2P181

表皮ケラチノサイトにおけるVR1, P2X3の発現

○傳田 光洋、藤原 重良、井上 かおり、傳田 澄美子（資生堂ライフサイエンス研）

VR1 (vanilloid receptor subtype 1) と P2X3 は痛み受容に関わるカチオンチャネルであり、これまでの報告では神経細胞にのみ発現するとされてきた。しかし最近、気道上皮細胞がVR1を持つ細胞に似た応答を示すことが報告された。皮膚表面の表皮組織を構成するケラチノサイトには、神経系での発現が報告されているいくつかの受容体が発現していることが報告されている。また我々は神経ペプチドや内分泌系の因子、環境因子の変化によって表皮中のイオン勾配が変化することを明らかにした(1)(2)(3)。さらに組織培養系の電位差測定の結果(3)、表皮においてもカプサイシン受容体様の応答が認められた。これらの知見から、我々はケラチノサイトにもVR1、P2X3様の受容体が存在しているという仮説を立てた。今回はVR1およびP2X3の抗血清を用いた免疫組織化学的検討、およびRT-PCRによるこれらの受容体mRNAの発現を、ヘアレスマウス皮膚組織で行なった。その結果、表皮全層の細胞膜部分にVR1、P2X3の抗血清に対する特異的な活性が認められた。この活性は抗原ペプチドによってブロックされた。また、これらの抗血清は同じマウスの脊髄後根神経節にも反応を示した。またRT-PCRによる解析も表皮中におけるこれらの受容体由来mRNAの発現を示した。これらの結果は表皮ケラチノサイトにおけるVR1およびP2X3の発現を示唆している。1. Denda M. et al. Am J Physiol 278:R367-72(2000) 2. Denda M. et al. Biochem Biophys Res Commun 272:134-7(2000) 3. Denda M. et al. Biochem Biophys Res Commun 284:112-117(2001)

M.Denda, S.Fuziwar, K.Inoue, and S.Denda : Localization of VR1 and P2X3 on epidermal keratinocyte

2P183

海馬における神経ステロイドの合成様式

○木本 哲也^{1,3}、北條 泰嗣^{2,3}、榎並 太平^{2,3}、川戸 佳^{1,3}（¹東大院・総合文化・広域・生命物理、²東大院・理学系・物理、³CREST・科技団）

脳で作られるニューロステロイドは、神経細胞膜上の神経伝達物質受容体に直接作用して情報伝達効率を修飾し、特に海馬では記憶・学習の効率を制御している。この神経作用は極めて短い時間（数秒～30分程度）のうちに引き起こされるため、ニューロステロイドの合成も極めて短い時間においてなされているのではないかと考えられてきたが、その実験的証明はこれまでになされていない。実際、ニューロステロイドの合成部位や合成様式に関してはこれまでほとんど明らかにされていなかった。そこで本研究では複数の手法を組み合わせ、成熟ラットの海馬におけるニューロステロイドの合成機構を詳細に検討することで、神経ステロイドの作用様式の全体像に迫ることを目指した。その結果、(1) 高速液体クロマトグラフ分析によりニューロステロイドの合成産物を検討した結果、海馬ではプレグネロンからDHEAを経て女性ホルモン（エストラジオール）まで一貫して合成されていることを発見した。(2) コレステロールからプレグネロン、DHEA、エストロゲンの合成に必要な酵素群が全て海馬の神経細胞に存在していることを、特異性の高い抗体による免疫染色法により明らかにした。(3) 更に海馬神経細胞をNMDAで刺激すると、NMDA受容体から流入するCa²⁺によって、内在性コレステロールからのニューロステロイドの合成が促進されることを、ニューロステロイドの量をラジオイムノアッセイで直接測定することにより明らかにした。このとき、ニューロステロイドの合成はNMDA刺激から少なくとも15分以内に開始されることが明らかになった。これに対応し、コレステロールをミトコンドリア内膜に輸送してチトクロムP450_{ssc}に供給するStAR蛋白質のプロセッシングも、NMDA刺激後15～30分という短時間で促進されることも明らかとなった。

T Kimoto, Y Hojo, T Enami and S Kawato : Neurosteroid synthesis in the hippocampus

2P182

ラット脳海馬におけるニューロステロイド DHEA の合成機構の研究

○北條 泰嗣^{1,3}、木本 哲也^{2,3}、山崎 岳^{3,4}、小南 思郎^{3,4}、川戸 佳^{2,3}（¹東大院・理学系・物理、²東大院・総合文化・広域科学・生命物理、³CREST・科技団、⁴広大・総合科学）

DHEA(dehydroepiandrosterone)は、1980年代にラットの脳内に高濃度で存在することが発見され、副腎皮質や性腺といったステロイド合成器官を摘出した場合でも、脳内においては濃度が減少しなかったことから、脳内で合成されたことが示唆された。DHEAをはじめとして、このように脳を含む神経系で新規に合成されたステロイドをニューロステロイド(neurosteroid)と呼ぶ。培養神経細胞や、脳内にステロイド分子を投与した実験結果から、ニューロステロイドは、記憶・学習効果の増強、神経細胞の保護作用などのさまざまな機能を持つことが示唆された。このことから、脳内においてもステロイド合成器官と同じく、ステロイド合成酵素が存在し、そこで合成されたニューロステロイドが神経系に対してさまざまな作用を及ぼしているものと予想される。しかしながら、ステロイド合成酵素が脳内に存在することを観察し、その酵素がニューロステロイドを合成していることを確認した報告は、今のところ存在しない。われわれは、これまでにコレステロールからニューロステロイドの一種である、プレグネロン(pregnenolone)および、硫酸プレグネロン(pregnenolone sulfate)を合成する酵素であるcytochrome P450_{ssc}とHydroxysteroidsulfotransferaseがラット海馬神経細胞に局在することを発見した(Kimoto et al. in press)。今回は、脳内のDHEA合成に関して以下の2点を発見したので、報告する。(1) プレグネロンからDHEAを合成する酵素であるcytochrome P450_{c17}が海馬神経細胞に局在することを免疫組織染色及びウェスタンブロッティングにより発見した。(2) 高速液体クロマトグラフ(HPLC)を用いて、トリチウム標識されたプレグネロンが、P450_{c17}の働きによって、DHEAに代謝されることを確認した。

Y.Hojo, T.Kimoto, T.Yamazaki, S.Kominami and S.Kawato : Mechanism of biosynthesis of neurosteroid DHEA in the rat hippocampus

2P184

ラット脳におけるエストロゲン受容体の探索

○向井 秀夫^{1,2}、山中 麻里^{1,2,3}、古川 愛造⁴、川戸 佳^{1,2}（¹CREST・科技団、²東大・院・総合・広域、³農工大・院・工学、⁴香川医大・生化学）

エストロゲン(女性ホルモン)は、生殖活動のみならず、神経細胞生存因子としての働きや情動や記憶への関与が示唆されているホルモンである。エストロゲンは核内受容体(ER α 、ER β)を通しての遺伝子の転写調節だけでなく、脳において短時間に効果を発揮することが明らかになりつつある。また、エストロゲンとの作用の類似性が指摘されている内分泌攪乱物質(環境ホルモン)の脳に対する急性効果の作用経路は全く知られていないが、内在性のエストロゲン(女性ホルモン)と相当部分共通ではないかと考えられる。

我々は特に脳の記憶・学習の中核である海馬におけるエストロゲンの作用について調べている。最近当研究室では、海馬神経細胞においてエストロゲン(女性ホルモン)の一つであるエストラジオールの合成機構の存在が発見され、また電気生理実験から、エストラジオールは記憶・学習に関係が深いとされる長期増強(LTP)に短時間で効果を及ぼすことが見出された。これらの知見をつなぐものとして、我々はER α 、ER β を含むエストロゲン受容体の脳内での存在を追求している。

脳内における核内エストロゲン受容体の存在状態に関しては未だに不明な点が多い。そこで、核内エストロゲン受容体の脳内分布を、数種類の抗エストロゲン受容体抗体を用い、ラット脳組織のウェスタンブロットにより検出した。その結果、生殖活動の中核である視床下部のみならず、記憶・学習の中核である海馬にもエストロゲン受容体が存在していることを発見した。本研究において、海馬でのエストロゲン(女性ホルモン)の作用の経路に関する一つの手がかりを得たと言える。

H.Mukai, M.Yamanaka, A.Furukawa, and S.Kawato : Estrogen receptor in the rat brain