

プロシーディング (第11回徳島医学会賞受賞論文)

嗅球におけるステロイド合成酵素の局在

清 蔭 恵 美, 樋 田 一 徳, 山 本 登 志 子, 石 村 和 敬

徳島大学医学部情報統合医学講座形態情報医学分野

(平成15年8月18日受付)

(平成15年8月20日受理)

ステロイドホルモンは副腎, 性腺などで産生・分泌される化学物質で, その多様な生理活性作用により生体の恒常性維持に寄与している。一方, これら末梢器官とは独立して中枢神経系で *de novo* 合成されるステロイド物質が存在し, 神経ステロイドと呼ばれて注目されている。しかしながらその存在意義は十分明らかになっていない。このため本研究では, 免疫組織化学法および生化学的手法を用いて, 中枢神経系の中でも特に構造と機能の対応が比較的容易な, ラット及びマウス嗅球におけるステロイド合成酵素の発現と局在について解析を行なった。

方 法

解析には, 生後3週から6週のウイスター系の雄及び雌ラットと, 生後3週から13週のC57BL/6系の雄及び雌マウスを用いた。一部は, 精巣, 卵巣, 下垂体を摘出した同系動物も解析した。

ステロイド合成酵素のうち, cholesterol side chain cleavage enzyme (P450_{sc}: cholesterol pregnenolone), 3 β -hydroxysteroid dehydrogenase/ Δ^5 isomerase (3 β -HSD: pregnenolone progesterone), 17 α -hydroxylase/C₁₇ C₂₀ lyase (P450_{c17}: progesterone androstenedione), 17 β -hydroxysteroid dehydrogenase (17 β -HSD: androstenedione testosterone), 5 α -reductase (5 α R: testosterone 5 α -dihydrotestosterone) 及び aromatase (testosterone estradiol) の嗅球における発現を RT-PCR 法と Western blot 法で解析した。P450_{c17}と17 β -HSDについては, 薄層クロマトグラフィー法で酵素活性の検出を試みた。また, これら諸酵素に対する特異的抗体を用い, 各酵素の嗅球における局在を免疫組織化学的に解析した。

更に, 皮下埋込みペレットを用いて, 17 β -estradiol 投与によるこれら酵素の発現に対する影響を, RT-PCR 法

と Western blot 法で解析・検討した。

結 果

RT-PCR 法と Western blot 法による解析の結果, cholesterol から estradiol および5 α -dihydrotestosterone (DHT) までの全てのステロイド合成系酵素の発現が, 嗅球において認められた。嗅球における酵素の発現は, 末梢の産生器官である精巣・卵巣・肝臓に比べ少ないものの, 雌雄ともに認められ, また性腺・下垂体を摘出した動物においても確認され, 末梢産生器官とは独立した神経ステロイドの嗅球における産生機構が示された。

これらステロイド合成酵素のうち, 17 β -HSD (testosterone 合成酵素) と P450_{c17} (性ステロイド合成 Key enzyme) については, ラット及びマウス嗅球において酵素活性も検出され, 嗅球における少なくとも progesterone から testosterone までの生合成能の存在が確認された。

次に, 各ステロイド合成酵素の特異的抗体を用いて, 免疫組織化学法によりこれらの酵素の局在を検討した。この結果, 5 α R を除く全ての酵素はニューロンに局在し, 少なくとも投射ニューロン (Mitral/Tufted cells) には全ての酵素が共存した。これに対して5 α Rは主にグリア (Ensheathing cells, Astrocytes, Oligodendrocytes) に存在し, 層による多様な局在性を示した。

更に, 皮下埋込みペレットによる17 β -estradiol 持続投与の結果, 多くのステロイド合成酵素の発現は抑制されるものの, グリアに存在する5 α Rの発現は変化しないことが認められた。このことから, 嗅球に存在するステロイド合成酵素の発現は, 17 β -estradiol 投与により多様な影響を受けることが明らかとなった。

結 語

本研究により、嗅球における神経ステロイド合成能の存在が初めて明らかとなった。嗅覚は生殖と関係が深く、フェロモンを介した生殖生理機能はよく知られているが、本研究により、嗅覚機能に対するステロイドの関与が初めて具体的に示唆された。最近、海馬や小脳での神経ス

テロイドの存在が報告されているが、構造がより単純で、入力と出力が限定され、化学的感覚情報を処理する嗅球の、特定のニューロン（嗅覚情報を高次脳中枢へ伝える投射ニューロン）にステロイド合成酵素が局在することは、神経ステロイドの機能解明の上で意義深く、今後様々な解析の可能性が考えられる。

Localization of steroid-synthesizing enzymes in the olfactory bulb

Emi Kiyokage, Kazunori Toida, Toshiko Suzuki-Yamamoto, and Kazunori Ishimura

Department of Anatomy and Cell Biology, The University of Tokushima School of Medicine, Tokushima, Japan

SUMMARY

Neurosteroids are synthesized through mechanism at least partly independent of the peripheral steroidogenic glands, and their neurobiological actions seem to depend on the specific functions of various brain regions. However, little is known about neurosteroids function corresponding to specific structure and functions of the brain regions. Thus the present study analyzed localization of steroid-synthesizing enzymes in the rat and mouse olfactory bulb.

RT-PCR and Western-blotting indicated the possible presence of almost all enzymes of steroid synthesis from cholesterol to estradiol, that is, cholesterol side chain cleavage enzyme (P450_{scc}: cholesterol pregnenolone), 3 β -hydroxysteroid dehydrogenase/ Δ^5 - Δ^4 isomerase (3 β -HSD: pregnenolone progesterone), 17 α -hydroxylase/C₁₇-C₂₀ lyase (P450_{c17}: progesterone androstenedione), 17 β -hydroxysteroid dehydrogenase (17 β -HSD: androstenedione testosterone), 5 α -reductase (5 α R: testosterone 5 α -dihydrotestosterone), and aromatase (testosterone estradiol). Immunohistochemistry confirmed that the 5 α -reductase was mainly in glial cells with various immunoreactivity and co-localization pattern, but other enzymes were in bulbar neurons, and at least co-localized in mitral/tufted cells. In addition, so far analyzed, enzymatic activities of P450_{c17} (a key enzyme in sex steroid synthesis) and 17 β -HSD were detected biochemically. These enzyme expression and activities were influenced under exposure of 17 β -estradiol with various degrees.

These findings indicated the presence of steroid-synthesizing activities, and thus of possible neurosteroid metabolism in the olfactory bulb.

Key words : neurosteroid, olfactory bulb, enzyme, steroid, immunohistochemistry, localization

備考：受賞対象となった研究内容は現在、他誌に投稿準備中のため、本誌編集委員会は徳島医学会賞贈と規程第2条「本賞は本会において優れた研究を発表し、かつ受賞後速やかに四国医学雑誌にその研究成果を原著、総説、プロシーディング等論文として発表する本会会員に授与する」にのっとりプロシーディングとして受理しました。