

# 論文の内容の要旨

## 論文目録 海馬神経におけるエストロゲン受容体の解析

(Analysis of Estrogen Receptors in Hippocampal Neurons)

氏 名 村上 元

エストロジオールは代表的な女性ホルモン(エストロゲン)である。雌ではエストロジオールは卵巣・子宮で合成され血流によって脳に到達し、雄では精巣で合成されたテストステロンが血流に乗って脳に到達し、エストロジオールに変換されると考えられていた。しかし川戸研の先行研究では雄・雌両方で、海馬が独自にエストロジオールを合成していることを明らかにした(Hojo et al., 2004, *PNAS*)。またエストロジオールの作用機構として、核内受容体(エストロゲン受容体:ER)とエストロゲンが結合することで核内に移動し、遺伝子の転写を制御することが知られていた。

エストロジオールは更年期障害の治療薬として臨床的に用いられ、アルツハイマー病やパーキンソン病の予防薬としても注目されていることなど、神経活動において非常に重要な物質である。特に海馬においては、エストロジオールは神経成長因子として働き、神経保護効果も認められることが知られている。またその作用を担う受容体の探索も世界中で盛んに行なわれている。特に、従来からエストロジオールの主な作用先として知られるエストロゲン受容体 $\alpha$ (ER $\alpha$ )については、その存在・分布に関して多くの報告がある。しかし海馬においては、錐体神経細胞に存在するという報告と介在神経細胞に存在するという相反する報告が多数なされ、統一された見解が得られていない。川戸研究室では海馬におけるER $\alpha$ のmRNAの検出に成功しているが(Ishii, 2006 博士論文)、エストロジオールの脳での様々な重要な作用を考えると、ER $\alpha$ タンパク質の存在・分布を明らかにすることは非常に意義があると考えられる。

また海馬において、エストロジオールは急性的に神経可塑性を修飾することや、行動実験で空間学習能力を向上させることが多く報告されている。川戸研の先行研究においては、エストロジオールが記憶学習の素過程と考えられている長期抑圧(LTD)を1時間で強化することや、スパインを1-2時間で増加させることが明らかになっている(Mukai et al., in press, *J. Neurochem.*)。しかし、

従来の作用機構では遺伝子転写を伴うため数十時間以上必要とするのに対し、LTD の強化やスパインの制御作用は1時間程度である。従って、これらの作用には、従来の作用機構とは異なり、シナプスに直接作用する non-genomic な作用機構が示唆されている。現在では従来から知られている遺伝子転写の制御を介した作用を長期作用、シナプス可塑性の制御やスパインの制御で見られる1時間程度で効果が発現する non-genomic な作用を短期作用と呼んでいる。また短期作用を担う受容体として、膜上に ER $\alpha$ が存在すると考えられているが、報告はほとんどされていない。そこで本研究では、成獣 12 週齢の雄ウイスターラットを用い、海馬内での ER $\alpha$ タンパク質の局在と、それによる効果を明らかにすることを目的とした。

まず、過去の研究で頻繁に使用されている代表的な ER $\alpha$ の抗血清である MC-20 と AS-409 について、海馬での ER $\alpha$ に対する特異性をウェスタンブロット法を用い検討した。その結果、これらの抗血清では、陽性対照の卵巣で検出される ER $\alpha$  (67kDa)とは異なる位置に強いバンドが検出された。また MC-20 抗血清では ER $\alpha$ KO マウスでも正常マウスと同様に 62kDa のバンドが検出された。また MC-20 を用いた免疫組織染色では、ER $\alpha$ KOマウスでもラットと同様に神経細胞層に強い染色が検出された。従って、これらの抗血清が認識するタンパク質は ER $\alpha$ とは異なるタンパク質であることを示している。また、AS-409 や MC-20 のような特異性の低い抗体を用いていることが、ER $\alpha$ の局在に関して世界的に統一された見解が得られない原因であると考えられる。

そこで本研究では、新規に ER $\alpha$ の C 端 19 残基に対する抗血清を作製した後、アフィニティークロマトグラフィーで精製したポリクローナル抗体(RC-19)を作製し、ER $\alpha$ に対する特異性をウェスタンブロット法を用い検討した。その結果、卵巣で検出された 67kDa のバンドと同じ位置に、海馬でも高感度にバンドを検出することに成功した。また正常マウスではラットと同様に 67kDa の位置にバンドが検出され、ER $\alpha$ KO マウスではバンドは検出できなかった。これらのことから、RC-19 は海馬において特異的に ER $\alpha$ タンパク質を認識することを見出した。

さらに RC-19 の ER $\alpha$ に対する特異性を、免疫沈降法を用いて確認した。すなわち、ER $\alpha$ が高密度に存在する細胞質画分に対し、RC-19 を用いた免疫沈降法を行ない ER $\alpha$ を精製した。SDS-PAGE 後、銀染色により可視化した 67kDa のバンドを切り出し、MALDI-TOF を用いた質量分析法によりそのバンドが ER $\alpha$ であることを同定した。この結果は RC-19 が海馬で ER $\alpha$ を特異的に認識することを裏付けている。

次に ER $\alpha$ の海馬内での局在を調べるために、RC-19 を用いた免疫組織染色を行なった。その結果、CA1、CA3 領域では錐体細胞層が、DG 領域では顆粒細胞層が強い染色を示した。また ER $\alpha$ KO マウスの海馬スライスでは全く染色が検出されないことを確認した。従って、海馬スライスで RC-19 を用い検出されるタンパク質が ER $\alpha$ であることを明らかにし、海馬で ER $\alpha$ は神経細胞に存在していることを示した。

さらに本研究では、短期効果を担っていると考えられる、膜上に存在する ER $\alpha$ を検出する実験を行なった。海馬ホモジネートを用い、界面活性剤である TritonX-100 による可溶化と浸透圧ショックを遠心分離法と組み合わせることで post synaptic density (PSD)画分をはじめ、前シナプス成分が多く含まれる低密度膜画分、細胞質画分、核画分等を分離し、RC-19 を用いたウェスタンブロットを行なった。その結果、細胞質画分や核画分だけでなく、PSD 画分や低密度膜画分において強い染色が得られた。さらにこの結果を裏付けるため RC-19 を用いた免疫電顕法により、神経細胞内の ER $\alpha$ の局在を調べた。その結果、細胞質や核だけでなく PSD、前シナプス、スパインに染色が検出された。これらの結果は遠心分離の解析と一致しており、ER $\alpha$ は海馬神経細胞で PSD を含むシナプスにも高濃度に存在していることが明らかになった。

また本研究では ER $\alpha$ の PSD への局在が NMDA 依存的であることを発見した。ACSF 中の海馬スライスを 30 $\mu$ M NMDA で 5 分間刺激し、通常の ACSF に戻し 30 分間置いた後、遠心分離法により PSD 画分を多く含む Triton 不溶性画分を分離し、RC-19 を用いたウェスタンブロットを行なった。その結果、NMDA で刺激した試料では刺激していない試料に比べ ER $\alpha$ が増加していた。また、NMDA と NMDA 受容体のアンタゴニストである AP-5 を同時投与した試料では変動は見られなかった。以上のことから、ER $\alpha$ の PSD への局在は NMDA 受容体依存的であることがわかった。

最後に、シナプス ER $\alpha$ による効果を調べるために、ACSF 中の海馬スライスをエストラジオールで2時間刺激し、スパインの形態変化を海馬 CA1 の網状分子層と上昇層で調べた。その結果、放射状層と同様に(Tsurugisawa, 2006 博士論文)、エストラジオールが CA1 の全ての層でスパイン密度を増加することがわかった。またスパインはその形態により 4 種類に分類されるが、中でも特に thin 型のスパインが増加することがわかった。またエストロゲン受容体の阻害剤である ICI 182,780 存在下でエストラジオールを加え刺激するとスパイン密度の増加が抑えられることから、この効果はエストロゲン受容体依存的であることがわかった。さらに ER $\alpha$ のアゴニストである PPT による刺激ではエストラジオールと同様にスパインが増加するが、ER $\beta$  (ER のサブタイプ)のアゴニストである DPN ではスパイン密度は増加しないことから、エストラジオールによるスパイン密度の増加は ER $\alpha$ 依存的な効果であるといえる。またこれらの効果は MAPK の阻害剤である PD98059 で消失することから、その細胞内情報伝達経路に MAPK が含まれることがわかった。さらに上昇層では、AMPA 受容体のアンタゴニストである CNQX でエストラジオールによるスパイン密度の増加が有意に抑えられた。一方、網状分子層では放射状層と同様に NMDA 受容体のアンタゴニストである MK-801 で増加が有意に抑えられた。

以上の結果から、海馬神経細胞で ER $\alpha$ がシナプスへ局在することが明らかになり、エストラジオールがシナプスの ER $\alpha$ に直接結合して、スパイン密度の増加などの短期効果を発現することがわかった。