

## 論文審査の結果の要旨

論文提出者氏名 村上 元

本研究の目的は海馬神経細胞における ER $\alpha$ の存在・分布を明らかにすることである。従来から使われている特異性の低い抗血清を用いず、特異性の高い新規の抗体を精製し使用することで ER $\alpha$ が核や細胞質だけでなく、post synaptic density を含む神経シナプス後部（スパイン）や神経シナプス前部に分布することを明らかにした。またエストラジオールがシナプスの ER $\alpha$ に直接作用することで、海馬 CA1 領域の上昇層、網状分子層の樹状突起スパインを 2 時間で増加させることを明らかにした。

雌では女性ホルモンであるエストラジオールは卵巣・子宮で合成され血流にのって脳に到達し、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、エストラジオールに変換されると考えられていた。またエストラジオールの作用機構として、細胞質にある受容体(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。

海馬においてエストラジオールは神経成長、神経保護を示すなど重要な物質であることが知られている。それらの作用を担う主な受容体であるエストロゲン受容体 $\alpha$  (ER $\alpha$ )の存在・分布に関しても世界的に多く研究されている。しかし海馬においては、グルタミン酸神経細胞に存在するという報告と、少数である GABA 神経細胞に存在するという相反する報告が多数されており、その分布・存在はわかっていない。本研究では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 や AS-409 が実は海馬では ER $\alpha$ とは異なるタンパク質に反応することを、ER $\alpha$ KO マウスを用いた入念な検証を行なう事で明らかにした。そこで、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、海馬でも特異的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るが、ER $\alpha$ KO マウスでは 67kDa のバンドが消失することを確認した。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、DG の全ての領域でグルタミン酸神経細胞が強い染色を示し、ER $\alpha$ がグルタミン酸神経細胞に存在していることを示した。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。さ

らに RC-19 を用いた免疫沈降法を行ない MALDI-TOF 質量分析により RC-19 が海馬で ER $\alpha$  を特異的に認識することを直接明らかにした。

一方、最近川戸研の先行研究で海馬では雄・雌両方で独自にエストラジオールを合成していることが明らかになっている。またエストラジオールの急性的な作用として、海馬において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が川戸研の先行研究で明らかになっている。従来の女性ホルモンの作用機構では遺伝子転写を伴うため1-2日以上必要とするのに対し、これらの作用は1時間程度である。従って、従来の作用機構とは異なり、シナプスに直接作用する急性的な作用機構が示唆される。本研究ではこれらの作用を担う受容体として、シナプス膜上に ER $\alpha$  が存在すると考え、海馬神経細胞での ER $\alpha$  の詳細な局在を明らかにすることを目的とした。実験は、海馬ホモジネートを遠心分離法により各画分を分離し、RC-19 を用いたウェスタンブロットを行なった。その結果、細胞質画分や核画分だけでなく、post synaptic density 画分やシナプス前部画分において強い染色が得られた。また RC-19 を用いた免疫電顕法により細胞質や核だけでなく post synaptic density を含むシナプス後部(スパイン)やシナプス前部に染色が検出され、遠心分離による結果と一致した。

更に、シナプス ER $\alpha$  による急性効果を調べるために、海馬スライスを経路をエストラジオールで2時間処理し、スパインの形態変化を海馬で調べた。その結果、エストラジオールが CA1 の網状分子層と上昇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 型のスパインが選択的に増加することがわかった。また ER $\alpha$  の阻害剤である ICI、ER $\alpha$  のアゴニストである PPT を用いることで、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ことを明らかにした。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、ER $\alpha$  の下流に MAPK を含む情報伝達経路があることを明らかにした。

以上の結果から、海馬神経細胞で ER $\alpha$  がスパインに局在していることが明らかになり、エストラジオールがスパインの ER $\alpha$  に直接作用して、スパイン密度の増加を2時間という短期間で発揮することを明らかにした。これらの結果は脳神経科学において、非常に有意義な貢献をしたものと認められる。

よって、審査員一同、論文提出者村上 元は東京大学博士(学術)の学位を受けるに十分な資格があるものと認めた。なお、本論文の内容は、2007年に Biochemical and Biophysical Research Communications 誌に公表済みである。これは共著論文であるが、論文提出者は研究の主要部分に寄与したものであることを確認した。