

## 論文審査の結果の要旨

論文提出者氏名 肥後 心平

本研究の目的は2点あり、一つは成獣ラット海馬におけるコルチコステロイド合成系の存在と活性を明らかにすることであり、一つは生後発達期・成獣期における海馬内性ステロイドの合成系を比較し、その差異を明らかにすることである。本研究で、従来の研究では存在しないと考えられていたコルチコステロイド合成系がラット海馬に存在し、神経に対し強力な作用をもつコルチコステロンが実際に合成されていることが証明された。また、従来から海馬内性ステロイド合成系は発達期でのみ存在し成獣では消失すると考えられてきたが、本研究の比較実験で、確かに発達期で合成系はよく働くが、成獣になっても消失せずに一定以上の合成活性を維持しているという新しい事実が明らかになった。

コルチコステロンはストレス応答を担うステロイドホルモンであり、ストレス時に副腎から放出され血中濃度が急激に増加し、血液を經由して脳に流入して神経活動を抑制すると考えられている。一方、コルチコステロイドの脳内合成系の研究は報告が少なく、合成系の一部のみを研究したものが少数あるのみで、合成系の全容を知るには程遠い状況であった。とくにコルチコステロン合成の最初の段階であるプロゲステロン→デオキシコルチコステロンの反応を行う酵素シトクロム P450(c21)は脳に存在しないと考えられてきた。本研究では、RT-PCR においてプライマーを熱力学的な Gibbs 自由エネルギーの計算により最適化し、いままで存在しないとされてきた P450(c21) mRNA の検出に成功している。また、金抗体免疫電顕法により、P450(c21)のタンパクが海馬神経細胞の小胞体膜状、および神経の接合部であるシナプスに存在していることを明らかにした。P450(c21)以外にも、コルチコステロイド合成系に必要である酵素群 P450(2D4)、P450(11β)、11β-HSD が海馬に発現していることを明らかにしている。P450(2D4)、P450(11β)は P450(c21)と同様にシナプスにも存在していることが明らかになった。これはシナプスで合成されたステロイドがその場で働きシナプスの伝達効率をモジュレーションしているという、新しい機構の研究 (synaptocrinology) を支持する重要な事実であるといえる。また、<sup>3</sup>H 標識ステロイドを基質とした代謝実験で、これらの酵素が実際に働き、プロゲステロン→デオキシコルチコステロン→コルチコステロンという一連の合成反応が行われていることを証明した。本実験ではまた、海馬自身のコルチコステロン合成量を正確に知るため、副腎を切除したラットの海馬内コルチコステロン濃度を

LC-MS/MS 質量分析器を用いて定量している。この結果、海馬自身で合成されたコルチコステロンは約 7 nM 程度であることが明らかになった。これはストレス下の濃度に比べ低い。コルチコステロンは低濃度では神経の活性化・神経保護など良い影響を脳に与え、ストレス下の高濃度では神経細胞死など悪影響を及ぼすことが知られているため、脳内で合成されたコルチコステロンが神経の活性化・神経保護などに用いられていることを示唆している。

性ステロイドの脳内合成は発達期において一過的に活性をもち、成獣では消失すると考えられてきた。一方、川戸研究室の研究から成獣にも脳内性ステロイド合成系があることが判明し、発達期の合成系との比較研究をおこなう必要が生じている。本研究では、発達期（生後 10 日齢）と成獣（12 週齢）の性ステロイド合成系の酵素 mRNA 発現、実際の合成活性の比較を網羅的に行なっている。性ステロイドの合成に関わる酵素はシトクロム P450<sub>arom</sub>、P450(17 $\alpha$ )、3 $\beta$ -HSD、3 $\alpha$ -HSD、5 $\alpha$ -reductase があり、本実験ではそれらの酵素をサブタイプごとに区別し RT-PCR による発現解析をおこなっている。結果として、一部の酵素サブタイプを除いて発達期に発現量が多いが、その量は成獣と比較して約 1.3~1.5 倍が中心であり、数十倍から数百倍などの大きな差は見られないことが明らかになった。また、実際の性ステロイド合成活性を比較するために、<sup>3</sup>H 標識ステロイドを基質とした代謝実験も行われている。代謝実験では、おおむね発達期における合成活性が成獣における活性を上回る傾向が見られ、その差は 2~7 倍が中心であった。RT-PCR による発現解析とステロイド代謝実験は、発達期に比べればやや少ないものの、成獣でも活発な海馬内性ステロイド合成活性が行われていることを示した。これは、しっかりとした比較実験もないまま信じられてきた、成獣で海馬内性ステロイド合成が消失するという従来の定説を覆すものである。

上記の結果は神経内分泌研究に重要な影響を与える研究結果であり、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、論文提出者肥後 心平は東京大学博士(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、本論文の内容の一部は、2009 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。