

「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

記憶学習の中心である脳海馬の神経シナプスで、チトクロムP450系が合成するニューロステロイド（女性・男性ホルモンなど）はニューロモジュレータであり、神経活動に急性的に作用することを見出した。海馬神経のシナプス伝達は、女性ホルモンによって急性的に大きな制御を受け、また低濃度の環境ホルモンがこの作用に攪乱を与える。神経スパイン（シナプス後部）の数や形態も、女性ホルモンや環境ホルモンで急性的に大きく変動する。神経のシナプスには膜結合エストロジェン受容体が存在して、ホルモンはこれを経由して数十分で記憶過程に影響を発揮する。以上より、環境ホルモンは大人の記憶に顕著に影響する急性効果を持つことがわかってきた。

2. 研究実施内容

1) 海馬のニューロステロイド合成活性と、環境ホルモンによる攪乱解析

海馬ニューロステロイド合成系が女性ホルモンを合成している機構を調べる為に、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ている。代謝産物は、有機溶媒で抽出後、HPLCを用いて分離し解析した。昨年までの成果として、コレステロール→[P450sc]→プレグネノロン→[P45017 α]→デヒドロエピアンドロステロン(DHEA) [17 β-HSD (type 1, 3)]→アンドロステジオール（もしくは→[3 β-HSD (type 1, 2)]→アンドロステジオン）→[3 β-HSD (type 1)]→テストステロン→[P450arom]→エストラジオールという女性ホルモン合成経路を発見した。[P450arom]などは触媒する酵素を表している。今年度はこれに加えて、テストステロン→[5 α-reductase]→ジヒドロテストステロン→[3 α-oxidoreductase]→3 α, 5 α-アンドロスタンジオール、という男性ホルモンの代謝経路を発見した。この経路はかなり早く働き、ジヒドロテストステロンは結果として早く不活性化されるが、一方エストラジオールは安定に存在した。LC/MS/MSを用いて質量分析を行い、DHEA 0.3 nM, テストステロン 17 nM, ジヒドロテストステロン 0.01 nM以下, エストラジオール4 nMというように海馬内の濃度を厳密に決定した。血中からのステロイドの寄与を差し引く為に、♂ラットで精巣摘出を行い測定したが、テストステロンなどの血中濃度は顕著に低下したが、海馬内の濃度は変動し

なかった。以上の性ホルモン合成活性には雄と雌の海馬に顕著な差がない。すなわち、雄も女性ホルモンを合成し、雌も男性ホルモンを合成する。海馬のような高次脳機能を司る器官では、雄雌の差は少ないのかもしれない。以上の結果はこの分野の長年の懸案を解決した重要な結果であり、昨年度分はProc. Natl. Acad. Sci (2004)に掲載された。今年度分は論文執筆中であるが、他のグループから出版を待望されている。

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 α , 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。グリア細胞にはこれら蛋白質は少なかった。更に抗体の存在しない5 α -reductase, 3 α -oxidoreductase, 17 β -HSD type 1, 3, 4, 3 β -HSDに関しては、RT-PCRによる酵素の mRNAの同定を行った。その存在量は副腎皮質や精巣の500分の一程度であるが、海馬のみで局所的に働くことを考えると、十分な量であると思われる。更に、昨年度までに、ニューロステロイド合成酵素P45017 α , P450aromが神経細胞のどの部分にあるのかを、電子顕微鏡を用いて金コロイド免疫抗体染色像を観察することで調べた結果、CA1-CA3の錐体神経細胞とDGの顆粒神経細胞のシナプス部分（シナプス前部とシナプス後部の両方）に存在していることを発見した。これは、性ステロイドが記憶を貯蔵する神経シナプスで局所的に合成されることを鮮明に示しているため、重要な発見である。以上の結果はこの分野の長年の懸案を解決した重要な結果であり、Proc. Natl. Acad. Sci (2004)に掲載された

3) エストロジェン受容体の神経シナプス局在の同定

海馬の神経はエストロジェンの作用を大きく受けるが、未だ世界的に、海馬の主要なグルタミン酸作動性の神経細胞（錐体細胞や顆粒細胞）にはエストロジェン受容体が存在するという明確な証明がなかった。核内受容体としてのER α すら見つかっていなかった。我々は、世界中で使用されているER α の著名な抗体とされているMC-20抗血清は、不純抗体を多く含む抗血清で、卵巣や脳視床下部で染色すると67 kDaのER α に反応するが、海馬・大脳皮質・小脳などのER α が極めて少ない部位では、ER α とうまく反応せず、62kDaなどの未同定の蛋白に結合してしまうことを、Western Blotで発見した。Er α K0マウスを用いた実験でも、MC-20は62kDa蛋白と反応し、海馬の組織染色はWildマウスとEr α K0マウスで差が無いという奇妙な結果が得られた。従ってこれまで発表されている多くの論文は、海馬スライスでの組織染色、免疫電子顕微鏡観察、単離した培養神経細胞の染色に関して深刻な間違いを含んでいる。この難問題に対して、エストロジェン受容体ER α の新しい高純度精製抗体RC-19を新たに作成して（小南グループ）、問題を解決した。RC-19抗体を用いて、海馬スライスでの組織染色観察を行い、ER α がCA1-CA3の錐体神経細胞とDGの顆粒神経細胞に分布することを示した。グリア細胞はER α が非常に少ない。更に、密度勾配遠心で厳密に精製したシナプスや核の画分に対して、Western Blot を行うことで、同一のエストロジェン受容体ER α が海馬神経シナプス膜分画（特にPSD画分）と核内に存在することを、きれいに示した。神経シナプスでの局在を蛋白

質サイズの分解能で解析するため、電子顕微鏡による免疫金抗体染色の解析を行い、錐体神経細胞と顆粒神経細胞のシナプス前部・後部と核にER α が確かに局在していることを発見した。これは、エストラジオールと環境ホルモンが神経シナプスで局所的に作用出来ることを鮮明に示している。ER α のmRNAは、ラット成獣に於いて海馬に発現している（4週齢卵巣の約500分の1）。ER α のmRNAのスプライスバリエーションの探索を、各構成エクソンごとに徹底的に行ったが、全長mRNA以外にはスプライスバリエーションは存在しなかった。以上の結果は、長年にわたり謎とされてきた、海馬神経細胞へのエストラジオール作用を解明する大きな一歩となる。神経シナプスでのER α 受容体の存在が確定することで、神経シナプス伝達・記憶学習の環境ホルモンによる攪乱を分子論的に論じることがはじめて可能になった。これ等の結果をまとめて投稿した論文は現在審査中である。

4) 電気生理による海馬長期抑圧への効果から記憶モジュレーションを解析

電気生理はニューロステロイドの記憶学習の短期効果を測定する方法としては、最も高感度である。ラット海馬スライスを用いて、NMDA刺激によるCA1, CA3, DGの3領域で同時に長期抑圧LTDを測定できる多電極法を開発して、17 β -エストラジオールとBPA, DESの急性効果（30分間の灌流で作用させた効果）を解析した。1-10 nMエストラジオール, 1-10 nM DES, 100 nM BPAは、この低濃度で共にLTDを促進した。但しLTD促進はCA1で一番顕著であり、CA3とDGは効果が小さかった。これらの効果はER α の阻害剤17 α -エストラジオールで阻害された。以上の実験結果は、環境ホルモンのシナプス伝達への攪乱効果をはっきりと存在することを示している。また、ER α アゴニストのPPTは17 β -エストラジオールと同じLTD促進効果を示すが、ER β アゴニストのDNPは正反対のLTD抑制効果を示すことがわかり、BPA, DESの作用はER α を介して行われていることを確認した。これ等の結果をまとめて投稿した論文は現在審査中である。

5) スパイン密度・形態変化による海馬神経細胞での急性効果の解析

海馬神経のスパイン（シナプス後部）はエストラジオールの作用を大きく受けることがわかった。海馬スライス中の単一神経に蛍光色素をマイクロインジェクションして、CA1で個々のスパインを可視化する方法を確立した。海馬スライスにエストラジオールを120分作用させるだけで、スパイン密度が増加し、形状が変化することを発見した。これはスパインのタイプ（mushroom, thin, stubby, filopodium）のうち、頭部が比較的小さく、首の長いthinスパインが選択的に増加することによる。1-10 nMエストラジオール, 1-10 nM DES, 10-100 nM BPAで非常に良く似た効果が認められた。MAP Kinase, NMDA受容体をブロックするとこのエストラジオール効果は消滅することから、情報伝達経路を解析中である。また、ER α アゴニストのPPTは17 β -エストラジオールと同じスパイン増加効果を示すが、ER β アゴニストのDNPはほとんど効果が無いことから、BPA, DESの作用はER α を介して行われていることを確認した。この非常に早いスパイン変動は業界の常識を覆す全く新しいもので、これ等の結果をまとめて投稿した論文は現在審査中である。

6) 小脳プルキンエ神経の発達解析

小脳プルキンエ神経細胞は、新生仔脳の発達に伴い、生後20日に渡り神経細胞突起が大きく成長するので、環境ホルモンの脳発達に対する、遺伝子を介した遅い慢性的な影響を解析するのに非常に適している。昨年度までに、1週齢のラットで、プルキンエ神経細胞の発達に及ぼす、エストラジオール・オクチルフェノール・BPAの作用を解析した。これらの薬品を、数日間に渡り小脳の周りの液に注入し作用させた後、小脳スライスを作成して、カルビンジン抗体で組織染色し、プルキンエ細胞の突起の成長を解析した。エストラジオール・オクチルフェノール及びBPAは共に、プルキンエ神経細胞突起の発達を促進し、シナプス接合部のスパインの数も増加させることがわかった。しかし同じ効果を引き起こすにはBPAやオクチルフェノールはエストラジオールの100倍の濃度を必要とした。更にこのプルキンエ神経細胞突起の発達促進効果は、エストロジェン受容体の阻害剤であるタモキシフェンで抑制された。これ等の実験で、雄雌による性差はほとんど観測されなかった。mRNA解析によると新生仔期にはER β , ER α 共に多く存在する。

3. 研究実施体制

川戸グループ (この1グループのみ)

東京大学大学院 総合文化研究科 広域科学専攻 (川戸佳)

研究実施項目：海馬での記憶学習攪乱の解析

概要：内分泌攪乱物質による海馬ニューロステロイド作用への攪乱を、電気・Ca信号により可視化解析。海馬エストロジェン受容体の同定。

ニューロステロイド合成P450系の代謝活性の環境ホルモンによる攪乱の解析。

海馬や小脳の神経回路におけるニューロステロイド作用の環境ホルモンによる攪乱を解析。

4. 主な研究成果の発表 (論文発表および特許出願)

(1) 論文発表

- Hojo Y., Hattori T., Enami T., Furukawa A., Suzuki K., Ishii H., Morrison J. H., Janssen W. G.M., Mukai H., Kominami S., Harada N., Kimoto T., and Kawato S.

Adult Male Rat Hippocampus Synthesizes Estradiol from Pregnenolone by Cytochromes P45017a and P450 Aromatase Localized in Neurons

Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 101, 865-870, 2004

- Kawato S.

Endocrine disrupters as disrupters of brain function: a neurosteroid viewpoint, **Enviro Sci**, 11, 1-14, 2004

- **Ogiue-Ikeda M, Kawato S, Ueno S** Acquisition of ischemic tolerance by repetitive transcranial magnetic stimulation in the rat hippocampus. **Brain Research**, 1037, 7-11, 2005
- Sato S, Osanai H, Monma T, Harada T, Hirano A, Saito M, Kawato S
Acute effect of corticosterone on N-methyl-D-aspartate receptor-mediated Ca^{2+} elevation in mouse hippocampal slices. **Biochem Biophys Res Commun**, 321, 510-513, 2004
- Miyatake R., Furukawa A., Matsushita S., Higuchi S., Suwaki H.; Functional polymorphisms in the signal receptor gene associated with alcoholism. **Biol Psychiatry**, 55, 85-90.,2004
- Ubuka T, Bentley GE, Ukena K, Wingfield JC, Tsutsui K.
Melatonin induces the expression of gonadotropin-inhibitory hormone in the avian brain.
Proc Natl Acad Sci USA 102:3052-3057, 2005.
- Matsunaga M, Ukena K, Baulieu E-E, Tsutsui K.
7 α -Hydroxypregnenolone acts as a neuronal activator to stimulate locomotor activity of breeding newts by means of the dopaminergic system.
Proc Natl Acad Sci USA 101:17282-17287, 2004.
- Sakamoto H, Ukena K, Takemori H, Okamoto M, Kawata M, Tsutsui K.
Expression and localization of 25-Dx, a membrane-associated putative progesterone-binding protein, in the developing Purkinje cell.
Neuroscience 126:325-334, 2004.
- Inoue M, Rashid MH, Fujita R, Contos JJ, Chun J, Ueda H.
Initiation of neuropathic pain requires lysophosphatidic acid receptor signaling.
Nat Med 10:712-718, 2004.
- Sreaton RA, Conkright MD, Katoh Y, Best JL, Canettieri G, Jeffries S, Guzman E, Niessen S, Yates JR 3rd, Takemori H, Okamoto M, Montminy M.
The CREB coactivator TORC2 functions as a calcium- and cAMP-sensitive coincidence detector.
Cell 119:61-74, 2004.
- Kumar S, Chaturvedi NK, Nishi M, Kawata M, Tyagi RK.
Shuttling components of nuclear import machinery involved in nuclear translocation of steroid receptors exit nucleus via exportin-1/CRM-1 independent pathway.
Biochim Biophys Acta 1691:73-77, 2004.
- Nishi M, Tanaka M, Matsuda K, Sunaguchi M, Kawata M.

Visualization of glucocorticoid receptor and mineralocorticoid receptor interactions in living cells with GFP-based fluorescence resonance energy transfer.

J Neurosci 24:4918-4927, 2004.

- Ochiai I, Matsuda K, Nishi M, Ozawa H, Kawata M.
Imaging analysis of subcellular correlation of androgen receptor and estrogen receptor α in single living cells using green fluorescent protein color variants. **Mol Endocrinol** 18:26-42, 2004.
- Derbalah AS, Wakatuki H, Yamazaki T, Sakugawa H.
Photodegradation kinetics of fenitrothion in various aqueous media and its effect on steroid hormones biosynthesis. **Geochem J** 38:201-212, 2004.
- Ohashi K, Kominami S, Yamazaki T, Ohta S, Kitamura S.
Inhibitory effect of organotin compounds on rat neuronal nitric oxide synthase through interaction with calmodulin. **Biochem Biophys Res Comm** 324:178-185, 2004.
- Kishimoto W, Hiroi T, Shiraishi M, Osada M, Imaoka S, Kominami S, Igarashi T, Funae Y.
Cytochrome P450 2D catalyze steroid 21-hydroxylation in the brain.
Endocrinology 145:699-705, 2004.
- Philips BJ, Ansell PJ, Newton LG, Harada N, Honda SI, Ganjam VK, Rottinghaus GE, Welshons WV, Lubahn DB.
Estrogen receptor-independent catechol estrogen binding activity: protein binding studies in wild-Type, estrogen receptor- α KO and aromatase KO mice tissues.
Biochemistry 43: 6698-6708, 2004.
- Bakker J, Honda S, Harada N, Balthazart J.
Restoration of male sexual behavior by adult exogenous estrogens in male aromatase knockout mice.
Horm Behav 46:1-10, 2004.
- Hattori T, Watanabe K., Uechi Y, Yoshioka H, Ohta Y.
Repetitive transient depolarizations of the inner mitochondrial membrane induced by proton pumping.
Biophys J 88:2340-2349, 2005.
- Parhar IS, Ogawa S, Sakuma Y.
Three GnRH receptor types in laser captured single cells of the cichlid pituitary display cellular and functional heterogeneity.
Proc Natl Acad Sci USA 102:2204-2209, 2005.

- Xiao K, Kondo Y, Sakuma Y.
Sex-specific effects of gonadal steroids on conspecific odor preference in the rat.
Horm Behav 46:356-361, 2004.
- Rho JY, Wada-Kiyama Y, Onishi Y, Kiyama R, Sakuma Y.
Expressional regulation of neuronal and cancer-related genes by estrogen in adult female rats.
Endocr Res 30:257-267, 2004.
- Higashi T, Takido N, Shimada K,
Studies on neurosteroids XVII.: Analysis of stress-induced changes in neurosteroid levels in rat brains using liquid chromatography-electron capture atmospheric pressure chemical ionization-mass spectrometry.
Steroids 70:1-11, 2005.
- Shimizu M, Nakano Y, Yamasaki T, Tamura H.
Region- and isoform-specific expression of hydroxysteroid sulfotransferases in rat brain.
J Health Sci 50:689-692, 2004.
- Mitani F, Ogishima T, Mukai K, Suematsu M.
Possible participation of outer mitochondrial cytochrome b5 in steroidogenesis in zona glomerulosa of rat adrenal cortex.
Endocrine Res 30:639-644, 2004.

(2) 特許出願

H16年度特許出願件数：2件（CREST研究期間累積件数：2件）