（ニューロステロイドはGABAレセプターに作用する）

γ -アミノ酪酸(GABA)は、我々動物の脳において代表的な抑制性神経伝達物質である。そのレセプターであるGABA_AレセプターはCl⁻チャンネル共役型の5量体レセプターであり、現在のところ α_{1-6} , β_{1-4} , γ_{1-3} , δ , ϵ の15種類のサブユニットの組合せにより、脳領域特異的な性質を示すことが知られている。このレセプターは、情動、睡眠、学習・記憶などと深く関わっている⁽¹⁾。

一方、ニューロステロイドは、近年盛んに研究が行なわれるようになった新しい概念の分子である。ステロイドとは、胆汁酸、性ホルモン、副腎皮質ホルモンなどのコレステロールに似たステロイド骨格をもつ物質の総称であり、たとえば精巣がつくる性ステロイドは、攻撃、求愛、交尾などの一連の行動を促進するステロイドホルモンである。これまで内分泌学的には、脳はこのステロイドホルモンの標的器官と考えられていたが、脳が独自にステロイドを合成していることが明らかになり、この脳のつくるステロイドを、ニューロステロイドと呼ぶようになった。ニューロステロイドの働きとして、末梢ステロイドホルモンでよく知られている核内レセプターに作用するシステムとは違い、脳内で傍分泌的に放出されて膜レセプターに作用し、ス

トレス、情動、学習・記憶などに関与していることが示唆されている⁽²⁾。

最近、膜レセプターとニューロステロイドの関わりを証明するきっかけになるであろう論文が発表された⁽³⁾。これまで、ニューロステロイドの研究者の大部分が、ニューロステロイドとGABA_Aレセプターとの関わりに着目してきた。ニューロステロイドには、麻酔効果や鎮痛効果があり、おそらくこれらの効果はGABA_Aレセプターにアロステリックに作用した結果生じたものであろうと考えられていた。

Mihalekらは、GABA_Aレセプターのサブユニットの δ サブユニットをノックアウトしたマウスを作製し、著者が18人というところからもわかるように、非常に精力的に、生化学、電気生理学、薬理学、行動学といった幅広い手法を用い、野生型マウスとの性質の違いを検討している。まず、この δ サブユニットは、小脳の顆粒細胞、海馬、視床などで多量に発現しているが、ノックアウトマウスでは、GABA_Aレセプターのアゴニストであるムシモールの結合が弱まること、GABA作動性の抑制性シナプス電流の消失時間が短縮することがわかった。つまり、正常なGABA_Aレセプターの性質を示していないのである。なお、脳の形態的構造や身体の大きさなどの点では、

野生型マウスもノックアウトマウスも差は認められていない。

GABA_Aレセプターは、これまで、睡眠、不安、痙攣などの現象と深い関わりのあることが知られており、神経薬理学的解析により様々な薬物がGABA_Aレセプターに作用することが報告されている。そこでMihalekらは、様々な睡眠薬(麻酔薬)や抗不安薬を静脈や腹腔内に投与することによって出る影響を、睡眠時間や未知の迷路に進むまでの時間を測定することによって調べる抗不安テストなどにより解析している。10種類の薬物のうちで、ノックアウトマウスで睡眠時間の短縮と抗不安テストでの成績の低下がみられたものは、ステロイド系の薬物のみであった。このステロイドの中には、内因性のニューロステロイドであるプレグナノロン(性ステロイドとして有名なプロゲステロンの代謝物)も含まれている。つまり、 δ サブユニットはニューロステロイドの作用部位であるということが明らかになった。ちなみに、恐怖に対する行動や記憶についてはどちらのマウスでも差はなかった。この報告により、 δ サブユニットの機能とニューロステロイドの作用点の解明への一歩が踏み出された。

筆者らも最近、哺乳類のラット、鳥類のウズラ、両生類のトノサマガ

エルなどを用い GABA_A レセプターを発現しており、またそれ自体 GABA ニューロンである小脳のプルキンエ細胞が活発にニューロステロイドを合成していることを明らかにしてきた^(4,5)。筆者らも、ニューロステロイドと GABA_A レセプターに着目し、運動学習といった脳内メカニズムの解析に

取り組んでいる。これまで不明であったニューロステロイドの具体的な作用部位が明らかになったことから、今後、この新しい概念の分子であるニューロステロイドによる情動や学習・記憶といった脳内メカニズムの制御システムの解析が進むことが期待される。

1) R.W. Olsen & A.J. Tobin: *FASEB*

J., 6, 2311 (1990).

2) E.E. Baulieu: *Recent Prog. Horm. Res.*, 52, 1 (1997).

3) R.M. Mihalek *et al.*: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 96, 12905 (1999).

4) K. Ukena *et al.*: *Endocrinology*, 139, 137 (1998).

5) M. Takase *et al.*: *Endocrinology*, 140, 1936 (1999).

(浮穴和義, 広島大学総合科学部)

まず複合体ありき? TATA-box binding protein のプロモーターへの結合

真核生物遺伝子の誘導発現には、すべての遺伝子の RNA 合成に必要な基本転写因子に加えて、発現を正に制御する転写活性化因子 (アクティベーター) が関与している。アクティベーターの機能の一つは、対象遺伝子のプロモーター上に転写開始前複合体 (pre-initiation complex) をリクルート (動員) することであると考えられている⁽¹⁾。しかし、誘導型の発現様式を示す *CYCI* 遺伝子において、抑制条件下 (=アクティベーターが機能しない条件下) でも基本転写因子がプロモーターに結合していることが報告されており⁽²⁾、アクティベーターによる転写開始前複合体のリクルート機構、および転写開始前複合体のプロモーターへの結合量と遺伝子発現量との相関に関しては、確たる概念が提唱されているとは言えない。その原因として、これまで解析に多用されてきた *in vivo* フットプリント法が煩雑な操作を必要とし、

さらに DNase I 消化からのプロテクト部位に結合している複合体のサブユニット構成が判断できないという短所があることが挙げられる。

そこで、Li ら⁽³⁾ および Laurent ら⁽⁴⁾ は、formaldehyde crosslinking/immunoprecipitation technique を用いて、酵母生細胞内において上述の課題を解決することを試みた。まず、任意の培養条件下にある酵母をホルムアルデヒド処理し、タンパク質と DNA を生細胞内で架橋する。界面活性剤で溶菌後、超音波処理によりクロマチンを低分子化し、抗体を用いて解析対象のタンパク質を含む DNA-タンパク質複合体を特異的に免疫沈降する。プロナーゼ処理、フェノール/クロロホルム処理の後、解析対象タンパク質の結合領域を含む DNA 量を PCR を用いて定量する。得られた DNA 量が DNA 結合タンパク質の結合量を反映することになる。

制御するアクティベーターの異なる 30 種類の遺伝子について、転写開始前複合体のプロモーターへの結合を、そのサブユニットで直接 DNA に結合する TATA-box binding protein (TBP) をターゲットとして解析した。アクティベーター Gal4 の制御下にある遺伝子群をはじめ、Met4 制御下のメチオニン生合成系遺伝子群、Hsf1 や Msn2・Msn4 に制御され熱刺激に応答する遺伝子群などにおいて、アクティベーターが機能する条件下においてのみ TATA-box への TBP 結合量の増加が観察された。以前の解析結果と同様、*CYCI* に関しては、転写量の増減に関係なく一定量の TBP が結合していたものの、それぞれ性質 (座位、アクティベーターの種類とその結合サイトの数、TATA-box の配列など) が異なるにもかかわらず、TBP の TATA-box への結合量増加と転写活性増大との間に相関関係が成立した遺伝