

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 3 日現在

機関番号：12601

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2014

課題番号：24657082

研究課題名(和文)ニューロステロイド・7 $\alpha$ -ヒドロキシプレグネノロンの生理機能とその作用機序研究課題名(英文)Approach for physiological function of neurosteroid, 7 $\alpha$ -hydroxypregnenolone

研究代表者

清水 貴美子 (Shimizu, Kimiko)

東京大学・理学(系)研究科(研究院)・助教

研究者番号：50451828

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、哺乳類における7 $\alpha$ -ヒドロキシプレグネノロン(7 $\alpha$ -OH-Preg)の生理的役割と合成分泌制御機構を明らかにするため、マウス脳内における7 $\alpha$ -OH-Pregの同定と、その合成酵素のマウス脳内分布を明らかにする事を目的とした。高分離能HPLCに精密質量分析法を連動する方法により、7 $\alpha$ -OH-Pregおよび関連するニューロステロイドの分析を可能にした。また、脳内の7 $\alpha$ -OH-Preg合成に関わる一連の合成酵素群の時刻変動を検討し、間脳、海馬などいくつかの部位においてすべての合成酵素群の存在が確認でき、脳部位により合成酵素の発現量が概日変動する事を見いだした。

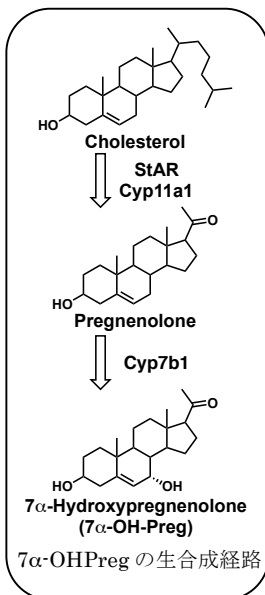
研究成果の概要(英文)：We focused our attention to a new neurosteroid, 7 $\alpha$ -hydroxy pregnenolone (7 $\alpha$ -OH-Preg). Our purpose is to identify and examine 7 $\alpha$ -OH-Preg and its synthetic enzymes in the mammalian brain. We investigated endogenous steroids in the mouse and rat brain by HPLC and MS analysis. We established an HPLC-MS analysis method for the detection of 7 $\alpha$ -OH-Preg and its related neurosteroids. We examined mRNA levels of genes encoding the enzymes that are necessary for synthesis of 7 $\alpha$ -OH-Preg and detected the circadian expression in some part of the mouse brain. We also performed various behavioral tests that evaluate emotion and memory formation of mice which lack synthetic enzyme of 7 $\alpha$ -OH-Preg at several time points during the day for understanding of its actions.

研究分野：神経分子生物学

キーワード：ニューロステロイド 哺乳類

### 1. 研究開始当初の背景

当研究室では動物の光応答と行動に関する研究に広く取り組んできた。その過程で、ニワトリ松果体において光応答を示す遺伝子群を網羅的に探索した結果、一連のコレステロール合成酵素群の遺伝子発現が上昇する事を見いだした<sup>1</sup>。コレステロールは脳内でニューロステロイドに変換しうるが、我々は、ニワトリ松果体において明期に 7 $\alpha$ -ヒドロキシプレグネノロン (7 $\alpha$ -OH-Preg) の合成量が上昇する事を発見した。7 $\alpha$ -OH-Preg はイモリの脳内で合成され行動量を上昇させる物質として知られ<sup>2</sup>、ニワトリでもその脳内投与で行動量が上昇した<sup>1</sup>。これらのことから 7 $\alpha$ -OH-Preg が行動リズムを生み出す鍵因子である可能性が考えられた。また、ラットへの 7 $\alpha$ -OH-Preg の脳室内投与により老化による記憶改善が見られるという報告もあり<sup>3</sup>、高次脳機能への関与も示唆される。しかし、哺乳類では脳内で 7 $\alpha$ -OH-Preg が合成される可能性を示す報告があるもののその実体は明示されておらず、存在や生理機能など多くの謎が残されている。



### 2. 研究の目的

7 $\alpha$ -OH-Preg は発見されて間もないニューロステロイドの一つであり、その研究の歴史は浅い。哺乳類における生理作用や生体内での発現分布をはじめ、受容体や作用メカニズムに到るまで、すべてが謎に包まれている。申請者らは、ニワトリ松果体において 7 $\alpha$ -OH-Preg 発現量が日周変動し、さらに光に応答して上昇する事を見いだした。そこで、哺乳類における 7 $\alpha$ -OH-Preg の活性・生理作用の実体を明らかにすることにより、光環境と生体リズムに依存する動物の行動様式とその分子メカニズムの解明を目指した。具体的には、マウス脳内における 7 $\alpha$ -OH-Preg の存在を明示し、哺乳類における 7 $\alpha$ -OH-Preg の発現の概日リズムや光応答性を検証する。また、7 $\alpha$ -OH-Preg を投与したマウスや 7 $\alpha$ -OH-Preg 合成酵素の欠損マウスをもちいて、行動リズムや行動量の変化をはじめ、学習・記憶や情動に関する多様な行動実験を行い、哺乳類における 7 $\alpha$ -OH-Preg の活性・生理作用の実体を明らかにする。

### 3. 研究の方法

マウス脳内において 7 $\alpha$ -OH-Preg の実体とその合成の日周変動・光依存性を解析する。

また、7 $\alpha$ -OH-Preg の生理機能の一つとして注目している「行動リズムを生み出す因子」としての機能も明らかにするため、7 $\alpha$ -OH-Preg の脳内投与や、7 $\alpha$ -OH-Preg 最終合成酵素の欠損マウスを用いて、行動量の測定をおこなう。さらに、これらのマウスの情動や記憶を中心とした行動測定にも取り組む。

#### (1) マウス脳における 7 $\alpha$ -OH-Preg の存在の検証：

マウス脳を各部位に分けた試料からステロイドを抽出し、HPLC および質量分析により 7 $\alpha$ -OH-Preg の存在確認にとりくむ。7 $\alpha$ -OH-Preg の合成に関わる酵素群の RT-PCR 解析により、7 $\alpha$ -OH-Preg の産生部位を特定する。さらに、一日のうちの様々な時刻において合成酵素発現量を測定し、7 $\alpha$ -OH-Preg の脳内レベルに日周変動が存在するか否かを検証する。

#### (2) 7 $\alpha$ -OH-Preg の脳内投与による行動測定：

シリンジポンプによる 7 $\alpha$ -OH-Preg の急性脳室内投与、および、浸透圧ポンプを用いた 2 週間連続脳室内投与の 2 種類の投与をおこない、輪回し行動解析により、行動の概日リズムおよび活動量への影響を検討する。

#### (3) 7 $\alpha$ -OH-Preg 合成酵素 Cyp7b1 欠損マウスを用いた行動解析：

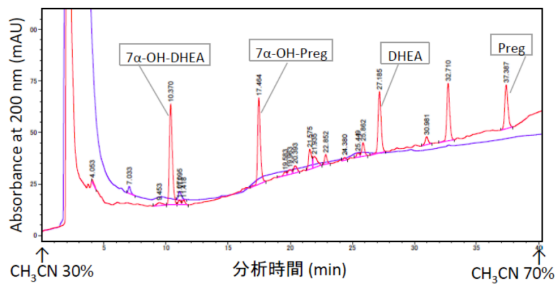
7 $\alpha$ -OH-Preg 合成経路の最終酵素である Cyp7b1 の欠損マウスをもちいて、(2)でもちいた輪回し行動解析に加え、新奇物体認識テスト等により記憶・学習への影響を、open field テスト、尾懸垂試験、強制水泳試験により情動系への影響を検証する。

#### (4) 7 $\alpha$ -OH-Preg の概日時計機構への影響：

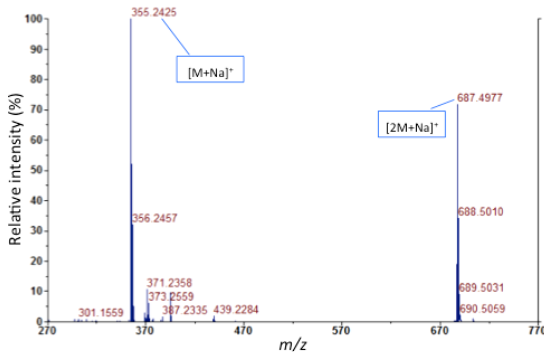
(2), (3) で述べたマウス個体を用いる実験に加えて、よりダイレクトに概日時計への影響を検討するために、概日時計の中核である視床下部視交叉上核を単離培養し中枢時計への 7 $\alpha$ -OH-Preg 添加による影響を検討した。このとき、PER2 とルシフェラーゼの融合蛋白質発現マウスから視交叉上核を単離し、ルシフェラーゼの発光を計測する事により、概日リズムをリアルタイムにモニターする。

### 4. 研究成果

(1) マウス脳における 7 $\alpha$ -OH-Preg の存在の検証：7 $\alpha$ -OH-Preg および関連するステロイドの分析のため、脳組織からの抽出法、HPLC および質量分析を用いた分析条件の検討をおこなった。有機溶媒と逆相カラムによる抽出後、高性能 HPLC に精密質量分析法を連動する方法を開発した (大阪大学蛋白質研究所 高尾敏文 教授との共同研究)。また、7 $\alpha$ -OH-Preg は質量分析時に脱水体になりやすい物質である事がわかったが、測定時に Na<sup>+</sup> を添加する事により脱水体の生成が抑えられ、7 $\alpha$ -OH-Preg の分析が可能になった。



HPLC による  $7\alpha$ -OH-Preg と関連するステロイドの分析



$\text{Na}^+$  添加条件における  $7\alpha$ -OH-Preg の質量分析結果

この方法を用いて、脳内の  $7\alpha$ -OH-Preg 量の分析を試みたが、微量に存在する内在の  $7\alpha$ -OH-Preg の検出には至っていない。現在、試料を濃縮することにより、脳内の  $7\alpha$ -OH-Preg の検出を試みている。

一方、脳内の  $7\alpha$ -OH-Preg 生合成に関わる一連の合成酵素群の解析のため、RT-qPCR法により、 $7\alpha$ -OH-Preg の産生部位および時刻変動を検討した。この結果、間脳、海馬、松果体などいくつかの脳部位において合成酵素群の存在が確認できた。また、このうちのいくつかの脳部位において合成酵素群の発現量が時刻変動することをみいだした。

(2)  $7\alpha$ -OH-Preg の脳内投与による行動測定: マウスにおける  $7\alpha$ -OH-Preg の生理作用を明らかにするため、明暗、または恒暗条件下における連続行動量測定をおこなった。活動量、行動リズム周期および行動リズム位相等を解析した結果、急性投与においても、連続投与においても、活動リズムや活動量に影響は見られなかった。

(3) *Cyp7b1* 欠損マウスを用いた行動解析: マウスを用いた輪回し行動の活動量・行動リズム周期・行動リズム位相の解析を行った結果、脳内投与と同様に、活動リズムや活動量に影響は見られなかった。

一方、記憶や情動を評価する高次脳機能の行動解析の結果、*Cyp7b1* 欠損マウスでは一部の情動関連行動に影響がみられている。現在、確認できる情動異常の詳細な解析を行っている。

(4)  $7\alpha$ -OH-Preg の概日時計機構への影響:  $7\alpha$ -OH-Preg の概日時計機構への影響を直接観察するために、概日時計の中核である視床下部視交叉上核の単離培養系に  $7\alpha$ -OH-Preg を直接投与した。レポーターとしてもちいた PER2 とルシフェラーゼとの融合蛋白質のリズム周期や位相には変化が見られなかった。本実験と、個体を用いた実験により、 $7\alpha$ -OH-Preg が概日時計に与える影響はほとんどないと判断した。

以上 (1)-(4)の成果より、マウスでは両生類や鳥類とは異なり、行動量に与える影響は見られなかった。動物種により  $7\alpha$ -OH-Preg の生理作用は異なると考えられる。しかし、マウス脳内の特定の部位において、 $7\alpha$ -OH-Preg の時刻依存的な生合成の可能性がある事、 $7\alpha$ -OH-Preg 合成酵素欠損マウスにおいて情動への影響がみられることを見いだした。これらの知見は、 $7\alpha$ -OH-Preg が時刻に依存した情動調節に関わる可能性があることを示唆している。 $7\alpha$ -OH-Preg が概日時計には影響しないことを考えると、この時刻依存性は、内在の概日時計ではなく、環境の光に依存する可能性が高い。ヒトにおいて一日のうちの時刻により気分が変化すること<sup>4</sup>や、季節性の鬱病に光治療が効果的であること<sup>5</sup>などの報告は、環境の光が情動に影響する事を示唆している。 $7\alpha$ -OH-Preg がこのような光依存的な情動の変化に寄与している可能性について、更に検討を継続している。

#### <引用文献>

- Hatori M. *et al.* Proc. Natl. Acad. Sci. USA (2011) 4864-4869
- Matsunaga M. *et al.* Proc. Natl. Acad. Sci. USA (2004) 17282-17287
- Yau J.L. *et al.* J. Neurosci (2006) 11034-11040
- Rosenthal N.E. *et al.* Arch. Gen. Psychiatry (1984) 72-80
- Bunney W.E. & Bunney G.B. Neuropsychopharmacology (2000) 335-345

#### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[学会発表] (計 2件)

① 前畑 佳納子、清水 貴美子、高尾 敏文、深田 吉孝: Molecular analysis of neurosteroids in mouse brain. 第37回日本分子生物学会年会 (パシフィコ横浜 横浜市 神奈川県) 2014年11月27日

② 前畑 佳納子、清水 貴美子: マウス脳に

おけるニューロステロイドの分子解析. 第  
2回卓越した大学院拠点形成支援補助金に  
よる理学系リトリート 東京大学 理学系  
研究科 (ラフォーレ修善寺 伊豆市 静岡  
県 ) 2014年3月11日

[その他]

ホームページ

<http://www.biochem.s.u-tokyo.ac.jp/fukada-lab>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

清水 貴美子 (SHIMIZU, Kimiko)

東京大学・大学院理学系研究科・助教

研究者番号: 50451828

### (4) 研究協力者

前畑 佳納子 (MAEHATA, Kanako)