase の抗体で染色して共焦点レーザー顕微鏡観察で分布を観察しています。ウエスタンブロッティングにより、P450<sub>scc</sub>、アドレノドキシシンや還元酵素、sulfotransferase などは正しい分子量の所に単一バンドが確認されました。アドレノドキシシンとアドレノドキシシン還元酵素、P450<sub>scc</sub> などが錐体細胞に局在しています。これがちゃんと働いて硫酸プレグネノロンを産生していることを証明する必要があることから、Basal Level でプレグネノロンと硫酸プレグネノロンの量を調べてみました。その結果、脳では海馬がもっとも多く、血漿の 50~200 倍ほど存在していますが、副腎で産生されるレベルに比べると、100 分の 1 か 1,000 分の 1 ほどと少なくなっています。NMDA 型グルタミン酸受容体を NMDA で刺激して 30 分後には、プレグネノロンの量が Basal Level の 2~3 倍に増加していました（図 7）。Ca<sup>2+</sup>の流入がないと、合成されません。NMDA 型グルタミン酸受容体の機能を阻害する MK-801 を添加するとまったく合成されません。また、P450<sub>scc</sub> の阻害剤を添加しておくとう合成が起りませんでした。以上により、NMDA 型グルタミン酸受容体を介する Ca<sup>2+</sup>信号によって駆動され、プレグネノロンが合成されることが証明できました。プレグネノロンから硫酸プレグネノロンに転化することも明らかにする必要があります。プレグネノロンの測定より硫酸プレグネノロンの測定のほうがはるかに困難でしたが、NMDA 刺激によって 2 倍になっていました。NMDA 型グルタミン酸受容体を阻害するとやはり合成は起りません（図 8）。

### 記憶学習の長期増強に対する効果

海馬の錐体細胞にプレグネノロン、硫酸プレグネノロンの合成系がすべて存在して働いています。それも、恒常的に合成しているのではなく、NMDA 型グルタミン酸受容体を介する信号がはいったときのみ、急性的に合成されます。記憶・学習を強化するかどうか、LTP（長期増強）との関係を調べてみました。長期増強をかけるためには、テタヌ刺激を海馬スライスの CA3 錐体細胞のシェ - ファー側枝に対して 100Hz で 1 秒かけるのが普通です。テタヌ刺激を与えますと CA1 錐体細胞で観測される EPSP（後シナプス電流）の初期スロープがテタヌ刺激前の 1.5~2 倍になります。これは前シナプスからの多量のグルタミン酸の放出により NMDA 型グルタミン酸受容体を介する Ca<sup>2+</sup>が流入し、その状況が何時間も続くのが長期増強、すなわち記憶したということです。ところで、30Hz を 0.5 秒というテタヌ刺激では、普通では長期増強がかかりません。そこで、あらかじめ硫酸プレグネノロンを 20 分ほど流し、その上でテタヌ刺激を 30Hz で 0.5 秒かけると LTP がかけられます（図 9）。つまり、硫酸プレグネノロンは長期増強をかかり易くしていることが証明できました。硫酸プレグネノロンの合成系があり、思考・学習するとき神経細胞の相

相互作用で合成され、それがすぐに作用するわけです。シナプスからグルタミン酸が放出されて NMDA 型グルタミン酸受容体に働き、 $Ca^{2+}$ が流入します。その結果、コレステロールが内膜に運ばれて P450<sub>scc</sub> に結合して、P450<sub>scc</sub> がコレステロールをプレグネノロンに変換して、sulfotransferase が硫酸基をつけて硫酸プレグネノロンに転化します。それが NMDA 型グルタミン酸受容体に結合してチャンネルが開き易くなり、更に多くの  $Ca^{2+}$ が流入します。その結果、さらにコレステロールが P450<sub>scc</sub> へ運ばれ、硫酸プレグネノロンが合成されるようになります。このようなフィードバックが何十分にもわたって働くことで、海馬での記憶・学習効果を高めています(図 10)。ミトコンドリアやミクロソームの中にステロイド合成系がどの様に配置されているかを図 11 に示しました。教科書には、長期増強は次のような仕組みで起こると記載されています。つまり、 $Ca^{2+}$ 流入に駆動されてマップキナーゼが働いて短寿命蛋白質が合成され、AMPA 型グルタミン酸受容体がリン酸化されたり、あるいは AMPA 受容体の数が増加します。また、NMDA 受容体もリン酸化されるかもしれないということです。我々の研究ではこの他に、シナプス後細胞にミトコンドリアがたくさんあり、そのミトコンドリアに入ってきた  $Ca^{2+}$ によって駆動されて、神経ステロイドが合成され→NMDA 受容体を増加し→正のフィードバックで LTP がかかり易くなるように働いていることがわかりました。

### ストレスステロイドや女性ホルモンの急性効果

私たちは NMDA 受容体に、プレグネノロンより下流のステロイドも効くことを発見しています。まず、チトクロム P450 17 $\alpha$  があることを証明して、コルチコステロンやエストラジオールなどプレグネノロンより下流を調べてみました。ちなみに脳では、P450 17 $\alpha$  は存在しないと考えている人がほとんどです。モルモットの P450 17 $\alpha$  の抗体で海馬を染色すると、成熟ラットの錐体細胞層で発現が観察されました。更にチトクロム P450aromatase がきれいに染色されることから、DHEA も合成され、エストラジオールも合成されるという感じです。コルチコステロンの急性効果を私の専門の  $Ca^{2+}$ イメージングで測定してみました。Calcium Green-1 や fura-2 を細胞に導入して、 $Ca^{2+}$ が結合すると蛍光が増加することで 2 次的に画像解析しました(図 12)。Mg を抜いた液に浸して NMDA 型グルタミン酸受容体のブロックをはずしておく、普通は NMDA 刺激で 1 分ほどの半値幅の  $Ca^{2+}$ スパイクがひとつ発生します。所が、コルチコステロン液に海馬の神経細胞を 10~20 分浸しておき、それで NMDA で刺激すると、NMDA 型グルタミン酸受容体が一度開くと開いたまま 2 度と閉じません。 $Ca^{2+}$ レベルが上がり、20 分、30 分、1 時間でも開いたままです(図 13)。これは 1  $\mu$ M や 500nM という低い濃度でも効果があります。このようにコルチコステロンは海馬の神経に急激に働くことを発見しました。我々がストレスを感じると、コルチコステロン濃度があがりますが、我々はストレスがかかるとすぐに記憶・学

習に障害を覚えます。ストレスステロイドがはるばる副腎皮質からやってくるのを待たなくても、海馬で合成した、コルチコステロンがすぐに効くことによると思われます。エストラジオールに関しては、慢性効果としては、多くの研究があり神経細胞の成長を促進することがわかっていますが、急性効果については説明が進んでいません。我々が発見したのは、エストラジオールは  $Ca^{2+}$  信号を増強しますが、コルチコステロンとはまったく違う方法で増強するということです。普通に NMDA で刺激すると、NMDA 型グルタミン酸受容体が 1 分ほど開いて  $Ca^{2+}$  流入が起こります。エストラジオールに 10 分ほど浸して NMDA 刺激をかけると、 $Ca^{2+}$  流入信号が、5 分ほど続きます (図 14)。コルチコステロンのように  $Ca^{2+}$  濃度が上がったままでは、次に入力きたときその神経は反応できません。ところが、エストラジオール作用は、 $Ca^{2+}$  濃度が 5 分経過するともとのレベルに戻るため、次の入力も神経が反応することができます。硫酸プレグネノロンはこの NMDA 受容体を介する  $Ca^{2+}$  信号のタイムコースをかえませんが、エストラジオールはタイムコースをかえて長く  $Ca^{2+}$  が流入するようにします。このように、海馬で女性ホルモンは、神経間の交信を増幅していることがわかりました。硫酸プレグネノロンは閉じていた NMDA 受容体を開け易くする方向で増幅しましたが、エストラジオールは開いている NMDA 受容体を少し長く開かせます。コルチコステロンは一度開くと閉じなくしてしまいます。ただし、洗えばすぐにコルチコステロンの影響がなくなるため、ストレスの効果を除こうと思えば、リラックスしてストレスステロイド濃度を下げればすぐにもとに戻ります。記憶学習を海馬で主に担っている NMDA 型グルタミン酸受容体に、これらの神経ステロイドが違った方式で神経伝達を大きくかえることにより、自分たちの効果を発揮していることが明らかになってきました。

## ストレスと海馬

私どもの目標は、感情を生物の言葉で解析することです。海馬は、いろいろな研究からすると、ストレスに関しては中心的な役割をはたします。ほかの幸福感や興奮などの感情にはあまり関係がないようです。阪神・淡路大震災では、神戸の人たちは大きなショックを受けました。このときの記憶は 2 度と忘れないほど頭に刷り込まれます。このときにも、多量のコルチゾールが産生されて海馬に作用していたのではないかと思います。 $Ca^{2+}$  濃度が上昇して、そのままのレベルを保つと、次の刺激に反応できなくなります。大量の  $Ca^{2+}$  が流入すると、そこで何らかの記憶が焼きついて、ストレスの記憶につながるのではないかと思います。これまでは、脳は単なるアンテナで、ストレスがかかると脳内で CRH が分泌され、ACTH が分泌されて、それが副腎皮質を刺激してコルチゾールが合成されて脳に働くといわれていました。そのような悠長なことはやっていないというのが私の説です。ストレスがかかると、すぐに海馬でコルチゾールが合成され脳神経に働きます。それ以上

の記憶・学習の能力を抑えます。我々は、ストレスばかりではなく楽しい感情を動かすような記憶が、神経ステロイドで増幅されることがわかるとよいと思い毎日研究しています。ストレスに示されるように、神経ステロイドは受容体のリン酸化やアラキドン酸・神経ペプチドが担っているような情報ではなく、感情に近いような情報の処理をになっているのではないかと考えています。

## おわりに

私は、自分の研究成果を先取りして、スーパーホルモン DHEA を時おり服用しています。海馬の記憶ボケを予防するためです。アルツハイマー病になった身内の人に何か良い薬はないかとたずねられて、DHEA を投与すればエストラジオールが合成されると思って輸入して配ったところ効果がありました。身内の人の名前を思い出したなどといって最近、感謝されています。しかし、名和田先生が輸入 DHEA は純度が低いと述べられたので「これはまずいな」と思っています。もっとよいものを開発する必要がありますが、神経ステロイドは脳の記憶・学習に効果があるので、つくれば効くだろうと思います。私たちの研究室は、20 人ほどのグループです。助手の木本君、それから博士課程の北条君・高橋君、修士課程の太田・釣木澤君などがこの仕事に関与しています。手分けして研究していますが、生物物理学を勉強しようとして研究室にはいつてきたら、組織染色やウエスタンブロットをやらされるため、ぶつぶつ不平をいいながらやっていますが、最近楽しんでいると思います。どうもありがとうございました。

## Q & A

### ■Q■

ニューロステロイドの消去系は、どの程度まで明らかになっているのでしょうか。特に、記憶と関係するという話だと興味ある点だと思います。

### ●A●

硫酸プレグネノロンとして作用して、NMDA 受容体を開ける過程が循環して長期増強がかかっている間、つまり1時間ほどは消えずに存在すると思います。その後、sulfatase 酵素で硫酸基をはずされてプレグネノロンにもどり効果がなくなります。それからプログネノロンはどんどん代謝され、DHEA やエストラジオールまで転化します。その先は血中に放出されてなくなるのだと思います。

### ■Q■

海馬の神経細胞が NMDA により活性化されると、Ca<sup>2+</sup>の流入量が増加し、それによって P450<sub>scc</sub> によるプレグネノロン産生も増加して、LTP 増加と続くということですが、カルシウムイオンによる P450<sub>scc</sub> 活性化、またはその酵素活性の誘導機構に関して教えてください。

### ●A●

脳細胞中のミトコンドリアの外膜に StAR 蛋白質が待ちかまえており、Ca<sup>2+</sup>が流入すると内膜に移動します。その時にコレステロールを内膜に運びます。運ばれてきたコレステロールから P450<sub>scc</sub> が、プレグネノロンを合成します。もうひとつは、ミトコンドリアのなかに Ca<sup>2+</sup>波がはいって、NADPH の合成を引き起こします。それで、P450<sub>scc</sub> への電子伝達が活性化されて働くようです。おそらく、StAR 蛋白質は劇的に動きます。末梢器官では StAR がコンスタントに動いていますが、脳では Ca<sup>2+</sup>信号がはいらないかぎり待機しており、Ca<sup>2+</sup>が流入した途端に動くという、きれいな現象があります。

### ■Q■

硫酸プレグネノロンの NMDA 受容体への結合は、通常のエストロゲンの核受容体への結合よりかなり弱いようですが、特異的だという証拠は何でしょうか。

### ●A●

確かに NMDA 受容体を制御するには濃度がかかりが必要です。普通の核内受容体に比べると 100 分の 1、1,000 分の 1 ほど結合が弱くなっています。硫酸プレグネノロンでは 10 $\mu$ M は必要です。コルチコステロンは数百 nM できくので、かなり強いですが、核内受容体より結合能は弱くなっています。ですから、末梢からはるばると運ばれてくるのでは、その濃度をまかないきれません。脳内で局所的に合成されるので、硫酸プレグネノロンは 10 $\mu$ M も合成されているという結果です。

### ■Q■

一般に、先生が研究しているのは nongenomic action というもので、つい先だってまでは本道ではないといわれていました。いろいろな実験により重要であると考えられつつあります。例えば、NMDA 受容体に結合したとき、それがどのような立体構造変化を起こして伝えるかまでやらないと、これまでの genomic action 派を説得することが難しいと思います。頑張ってくださいと思います。

### ●A●

NMDA 受容体への結合はタイトバインディングではないので、バインディングサイトを同定することが困難です。しかしながら、プロゲステロンと一緒にいれると、コルチコステロン効果は消失します。また、硫酸 DHEA や硫酸エストラジオールを添加すると、硫酸プレグネノロンの効果を完全にうち消してしまいます。ステロイドの濃度は上がるにもかかわらず、効果がキャンセルされてしまいます。このようにステロイドの結合は、どうも competitive なようです。硫酸抱合体では同じようなところに結合しているようですが、このように competitive な阻害実験をやって追求するのが、結合の特異性を証明するには今のところ考えられる一番よい方法だと思います。その効果は  $Ca^{2+}$  で測定できるので、きれいにできます。

### ■Q■

やはり、NMR やクリスタルグラフィーなどを使い、低分子が NMDA 受容体に結合するところまでやっていただきたいと思います。

### ●A●

はい、了解しました。少し補足しますと、NMDA 受容体はステロイドで増強されますが、AMPA 型受容体は 10% ほど抑制されます。従ってステロイドがランダムにいろいろなところに効いていて、すべて増強しているわけではなく、特別なところにきいているのだと思います。

### ■Q■

ステロイドの合成で、コレステロールが外膜から内膜に移るときに関連しているペプチドとして、ジアゼパンバインディングインヒビターが海馬での活性化に関係しているのでしょうか。  $Ca^{2+}$  との関係を教えてください。

### ●A●

ジアゼパンバインディングインヒビターも関係していると思います。急激にはいつてきた  $Ca^{2+}$  で制御される性質は、StAR 蛋白に比べると弱いようで、海馬で調べている人はほとんどいません。私は「ジアゼパンバインディングインヒビターを研究するのはどうか」と助手の木本君に聞いたところ、「あれは  $Ca^{2+}$  のレギュレーションが弱いからやめましょう」といわれ、主に StAR 蛋白を研究しています。私の認識は間違っているかもしれませんが、働いてはいるが、入ってくる  $Ca^{2+}$  によるトリガーは弱いとされています。

### ■Q■

私たちはエストロゲン受容体  $\alpha$  の局在を海馬で調べています。海馬の錐体細胞に発現し

ているという報告がありますが、私たちの結果ではでていません。インターセルとデンテートジャイラスの介在ニューロンにエストロゲン受容体は確かにありますが、それも数が少ないため、いわゆる核に共存することになります。エストロゲンが海馬に関係していることはわかりますが、核受容体が抗体染色でないのはおかしいと思っています。別の膜での働きが強いのかもしれないという印象をもっていたのですが、先生の発表と一致しているということで、コメントさせていただきました。

●A●

10年ほど前の「Science」に、エストラジオールをかけると海馬神経の電気信号が増強されるという文献がありました。実際にCa<sup>2+</sup>信号や電気生理の文献を調べると、非常に効果があるという結果が数報報告されています。私たちは効果をはっきりさせるためにμM濃度のエストラジオールをいれていますが、脳内でのエストラジオールの存在濃度は硫酸ブレグネノロンに比べると低いため、低い濃度でかなり効いていると思います。似たような感じで、女性ホルモン類似環境ホルモンが効いているという気がします。

■Q■

コルチゾールなどの発現作用が早くなっていますが、受容体はどこに存在するのでしょうか。NMDA受容体に結合サイトがあるのでしょうか。

●A●

そうだと思います。

\*\*\*\*\*

### 1.1.1 参考文献

文献1 Kawato, S., Yamada, M., and Kimoto, T.

Adv. Biophys., (2000) in press. "Neurosteroids are 4th generation neuromessengers: cell biophysical analysis of steroid signal transduction" 以上の話の内容がほぼ全部収められている。

文献2 Flood J. F., Morley J. E. and Roberts E. (1995) "Pregnenolone sulfate enhances post-training memory processes when injected in very low doses into limbic system structures:" Proc. Natl. Acad. Sci. USA 92, 10806-10810

文献3 Baulieu E. E. (1987) Neurosteroids: of the nervous system, by the nervous system, for the nervous system. Recent progress in hormone research 52, 1-32

## 図と説明

### 図 1

脳海馬での神経ステロイドの合成経路。神経ステロイドの構造と、代謝に関与する酵素の名前を示してある。チトクロム P450<sub>scc</sub> と P450<sub>11β</sub> はミトコンドリアに存在する。P450<sub>17α</sub> と P450<sub>arom</sub> はミクロソームに存在する。

### 図 2

硫酸プレグネノロンを扁桃体や海馬にフェルトモル以下のごく低濃度注入しただけで、脚の電気ショックを逃避するテストの成績が向上することを示したもの（文献 2）。

### 図 3

海馬における硫酸プレグネノロン量が加齢とともに低下することを明らかにしています。さらに、老化したマウスに硫酸プレグネノロンを投与すると、空間学習能が劇的に回復することを報告しました（文献 3）。硫酸プレグネノロンの効果が行動面からも明らかになっています。

### 図 4

ラット海馬スライスでの錐体神経細胞（三角形の核）と顆粒神経細胞（円形の核）の配置図。更に電気生理で、CA3 錐体細胞の Schaffer Collaterals を高周波刺激し、CA1 錐体細胞の細胞外電流を測定し、長期増強 LTP を測定する電極配置を示している。

### 図 5

成獣雄ラット海馬スライスでのチトクロム P450<sub>scc</sub> の抗体組織染色の図。 a, ラット P450<sub>scc</sub> 抗体による染色。 b, Neuron N 抗体による染色。 c, CA1 領域における P450<sub>scc</sub> 抗体による染色（図の真ん中 pcl 部を左から右に層状に染まっている）の拡大図。 d, 精製 P450<sub>scc</sub> により抗体を前処理した後染色したコントロールで何も染まっていない。

### 図 6

ラット海馬スライスでのチトクロム P450<sub>scc</sub> の蛍光抗体二重組織染色の図。 a, ラット

P450scc 抗体と Neuron N 抗体による染色。両者はほぼ重なっている。b, ラット P450scc 抗体 (図の真ん中 pcl 部を左から右に層状に染まっている) とアストログリア GFAP (glial acidic fibril protein) 抗体 (図の上 so 部と下 sr 部に星状に染まっている) による染色。c, ラット P450scc 抗体 (図の真ん中 pcl 部を左から右に層状に染まっている) とオリゴデンドログリア MBP (myelin basic protein) 抗体 (図の上 so 部と下 sr 部に筋状に染まっている) による染色。いずれも CA1 領域の拡大図。

#### **図 7**

海馬で NMDA 型グルタミン酸受容体を介する  $Ca^{2+}$  信号によって駆動され、プレグネノロンが合成されることをラジオイミュノアッセイ (RIA) で示したもの。左より右へ、海馬 basal のプレグネノロン、0 分インキュベーション。海馬を NMDA 刺激なしで 30 分インキュベーションしたもの。海馬を 100 $\mu$ M NMDA 刺激で 30 分インキュベーションしたもの。外液の Ca を無くした状態で海馬を 100 $\mu$ M NMDA 刺激で 30 分インキュベーションしたもの。NMDA 受容体阻害剤 MK-801 を加えて海馬を 100 $\mu$ M NMDA 刺激で 30 分インキュベーションしたもの。NMDA 受容体阻害剤 AP5 を加えて海馬を 100 $\mu$ M NMDA 刺激で 30 分インキュベーションしたもの。P450scc 阻害剤 aminoglutethimide (AG) を加えて海馬を 100 $\mu$ M NMDA 刺激で 30 分インキュベーションしたもの。

#### **図 8**

海馬で NMDA 型グルタミン酸受容体を介する  $Ca^{2+}$  信号によって駆動され、硫酸プレグネノロン (PREGS) が合成されることをラジオイミュノアッセイ (RIA) で示したもの。左より右へ、海馬 basal の硫酸プレグネノロン、0 分インキュベーション。海馬を NMDA 刺激なしで 30 分インキュベーションしたもの。海馬を 100 $\mu$ M NMDA 刺激で 30 分インキュベーションしたもの。NMDA 受容体阻害剤 MK-801 を加えて海馬を 100 $\mu$ M NMDA 刺激で 30 分インキュベーションしたもの。

#### **図 9**

テタヌス刺激を海馬スライスの CA3 錐体細胞のシェ - ファー側枝に対して 50Hz で 0.5 秒かけても CA1 錐体細胞で観測される EPSP (後シナプス電流) の初期スローブは変化しない (control 折れ線)。所があらかじめ硫酸プレグネノロン 100 $\mu$ M を 20 分灌流し、その上でテタヌス刺激を 30Hz で 0.5 秒かけると、EPSP の初期スローブは 1.3 倍になり (PREGS 折れ線)、長期増強がかかったことがわかる。

#### 図 1 0

神経ステロイドによる海馬神経細胞間の信号伝達増強の模式図。シナプス前細胞からグルタミン酸が放出されて、シナプス後細胞の NMDA 型グルタミン酸受容体に働き、 $\text{Ca}^{2+}$  が流入→StAR 蛋白質によってコレステロールが内膜に運ばれてチトクロム P450<sub>scc</sub> に結合し→P450<sub>scc</sub> がコレステロールをプレグネノロンに変換→sulfotransferase が硫酸基をつけて硫酸プレグネノロンに転化→NMDA 型グルタミン酸受容体に結合してチャネルが開き易くなり、更に多くの  $\text{Ca}^{2+}$  が流入→さらにコレステロールが P450<sub>scc</sub> へ運ばれ→硫酸プレグネノロンが合成されるようになる。このようなフィードバックが何十分にもわたって働くことで、海馬での記憶・学習効果を高める。NMDA 受容体にはストレスステロイド（コルチコステロン）や女性ホルモン（エストラジオール）も作用する。

#### 図 1 1

神経細胞内のミトコンドリアやミクロソームの中にステロイド合成系がどのように配置されているかの模式図。

#### 図 1 2

複合顕微イメージングシステム。右側の光学系では、ガラスボトムの培養皿に海馬神経細胞を培養し、37度の保温箱中で細胞の刺激応答が観測できる。キセノンランプで励起して、超高感度 CCD カメラで  $\text{Ca}^{2+}$  蛍光像をデジタル録画解析する。左側光学系は共焦点レーザー顕微鏡で、Ar+/Kr+レーザーで蛍光色素を励起して海馬スライスの光学断層撮影を行う。

#### 図 1 3

コルチコステロン存在下では NMDA 受容体を介する  $\text{Ca}$  流入が長時間続く。4日齢のラット海馬から調製した培養神経細胞を用いた。Curve a: コルチコステロン非存在下で、100 $\mu\text{M}$  NMDA 刺激したの  $\text{Ca}$  流入の時間経過。Curve b: 1 $\mu\text{M}$  コルチコステロン 20 分前処理したのち、100 $\mu\text{M}$  NMDA 刺激した  $\text{Ca}$  流入の時間経過。

#### 図 1 4

エストラジオール存在下では NMDA 受容体を介する  $\text{Ca}$  流入が増幅される。4日齢のラット海馬から調製した培養神経細胞を用いた。Curve a: 10 $\mu\text{M}$  エストラジオール 20 分前

処理したのち、100 $\mu$ M NMDA 刺激した Ca 流入の時間経過。 Curve b : エストラジオール  
非存在下で、100 $\mu$ M NMDA 刺激したの Ca 流入の時間経過。