

審 査 の 結 果 の 要 旨

論文提出者氏名 木 本 哲 也

副腎皮質束状層細胞では、副腎皮質刺激ホルモン（ACTH）の刺激に対して肝糖新生促進や炎症抑制などの作用をもつステロイドホルモンが産生されている。また最近、脳でも神経機能を急性に調節するニューロステロイドが産生されていることがわかってきた。しかし、これらステロイドの産生制御機構に関しては不明な点が多く残されており、その解明が待たれていた。

本論文「カルシウム信号によるステロイドホルモン合成制御に関する研究」では、これまで不可能であった副腎皮質束状層ステロイドホルモン産生細胞における細胞内カルシウム信号の実時間蛍光測定を可能とし、カルシウム信号が生理濃度の ACTH に対するセカンドメッセンジャーとして機能することを解明した。また、この成果の上に脳海馬でのニューロステロイド産生機構の解明に取り組み、海馬神経細胞において N-メチル-D-アスパラギン酸（NMDA）型グルタミン酸受容体を介したカルシウム信号がニューロステロイド産生を急性に亢進させることを明らかにした。

本研究ではまず、これまで用いられてきた方法によっては副腎皮質束状層ステロイドホルモン産生細胞におけるカルシウム信号の蛍光計測が不可能であったことを明らかにした。更に、微量のトリトン X-100 またはクレモフォア EL を色素導入補助剤として用いることにより、ウシ束状層ステロイドホルモン産生細胞においてカルシウム信号の実時間蛍光計測が可能となることを明らかにした。これにより、生理濃度（1-10 pM）の ACTH による刺激を与えると、束状層ステロイドホルモン産生細胞においてカルシウム信号が発生することを発見した。カルシウム信号を発する細胞の割合は ACTH の濃度にシグモイド状に依存し、生理濃度領域の ACTH に対してはステロイドホルモンの産生と極めてよい平行性

を示した。また、ACTH 受容体に結合し、cAMP を増加させずにステロイドホルモン産生を増加させる *o*-ニトロフェニルスルフェニル ACTH (NPS-ACTH) で束状層ステロイドホルモン産生細胞を刺激した際にも、ACTH 刺激の場合と同様のカルシウム信号が発生することも発見した。ACTH に対するセカンドメッセンジャーは長らく cAMP であると信じられてきたが、一方で生理濃度の ACTH に対しては細胞内 cAMP 増加が見られないにも拘わらずステロイドホルモン産生の亢進が惹起される。よって生理濃度の ACTH に対するセカンドメッセンジャーは不明であったが、本研究でのカルシウム信号の発見により、束状層ステロイドホルモン産生細胞においてステロイドホルモン産生を制御するセカンドメッセンジャーがカルシウム信号であることが解明された。

更に本研究では、脳海馬のニューロステロイド合成について検討した。脳のニューロステロイド合成酵素の量は末梢ステロイドホルモン産生器官の数百分の一以下と極めて少ないため、これまで海馬におけるニューロステロイド合成部位やニューロステロイドの合成制御機構は未解明であった。そこで本研究では、まずラット脳の海馬におけるニューロステロイド合成酵素の分布を免疫組織化学染色法及びウエスタンブロット解析により検討した。その結果、12 週齢のオスウィスターラットの海馬においてステロイド合成酵素群 (チトクロム P450<sub>scc</sub>、NADPH-アドレノドキシシン還元酵素、アドレノドキシシン)、及びステロイド合成急性調節蛋白質 (StAR) が、海馬の神経細胞に局在していることを発見した。これまでニューロステロイドの合成を担うのは主にグリア細胞であると信じられてきたが、海馬においては神経細胞がニューロステロイド合成の主要な担い手であることが本研究によって明らかとなった。StAR のウエスタンブロットにおいては、副腎皮質や精巣のミトコンドリアでは 30 kDa の StAR のみが観察されるのに対し、海馬ミトコンドリアでは 37 kDa の StAR が安定に存在することを発見した。本研究では更に、海馬組織を 100  $\mu$  M の NMDA で刺激するとプレグネノロン濃度の増加が引き起こされることを発見した。このプレグネノロン産生は、NMDA 受容体の特異的阻害剤である MK-801 と AP5、また細胞外液のカルシウムの除去によってほぼ完全に抑制されたので、海馬のプレグネノロ

ン産生は NMDA 受容体を介するカルシウム流入によって促進されることが解明された。本研究では NMDA 刺激を行った海馬のミトコンドリアでは、37 kDa の StAR が減少し、ほぼそれに相当する量の 30 kDa StAR が増加することを明らかとし、同時にステロイド合成速度を制御すると考えられる StAR の存在状態の変化がプレグネノロン濃度増加とよく一致することを解明した。これは、NMDA 刺激によって StAR が活性化されミトコンドリア内膜にコレステロールを供給したことを示すものと考えられる。

以上を要約すると、本研究は副腎皮質ステロイドホルモン産生細胞でのカルシウム信号の実時間蛍光計測を可能とし、生理濃度の ACTH による刺激に対するカルシウム信号を発見することにより、カルシウム信号のステロイドホルモン産生制御におけるセカンドメッセンジャーとしての役割を解明した。また、ほとんど明らかにされていなかったニューロステロイドの合成制御機構について検討し、脳海馬での主要なニューロステロイド産生部位が神経細胞であることを明らかにするとともに、NMDA 受容体を介したカルシウム流入によるカルシウム信号がニューロステロイド産生を亢進させることを発見した。更に末梢とは異なる StAR の存在様式を明らかにすることにより、脳独自のステロイド合成制御様式に関する新しい知見を得た。

以上の結果より、本研究は内分泌と脳の生物物理学の領域において重要な進展をもたらしたものと認められる。したがって、本審査委員会は博士（学術）の学位を授与するにふさわしいものと認定する。

なお、本論文の内容は既に学術誌に公表済みである。これらは共著論文であるが、論文提出者はその全てにおいて研究の主要部分に寄与したものであることを確認した。