3L1515

記憶学習能を改善する神経ステロイドが海馬で合成される

○太田 陽一郎、木本 哲也、釣木澤 朋和、川戸 佳（東大院・広域・生命）

神経ステロイドは、記憶学習形成に関わる基礎過程に重要な役割を果たすと考えられている。特に硫酸プレグネノロン（PREGS）は記憶初期形成に必要な海馬に投与するとラットの記憶学習能力が向上する。また、プレグネノロン（PREG）は他のステロイドの前駆体である。しかし、脳においてPREG、PREGS合成に対する調節機構については不明であった。そこで海馬に於けるPREG及びPREGS合成を調節する機構の解明を目指して本研究を行った。

ラット海馬においてNMDA刺激が神経ステロイド産生に与える効果を調べた。海馬組織を細切し、100 μ M NMDAを加えた緩衝液中で37℃、30分間インキュベートしたところ、NMDA刺激をしていない条件に比べてPREG産生量が顕著に増大することが明らかになった。また、NMDA受容体に対する特異的阻害剤（MK801,AP5）を加える実験及び外液からCa²⁺を除去した実験ではPREG産生は完全に阻害された。これらの結果からNMDA受容体が開口してCa²⁺が流入することによりPREG産生は活性化されると結論した。末梢器官におけるPREG合成酵素であるチトクロムP450sccの特異的阻害剤（アミノグルテチミド）を加えたところ、PREG産生が阻害されたので、海馬においてもPREG合成酵素はP450sccであると考えられる。PREGSについてもNMDA刺激の効果をみる実験をNMDA受容体阻害実験（MK801の投与）と併せて行い、PREGS合成もNMDA受容体のCa²⁺流入によって制御されることを強く示唆する結果を得た。なお、薬理学的見地から、産生に対するNMDA濃度依存性及びNMDA刺激時間依存性についても調べた。

本研究は神経ステロイドがNMDA受容体を介するCa²⁺流入によって制御されることを大脳組織において示した最初の報告である。

Y.Ohta, T.Kimoto, T.Tsurugizawa and S.Kawato : Neurosteroid, which improves learning and memory, is synthesized in the hippocampus.

3L1545

神経ステロイドによるNMDA受容体を介するカルシウム信号の制御の解析

○向井 秀夫¹、内野 茂夫²、渋谷 啓介¹、川戸 佳¹（¹東大・広域・生命、²国立精神・神経センター・神経研）

神経ステロイドは、脳神経系で合成され、情動の関与する記憶・学習を増強すると思われる。神経ステロイドは核内受容体を通しての遺伝子転写ではなく、急性的に効果を発揮するという作用が最近明らかになりつつある。本研究では、代表的な神経ステロイドである硫酸プレグネノロン（PREGS）が直接NMDA型グルタミン酸受容体、中でも出生前の胎児期から発現しているGluR ϵ 2サブユニットを持つGluR ϵ 2/ ζ 1型の受容体に作用してカルシウム流入を制御していることを受容体を発現した細胞を用いて解析した。NMDA受容体サブユニットの特定の組み合わせを、熱ショックをかけた時のみ発現するCHO細胞を用いた。NMDA受容体に対するPREGSの効果は、カルシウム感受性蛍光色素のfura-2を細胞に負荷し、蛍光顕微イメージングで測定した。灌流法を用いて刺激を与えた結果、PREGSがGluR ϵ 2とGluR ζ 1サブユニットから成る受容体に作用してNMDA受容体からのカルシウム流入を増強しうことを初めて見出した。増強の効果は濃度依存的に現れ、NMDAのみによるカルシウム信号を100%とした時、1 μ M、10 μ M、50 μ M、100 μ MのPREGSによってそれぞれ信号は、101%、118%、132%、141%に増強された。最近当研究室で、チトクロムP450sccをはじめとするステロイド産生機構が、ラット海馬神経細胞に局在していることが発見された。このことにより、神経細胞が自ら神経ステロイドを合成する可能性が強く示唆されている。また、胎児期のPREGS濃度は生後よりも3倍程度高いことが知られている。以上から、神経細胞によって合成されているPREGSが脳の発生・発達時期にもGluR ϵ 2/ ζ 1型NMDA受容体を通じて働いている可能性が初めて示唆された。

H.Mukai, S.Uchino, K.Shibuya, and S.Kawato : Effect of neurosteroids on calcium signaling mediated by NMDA receptors

3L1530

新規NO感受性蛍光色素DAF-FMを用いた海馬スライスでのNO産生増強の可視化解析

○高田 則雄¹、木本 哲也¹、小島 宏建²、長野 哲雄²、川戸 佳¹（¹東大院・広域・生命物理、²東大院・薬・薬品代謝化学）

我々はこれまで、NO感受性蛍光色素DAF-2を用いて海馬スライスでのNO産生を可視化解析してきた。ところが、DAF-2の蛍光強度はpHに大きく依存するため、海馬神経細胞のpH変動に伴いDAF-2の蛍光強度が変化してしまうという欠点があった。今回、我々は新規NO感受性蛍光色素DAF-FMを用いて海馬スライスでのNO産生を可視化解析し、NO産生に与えるステロイドの急性効果を観測した。DAF-FMはDAF-2のpH依存性を取り除くように改良されたNO感受性蛍光色素である。

6週齢のラットより調製した厚さ400 μ mの海馬スライスに10 μ MのNO感受性蛍光色素DAF-FMを1時間負荷し、intensified CCDカメラ付き顕微鏡により蛍光画像解析した。その結果、NMDAの灌流刺激によって海馬CA1領域でのNO産生を観測した。さらに、海馬スライスをNMDA刺激前20分間ニューロステロイドである硫酸プレグネノロン中でインキュベーションすると、NMDA灌流刺激時のNO産生が2倍程度に増大することを見つけた。これらの蛍光上昇はNO合成酵素の阻害剤であるL-NMMAやNMDA受容体の阻害剤であるMK-801によって抑制された。上記のDAF-FMを用いた観察では海馬細胞のpH変化による蛍光強度変化のアーチファクトは見られなかった。

N.Takata, T.Kimoto, H.Kojima, T.Nagano and S.Kawato : Nitric Oxide production in rat hippocampal CA1 region: Real-time fluorescence microscopic imaging using DAF-FM

3L1600

人工NO産生細胞における神経ステロイド存在下でのNO産生の可視化解析

○渋谷 啓介¹、向井 秀夫¹、内野 茂夫²、小南 恵郎³、長野 哲雄⁴、川戸 佳¹（¹東大院・物理専攻・広域科学専攻、²国立精神・神経センター・神経研、³広島大学総合科学部、⁴東大院・薬・薬品代謝化学）

脳神経では一酸化窒素（NO）はシナプス可塑性を調節することで脳の記憶・学習に関与すると考えられている。また、神経ステロイドの1つである硫酸プレグネノロン（PREGS）も情動の関与する記憶学習に寄与すると考えられている。本研究では、両者の関係を調べるため、NOを産生する細胞を構築し、PREGS存在下と非存在下でのNO信号の実時間可視化解析を行った。記憶形成をつかさどるといわれている海馬でのNO産生の直接測定は非常に難しく、NMDA受容体を介するCa²⁺とNO産生の関係を実証できていない。そこで、本研究では、遺伝子工学を用いてCHO細胞にNMDA受容体とnNOSを共発現させ、脳神経と同じ機構でNOを産生する細胞を人工的に構築した。細胞内Ca²⁺濃度の検出にはCa²⁺感受性蛍光色素であるFura-2を、NOの検出にはNO感受性色素DAF-2を用い、それぞれを別々に蛍光顕微鏡により実時間可視化解析を行った。この実験系を用いて、PREGS存在下、非存在下それぞれで、NMDA刺激を加えた。すると、PREGS存在下では、非存在下に対して、NO産生が約2倍に増大することが観測された。同じ条件下で細胞内Ca²⁺濃度を測定するとPREGS存在下の方がPREGS非存在下に対して約2倍に増大していることが確認された。以上のことから、PREGSがNMDA受容体を介したCa²⁺流入を増大させ、それによりnNOSの活性も増大しNO産生も増大することがわかった。この結果は、神経ステロイドの1つであるPREGSが、NO産生を増大させることにより、記憶・学習に寄与している可能性を示唆している。

K.Shibuya,H.Mukai,S.Uchino,S.Kominami,T.Nagano,S.Kawato : Analysis of the regulation of NMDA-induced Nitric oxide production by PREGS in CHO cells expressing NMDA receptors and nNOS