

論文審査の結果の要旨

論文提出者氏名 畑中 悠佑

本研究の目的は、成獣で男性ホルモンが記憶学習能に与える影響の神経機構を研究することである。海馬神経細胞樹状突起には棘状の微小な(直径 1 μm 弱)突起が存在している。これらの突起をスパインと呼ぶ。CA3 透明層では、スパインとは異なる、密集した複数の頭部構造(ゾーン)を持っている。神経前細胞からの軸索終末と後細胞のスパインやゾーンがシナプス結合を形成しており、神経細胞はこのシナプス結合を介して情報を伝達している。論文提出者は、スパインが海馬内で合成される男性ホルモン(ジヒドロテストステロン(DHT)とテストステロン(T))によってどのような影響を受けるかを、単一神経細胞を染色したスパインの蛍光イメージングによって解析した。

成獣の海馬における男性ホルモンの神経細胞スパインへの影響を研究する為、論文提出者は、12 週齢の雄ウイスターラットから作製した急性スライスを用いた。カレントインジェクション法を用いて単一神経の樹状突起とスパインを蛍光染色した。その後、共焦点レーザー顕微鏡により断層画像を撮影し、画像を三次元再構成したのち、CA1 放射状層と CA3 透明層でスパイン/ゾーンの密度を測定した。特に CA1 においては、単純にスパイン全体の密度を調べるだけでなく、スパイン頭部直径に応じて **small-head spine** (< 0.4 μm)、**middle-head spine** (0.4-0.5 μm)、**large-head spine** (> 0.5 μm) にスパインを分類して各々の密度を調べることで、同じ男性ホルモンである DHT と T でも、その効果の差異について詳細に解析した。

その結果、DHT や T による海馬 CA1、CA3 領域における神経細胞スパイン/ゾーンへの急性的な作用があることを発見した。CA1 放射状層では、10 nM DHT、10 nM T とともに 2 時間で全スパイン密度が約 1.3 倍に増加し、このとき DHT は **middle-head spine** と **large-head spine** を、T は逆に **small-head spine** を増やしていた。また、CA3 透明層においても 10 nM の DHT と T はともに 2 時間で全ゾーン密度を 1.5 倍に増加させた。DHT と T による 2 時間以内のスパイン増加効果を発見したのは本論文が世界で初となる。

従来、男性ホルモン受容体(AR)は核内受容体であり転写因子として遺伝子転写を制御すると考えられていたが、本研究では、ウェスタン・ブロッティングにより、海馬のスパイン内にある **postsynaptic density** に AR が局在していることを発見した。また、AR アンタゴニストを DHT や T と同時に作用させたところ、男性ホルモンのスパイン増加効果が完全に消失した。したがって、男性ホルモンのスパイン増加作用は、スパイン

に局在する AR を介した急速なシグナル伝達経路を介していることが示唆される。

次に、DHT や T の効果にグルタミン酸受容体が必要であるかどうかを調べた。海馬興奮神経細胞では、情報伝達物質がグルタミン酸であることが知られており、グルタミン酸受容体はシナプス結合の可塑性に重要な働きをもつ事が知られている。本研究では、CA1、CA3 とともに、AMPA 型受容体を介した自発的な膜電位変動と NMDA 型受容体を介した自発的な細胞内へのカルシウムイオンの流入が必要であることを阻害実験により示した。この結果からも、男性ホルモンが核や細胞質に存在する AR よりも、スパイン内にある AR に作用していることが支持される。

さらに、DHT や T の急性効果の細胞内シグナル伝達経路を解明する為、リン酸化酵素の網羅的な阻害実験を行った。その結果、Erk MAPK、p38 MAPK、PKC や脱リン酸化酵素の calcineurin などが CA1 や CA3 におけるスパイン/ソーン増加に関わっていることを発見した。また、PKA は CA1 における男性ホルモンのシグナル伝達に関与していたが CA3 では関与していなかった。逆に、CaMKII は CA3 では働くが、CA1 では働いていなかった。一方、PI3K を阻害しても男性ホルモンによるスパインの増加には影響はなかった。複数関与するリン酸化酵素を一つでも阻害しただけで男性ホルモンによるスパイン密度の増加が完全に抑制されたことから、最終的なターゲットであると考えられるコータクチンなどのアクチン結合タンパク質に存在する複数のリン酸化部位が適切にリン酸化されないと、男性ホルモンによるスパインの形態変化が起こらないことが示唆される。神経細胞において、男性ホルモンによる多数のリン酸化酵素の活性化を伴うシグナルカスケードを明らかにした研究は本研究が初めてである。

以上をまとめると、論文提出者は本研究において、海馬スライスでのカレントインジェクション法を用いた単一神経細胞スパインのイメージングにより、男性ホルモンが雄ラット海馬スパインに急性的な変化を与えることを初めて明らかにした。さらに、このとき男性ホルモンが多数のリン酸化酵素経路を駆動するという新しい作用機序も発見した。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、論文提出者畑中悠佑は東京大学博士(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、2009 年に **Biochemical and Biophysical Research Communications** 誌に公表済みである。