

論文の内容の要旨

論文題目 神経ステロイドによる NMDA 受容体を介する Ca^{2+} 信号の制御の解析

氏名 向井 秀夫

脳神経系におけるシナプス伝達では、前シナプスから放出されたグルタミン酸を受けて、まず AMPA 型グルタミン酸受容体が開く→後シナプス膜が脱分極する→NMDA (N-methyl-D-aspartate) 型グルタミン酸受容体が開いて細胞内にカルシウムイオンが大量に流入する、という順序で LTP (長期増強) の成立に必要なカルシウム信号が発生する。この点で NMDA 受容体は、記憶・学習を司る海馬の LTP に本質的に不可欠である。

神経ステロイドは、脳神経系で合成され、情動の関与する記憶・学習を増強すると思われる。神経ステロイドは、核内受容体を通しての遺伝子転写ではなく、急性的にその効果を発揮するという作用が最近明らかになりつつある。例えば、脳内に最も多く存在する神経ステロイドの 1 つである硫酸プレグネノロンは、老齢ラットの記憶を改善することが知られている。しかし機構の詳細は未だ知られていない。

本研究では、神経ステロイドが直接 NMDA 受容体、中でも出生前の胎児期から発現している $\epsilon 2$ サブユニットを持つ $\epsilon 2/\zeta 1$ 型の受容体に作用してカルシウム流入を制御している可能性を検討した。また、NMDA 受容体からのカルシウム信号によって神経細胞で起こる重要な細胞機能として、シナプス間の逆行性伝達物質の候補である一酸化窒素 (NO) の産生を取り上げ、そのイメージングによる解析を行った。

神経ステロイドの NMDA 受容体に対する直接の効果を検出するために、熱ショックによ

り、NMDA 受容体サブユニットの特定の組み合わせを発現する CHO 細胞を作成し用いた。NMDA 受容体のサブユニットの分布は脳の発達の時期及び部位特異的にダイナミックに変化するため、どのサブユニットの組み合わせに神経ステロイドが効果をもつかは重要である。培養ニューロンでは、一般に NMDA 受容体のサブユニットを複数種類発現しているため、このような検討はできない。この CHO 細胞は、5%CO₂ 下で 43°C、2 時間の熱ショックをかけると、9~15 時間後に NMDA 受容体を発現する。

NMDA 受容体に対する神経ステロイドの効果は、カルシウム感受性蛍光色素の Fura-2 を細胞に負荷し、蛍光顕微イメージングすることで測定した。

神経ステロイドのうち、硫酸プレグネノロン (Pregnenolone Sulfate, PREGS) が $\epsilon 1$ と $\zeta 1$ サブユニットから成る NMDA 受容体だけではなく、 $\epsilon 2$ と $\zeta 1$ サブユニットから成る受容体にも作用して NMDA 受容体からのカルシウム流入を増強しうることを初めて見出した。まずはじめに NMDA (100 μ M) を灌流してカルシウム信号を観察した後、灌流液を流して NMDA を除き、信号が完全に消失してから、PREGS を含んだ灌流液を流した。10 分間おいた後、PREGS と 100 μ M NMDA を含んだ灌流液を流して、増強の効果を観察した。増強の効果は濃度依存的 (1 μ M~100 μ M) に現れた。はじめの NMDA のみによるカルシウム信号を 100% としたとき、1 μ M、10 μ M、50 μ M、100 μ M の PREGS によってそれぞれ信号は、101%、118%、132%、141% に増強された。この結果は、PREGS が、 $\epsilon 2/\zeta 1$ 型受容体にも作用し得ることを示している。

次に、他の硫酸基をもつステロイドが NMDA 受容体への硫酸プレグネノロンの作用にどのような影響を及ぼすかをカルシウム信号で検討した。倍濃度 (100 μ M) の硫酸デヒドロエピアンドロステロンを硫酸プレグネノロン (50 μ M) と同時に加えた結果、硫酸プレグネノロンの増強効果を抑える (132%→105%) ことがわかった。また同様に、倍濃度 (100 μ M) の硫酸エストラジオールも硫酸プレグネノロンに対し抑制的な効果 (94%) をもつことが判明した。これらの結果から、硫酸プレグネノロンの硫酸基は受容体との相互作用において重要であることがわかった。また、3 α -ol-5 β -pregnan-20-one (3 α 5 β S) は、濃度 100 μ M で硫酸プレグネノロンのみならず、NMDA の効果も抑える (52%) ことが明らかになった。このことは、3 α 5 β S は他の硫酸化ステロイドと違う様式で NMDA 受容体と作用していることを示している。

最近、当研究室でラット海馬神経細胞に、チトクロム P450_{scc} をはじめとする、ステロイド産生機構が局在していることが発見された。このことにより、神経細胞が自ら神経ステロイドを合成している可能性が強く示唆されている。また、胎児期の硫酸プレグネノロン濃度は、生後よりも 10 倍程度高いことが知られている。本研究で対象とした $\epsilon 2/\zeta 1$ 受容体の一方をなす $\epsilon 2$ サブユニットは、生後数日で初めて $\epsilon 1$ サブユニットと異なり、胎児期から発現しているため、本研究で、神経細胞によって合成されている硫酸プレグネノロンが脳の発生時期にも働いている可能性が示唆された。

NO のイメージングは、NO が活性分子種であることから、今まで非常に困難であった。本研究では、神経型一酸化窒素合成酵素 (nNOS) を上記の CHO 細胞に発現し、最近新たに作成された NO 感受性蛍光色素である DAF-2DA を用い、NMDA 受容体からのカルシウム信号が単一細胞レベルで NO の産生に変換される様子を可視化した。NMDA 受容体からのカルシウム流入による NO 産生は、NMDA (100 μ M) のみの時よりも硫酸プレグネノロンを加えた時の場合が産生が大きいことが見出された。これは NMDA 受容体チャネルからのカルシウム流入の大きさが NO 産生の違いとして現れてくることを意味しており、神経ステロイドの効果の一端が NO 産生にあることを示唆している。