
 総説

## ニューロステロイド：脳海馬で合成され、記憶学習を活性化したり抑制したりする第4世代の脳の情報伝達物質

東京大学大学院総合文化研究科広域科学専攻 / CREST 川戸 佳

Brain is an emotional computer which has as effective capacity of learning and memory about things which move/impress us. Stress suppresses but deep impression enhances capacity of learning and memory. Neuronal mechanisms of learning and memory are significantly dependent on our mind and emotion, as judged from our experiences. We are trying to resolve molecular basis of these neuronal processes by means of function of neurosteroids (brain steroids).

neurosteroid / brain / learning and memory / hippocampus / Ca imaging / cytochrome P450

### 1. まえがき

感情をになう情報伝達物質の1種として、シトクロムP450が作るニューロステロイドがあります。これにより、脳神経シナプス伝達効率の長期増強や長期抑制が起こります。ニューロステロイドは脳の海馬で神経伝達に同期して合成され、海馬の記憶学習能力を上昇・低下させます。情報伝達物質の第1世代をニューロトランスミッター（グルタミン酸、GABAなど）、第2世代をカテコールアミン（ドーパミンなど）、第3世代をニューロペプチド（サブスタンスPなど）とすれば、ニューロステロイドは第4世代と位置づけることができます。ラット海馬でのニューロステロイドの合成経路をまとめたのが図1です<sup>1)</sup>。

### 2. ニューロステロイドは記憶・学習や情動の神経伝達に効く

硫酸プレグネロン（PREGS）を海馬に低濃度注入しただけで脚の電気ショックから逃避する記憶・学習テストの成績が向上します。海馬PREGS量は加齢とともに低下しますが、老化したマウスにPREGSを投与すると、空間学習能が回復します<sup>2)</sup>。血中デヒドロエピアンドロステロン（DHEA）濃度は年齢と反比例して減少しますが、老齢でも元気な人のDHEA濃度は平均値の2倍もあります。閉経期に女性ホルモンが急激に低下

することで発生すると思われるアルツハイマー病の治療で、女性ホルモンの経口投与が記憶学習能力の改善に大変よく効くことは臨床的に確立されています。さらに、ストレスで海馬の記憶学習が抑制されることも、ストレスステロイドの作用効果だろうと思われます。

ステロイドホルモンは生体ホメオスタシスや性行動・性分化を制御していますが、ニューロステロイドはこの作用に加えて、核受容体を經由することなく、急性に作用し、興奮性のNMDA型グルタミン酸受容体のCa信号や、抑制性のGABA受容体のCl信号を変化させることで、神経細胞間の情報伝達効率を制御します。培養海馬神経細胞や海馬スライスにPREGSを20分作用させると、同じNMDA刺激を与えてもNMDA受容体を介するCa<sup>2+</sup>流入が1.5倍大きくなるなど<sup>1)</sup>、PREGSはNMDA受容体信号を増強し、GABA受容体は抑制して、神経伝達の効率を大きく上げます<sup>2)</sup>。

### 3. ニューロステロイド合成タンパク質の抗体組織染色（木本・北條・牧野）

ニューロステロイドが記憶・学習に関与しているのであれば、分泌して局所的にすぐに作用しないと話になりません。脳内での局所合成系があるのではないかと、多くの研究者が探索に努力しましたが、脳神経での完全なニューロステロイド合成酵素系の発現は確認されませんでした。P450のmRNA発現は副腎皮質や精

**Neurosteroids are 4th Generation Neuromessengers which are Synthesized in the Brain and Enhance/Suppress Learning and Memory**

Suguru KAWATO

Dep. of Biophysics and Life Sciences, Graduate School of Arts and Sciences, Univ. of Tokyo

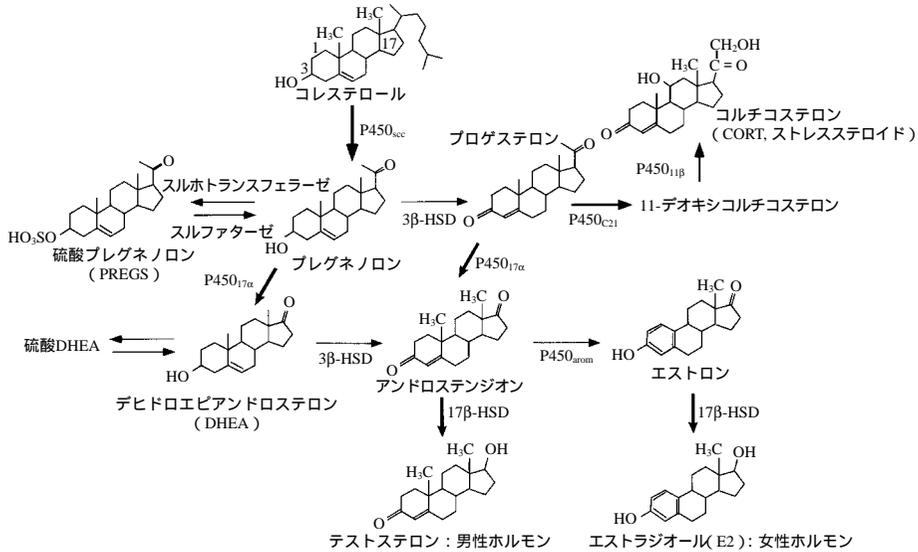


図1 海馬神経細胞でのニューロステロイドの合成経路予想図

ニューロステロイドの構造と、代謝に関する酵素の名前を示してある。P450<sub>scc</sub>はミトコンドリアに、P450<sub>17α</sub>とP450<sub>arom</sub>はミクロソームに、そしてスルホトランスフェラーゼは細胞質に存在する。

巢・卵巣に比べて千分の1以下で、タンパク質の抗体染色もうまくできないため、ほとんどの研究者は、脳での役割はたいしたものではないと、撤退してしまいました。我々は、海馬神経でのステロイドの急性効果を測定すると、はっきりした効果が出るため、海馬内に合成系があるに違いない！と感じ、思い切って抗体組織染色やステロイド代謝のラジオイムノアッセイに飛び込みました。ステロイド合成の最初の反応を行うP450<sub>scc</sub>は海馬では発現していないという論文が多数あります。組織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P450<sub>scc</sub>の抗体を使ってパラフィン抱埋したラット脳で探索していました。この方法では脳梁・白質・線状体のみが染色されるため、P450<sub>scc</sub>は脂肪が多いグリア層に存在する、という結果が得られ、「グリア細胞のみがニューロステロイドを合成する」という誤った方向に研究を導いてしまいました。ステロイド合成酵素が小脳プルキンエ神経細胞や小脳顆粒神経細胞で見つけられた(筒井・古川・市川博士ら)のは、例外的な成功例です。

我々は、ラットの抗体を使い、新鮮な急性凍結切片を使うことで、錐体神経細胞層や顆粒神経細胞層に沿って線状にシトクロムP450<sub>scc</sub>が分布しているようすを発見しました<sup>3)</sup>(図2)。共焦点レーザー顕微鏡で蛍光二重染色を観察することにより、グリア細胞の分布とは異なることも明らかにしました。P450<sub>scc</sub>の他に、重要なステロイド合成酵素群(スルホトランスフェラーゼ、シトクロ

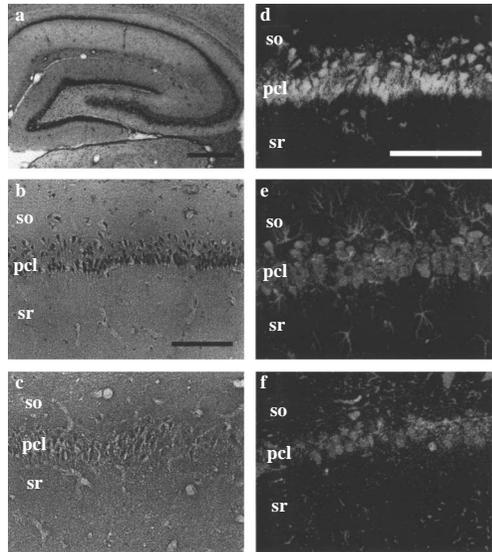


図2 成獣雄ラット海馬スライスでのシトクロムP450<sub>scc</sub>の抗体組織染色

a. ラットP450<sub>scc</sub>抗体による海馬全体染色。b. CA1領域でのP450<sub>scc</sub>染色。c. 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も何も染まっていない。d. P450<sub>scc</sub>抗体とNeuN抗体による蛍光抗体二重組織染色の図。両者はほぼ重なっている。e. P450<sub>scc</sub>抗体(左右に層状に染色)とアストログリアGFAP抗体(上下部分に星状に染色)による染色の比較。f. P450<sub>scc</sub>抗体とオリゴデンドログリアMBP抗体(上下部分に筋状に染色)による染色の比較。d~fはいずれもCA1領域。スケールバーは、aで800 μm、bとcで120 μm、d~fで100 μm。

ムP450<sub>17α</sub>, シトクロムP450<sub>arom</sub>, ステロイド合成急性調節タンパク質(StAR)が錐体神経細胞層や顆粒神経細胞に共存することを、抗体染色で確認しました。ウェスタンブロット法により、これらすべての酵素は期待される分子量の場所に単一バンドが観測されました。StARはふだんは37kDaの全長タンパクで、NMDA受容体を通るCa<sup>2+</sup>流入により37kDa-30kDa StAR変換が起ることを発見しました。これにより図1のような合成の流れ図を予想するに到りました。

このような成果が認められ、Methods in Enzymologyに脳のステロイド合成タンパクの組織染色と活性の原稿を書くよう頼まれました<sup>4)</sup>。これまで、DHEA合成酵素のシトクロムP450<sub>17α</sub>は脳には絶対に存在しないと信じられてきました。組織染色でも染まらず、mRNAもないという報告ばかりです。このため、下流のエストラジオール(E2)、テストステロンなどの性ホルモンは脳ではなく副腎皮質や精巣・卵巣で合成され、血流に乗って脳に到達し、ニューロンに作用するとされています。しかし血流から脳血液関門を通過して脳内に入るステロイド量は血中の百分の1以下に低下してしまうため、海馬内のステロイド量が血中より10倍も高いという我々の結果(3節)を説明できず、私はこの考えは、現実的ではないと考えています。

#### 4. 海馬における(硫酸)プレグネノロンとエストラジオールの合成(太田・鈴木澤・服部・櫻並・木本)

発見した酵素群が働いてニューロステロイドを産生していることを証明するために、プレグネノロン・PREGS・E2の産生をラジオイムノアッセイで調べてみました。その結果、基底レベルでは、海馬には血漿(血中)の10倍ほど存在することがわかりました。海馬スライスをNMDAで刺激してNMDA受容体を介するCa<sup>2+</sup>の流入を起して30分後には、プレグネノロンの量が2倍に増加しました(図3)。プレグネノロンは外液Ca<sup>2+</sup>流入を阻止すると合成されません。PREGSやE2もNMDA刺激によって2倍になりました。NMDA受容体を阻害するとやはり合成は起こりません。NMDA受容体を介するCa<sup>2+</sup>流入によってStARがミトコンドリアのP450<sub>sc</sub>にコレステロールを供給することが引き金になり、ニューロステロイドが合成されるわけです。さらにHPLC解析を用いて、<sup>3</sup>H-プレグネノロンから出発して<sup>3</sup>H-DHEAができ、<sup>3</sup>H-DHEAからは<sup>3</sup>H-E2ができることを発見しました。

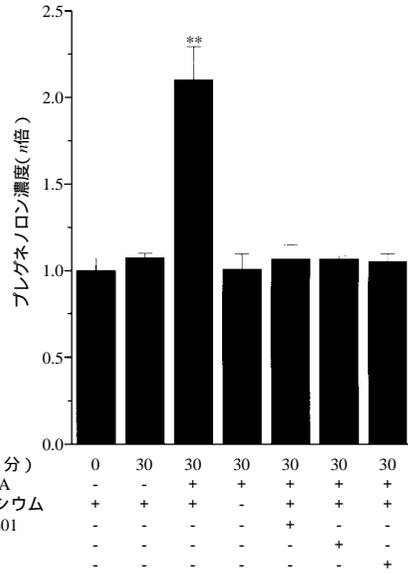


図3 海馬スライスでのプレグネノロン合成をラジオイムノアッセイで解析

左より右へ、海馬の基底レベルのプレグネノロン、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 μM NMDA刺激で30分インキュベーションすると2倍ほどに増加。外液のCaをなくして海馬をNMDA刺激で30分インキュベーションしても新たな合成なし。NMDA受容体阻害剤MK-801を加えて海馬を100 μM NMDA刺激し、30分インキュベーションしても合成なし。NMDA受容体阻害剤AP5を加えて100 μM NMDA刺激し、30分インキュベーションしても合成なし。P450<sub>sc</sub>阻害剤アミノグルテチミド(AMG)を加えて100 μM NMDA刺激で30分インキュベーションしても合成なし。各棒グラフは、基底レベルのプレグネノロン濃度(0.165 pmol/mg protein = 約15 nM)に比べて何倍であるかで表示。\*\*P < 0.01。

#### 5. 記憶学習の長期増強に対する効果

合成されたニューロステロイドが記憶・学習を強化するかどうか、長期増強(LTP)を調べてみました。長期増強を起こすためには、海馬スライスを用いて、テタヌ刺激をCA3錐体細胞から伸びるSchaffer側枝に対して100 Hzの高周波で1秒与えます。テタヌ刺激を与えるとCA1錐体細胞で観測されるEPSP(興奮性後シナプス電位)の初期勾配(電流)がテタヌ刺激前の1.5~2倍になります。これは1秒間の刺激で前シナプスからの多量のグルタミン酸の放出によりNMDA受容体を介するCa<sup>2+</sup>流入が一過性に増大し、シナプス伝達効率が上昇するためです。その後この状況が何十分から何時間も続くとして長期増強、すなわち記憶が生じたということです。

### 5.1 硫酸プレグネノロン (PREGS) の急性効果 (長谷川・向井・渋谷・高田)

ところが、中周波数の30 Hzで0.5秒という刺激では、普通ではLTPが起こりません。そこで、あらかじめ100 μM PREGSを20分ほど流しておくでLTPが起こります(図4) PREGSにより長期増強が起こりやすくなったわけですが、この効果は測定法を少し変えれば1 μM以下でも観測できます。

海馬の神経細胞は、体の合成器官のように恒常的にステロイドを合成しているのではなく、NMDA 受容体を介する信号が入ったときのみ、10分程度で急性的に合成します。図5に示すように、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<sup>2+</sup>が流入します。その結果、コレステロールがミトコンドリア内膜に運ばれてP450<sub>sc</sub>に結合し、プレグネノ

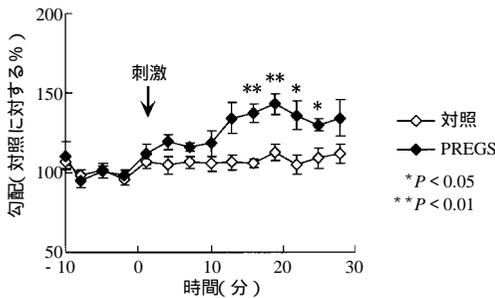


図4 テタヌス刺激を海馬スライスのSchaffer側枝に対して30 Hzで0.5秒与えてもCA1錐体細胞のEPSPの初期勾配は変化しない(対照の折れ線)。ところが、あらかじめ100 μM PREGSを20分灌流し、テタヌス刺激を30 Hzで0.5秒与えると、EPSPの初期勾配は1.3倍になり(PREGSの折れ線)、長期増強が起こった。

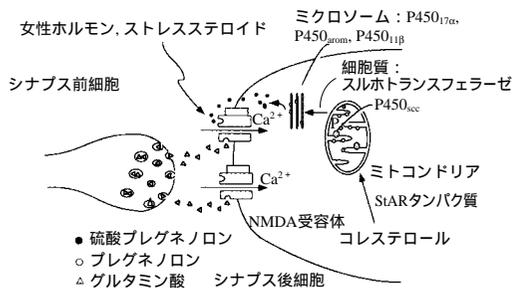


図5 ニューロステロイド合成と作用による海馬神経細胞間の信号伝達増強・抑制の模式図  
NMDA 受容体にはPREGS, 女性ホルモンやストレスステロイドなどが作用して、本文中に記述した特有の効果を示す。NMDA 受容体に直接作用せず、膜上ステロイド受容体(未同定)に作用してから、間接的に作用する可能性も大きい。

ロンに変換されます。これにスルホトランスフェラーゼの働きで硫酸基が付加され、PREGSになります。PREGSがNMDA 受容体に結合してチャンネルが開きやすくなり、さらに多くのCa<sup>2+</sup>が流入します。その結果、さらにコレステロールがP450<sub>sc</sub>へ運ばれ、PREGS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るのです。

### 5.2 女性ホルモン (E2) の急性・慢性効果と環境ホルモン (安松・服部・田辺)

NMDA 受容体に、E2が効くことも研究しています。E2は神経成長因子であり、数時間以上の長期にわたって作用させると、慢性ゲノミック効果で、神経細胞の成長や神経ネットワーク構築を促進することが知られています。海馬のスライスに2時間作用させると、スパイン数が増加し、シナプス伝達が増強されることがわかっています。神経細胞の効果的な培養にはE2が必須です。

E2の急性効果は最近研究され始めましたが、結果は今のところかなり複雑です。4週齢の若いラットの海馬に0.1 ~ 10 nMの低濃度E2を20分程度作用させて測定すると、急性的にLTPの程度が減少します。ところが大人のラット(1カ月から3カ月)では、急性効果はLTPに影響しないか、もしくは増強させるかのどちらかであるという伊藤博士やBerger博士などの報告があります。合成量の測定から神経内E2濃度は1 ~ 6 nM程度なので、生理濃度で効いていることになります。教科書的には、Ca<sup>2+</sup>流入に駆動されてカルモジュリンキナーゼIIが働いて短寿命タンパク質が合成され、AMPA型グルタミン酸受容体がリン酸化されたり、あるいはシナプス膜上のAMPA受容体の数が増加します。また、NMDA 受容体がリン酸化される可能性もあります。我々の研究からこの他の経路として、シナプス後細胞のCa<sup>2+</sup>信号により合成系が駆動されてPREGSが合成され、これがNMDA 受容体を活性化してLTPが起こりやすくなるものの、その後(若いラットでは)E2が合成されてLTPが抑制されることがわかりました。

一方、培養海馬神経細胞を(電気刺激やNMDA刺激なしで)E2のみで刺激すると、数秒でCa<sup>2+</sup>信号が発生することから、E2特有の受容体があるのではないかと推測されます。このE2膜受容体が、NMDA 受容体と相互作用して、長期増強や神経興奮性を変化させている可能性があります。またE2には神経細胞保護効果があり、10分という短い処理時間で効果が現れます。E2膜受容体を介して、信号が下流の神経保護や成長因子に関わる遺伝子転写へと伝わる経路があると考えられます。おもしろいことに、男性ホルモンは直接には神経の興

奮性やLTPに効果を与えないようです。

我々は「脳ニューロステロイド作用の環境ホルモンによる攪乱」という戦略基礎プロジェクトを進めています。環境ホルモン（ビスフェノール、ノニルフェノール、DES、PCB、ダイオキシン、有機スズなど）はマスコミでは大変有名ですが、科学的な理解は不明確であり、作用部位などがよくわかっていません。実は環境ホルモンは多くの場合人工の性ホルモンなのです。したがって環境ホルモンは女性・男性ホルモンの合成と作用を攪乱すると思われます。特にビスフェノール、ノニルフェノール、DESという環境ホルモンは女性ホルモンと作用部位が同じか似ているので、E2受容体に作用して促進効果や阻害効果を示すと考えられます。現在、ビスフェノールの脳海馬での急性的・慢性的な作用を解析しています。

### 5.3 ストレスステロイド（コルチコステロン）の急性・慢性効果（高橋）

海馬はストレスの主な標的ですが、ラットにストレスをかけたり、高濃度のコルチコステロン（CORT）を注入すると、3週間して海馬の神経細胞が萎縮・死亡します。NMDA受容体をブロックしておくとその悪影響が阻害されることから、細胞内Ca<sup>2+</sup>増加が原因であると推測されています。この慢性効果は核受容体を經由するゲノミックなものです。ベトナム帰還兵の問題として研究が進んだPTSD（心的外傷後ストレス障害）もこの一種であると考えられています。しかし経験上、ストレスを感じると記憶学習が数分で抑制されてしまいますが、このような急性効果はあまり研究されていません。急性効果を顕微イメージングで測定します。Mg<sup>2+</sup>を除いた液に海馬の神経細胞を浸してNMDA受容体のブロックをはずし、NMDAで刺激すると20秒ほどの幅のCa<sup>2+</sup>スパイクが1つ発生します。ところが、CORT液に20分浸した後NMDAで刺激すると、Ca<sup>2+</sup>が流入し続けるようになり、Ca<sup>2+</sup>レベルは10分以上も上昇したまま、ミトコンドリア膜電位も低下しっぱなしの状態となり、神経活動が抑制されます。CORTは500 nM ~ 10 μMという、実際にストレス負荷時に血中に分泌される濃度で効果を示します。このようにCORTが海馬のNMDA受容体に急性的に働くことを発見しました。我々がストレスを感じると、すぐに記憶・学習に障害を覚えるのは、海馬で合成されたCORTがすぐに働いて効くことによると思われます。ストレスがかかると脳下垂体から副腎皮質刺激ホルモン（ACTH）が分泌され、副腎皮質でCORTが合成され、血流に運ばれて脳に働くという流れが知られていますが、この他に、海馬自身が合成して効くというのが私の説です。

このように、ニューロステロイドは、海馬でNMDA型グルタミン酸受容体に効いて神経伝達効率を変化させることにより、効果を発揮していることが明らかになってきました。ストレスステロイドや男性・女性ステロイドという名前に示されるように、ニューロステロイドは、抑うつ、攻撃性興奮、受動性防御、さらには異性を認識するような精神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。

## 6. おわりに

厄年を過ぎた頃、「やる気」の喪失を味わいました。別の更年期？ 感情の高まりが感じられず体から元気が抜けていく、これはどうしたことなんじゃい？ そのあなた！もしかして君もそうじゃないか！「Shall we dance？」という映画にもあったじゃないか、ローンの重圧もなんのその、家も建てて、かみさんの文句もひと段落、子供も大学で勝手にやっている。まだ人生先は長いのに脱力感。その頃、「感動したことはなぜあつという間に記憶するのか？」、「やる気のあることはなぜ学習意欲が続くのか？」と考え、「この分子機構を解明したい」と強く思うようになりました。といっても、突然研究対象を変えたわけではなく、20年来ずっと携わっていたシトクロムP450がこの方面に関連があると感じて、肝臓や副腎皮質をやめて脳海馬の研究に絞ったわけです。最近では、医学の進展で、たいそう長寿になり、体が壊れる前に、脳が壊れてしまいます。そこで私は、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。

以上の仕事を行った、助手や大学院生の名前は各章に記しました。スルホトランスフェラーゼ抗体は田村教授、P450<sub>17α</sub>抗体は小南教授、P450<sub>arom</sub>抗体は原田教授、StAR抗体はStocco教授から提供していただきました。HPLC解析は小南教授との共同研究です。

## 文 献

- 1) Kawato, S., Yamada, M. and Kimoto, T. (2001) *Adv. Biophys.* **37**, 1-30. この総説の内容がほぼ全部収められている。
- 2) Baulieu, E. E. (1987) *Recent Prog. Hormone Res.* **52**, 1-32.
- 3) Kimoto, T., Tsurugizawa, T., Ohta, Y., Makino, J., Tamura, H., Hojo, Y., Takata, N. and Kawato, S. (2001) *Endocrinology* **142**, 3578-3589.
- 4) Kawato, S., Hojo, Y. and Kimoto, T. (2002) *Methods in Enzymology* (eds. E. Johnson and M. Waterman) in press.

ニューロステロイド：脳海馬で合成され、記憶学習を活性化したり抑制したりする第4世代の脳の情報伝達物質



川戸 佳

川戸 佳(かわと すぐる)

東京大学大学院総合文化研究科広域科学専攻 教授(生命情報学講座)理学博士

1979年東京大学理学系研究科物理学専攻修了, 同年スイスチューリッヒ工科大学生化学科 助手, 82年科学技術振興事業団 研究員, 84年東京大学教養学部物理学教室 助教授, 92年大学院総合文化研究科広域科学専攻 教授, 91~94年文部省宇宙科学研究所 教授(併任)

おもな研究分野: 脳の生物物理学. 脳が男性・女性ホルモンやストレスホルモンなどのステロイドを合成しており, このニューロステロイドが, 精神が関与する海馬の記憶学習に急性的に大きな効果を及ぼしている機構の解明.

URL: <http://glia.c.u-tokyo.ac.jp>