

# ニューロンが合成するニューロステロイドの ノンゲノミック作用とゲノミック作用

筒井 和義<sup>1)</sup>, 坂本 浩隆<sup>2)</sup>, 食見 花子<sup>1)</sup>, 浮穴 和義<sup>1)</sup>

1) 広島大学総合科学部脳科学研究室; CREST・科学技術振興事業団

2) 現所属: 京都府立医科大学・解剖学教室・生体構造科学部門

## 要 約

高次情報中枢である脳は末梢内分泌腺が合成するステロイドの標的器官として捉えられてきたが、脳も独自にコレステロールをもとにステロイドを合成していることが哺乳類を用いた Baulieu らの研究とわれわれの鳥類、両生類、魚類の研究により明らかとなった。この新しい概念の脳分子はニューロステロイドと名付けられた。脳が合成するニューロステロイドの作用を解析するには、ニューロステロイド合成細胞を同定する必要があった。われわれは小脳の代表的ニューロンであるプルキンエ細胞が活発にニューロステロイドを合成することを見出し、ニューロンによるニューロステロイド合成を初めて証明した。プルキンエ細胞が脳の代表的ニューロステロイド合成細胞であることは脊椎動物に一般化される重要な発見である。プルキンエ細胞ではさまざまなニューロステロイドが時期特異的に合成されており、ニューロステロイドの作用を解析する優れた細胞モデルとなった。小脳皮質が形成される新生期のプルキンエ細胞ではプロゲステロンとエストラジオールの合成が高まり、これらのニューロステロイドはゲノミック作用により、プルキンエ細胞の樹状突起を伸長させ、さらに棘シナプスの形成を誘導することが明らかになった。一方、新生期以降のプルキンエ細胞が合成するプレグネノロン硫酸エステルには神経回路のシナプス情報伝達を急性的に調節するノンゲノミック作用があることが分かった。

## ニューロステロイドの発見

高次情報中枢である脳は末梢内分泌腺が合成するステロイドホルモンの標的器官として捉えられてきた。例え

ば、生殖腺がつくる性ステロイドは脂溶性という物理化学的性状により、生殖腺から分泌されたのち、血液—脳関門を通過して脳内の限られた部位に作用する。本能行動の中枢である間脳の視索前野・視床下部には性ステロイドの受容体が密に分布しており、性ステロイドはこれらの脳部位に局在する受容体を介してニューロン活動を制御し、本能行動の発現を促す。一方、性ステロイドは感受性期の脳に作用して脳の性分化を決定し、神経回路形成に決定的な役割を担う。ところが、最近になり脳も独自にコレステロールをもとにステロイドを合成していることが明らかになった。脳のステロイド合成はこれまでの常識を覆す重要な発見であり、脳が合成するこの新しい概念の脳分子はニューロステロイド (neurosteroids) と名付けられた。

ステロイド合成細胞では、コレステロールをもとにチトクローム P450<sub>scc</sub> (P450分子種の1つ; コレステロール側鎖切断酵素) の作用によりプレグネノロンがつくられる。このプレグネノロン合成が生体内に存在するすべてのステロイドの生合成の第一段階である。したがって、脳におけるステロイド生合成を証明するには、ステロイド合成の第一段階となるプレグネノロンの合成を明らかにする必要があった。脳のプレグネノロン合成は、まず哺乳類を用いた Baulieu のグループ [総説 1] により、続いて鳥類、両生類、魚類を用いたわれわれのグループにより発見された [総説 2, 総説 3]。通常は血液—脳関門を通過できない親水性の高いプレグネノロン硫酸エステルがラットの脳に高濃度に存在することに着目した Baulieu らにより、脳におけるプレグネノロンとその硫酸エステルの合成がラットで証明された [4-10]。一方、われわれはウズラやカエルなどの脳細胞ミトコンドリアとコレステロールを反応させて生化学的に解析し、チトクローム P450<sub>scc</sub> が脳細胞に存在してプレグネノロンが合成されることを明らかにした [11-15]。このようにして、広く脊椎動物では脳が独自にコレステロールからプレグネノロンを合成していることが発見された。

連絡先: 筒井和義, 広島大学総合科学部脳科学研究室,  
〒739-8521 東広島市鏡山1-7-1  
TEL: 0824-24-6571  
FAX: 0824-24-0759  
E-mail: tsutsui@hiroshima-u.ac.jp

## ニューロステロイドの生合成

その後の精力的研究により、脊椎動物の脳にはチトクローム P450<sub>scc</sub> に加えてステロイド硫酸基転移酵素 (HST), 3β-水酸基脱水素/Δ<sup>5</sup>-Δ<sup>4</sup>-異性化酵素 (3β-HSD), 5α(β)-還元酵素, チトクローム P450<sub>17α,17β</sub> (P450分子種の1つ; 17α-水酸化酵素・開裂酵素), 17β-水酸基脱水素酵素 (17β-HSD) など多くのステロイド合成酵素が存在することが証明され, 脳はコレステロールをもとにプレグネノロンとプレグネノロン硫酸エステルを初めとするさまざまなニューロステロイドを合成していることが明らかになった [総説1-3]. ニューロステロイドは末梢内分泌腺を除去してもあまり変動しないことから, 末梢内分泌腺とは独立したステロイド合成系が脳に存在する.

脳におけるニューロステロイド生合成経路の大略を,

われわれは鳥類の研究から次のように明らかにした (図1). まずコレステロールからチトクローム P450<sub>scc</sub> によりプレグネノロンが合成される [11-14]. ステロイド硫酸基転移酵素 (HST) の作用により一部のプレグネノロンはプレグネノロン硫酸エステルとなる [11-14]. さらに3β-HSDが脳に存在しており, プレグネノロンから性ステロイドとして知られるプロゲステロンが合成される [16, 17]. プロゲステロンは5β-還元酵素により5β-ダイヒドロプロゲステロン, さらに3β-水酸基還元酵素 (3β-HSO) により3β,5β-テトラヒドロプロゲステロン (エピプレグナノロン) に代謝される [18]. 哺乳類の脳にもほぼ同様のプロゲステロン合成とプロゲステロン代謝経路が存在するが [19-25], 哺乳類では5α-還元酵素と3α-水酸基還元酵素 (3α-HSO) によりプロゲステロンは3α,5α-テトラヒドロプロゲステロン (アロプレグナノロン) に代謝される. 両生類

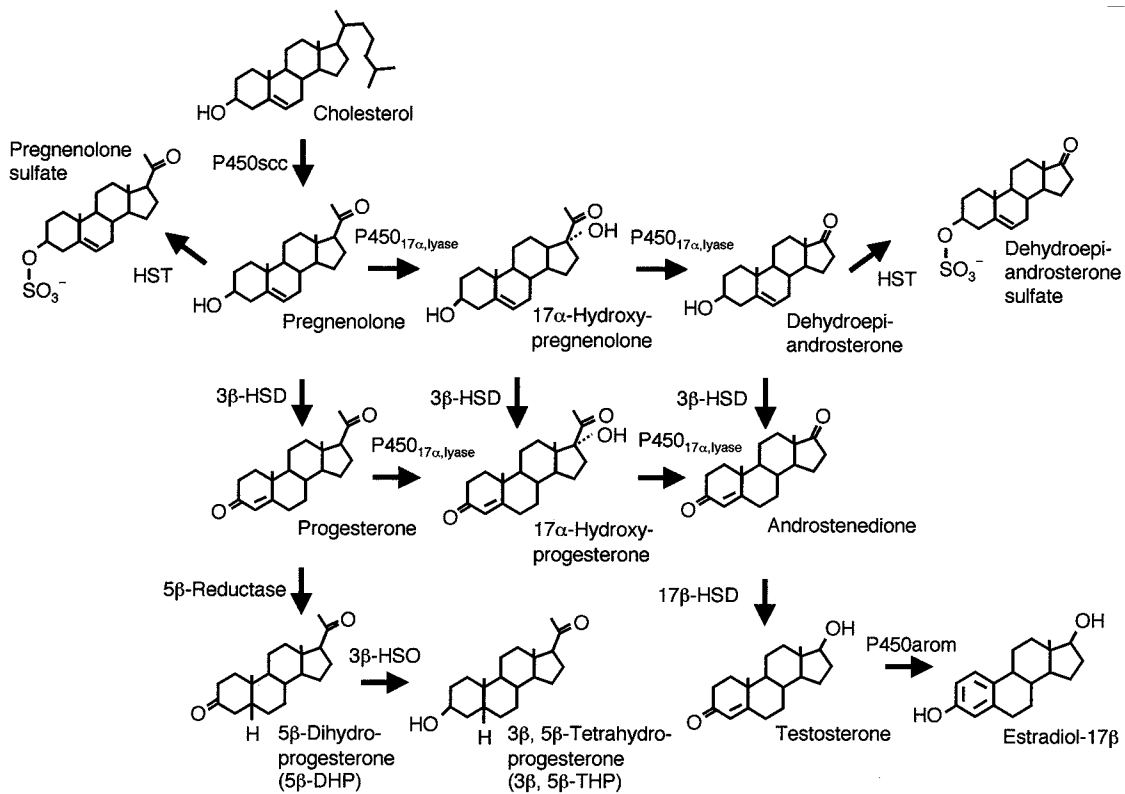


図1 脳のニューロステロイド生合成

脳におけるニューロステロイド生合成経路の大略を鳥類の研究から明らかにした. 脳にはチトクローム P450<sub>scc</sub> (コレステロール側鎖切断酵素) が存在しており, コレステロールからプレグネノロンが合成される. 一部のプレグネノロンはステロイド硫酸基転移酵素 (HST) によりプレグネノロン硫酸エステルとなる. 一方, 3β-水酸基脱水素酵素/Δ<sup>5</sup>-Δ<sup>4</sup>-異性化酵素 (3β-HSD) の作用によりプレグネノロンからプロゲステロンが合成される. プロゲステロンは5β-還元酵素により5β-ダイヒドロプロゲステロン, さらに3β-水酸基還元酵素 (3β-HSO) により3β,5β-テトラヒドロプロゲステロン (エピプレグナノロン) に代謝される. 脳にはチトクローム P450<sub>17α,17β</sub> (17α-水酸化酵素・開裂酵素) も存在しており, プロゲステロンは17α-ヒドロキシプロゲステロンを経てアンドロステンジオンに代謝される. さらにアンドロステンジオンは17β-水酸基脱水素酵素 (17β-HSD) によりテストステロン, チトクローム P450<sub>arom</sub> (芳香化酵素) によりエストラジオールへと代謝される.

[15, 26] や魚類 [27] の脳でもプレグネノロンやプロゲステロンなどのニューロステロイドが合成される。

一方、鳥類の脳にはチトクローム P450<sub>17 $\alpha$ ,17 $\beta$</sub> が存在しており、プロゲステロンから17 $\alpha$ -ヒドロキシプロゲステロンを経てアンドロステンジオンが合成される [28]。このアンドロステンジオン合成に対して、鳥類では P450<sub>17 $\alpha$ ,17 $\beta$</sub> によるプレグネノロンからデヒドロエピアンドロステロンの合成は弱いと考えられる [11, 28]。デヒドロエピアンドロステロンとその硫酸エステル・脂肪酸エステルが高濃度に存在する哺乳類の脳ではチトクローム P450<sub>17 $\alpha$ ,17 $\beta$</sub> の存在について統一見解は得られていないが [24, 29]、一部の研究者が P450<sub>17 $\alpha$ ,17 $\beta$</sub> によるデヒドロエピアンドロステロン合成を報告している [30]。以上のステロイド合成酵素に加えて、鳥類の脳には17 $\beta$ -HSD が存在しており、アンドロステンジオンからアンドロゲンであるテストステロンが合成される [31, 32, 総説33]。脳におけるチトクローム P450<sub>arom</sub> (P450分子種の1つ；芳香化酵素)の存在は古くから知られており、脳はさらにアンドロゲンからエストラジオール、エストロンなどのエストロゲンを独自に合成する [31, 32, 総説33]。哺乳類の脳におけるニューロステロイド合成は以上の鳥類と基本的には同じであるが、いくつかの点で異なる [総説1, 2]。下等脊椎動物の脳も、哺乳類や鳥類の脳と同様に、多くのニューロステロイドを合成する [総説2]。

われわれの生化学的解析と分子生物学的解析により、チトクローム P450<sub>scc</sub> は大脳、間脳、中脳、小脳にかけて広く発現していることが明らかになった [12, 24, 34]。免疫組織化学的解析により、ウズラの脳ではチトクローム P450<sub>scc</sub> は大脳の高線状体・原線状体、間脳の視索前野・視床下部、小脳皮質などに分布していることが分かった [12]。ラットでは、嗅球、大脳白質、海馬、間脳の視索前野・視床下部、小脳皮質などにチトクローム P450<sub>scc</sub> が局在している [34, 35]。3 $\beta$ -HSD も哺乳類や鳥類の大脳、間脳、小脳に発現しており、チトクローム P450<sub>scc</sub> とほぼ同様の局在を示した [17, 24, 25]。チトクローム P450<sub>17 $\alpha$ ,17 $\beta$</sub> の発現は中脳で高いが、大脳、間脳、小脳にも分布している [24, 28, 29]。脳におけるステロイド合成酵素の発現をさらに詳細に調べたところ、以下の重要な事実が見い出された。哺乳類では3 $\beta$ -HSD の発現は新生期の時期に増加するのに対し [24, 25]、チトクローム P450<sub>scc</sub> とチトクローム P450<sub>17 $\alpha$ ,17 $\beta$</sub> は新生期、思春期、成熟期にかけて恒常的に発現する [24, 34]。5 $\alpha$  ( $\beta$ )-還元酵素の発現も時期特異的であり、プロゲステロンの合成と代謝は新生期に増加する [総説

3, 25]。鳥類ではプロゲステロンの代謝が孵化直前の卵生期に高い [18]。

生殖活動が年周期性を示す野生動物を用いたわれわれの研究により、ニューロステロイドの季節変動が明らかになった。無尾両生類のトノサマガエルの脳ではプレグネノロン硫酸エステルは冬眠期では低く、生殖行動が活発になる繁殖期に増加する [15]。有尾両生類のイモリや野生鳥類のジュジュカケバトの脳ではプレグネノロンとプロゲステロンの季節変動が見い出された [総説2, 総説44]。このように脳におけるニューロステロイドの季節変動は野生脊椎動物に一般化される。われわれはニューロステロイドの季節変動の生理的意義とこれらの変動を導く脳内機構に関する研究も進めているが、本稿では紙面の関係からその内容を省略した。

## ニューロンによるニューロステロイド合成

ニューロステロイドの作用を解析するには、ニューロステロイドを合成する細胞を同定する必要があった。Baulieu らの研究から、まずオリゴデンドロサイトやアストロサイトなどのグリア細胞によるニューロステロイドの合成が証明された [総説1]。Le Goascogne ら [35] は P450<sub>scc</sub> 抗体を用いた免疫組織化学的解析から、ラットの大脳の白質が免疫陽性を示すことを報告した。白質においてニューロン軸索のミエリン鞘を形成するのが代表的グリア細胞であるオリゴデンドロサイトであり、生化学的解析からオリゴデンドロサイトがコレステロールをもとにプレグネノロンを合成することが明らかになった [9, 36]。その後、アストロサイトもプレグネノロンを合成することが見い出された [19, 20, 37-39]。

一方、ニューロンによるニューロステロイド合成は不明であったが、われわれは小脳のプルキンエ細胞がニューロステロイドを合成することを見い出してニューロンによるニューロステロイド合成を初めて明らかにした [総説3, 総説40] (図2)。まず、われわれはウズラを用いた免疫組織化学的解析と生化学的解析により、小脳皮質ニューロンであるプルキンエ細胞にチトクローム P450<sub>scc</sub> が存在することを明らかにした [12-14]。ラット [34] やカエル [15] でも同様であり、プルキンエ細胞が脳の代表的なニューロステロイド合成細胞であることは脊椎動物に一般化される重要な発見である。さらに、われわれはラットを用いた *in situ* hybridization 法による解析により、プルキンエ細胞にはチトクローム P450<sub>scc</sub> に加えて3 $\beta$ -HSD が存在していることを見出した [25, 34] (図2)。

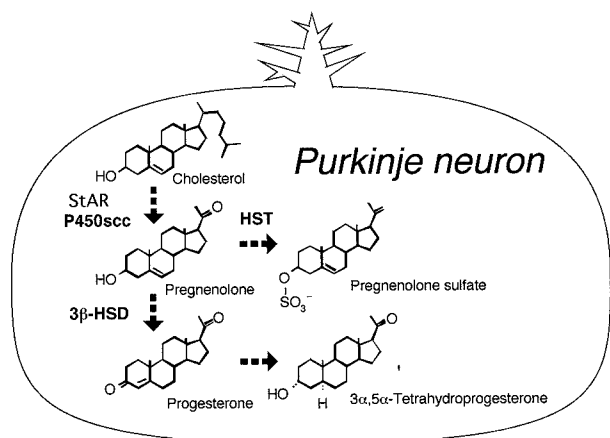


図2 プルキンエ細胞におけるプレグネノロン、プレグネノロン硫酸エステル、プロゲステロン、プロゲステロン代謝ステロイドの合成

小脳皮質ニューロンであるプルキンエ細胞にはチトクローム P450sccc, ステロイド硫酸基転移酵素 (HST), 3β-水酸基脱水素酵素/Δ<sup>5</sup>-Δ<sup>4</sup>-異性化酵素 (3β-HSD) などのステロイド合成酵素が共存している。ラットのプルキンエ細胞では、チトクローム P450scc が生後から成熟期にかけて恒常的に発現しており、コレステロールからプレグネノロンとその硫酸エステルが合成される。一方、新生期のプルキンエ細胞では3β-HSDの発現が高まり、この細胞ではさらにプレグネノロンからプロゲステロンとその代謝ステロイドである3α,5α-テトラヒドロプロゲステロン (アロプレグナノロン) が合成される。プルキンエ細胞にはチトクローム P450scc の存在するミトコンドリア内膜にコレステロールを輸送する StAR タンパク質も発現している。

興味深いことに、このニューロンではチトクローム P450scc の発現は生後から成熟期にかけて恒常的に認められるが、3β-HSD の発現は新生期に増加する [25, 34]。さらに生化学的に解析したところ、プルキンエ細胞では生後から成熟期にかけて恒常的にプレグネノロンとその硫酸エステルが合成されるが、新生期にはプレグネノロンからプロゲステロンとその代謝ステロイドであるアロプレグナノロン (3α,5α-テトラヒドロプロゲステロン) の合成が高まることなどが明らかになった [25, 34, 総説3, 総説40] (図2)。プルキンエ細胞には、さらにコレステロールをチトクローム P450scc の存在するミトコンドリア内膜に輸送する StAR タンパク質 (ステロイド合成急性調節タンパク質) が発現している [41] (図2)。

最近、プルキンエ細胞の他にニューロステロイドを合成するニューロンとして海馬の錐体細胞が同定された [42]。このニューロンにもチトクローム P450scc, チトクローム P450<sub>17α,17β</sub>-ラーゼ, StAR タンパク質などが発現しており、さまざまなニューロステロイドが合成される [42]。脳他には、脊髄の背根神経節感覚ニューロンや運動ニューロンなどがニューロステロイドを合成する [10, 43]。

## ニューロステロイドのノンゲノミック作用とゲノミック作用

プルキンエ細胞ではさまざまなニューロステロイドが時期特異的に合成されており、ニューロステロイドの作用を解析する優れた細胞モデルとなった。小脳皮質が形成される新生期のプルキンエ細胞ではプロゲステロンとエストラジオールの合成が高まる。これらのニューロステロイドは、プルキンエ細胞の核内に局在する受容体を介したゲノミック作用により、プルキンエ細胞の樹状突起の伸長、樹状突起上の棘シナプスの形成を誘導することが明らかになった。一方、新生期以降プルキンエ細胞が合成するプレグネノロン硫酸エステルには神経回路のシナプス情報伝達を急性的に調節するノンゲノミック作用があることが分かった。プルキンエ細胞を実験系にしたわれわれの一連の研究により、ニューロステロイド作用の理解が進展した。

### 1) シナプス情報伝達を調節するノンゲノミック作用

従来、生体内のステロイドは標的細胞内(多くは核内)に存在する受容体を介したゲノミック作用により脳機能を調節すると考えられていたが、ある種のニューロステロイドは急性的なノンゲノミック作用によりシナプスの情報伝達を調節することが分かった。われわれはプルキンエ細胞が合成するニューロステロイドであるプレグネノロンとプレグネノロン硫酸エステルの作用をラットの小脳スライスをを用い電気生理学的に解析した [13, 総説40] (図3)。パッチクランプ法によりプルキンエ細胞からシナプス電流の発生頻度を調べたところ、プレグネノロン硫酸エステルには抑制性のシナプス電流の発生頻度を増加させる作用があることが分かった。この効果は急性的であり、プレグネノロン硫酸エステルの灌流を開始してわずか数分後から検出された。一方、プレグネノロンにはプレグネノロン硫酸エステルのような急性効果は確認されなかった。詳しい解析の結果、シナプス電流の発生頻度を急性的に増加させるプレグネノロン硫酸エステルの作用機序は次のように要約された [13, 34, 総説40] (図3)。

- ①プルキンエ細胞で合成されたプレグネノロンはステロイド硫酸基転移酵素 (HST) によりプレグネノロン硫酸エステルとなる。
- ②プレグネノロン硫酸エステルはプルキンエ細胞から傍分泌されてプルキンエ細胞に投射する GABA ニューロンに作用する。
- ③GABA ニューロンの活動が高まり、シナプスにおける GABA の放出頻度が増加する。
- ④その結果、プルキンエ細胞の活動が変化する。このように、プレグネノロン

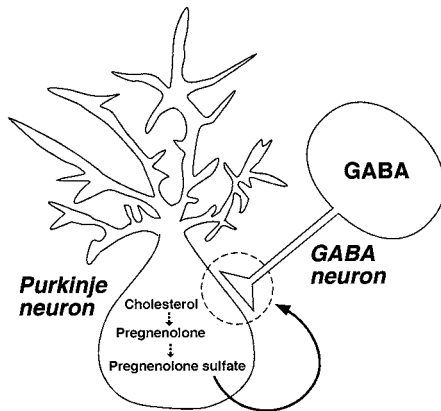


図3 プルキンエ細胞が合成するプレグネノロン硫酸エステルによるシナプス情報伝達の調節  
 ラットのプルキンエ細胞では生後から成熟期にかけて恒常的にプレグネノロンが合成される。プルキンエ細胞で合成されたプレグネノロンは、i) 硫酸エステルとなり、ii) 傍分泌されてプルキンエ細胞に投射する GABA ニューロンに作用する。iii) GABA ニューロンの活動が高まり、シナプスにおける GABA の放出頻度が増加する。iv) その結果、プルキンエ細胞の活動が変化する。

硫酸エステルにはシナプス情報伝達を調節する情報伝達調節因子としての作用があり、細胞膜にある受容体を介したノンゲノミック作用である、と結論された。

一方、ニューロステロイドは GABA 介在塩素イオンチャネルのアロステリック部位に結合し、GABA 受容体の機能を調節していることが報告されている [51, 52]。ノックアウトマウスを用いた最近の解析により、ニューロステロイドが GABA<sub>A</sub> 受容体の  $\delta$  サブユニットに特異的に作用することが報告されている [53]。プレグネノロンとプレグネノロン硫酸エステルはそれぞれ GABA 受容体のアゴニストとアンタゴニストとして働くことも報告されている [54, 55]。プロゲステロンとその代謝ステロイドであるアロプレグナノロン (3 $\alpha$ ,5 $\alpha$ -テトラヒドロプロゲステロン) にも急性作用があり、GABA 受容体とグリシン受容体に作用してシナプス情報伝達を変化させる [51, 52, 56-60]。さらにプロゲステロンは本能行動である生殖行動の発現を調節することが報告されている [総説44, 61]。さらに、プレグネノロン硫酸エステルは NMDA 受容体 (グルタミン酸受容体の一種) に急性的に作用して Ca<sup>2+</sup> の流入を変化させることにより、学習・記憶、認知に関わっている可能性がある [45-48]。哺乳類の海馬や扁桃体にプレグネノロン硫酸エステルを注入すると、電気ショック逃避の学習記憶能が向上するといった報告がある [49]。老化して空間学習能が低下したマウスでは海馬のプレグネノロン硫酸エステルが低いこと、プレグネノロン硫酸エステルを注入すると学習能が良くなることも報告されている [50]。

## 2) ニューロンの発達とシナプス形成を誘導するゲノミック作用

小脳の皮質は生後まもない新生期に形成される。この時期の小脳ではニューロンの発達やシナプス形成が活発になされ、小脳の機能を担うハードウェアである神経回路が構築される。われわれは、新生期のプルキンエ細胞が活発に合成するニューロステロイドであるプロゲステロンの作用を、ニューロンの発達とシナプス形成に着目して超微形態学的に解析した。出生直後のラットを用いた in vitro と in vivo 解析から、プロゲステロンにはプルキンエ細胞の樹状突起の伸長を導く作用があることが明らかになった [62, 63] (図4)。次に、樹状突起の形態を詳しく解析したところ、プロゲステロンは樹状突起の棘形成と棘シナプス形成を誘導することも見い出された [62, 63] (図4)。しかし、プロゲステロンの代謝ステロイドであるアロプレグナノロン (3 $\alpha$ ,5 $\alpha$ -テトラヒドロプロゲステロン) にはプルキンエ細胞の樹状突起の伸長、樹状突起の棘形成、棘シナプスの形成を誘導する作用はなかった [62, 63]。

われわれはプルキンエ細胞の樹状突起の伸長、樹状突起上の棘と棘シナプスの形成を誘導するプロゲステロンの作用機構を明らかにするために、プロゲステロン受容体の同定を行った。その結果、プルキンエ細胞の核内にはプロゲステロン受容体 (PR-A と PR-B) が局在しており [64]、プロゲステロンはこれらの PR を介したゲノミック作用により、樹状突起の伸長、樹状突起の棘と棘シナプスの形成を導くことが明らかになった [62-64]

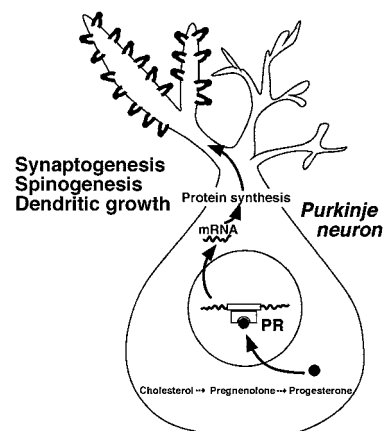


図4 プルキンエ細胞が合成するプロゲステロンによる樹状突起伸長とシナプス形成の誘導

新生期のラットのプルキンエ細胞ではプロゲステロンが活発に合成される。プルキンエ細胞の核内にはプロゲステロン受容体 (PR-A と PR-B) が局在しており、プロゲステロンはプロゲステロン受容体を介したゲノミック作用により、樹状突起の伸長、樹状突起上の棘と棘シナプスの形成を誘導する。

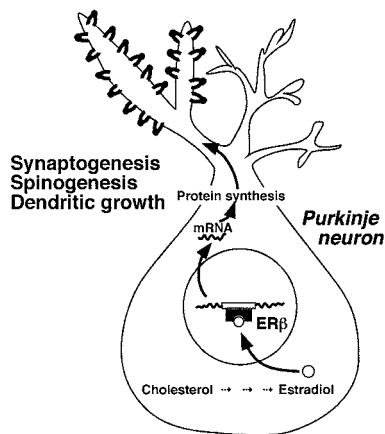


図5 プルキンエ細胞が合成するエストラジオールによる樹状突起伸長の誘導

ラットのプルキンエ細胞にはチトクローム P450arom も共存している。新生期にはチトクローム P450arom の発現が高まり、エストラジオールも活発に合成される。プルキンエ細胞の核内にはエストロゲン受容体 (ERβ) が局在しており、エストラジオールはエストロゲン受容体を介したゲノミック作用により、樹状突起の伸長を誘導する。

(図4)．ニューロンの発達やシナプス形成を導くプロゲステロンのゲノミック作用により新生期には小脳神経回路の構築がなされると考えられる [62-65, 総説40]．一方、末梢神経系ではプロゲステロンによるミエリン形成の促進作用が報告されている [66]．また、アロプレゲナノロン (3α,5α-テトラヒドロプロゲステロン) がニューロンの発達を導くことが報告されている [67]．

さらに、われわれはプルキンエ細胞にはチトクローム P450arom が共存していることを明らかにした [68]．新生期のプルキンエ細胞ではチトクローム P450arom の発現が高まり、エストラジオールも活発に合成されることを見出した [68]．詳しい解析から、エストラジオールにもプルキンエ細胞の樹状突起の伸長を誘導する作用があることが明らかになった [68] (図5)．プルキンエ細胞の核内にはエストロゲン受容体 (ERβ) が局在しており、エストラジオールは ERβ を介したゲノミック作用により樹状突起の伸長を誘導することが分かった (図5)．

以上のプロゲステロンとエストラジオールのゲノミック作用により、新生期には小脳の機能を担うハードウェアである神経回路が構築されると考えられる [総説69]．プロゲステロンとエストラジオールは卵巣が合成する性ステロイドとして知られているが、新生期の卵巣ではプロゲステロンとエストラジオールの合成は低く、プルキンエ細胞が独自に合成するプロゲステロンとエストラジオールがニューロンの発達とシナプス形成を誘導するという重要な発見がなされた。

## まとめ

脳はコレステロールをもとにさまざまなニューロステロイドを合成する。小脳皮質ニューロンであるプルキンエ細胞は脳の代表的ニューロステロイド合成細胞であり、この細胞を実験系としたわれわれの研究により、脳におけるニューロステロイドの合成と作用の理解が得られた。ニューロステロイドにはニューロン樹状突起の伸長、シナプス形成、神経回路構築などを促進するゲノミック作用と構築された神経回路のシナプスにおける情報伝達を調節するノンゲノミック作用があることが見い出された。

## 謝辞

本研究は文部省科学研究費補助金 (特定領域研究 A 11170237; 特定領域研究 C 13210101; 基盤研究 A 11354010; 15207007; 基盤研究 B 12440233; 萌芽的研究10874129; 基盤研究企画調査 12894021) および科学技術振興事業団・CREST 等の援助と広島大学総合脳科学研究プロジェクト, 日英国際共同研究, ヒューマンフロンティアサイエンス国際共同研究により得られたものであり, 臼井真理子, 本田陽子, 稲井雄人, 松永昌宏, 古川康雄, 河内千恵, 高瀬 稔, 山崎 岳, 小南思郎, 大石 正, Robert W. Lea, J. A. Clark, G. C. Georgiou 諸氏との共同で行われた。

## 文献

1. Baulieu EE (1997) Neurosteroids: of the nervous system, by the nervous system, for the nervous system (review). *Rec Progr Hormone Res* 52, 1-32.
2. Tsutsui K, Ukena K, Takase M, Kohchi C, Lea RW (1999) Neurosteroid biosynthesis in vertebrate brains (review). *Comp Biochem Physiol C* 124, 121-129.
3. Tsutsui K, Ukena K, Usui M, Sakamoto H, Takase M (2000) Novel brain function: biosynthesis and actions of neurosteroids in neurons (review). *Neurosci Res* 36, 261-273.
4. Corpéchet C, Robel P, Axelson M, Sjövall J, Baulieu EE (1981) Characterization and measurement of dehydroepiandrosterone sulfate in rat brain. *Proc Natl Acad Sci USA* 78, 4704-4707.
5. Corpéchet C, Synguelakis M, Talha S, Axelson M, Sjövall J, Vihko R, Baulieu EE, Robel P (1983) Pregnenolone and its sulfate ester in rat brain. *Brain Res* 270, 119-125.
6. Robel P, Baulieu EE (1985) Neuro-steroids, 3β-hydroxy-Δ<sup>5</sup>-derivatives in the rodent brain. *Neurochem Int* 7, 953-958.
7. Robel P, Bourreau E, Corpéchet C, Dang DC, Halberg F, Clarke C, Haug M, Schlegel ML, Synguelakis M, Vourc'h C, Baulieu EE (1987) Neuro-steroids: 3β-hydroxy-Δ<sup>5</sup>-derivatives in rat and monkey brain. *J Steroid Biochem* 27, 649-655.
8. Jo DH, Abdallah MA, Young J, Baulieu EE, Robel P (1989)

- Pregnenolone, dehydroepiandrosterone, and their sulfate and fatty acid esters in the rat brain. *Steroids* 54, 287-297.
9. Jung-Testas I, Hu ZY, Baulieu EE, Robel P (1989) Neurosteroids: biosynthesis of pregnenolone and progesterone in primary cultures of rat glial cells. *Endocrinology* 125, 2083-2091.
  10. Compagnone NA, Bulfone A, Rubenstein JLR, Mellon SH (1995) Expression of the steroidogenic enzyme P450scc in the central and peripheral nervous systems during rodent embryogenesis. *Endocrinology* 136, 2689-2696.
  11. Tsutsui K, Yamazaki T (1995) Avian neurosteroids. I. Pregnenolone biosynthesis in the quail brain. *Brain Res* 678, 1-9.
  12. Usui M, Yamazaki T, Tsutsui K (1995) Avian neurosteroids. II. Localization of a cytochrome P450scc-like substance in the quail brain. *Brain Res* 678, 10-20.
  13. Tsutsui K, Yamazaki T, Usui M, Furukawa Y, Ukena K, Kohchi C, Kominami S (1997) P450scc activity in the brain. In: Harvey S, Etches RJ (eds) *Perspectives in Avian Endocrinology*. Journal of Endocrinol Ltd, pp 427-436.
  14. Tsutsui K, Usui M, Yamazaki T, Ukena K, Kominami S (1997) Neurosteroids in the avian brain. In: Maitra SK, ed. *Frontiers in Environmental and Metabolic Endocrinology*. Burdwan press, pp 151-159.
  15. Takase M, Ukena K, Yamazaki T, Kominami S, Tsutsui K (1999) Pregnenolone, pregnenolone sulfate and cytochrome P450 side-chain cleavage enzyme in the amphibian brain and their seasonal changes. *Endocrinology* 140, 1936-1944.
  16. Vanson A, Arnold AP, Schlinger BA (1996) 3 $\beta$ -Hydroxysteroid dehydrogenase/isomerase and aromatase activity in primary cultures of developing zebra finch telencephalon: dehydroepiandrosterone as substrate for synthesis of androstenedione and estrogens. *Gen Comp Endocrinol* 102, 342-350.
  17. Ukena K, Honda Y, Inai Y, Kohchi C, Lea RW, Tsutsui K (1999) Expression and activity of 3 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase/ $\Delta^5$ - $\Delta^4$ -isomerase in different regions of the avian brain. *Brain Res* 818, 536-542.
  18. Ukena K, Honda Y, Tsutsui K (2001) Developmental changes in progesterone biosynthesis and metabolism in the quail brain. *Brain Res* 898, 190-194.
  19. Akwa Y, Sananes N, Gouézou M, Robel P, Baulieu EE, Le Goascogne C (1993) Astrocytes and neurosteroids: metabolism of pregnenolone and dehydroepiandrosterone. Regulation by cell density. *J Cell Biol* 121, 135-143.
  20. Kabbadj K, El-Etr M, Baulieu EE, Robel P (1993) Pregnenolone metabolism in rodent embryonic neurons and astrocytes. *Glia* 7, 170-175.
  21. Dupont E, Simard J, Luu-The V, Labrie F, Pelletier G (1994) Localization of 3 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase in rat brain as studied by in situ hybridization. *Mol Cell Neurosci* 5, 119-123.
  22. Guennoun R, Fiddes RJ, Gouézou M, Lombès M, Baulieu EE (1995) A key enzyme in the biosynthesis of neurosteroids, 3 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase/ $\Delta^5$ - $\Delta^4$ -isomerase (3 $\beta$ -HSD), is expressed in rat brain. *Mol Brain Res* 30, 287-300.
  23. Sanne JL, Krueger KE (1995) Expression of cytochrome P450 side-chain cleavage enzyme and 3 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase in the rat central nervous system: a study by polymerase chain reaction and in situ hybridization. *J Neurochem* 65, 528-536.
  24. Kohchi C, Ukena K, Tsutsui K (1998) Age- and region-specific expressions of the messenger RNAs encoding for steroidogenic enzymes P450scc, P450c17 and 3 $\beta$ -HSD in the postnatal rat brain. *Brain Res* 801, 233-238.
  25. Ukena K, Kohchi C, Tsutsui K (1999) Expression and activity of 3 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase/ $\Delta^5$ - $\Delta^4$ -isomerase in the rat Purkinje neuron during neonatal life. *Endocrinology* 140, 805-813.
  26. Mensah-Nyagan AG, Feuilloley M, Dupont E, Do-Rego JL, Leboulenger F, Pelletier G, Vaudry H (1994) Immunocytochemical localization and biological activity of 3 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase in the central nervous system of the frog. *J Neurosci* 14, 7306-7318.
  27. Sakamoto H, Ukena K, Tsutsui K (2001) 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.
  28. Matsunaga M, Ukena K, Tsutsui K (2001) Expression and localization of cytochrome P45017 $\alpha$ -hydroxylase/c17, 20-lyase in the avian brain. *Brain Res* 899, 112-122.
  29. Compagnone NA, Bulfone A, Rubenstein JLR, Mellon (1995) Steroidogenic enzyme P450c17 is expressed in the embryonic central nervous system. *Endocrinology* 136, 5212-5223.
  30. Zwain IH, Yen SSC (1999) Dehydroepiandrosterone: biosynthesis and metabolism in the brain. *Endocrinology* 140, 880-887.
  31. Tsutsui K, Schlinger BA (2001) Steroidogenesis in the avian brain. In: Dawson A, Chaturvedi CM (eds) *Avian Endocrinology*. Narosa Publishing House, pp 59-77.
  32. Matsunaga M, Ukena K, Tsutsui K (2002) Androgen biosynthesis in the quail brain. *Brain Res* 948, 180-185.
  33. Tsutsui K, Matsunaga M, Ukena K (2003) Biosynthesis and biological actions of neurosteroids in the avian brain (review). *Avian Poultry Biol. Rev* 14, 63-78.
  34. Ukena K, Usui M, Tsutsui K (1998) Cytochrome P450 side-chain cleavage enzyme in the cerebellar Purkinje neuron and its neonatal change in rats. *Endocrinology* 139, 137-147.
  35. Le Goascogne C, Robel P, Gouézou M, Sananes N, Baulieu EE, Waterman M (1987) Neurosteroids: cytochrome P-450scc in rat brain. *Science* 237, 1212-1215.
  36. Hu ZY, Bourreau E, Jung-Testas I, Robel P, Baulieu EE (1987) Neurosteroids: oligodendrocyte mitochondria convert cholesterol to pregnenolone. *Proc Natl Acad Sci USA* 84, 8215-8219.
  37. Baulieu EE (1991) Neurosteroids: a new function in the brain. *Biol Cell* 71, 3-10.
  38. Akwa Y, Young J, Kabbadj K, Sancho MJ, Zucman D, Vourc'h C, Jung-Testas I, Hu ZY, Le Goascogne C, Jo DH, Corpechot C, Simon P, Baulieu EE, Robel P (1991) Neurosteroids: Biosynthesis, metabolism and function of pregnenolone and dehydroepiandrosterone in the brain. *J Steroid Biochem Mol Biol* 40, 71-81.
  39. Papadopoulos V, Guarneri P, Krueger KE, Guidotti A, Costa E (1992) Pregnenolone biosynthesis in C6-2B glioma cell mitochondria: Regulation by a mitochondrial diazepam binding inhibitor receptor. *Proc Natl Acad Sci USA* 89, 5113-5117.
  40. Tsutsui K, Ukena K (1999) Neurosteroids in the cerebellar Purkinje neuron and their actions (review). *Int J Mol Med* 4, 49-56.
  41. Furukawa A, Miyatake A, Ohnishi T, Ichikawa Y (1998) Ster-

- oidogenic acute regulatory protein (StAR) transcripts constitutively expressed in the adult rat central nervous system: Colocalization of StAR, cytochrome P-450<sub>scc</sub> (CYP XIA1), and 3 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase in the rat brain. *J Neurochem* 71, 2231-2238.
42. Kimoto T, Tsurugizawa T, Ohta Y, Kawato S (2001) 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.
  43. Guarneri P, Guarneri R, Cascia C, Pavasant P, Piccoli F, Papadopoulos V (1994) Neurosteroidogenesis in rat retinas. *J Neurochem* 63, 86-96.
  44. Lea RW, Tsutsui K (2001) Changes in central steroid receptor expression, steroid synthesis and dopaminergic activity related to the reproductive cycle of the ring dove (review). *Microsc Res Tech (MRT)* 55, 12-26.
  45. Wu F-S, Gibbs TT, Farb DH (1991) Pregnenolone sulfate: a positive allosteric modulator at the *N*-methyl-D-aspartate receptor. *Mol Pharmacol* 40, 333-336.
  46. Bowlby MR (1993) Pregnenolone sulfate potentiation of *N*-methyl-D-aspartate receptor channels in hippocampal neurons. *Mol Pharmacol* 43, 813-819.
  47. Irwin RP, Maragakis NJ, Rogawski MA, Purdy RH, Farb DH, Paul SM (1992) Pregnenolone sulfate augments NMDA receptor mediated increases in intracellular Ca<sup>2+</sup> in cultured rat hippocampal neurons. *Neurosci Lett* 141, 30-34.
  48. Fahey JM, Lindquist DG, Pritchard GA, Miller LG (1995) Pregnenolone sulfate potentiation of NMDA-mediated increases in intracellular calcium in cultured chick cortical neurons. *Brain Res* 669, 183-188.
  49. Flood JF, Morley JE, Roberts E (1992) Memory enhancing effects in male mice of pregnenolone and steroids metabolically derived from it. *Proc Natl Acad Sci USA* 89, 1567-1571.
  50. Vallée M, Mayo W, Darnaudéry M, Corpechot C, Young J, Koehl M, Moal ML, Baulieu EE, Robel P, Simon H (1997) Neurosteroids: deficient cognitive performance in aged rats depends on low pregnenolone sulfate levels in the hippocampus. *Proc Natl Acad Sci USA* 94, 14865-14870.
  51. Majewska MD, Harrison NL, Schwartz RD, Barker JL, Paul SM (1986) Steroid hormone metabolites are barbiturate-like modulators of the GABA receptor. *Science* 232, 1004-1007.
  52. Majewska MD (1992) Neurosteroids: endogenous bimodal modulators of the GABA<sub>A</sub> receptor: mechanism of action and physiological significance. *Prog Neurobiol* 38, 379-395.
  53. Mihalek RM, Banerjee PK, Korpi ER (1999) Attenuated sensitivity to neuroactive steroids in  $\gamma$ -aminobutyrate type A receptor delta subunit knockout mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 96, 12905-12910.
  54. Majewska MD, Mienville JM, Vicini S (1988) Neurosteroid pregnenolone sulfate antagonizes electrophysiological responses to GABA in neurons. *Neurosci Lett* 90, 279-284.
  55. Mienville JM, Vicini S (1989) Pregnenolone sulfate antagonizes GABA<sub>A</sub> receptor-mediated currents via a reduction of channel opening frequency. *Brain Res* 489, 190-194.
  56. Lan NC, Chen JS, Belelli D, Pritchett DB, Seeburg PH, Gee KW (1990) A steroid recognition site is functionally coupled to an expressed GABA<sub>A</sub>-benzodiazepine receptor. *Eur J Pharmacol* 188, 403-406.
  57. Morrow AL, Pace JR, Purdy RH, Paul SM (1990) Characterization of steroid interactions with  $\gamma$ -aminobutyric acid receptor-gated chloride ion channels: evidence for multiple steroid recognition sites. *Mol Pharmacol* 37, 263-270.
  58. Puia G, Santi MR, Vicini S, Pritchett DB, Purdy RH, Paul SM, Seeburg PH, Costa E (1990) Neurosteroids act on recombinant human GABA<sub>A</sub> receptors. *Neuron* 4, 759-765.
  59. Valera S, Ballivet M, Bertrand D (1992) Progesterone modulates a neuronal nicotinic acetylcholine receptor. *Proc Natl Acad Sci USA* 89, 9949-9953.
  60. Rupprecht R, Reul JM, Trapp T, van Steensel B, Wetzel C, Damm K, Holsboer F (1993) Progesterone receptor-mediated effects of neuroactive steroids. *Neuron* 11, 523-530.
  61. Frye CA, Vongher JM (1999) Progesterone has rapid and membrane effects in the facilitation of female mouse sexual behavior. *Brain Res* 815, 259-269.
  62. Sakamoto H, Ukena K, Tsutsui K (2001) Effects of progesterone synthesized *de novo* in the developing Purkinje cell on its dendritic growth and synaptogenesis. *J Neurosci* 21, 6221-6232.
  63. Sakamoto H, Ukena K, Tsutsui K (2002) Dendritic spine formation in response to progesterone synthesized *de novo* in the developing Purkinje cell in rats. *Neurosci Lett* 322, 111-115.
  64. Sakamoto H, Shikimi H, Ukena K, Tsutsui K (2003) Neonatal expression of progesterone receptor isoforms in the cerebellar Purkinje cell in rats. *Neurosci. Lett.* 343, 163-166.
  65. Tsutsui K, Ukena K, Sakamoto H (2001) Novel cerebellar function: Neurosteroids in the Purkinje neurons and their genomic and nongenomic actions. In: Handa R J, Hayashi S (eds) *Neuroplasticity, Development, and Steroid Hormone Action*. CRC Press, pp 101-116.
  66. Koenig HL, Schumacher M, Ferzaz B, Do Thi AN, Ressouches A, Guennoun R, Jung-Testas I, Robel P, Akwa Y, Baulieu EE (1995) Progesterone synthesis and myelin formation by Schwann cells. *Science* 268, 1500-1503.
  67. Brinton RD (1994) The neurosteroid 3 $\alpha$ -hydroxy-5 $\alpha$ -pregnan-20-one induces cytoarchitectural regression in cultured fetal hippocampal neurons. *J Neurosci* 14, 2763-2774.
  68. Sakamoto H, Shikimi H, Ukena K, Tsutsui K (2003) Dendritic growth and spine formation in response to estrogen in the developing Purkinje cell. *Endocrinology* 144, 4466-4477.
  69. Tsutsui K, Sakamoto H, Ukena K (2003) A novel aspect of the cerebellum: biosynthesis of neurosteroids in the Purkinje cell (review). *Cerebellum* 2, 215-222.