

「内分泌かく乱物質」

平成 12 年度採択研究代表者

川戸 佳

(東京大学大学院総合文化研究科 教授)

## 「脳ニューロステロイド作用を攪乱する環境ホルモン」

### 1. 研究実施の概要

脳内でチトクロム P450 系が合成するニューロステロイド(女性ホルモン、男性ホルモンなど)は第 4 世代情報伝達物質であり、神経伝達に急性的に作用する。脳神経細胞の情報伝達や神経ネットワーク構築は、ニューロステロイドによって大きな制御を受けるので、女性ホルモン類似環境ホルモン(ビスフェノール、有機スズ、ダイオキシンなど)が、脳の記憶・学習や新生児期の神経ネットワーク構築に大きな攪乱を与えるはずで、これを解明する。記憶学習の中心である海馬神経の膜上の受容体を経由して数分で効果を発揮する、急性効果(持続性有り)に重点を置いて解析する。海馬錐体細胞にはエストラジオールの核受容体は無いので、エストラジオール膜受容体を介して、NMDA 受容体に作用する経路や、神経シナプス数の増大を引き起こしている経路を解明する。このようにしてニューロステロイドの作用は、脳海馬の記憶学習の効率化に大きな役割を果たす。女性ホルモン類似環境ホルモンは脳血液関門を越えて、速やかに脳に作用出来る。環境ホルモンが、エストラジオールの受容体を介して海馬への急性作用を発揮する現象を捉え、分子機構を解析する。胎児/新生児期のみならず成熟した個体中の脳でも脳細胞は神経幹細胞から新生しており、この際エストラジオールが神経再生を促進するだろう。従って、女性ホルモン類似環境ホルモンが脳ネットワーク形成を攪乱するはずである。もちろん発育期の脳での効果は重要で、脳の性分化の決定にも脳内のステロイドが関与している?かもしれないし、環境ホルモンが脳ネットワーク発育を攪乱するだろう。

### 2. 研究実施内容

#### 1) 海馬のステロイド合成活性と、環境ホルモンによる攪乱。

海馬ニューロステロイド合成系が活動している様子を、放射性ステロイド基質を海馬スライスに添加して代謝解析を行った。代謝産物は HPLC を用いて分離し解析した。

その結果、コレステロール→プレグネノロン→DHEA→アンドロステンジオン→テストステロン→エストラジオールという経路を発見した。プレグネノロン→DHEA は P45017 $\alpha$  によって触媒されており、またテストステロン→エストラジオールは P450arom によって触媒されていた。アンドロステンジオン→テストステロンは 17 $\beta$ -HSD3 によって触媒されている。P45017 $\alpha$  や P450arom の阻害剤を用いたり、P450arom ノックアウトマウスなども用いて、解析中である。

ビスフェノール A 暴露ラットを用いてテストステロンやエストラジオール合成が害されるか促進されるかを解析している。母親にビスフェノール A を暴露して生まれた仔ラットでは、テストステロンとエストラジオールの合成能が低下していた。

## 2) 海馬ニューロステロイド合成酵素系の神経局在の同定

ニューロステロイド酵素系の各蛋白質の抗体組織染色や Western Blot による同定を行なった。StAR, P450scc, P45017 $\alpha$ , P450arom などの酵素蛋白は CA1-CA3 の錐体神経細胞と DG の顆粒神経細胞に局在していた。更に RT-PCR によるこれら酵素の mRNA の同定にも成功した。これらはいずれも現在まで海馬に存在しないか、ごく僅かしか存在しないとされてきた酵素であり、Methods Enzymology (2002) の CYTOCHROME P450 編に同定の方法論を執筆した。

## 3) Ca 信号イメージング解析

エストラジオールやビスフェノール A による神経細胞への急性効果を Ca 信号で解析した。Ca 信号の顕微視化解析を単離培養した海馬神経細胞で行い、10 nM のエストラジオールやビスフェノール A の添加で両者ともに、10 秒ほどで急性的な Ca 信号が発生することを確認した。BSA-エストラジオールでも同様の Ca 信号を発生するので膜上エストラジオール受容体 mER $\alpha$  が関与していると思われる。この Ca 信号は核受容体 ER $\alpha$  の阻害剤で抑制されたので、mER $\alpha$  の基質結合部位は ER $\alpha$  に類似しているのではないかと推察される。

## 4) 電気生理による海馬長期増強への効果の解析。

母親にエストラジオールを暴露して生まれた仔ラットに対して、海馬スライスで長期増強を測定すると、4 週齢までは対照と比べて変化がないが、7 週齢のラットに対しては対照群と比べて、長期増強がかかりやすくなった。

母親にビスフェノール A を暴露して生まれた仔ラットに対しては、12 週齢でビスフェノール A を暴露していない対照と比べて、長期増強はほぼ同じにかかるが、ビスフェノール A の高濃度投与でむしろ長期増強がかかりやすくなった。

## 5) ニューロステロイド膜上受容体の同定。

脳海馬神経はエストラジオールの作用を大きく受けるが、未だ世界的にも、組織染色では神経細胞核に核受容体 ER $\alpha$  や ER $\beta$  が見つかっていない。神経シナプス部位に一般の核受容体 ER $\alpha$  とは異なる膜上エストラジオール受容体が存在しないと困る理由がここにある。膜上エストラジオール受容体 mER $\alpha$  の蛋白質精製にむけて、核受容体 ER $\alpha$  と少し異なるがかなり類似した受容体候補蛋白質が海馬神経の膜分画に存在することを生化学的に突き止めたので、精製中である。

脳海馬神経はプロゲステロンの大きな効果をうける。ダイオキシンによって顕著に誘導がかかる膜上プロゲステロン受容体 25-Dx は、抗体組織染色により、海馬の CA1-CA3 の錐体神経細胞と DG の顆粒神経細胞に局在していた。25-Dx の機能は未だはっきりしていないが、Ca 信号に影響を及ぼす急性的な情報伝達経路が存在するようである。

## 6) 神経行動実験。

母親にエストラジオールを暴露して生まれた仔ラットでは、空間学習を検討する Water Maze の成績を調べると、4 週齢では対照群と差がないが、7 週齢以降の成獣になると改善された。これと良

い相関を持って、電気生理で調べた海馬スライスの長期増強も、4 週齢では対照群と差がないが、7 週齢以降の成獣になると増強された。

母親にビスフェノール A を低濃度暴露して生まれた仔ラットでは、Water Maze の成績が 13 週齢の成獣になると対照と比べて改善された。

#### 7) 小脳プルキンエ神経の発達解析

1 週齢のラットで、プルキンエ神経細胞の発達に及ぼす、プロゲステロンとオクチルフェノールの作用を解析した。脳に穴を開けて小脳に液を直接数日間に渡り注入した。プルキンエ細胞の突起の成長を解析すると、オクチルフェノールはプロゲステロンと同様に、プルキンエ神経細胞突起の発達を促進することがわかった。

### 3. 研究実施体制

#### 急性作用解析グループ

- ① 川戸佳(東京大学大学院総合文化研究科、教授)
- ② ・ 内分泌攪乱物質による海馬のニューロステロイド作用への攪乱を、電気生理や Ca イメージングにより生物物理的に解析する。長期増強の攪乱、シナプスの受容体を介する Ca 信号の攪乱。
  - ・ 膜上ステロイド受容体の同定と機能の解析
  - ・ 海馬におけるニューロステロイド合成の解析

#### P450 代謝解析グループ

- ① 小南思郎(広島大学総合科学部、教授)
- ② ニューロステロイド合成 P450 系の代謝活性を如何に攪乱するか解析

#### 脳発達解析グループ

- ① 筒井和義(広島大学総合科学部、教授)
- ② 小脳脳神経回路発達に対する攪乱解析。特にプルキンエ細胞。

#### プローブ開発グループ

- ① 長野哲雄(東京大学大学院薬学系研究科、教授)
- ② P450 活性や NO 発光測定の新規プローブの開発

### 4. 研究成果の発表

#### (1) 論文発表

- T. Kimoto, T. Tsurugizawa, Y. Ohta, J. Makino, H. Tamura, Y. Hojo, N. Takata, S. Kawato, Neurosteroid synthesis by cytochrome P450-containing systems localized in the rat brain hippocampal neurons: *N*-methyl-*D*-aspartate and calcium-dependent synthesis. **Endocrinology** 142: 3578-3589, 2001
- S. Kawato, M. Yamada and T. Kimoto, Neurosteroids are 4th generation neuromessengers: cell biophysics analysis of steroid signal transduction. **Adv Biophys** 37: 1-30, 2001
- M. Yamada, Y. Ohta, G. I. Bachmanova, A. I. Archakov, I. Hatta and S. Kawato, Effect of

microsome-liposome fusion on the rotational mobility of cytochrome P450IIB4 in rabbit liver microsomes. **J Inorg Biochem** 83: 261-268, 2001

- H. Sakamoto, K. Ukena and K. Tsutsui, Effects of progesterone synthesized de novo in the developing Purkinje cell on its dendritic growth and synaptogenesis. **J. Neurosci.** 21:6221-6232. (2001)
  - H. Sakamoto, K. Ukena and K. Tsutsui, Activity and localization of 3 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase/ $\Delta$ 5- $\Delta$ 4-isomerase in the zebrafish central nervous system. **J. Comp. Neurol.** 439:291-305. (2001)
  - K. Ukena, Y. Honda, R. W. Lea and K. Tsutsui, Developmental changes in progesterone biosynthesis and metabolism in the quail brain. **Brain Res.** 898:190-194 (2001)
  - M. Matsunaga, K. Ukena and K. Tsutsui, Expression and localization of cytochrome P45017 $\alpha$ -hydroxylase/c17,20lyase in the avian brain. **Brain Res.** 899:112-122 (2001).
  - K. Tsutsui, Neuronal neurosteroidogenesis in vertebrate brains. **Zool. Sci.** 18:1043-1053. (2001)
  - R. W. Lea and K. Tsutsui, Changes in central steroid receptor expression, steroid synthesis, and dopaminergic activity related to the reproductive cycle of the ring dove. **Micros. Res. Tech. (MRT)** 55:12-26 (2001)
  - K. Tsutsui and B. A. Schlinger Steroidogenesis in the avian brain. In **Avian Endocrinology**, A. Dawson and C. M. Chaturvedi (eds) **Journal of Endocrinology Ltd**, pp. 59-77 (2001)
  - K. Tsutsui, K. Ukena and H. Sakamoto, Novel cerebellar function: Neurosteroids in the Purkinje neuron and their genomic and non-genomic actions. In **Neural Plasticity, Development and Steroid Hormone Action**, R. J. Handa et al. (eds.) **CRC Press**, Boca Raton, USA, pp. 101-119 (2001)
  - T. Yamazaki, H. Kuwahara, M. Shimodaira, S. Kominami, Tributyltin perturbs adrenal steroid hormone biosynthesis. **Environ. Sci.**, 8, 126 (2001)
  - T. Tsubota, S. Taki, K. Nakayama, J. I. Mason, S. Kominami, N. Harada and I. Kita, Immunolocalization of steroidogenic enzymes in the corpus luteum and placenta of the Japanese black bear, *Ursus thibetanus Japonicus*, during pregnancy, **Reproduction** 121, 587-594 (2001)
  - S. Kominami, A. Owaki, T. Iwanaga, H. Tagashira-Ikushiro, and T. Yamazaki The rate determining step in P450 C21-catalyzing reactions in a membrane-reconstituted system, **J. Biol. Chem.** 276, 10753-10758 (2001)
  - S. Nakayama, T. Sakuyama, S. Mitaku, and Y. Ohta, Fluorescence Imaging of Metabolic Responses in Single Mitochondria, **Biochem. Biophys. Res. Comm.** 290, 23-28 (2002)
- (2) 特許出願  
なし