神経化学

Bulletin of the Japanese Neurochemical Society

第24回　日本神経化学会抄録集

Vol. 20, 1981

日本神経化学会

神経化学

第24回日本神経化学会抄録集

PROCEEDINGS OF THE 24th ANNUAL MEETING OF

THE JAPANESE NEUROCHEMICAL SOCIETY

於　長　崎

11月27日(金), 11月28日(土)

Vol. 20 1981

日 本 神 経 化 学 会

目　　次

1. 多発性硬化症患者の脳白質のホモジネートおよび精製ミエリン中のミエリン糖蛋白ならびに他のミエリン蛋白の定量的研究 …… 24

佐藤修三[*] R.H.Quarles

D.Johnson ・R.O.Brady

(NINCDS, NIH, [*]現・新大・脳研・神経内科)

2. 各種神経・精神疾患患者における髄液中GABA濃度 …… 28

黒田広生

(岡大・医・Ⅲ内)

小川紀雄

(同・脳研)

山脇泰秀・貫名至

大藤真

(同・Ⅲ内)

山本光利・大月三郎

(同・神経精神)

3. ヒト尿中アセチルアスパラギン酸と精神・神経疾患 …… 32

森野日出緒・三宅正治

柿本泰男

(愛媛大・医・神経精神)

4. 初老期・老年期痴呆における脳蛋白の変化(V)

— 神経原線維変化の構成蛋白について — …… 36

多田国利・播口之朗

武田雅俊・尾崎哲

窪田耕輔・西村健

(阪大・医・精神)

5. 陳旧性パーキンソン病におけるNE補充療法としてのL-Threo-3,
4-Dihydroxyphenylserine（L-Threo-DOPS）治療 …… 40
檜林博太郎・近藤智善
（順天堂大・医・脳神経内科）
林昭・鈴木友和
（阪大・医・Ⅲ内）

6. オリーブ・橋・小脳萎縮症の小脳における神経伝達物質の変化 …… 44
村本治・金沢一郎
（筑波大・臨床医系・神経内科）

7. 重水素標識アミノ酸を用いたin vivoの代謝変化の研究 …… 48
鈴木恵美子・林時司
成瀬浩
（国立神経センター）
高橋良
（長崎大・医・精神）

8. うつ病における5 HTP responderの研究
— うつ病患者に対するL-5HTP ester点滴静注時の精神症状と
血中パラメーター — …… 52
大島直和・金子元久
沼田吉彦・星野仁彦
山本俊昭・渡辺厚
渡辺実・熊代永
（福島県立医大・神経精神）

9. 脊髄小脳変性症におけるβ受容体感受性に関する研究 …… 56
小山司・岡五百理
加沢鉄士・松原繁広
三国雅彦・山下格
（北大・医・精神）

10. Rolling Mouse Nagoya の中枢神経系における GABA およびグルタミン酸受容体ならびにリン脂質について …… 60

山口知子・林　恵齢
（東京女子医大・生化）
村上博彦・丸山勝一
（同・脳神経センター・神経内科）

11. 正常ならびにうつ病モデルラットの脳セロトニンレセプター結合能に対する抗うつ剤の作用．Ⅱ …… 64

広中郁朗・立石紀昭
吉田秀夫・高橋　良
（長崎大・医・精神）

12. Methamphetamine 慢性投与による〔^{3}H〕-spiperone 高親和性結合部位の変化…… 68

秋山一文・佐藤光源
大月三郎
（岡山・医・神経精神）

13. β－フェニルエチルアミンのラット脳内ドーパミン代謝と常同行動におよぼす影響
— メトアンフェタミン投与ラットと比較して — …… 72

中河原通夫・渡辺明子
石井一平・本橋伸高
斉藤彰一・仮屋哲彦
（東医歯大・神経精神）

14. 逆耐性現象形成ラットの常同行動発現時の線条体・中脳辺縁領域における dopamine 代謝 …… 76

西川　徹・侯賀宣子
高嶋瑞夫・融　道男
（国立神経センター・疾病Ⅲ）

15. 『微細脳障害症候群モデル』ラットにおける脳dopamine受容体 …… 80
渡部修三
（国立神経センター・疾病Ⅲ）
P. Seeman
（トロント大学・薬理）

16. ビリルビン性脳症：Gunnラット脳におけるDNA量および化学伝達関連酵素活性 … 84
大野拓夫
（愛媛大・医・生理）

17. Gunnラット小脳におけるタンパク濃度の低下機構について …… 88
仙波りつ子・柏俣重夫
（愛知県コロニー・周生期）

18. 小脳低形成とGunnラット小脳のArylsulfatase, Succinate Dehydrogenase, Lactate Dehydrogenase, Arylesterase, Acetylcholine Esterase活性の加齢変化 …… 92
青木英子・仙波りつ子
柏俣重夫
（愛知県コロニー・周生期）

19. 脳障害ラットにおける脳脊髄液中エノラーゼ量の増加 …… 96
仙波礼治
（愛知県コロニー・周生期）
加藤兼房　（同・生化）

20. 低栄養環境下における実験的小頭症ラットの脳発育 …… 100
中原務・永吉道子
田丸政男・早川洋一
松谷天星丸
（保健衛生大・医・総医研・発達生理）

21. 筋ジストロフィーマウスと除神経筋の筋蛋白代謝 …… 104
溝渕睦彦・三宅正治
柿本泰男
（愛媛大・医・精神）

22. 実験的ヘルペスウィルス（Type 1）感染脳の生化学的研究 …… 108

阿部敏明
（帝京大・医・小児）
藤原仁
（同・病理）
小川希代子
（同・小児）
倉田毅
（東大・医科研・病理）
平岩幹男・野中千鶴
（帝京大・医・小児）
所安夫
（同・病理）
青山友三
（東大・医科研・病理）

23. Pyrithiamine-induced Encephalopathyにおける脳浮腫の生化学的研究…… 112

高橋弘・志村俊郎
中沢省三
（日本医大・脳外）
吉野芳夫
（同・Ⅱ生化）

24. 痙攣と脳内フリーラジカルについて…… 116

平松緑・高知宏喜
（岡大・医・脳研・機能生化）
河野雅弘
（日本電子・応用研）
森昭胤
（岡大・医・脳研・機能生化）

25. E1マウス脳RNAの発育期における変化 …… 120

山上栄・大野京介
辻正記・森浩一
川北幸男
（阪市大・医・神経精神）

26. 扁桃核キンドリングラットにおける痙攣準備性と脳内環状
ヌクレオチドとの関連について …… 124
沼田吉彦・金子元久
中西重雄・大島直和
森則夫・深津敏彦
板垣茂・渡辺厚
田子久夫・熊代永
（福島県医大・神経精神）

27. E1系マウス脳の分離核のRNAポリメラーゼの諸特性とpoly(A) RNA合成 …… 128
大西博・山上栄
森浩一・辻正記
千頭孝史・川北幸男
（阪市大・医・神経精神）

28. 虚血症における phospholipase A_1, A_2, lysophospholipase および
acyl CoA: lysophospholipid acyltransferase の酵素活性 …… 132
平島豊・中田潤一
甲州啓二・遠藤俊郎
高久晃
（富山医薬大・脳外）
本田昻・野田清美
（同・RI実験施設）
高崎親久
（東北大・理・生物有機）

29. G_{M1}ーガングリオシドーシスの大脳，肝臓及び脾臓における
糖脂質及び関連物質の異常 …… 136
原厚・笠間透
武富保
（信大・医・順応研・生化）

30. レックリングハウゼン病における神経線維腫及び神経線維肉腫の
ガングリオシド …… 140

土 田 哲 也・井 上 由紀子
（東大・医・皮膚）
新 村 真 人
（慈恵医大・皮膚）
大 塚 英 昭・橋 本 康 弘
脊 山 洋 右・山 川 民 夫
（東大・医・Ⅰ生化）

31. Rat 脳での脂脂酸代謝の研究Ⅰ …… 144
溝 淵 真 人
（東大・脳研・神経内科）
森 崎 信 尋・松 岡 信 夫
斉 藤 康
（千葉大・医・Ⅱ内）
杉 田 秀 夫
（東大・脳研・神経内科）
熊 谷 朗
（千葉大・医・Ⅱ内）

32. ジャイアント・パンダとヒグマ脳の脂質組成
— キャピラリーカラム— GLCによる真鎖脂肪酸とα—ハイドロキシ
脂肪酸の同時分析の応用 — …… 148
阿 部 久美子・玉 井 洋 一
（北里大・医・生化）

33. ラット脳ミクロソームの電子伝達系と脂肪酸代謝 …… 152
竹 下 正 純・三 木 真由美
田 村 実・指 吸 俊 次
（大分医大・生化）

34. イノシトールリン脂質の代謝回転と環状ヌクレオチド …… 156
貝 淵 弘 三・佐 野 公 彦
松 原 司・于 秉 治
高 井 義 美
（神戸大・医・Ⅱ生化）

35. 金魚視神経損傷後のオルニチン脱炭酸酵素活性上昇について …… 160

高 坂 新 一

（慶大・医・生理）

A.M.Heacock・B.W.Agranoff

(Neurosci. Lab. Univ. of Mich.)

36. 発達期のラット脳における蛋白合成及びmRNAレベルの変化

— 二次元電気泳動法による分析 …… 164

荒 木 一 明・崎 村 建 司

吉 田 豊・高 橋 康 夫

（新大・脳研・神経薬理）

37. 発達期のラット脳におけるS－100蛋白mRNAレベルの変化 …… 168

増 田 達・崎 村 建 司

吉 田 豊・櫛 谷 悦 子

高 橋 康 夫

（新大・脳研・神経薬理）

礒 辺 俊 明・奥 山 典 生

（都立大・理・化学）

38. 培養毛様体神経節ニューロンに働く神経突起伸展因子の精製と性質について…… 172

林 要 喜 知・郭 哲 輝

東 田 陽 博・三 木 直 正

（金大・がん研・薬理）

39. ラット睾丸の発育における自律神経の役割 …… 176

村 野 俊 一・永 井 克 也

中 川 八 郎

（阪大・蛋白研・代謝）

奥 田 拓 道

（愛媛大・医・生化）

絹 谷 政 江

（同・解剖）

熊 谷 朗

（千葉大・医・Ⅱ内）

40. ラットグリオーマ細胞中の細胞増殖促進因子 …… 180

山川洋右

（保健衛生大・医・外）

加藤泰治・田中亮

（名市大・医・生化Ⅰ）

41. ラットグリア芽細胞由来の神経芽腫増殖抑制因子（NGIF）の同定 …… 184

坂崎由紀夫

（名市大・医・外Ⅱ）

加藤泰治

（同・生化）

角岡秀彦・正岡昭

（同・外Ⅱ）

田中亮

（同・生化）

42. ラット脳ミエリンの5′-nucleotidase活性 …… 188

小嶋久子・玉井洋一

（北里大・医・生化）

43. 両生類神経組織における糖脂質とミエリン蛋白の多様性 …… 192

斉藤信太郎

（山梨県立中央病院・精神）

小嶋久子・玉井洋一

（北里大・医・生化）

44. P2蛋白およびその構成ペプチドの脱髄活性について …… 196

植村慶一・北村邦男

堀江賀与子・鈴木勝

（埼玉医大・Ⅰ生理）

45. Myelin proteolipids 由来の5-hydroxytryptamine結合物質の本体について …… 200

宮川明久・石谷良一

（城西大・薬・薬理）

46. 培養小脳組織によるミエリン形成細胞の分裂と分化の神経化学的研究 …… 204
長池一博・塚田裕三
（慶大・医・生理）

47. トリプトファン欠乏餌飼育ラットの脳ミエリンたん白及び学習行動の変動 …… 208
野村正彦・大辻正高
岡村邦博・永田豊
（保健衛生大・医・生理）

48. 網膜2′,3′-cyclic nucleotide 3′-phosphodiesteraseの免疫組織化学 …… 212
西沢芳子・栗原正
高橋康夫
（新大・脳研・神経薬理）

49. Snell下垂体性dwarfマウスのミエリン形成不全について …… 216
野口鉄也・杉崎哲朗
塚田裕三
（慶大・医・生理）

50. S−100タンパクの高感度エンザイムイムノアッセイ（EIA）法
— 人脳脊髄液（CSF）中のS−100タンパクとNeuron-specific enolase（NSE）の測定 — …… 220
加藤兼房
（愛知県コロニー・生化）
中島孝
（国立がんセンター・病理）
松谷天星丸
（保健衛生大・医・総医研・発達生理）

51. Enzyme Immunoassayによる膜結合性S−100蛋白質の測定 …… 224
古田知久・大西林吉
原田泰弘・田渕和雄
西本詮
（岡山大・医・脳外）

52. 神経特異エノラーゼ（NSE）の大量調製と免疫組織化学への応用 ……228
石岡憲昭・礒辺俊明
奥山典生
（都立大・理・化）
中島孝
（国立ガンセンター・Ⅱ病理）

53. クロマトフォーカシングカラムを使った人脳エノラーゼ（αα とγγ）の
精製とそれらの性質 ……232
伊藤温子・鈴木富士子
加藤兼房
（愛知県コロニー・生化）

54. ショウジョウバエ神経系に対するモノクローナル抗体 ……236
藤田忍・A.Ferrus
S.L.Shotwell・S.Benzer
（カルフォルニア工科大・生物）

55. アストログリア・フィラメントの蛋白構成
— グリア繊維酸性蛋白とヴィメンチンの共存 — ……240
横山和仁・森啓
黒川正則
（東大・医・脳研）

56. 小脳プルキンエ細胞膜蛋白（P_{400} 蛋白）の代謝的特徴 ……244
御子柴克彦・塚田裕三
（慶大・医・生理）

57. コルヒチンによる坐骨神経無髄繊維の選択的変性 ……248
小宮義璋
（東大・医・脳研・生化）

58. カルモデュリン及びカルモデュリン類縁蛋白質の軸索内輸送 ……252
田代朋子・黒川正則
（東大・医・脳研）

59. calmodulin 阻害剤固定化Sepharose によるS－100および
calmodulin の精製 …… 256
遠藤登代志・日高弘義
（三重大・医・薬理）

60. グリア性細胞の増殖に及ぼすカルモデュリン阻害剤の影響 …… 260
加藤泰治・奥村久仁子
伊藤仁一・田中亮
（名市大・医・生化Ⅰ）

61. ブタ脳中に存在するdes（Ala-Lys）カルモデュリン …… 264
儀辺俊明・石岡憲昭
奥山典生
（都立大・理・化）

62. 脳シナプス膜のカルモデュリン様タンパク質の活性と構造の検討 …… 268
中村泰治・中条茂男
大松孝樹・相内敏弘
柴山敏子・林久美子
（昭和大・薬・生化）
竹田稔
（同・医・生化）
中谷一泰
（同・薬・生化）
石岡憲昭・儀辺俊明
奥山典生
（都立大・理・生物化学）

63. 脳のミオシン軽鎖キナーゼの特異性 …… 272
福永浩司・山本秀幸
宮本英七
（熊大・医・Ⅰ薬理）

64. ラット脳のカルモデュリン結合性蛋白質の検索 …… 276
阿部輝雄・西須英雄
（新大・脳研・神経化学）

65. 向精神薬とcalmodulin及びphospholipidの相互作用 …… 280
菅野仁喜・佐々木泰治
（旭化成・医薬品・生化）
日高弘義
（三重大・医・薬理）

66. サンゴイソギンチャク毒素とザリガニ神経の結合 …… 284
藤田省三
（生理研・生体膜）
藁科彬
（新大・医・I生理）
佐武明
（同・脳研・神経化学）

67. 神経成長因子によって導き出される培養神経細胞のエンケファリン受容体 …… 288
畠中寛・井上順雄
（三菱化成生命研）

68. 電気ウナギ電気器官形質膜のテトロドトキシン結合蛋白の
ホトアフィニティラベル …… 292
上原政治・植村慶一
（埼玉医大・I生理）

69. ラット骨格筋培養細胞の細胞内α－トキシン結合成分の性質 …… 296
杉山博之・山下幸子
（生理研）

70. ラット脳における^{3}H-kainate bindingの内因性抑制物質 …… 300
辻村良太郎・野村純一
鳩谷龍
（三重大・医・精神）

71. ラット脳のVIP（vasoactive intestinal polypeptide）受容体 …… 304
小川紀雄・水野幸子
塚本修司・森昭胤
（岡大・医・脳研）
貫名至
（同・Ⅲ内）

72. High affinitive GABA receptor site をもつ
synaptic membrane の精製 …… 308
栗岡晋・堀誠治
松田誠
（慈恵医大・医化）

73. GABA受容体およびbenzodiazepine受容体に対するGABA構造類似体の
作用の差異 …… 312
水野幸子・塚本修司
小川紀雄・森昭胤
（岡大・医・脳代謝研・機能生化）

74. バルビツール酸誘導体によるGABA受容体結合の増強 …… 316
浅野富子・小笠原信明
（愛知県コロニー）

75 抗精神病の賦活作用とα_2—Adrenergic Receptor 阻害作用；
^{3}H–Clonidine および ^{3}H–Yohimbine 結合親和性 …… 320
朝倉幹雄・塚本徹
鴨志田智津恵・平田進英
長谷川和夫
（聖マリアンナ医大・神経精神）

76. 抗うつ剤長期投与と α_2，βリセプター感受性調節機構 …… 324
塚本徹・朝倉幹雄
鴨志田智津恵・平田進英
長谷川和夫
（聖マリアンナ医大・神経精神）

77. ラット輸精管のα_2受容体とアデノシン受容体との関連の可能性について …… 328

渡辺康裕・頼　榮燦
前田　一・吉田　博
（阪大・医・Ⅰ薬理）

78. 中枢神経系のcyclic AMP産生系に対する高級不飽和脂肪酸作用機構 …… 332

馬場明道・李　英培
龍野　徹・岩田平太郎
（阪大・薬・薬理）

79. 脳切片における興奮性アミノ酸のcyclic AMP増加作用
— とくに海馬におけるシステインスルフィン酸の特異性について — …… 336

龍野　徹・李　英培
馬場明道・岩田平太郎
（阪大・薬・薬理）

80. 節前あるいは節後神経切断による白鼠上頸部交感神経節のサイクリックGMP生成量の変動 …… 340

安藤正人・難波経篤
永田　豊
（保健衛生大・医・生理）

81. Ca^{2+}, リン脂質依存性蛋白質リン酸化酵素の精製とその性状 …… 344

吉川　潮・水口龍次
猪原慎一・山西淳司
越智　聡・高橋十郎
高井義美
（神戸大・医・Ⅱ生化）

82. Superoxide Dismutaseによる脳内Guanylate Cyclaseの活性化：
アスコルビン酸要求性について …… 348

栗山欣弥・吉川和明
神守功二
（京府医大・薬理）

83. ラット脳可溶性 Guanylate cyclase に対する単クローン性抗体 …… 352
中 根 正 樹・出 口 武 夫
（都神経研・医化）

84. 培養神経芽細胞腫N1E115に於けるPhosphatidic acidによる
Ca^{2+}の取り込みと cyclic GMP生成の促進 …… 356
大 迫 俊 二*・出 口 武 夫
（都神経研・医化）

85. コリンアセチルトランスフェラーゼ（EC 2.3.1.6）の超微量測定法 …… 360
加 藤 尚 彦
（東大・医・脳研）

86. 線条体アセチルコリン受容体の生理的役割について …… 364
高 野 行 夫・桜 井 康 子
糀 本 芳 郎・本 多 健 治
楠 木 隆 博・神 谷 大 雄
（福岡大・薬・薬理）
内 村 公 一
（福岡大病院・薬剤部）

87. 脳のムスカリン性アセチルコリン受容体とアゴニスト〔^{3}H〕CDの
結合特性及びその調節 …… 368
額 田 敏 秀・芳 賀 達 也
（浜松医大・生化）

88. ムスカリン様アセチルコリン受容体の研究
— トリプシン処理および線照射の影響 — …… 372
松 本 一 夫・内 田 修 次
竹 安 邦 夫・樋 口 宗 史
吉 田 博
（阪大・医・I薬理）

89. NG108−15細胞におけるプロスタグランディンD_2による
アセチルコリン遊離の促進 …… 376
東田陽博・中川勇三
三木直正
（金大・がん研・薬理）

90. 培養牛副腎髄質クロマフィン細胞におけるアセチルコリンエステラーゼ
（AChE）の生成とその放出：ニコチン刺激によるAChEとカテコールアミン
の同時放出 …… 380
溝部文夫・Bruce G. Livett
(The Montreal General Hospital and McGill University)

91. ニワトリ網膜に存在するニューロブラストーマ × グリオーマ
雑種細胞のコリンアセチルトランスフェラーゼ活性促進因子 …… 384
高橋正身・天野武彦
（三菱化成生命研）

92. An Antiserum Specific for Cholinergic Synaptic Vesicles
コリン性シナプス小胞の特異的抗血清について …… 388
Stadler, H.*・Walker, J.H.
Jones, T.R.
（Max-Planck生物物理化学研究所,
*現・東大・医・脳研）

93. 運動ニューロン疾患患者脊髄内アセチルコリン代謝系酵素活性の局所分布 …… 392
永田豊・奥谷正人
（保健衛生大・医・生理）
本多虔夫・渡辺良
（横浜市民病院・神経内科）

94. 高速液体クロマトグラフィーによるラット線条体およびヒト髄液中
p-hydroxyphenylacetic acidの測定 …… 396
小林清史・小出やよい
庄盛敏廉
（岡大・医・脳研・病態生化）

95. 松果体における Hydroxyindole O-methyltransferase
(HIOMT) の種特異性について …… 400
中 根 正 樹
横山(天野)恵美子
出 口 武 夫
(都神経研・医化)

96. 結合S-adenosylhomocysteine による hydroxyindole
O-methyltransferase 活性調節機構について …… 404
桑 野 良 三・高 橋 康 夫
(新大・脳研・神経薬理)

97. 新しいタイプのミトコンドリアMAOの存在とその酵素化学的性質 …… 408
杵 鞭 宏 育・須 藤 みゆき
森 川 文 雄・吉 野 守 彦
上 條 一 也
(昭和大・医・薬理)

98. ビオプテリン補酵素量の短時間調節機構
— チロシン負荷あるいは nomifensine, γ-butyrolactone
投与によるビオプテリン量の変化 …… 412
山 口 時 男・永 津 俊 治
(東工大・生命化学)
小 島 秀 樹
(久留米大・医・脳研)
飯 塚 礼 二
(順天堂大・医・精神)
近 藤 智 善・楢 林 博太郎
(同・神経)

99. マウス脳内ヒスタミンの存在様式とその代謝回転 …… 416
前 山 一 隆・渡 辺 建 彦
大和谷 厚・田 口 吉 孝
和 田 博
(阪大・医・II薬理)

100. 摂食制限がラット脳神経核レベルにおけるモノアミン酸化酵素活性の
日内変動におよぼす影響 …… 420
国元憲文・挾間秀文
釜瀬春隆・水川六郎
（鳥取大・医・神経精神）

101. YM-09151-2及びSulpiride投与のドパミン代謝回転に対する
作用の比較 …… 424
盛政忠臣・三宅好子
吉野公博・金行孝雄
三船和史・森久博司
庄盛敏廉
（岡大・医・脳研・病態生化）

102. 神経刺激によるカテコールアミン分泌機構
— ATPおよび関連物質による抑制作用 — …… 428
熊倉鴻之助・笹川展幸
菊野正隆
（上智大・生命研）
小林和夫・大泉信行
黒田洋一郎
（都神経研）

103. ラット脳神経終末細胞質分画中で合成された^{14}C-ドーパミンの
シナプス小胞への移行について …… 432
都築紀宏
（名市大・医・生化）

104. 大脳皮質除去ラットの脳幹部カテコールアミンの変動 …… 436
野村正彦・大辻正高
（保健衛生大・医・生理）
安達一真・神野哲夫
（同・脳外）

105. ラット脳各ドーパミン・ニューロン系のHVAへの haloperidol
慢性投与の影響 …… 440
松本 孝・内村英幸
平野 誠・金 長寿
斎藤 雅・横尾秀康
下村 学（国立肥前療養所）
中原辰雄
（九大・理）
大曲 清
（佐医大・精神）
井上 桂
（三重大・医・精神）

106. メトアンフェタミンのドパミン作動性ニューロン終末に及ぼす影響 …… 444
富樫俊二・和知 学
奥田正英・沢 政一
（新大・医・精神，脳研神経化学）

107. コイ網膜インドールアミン蓄積細胞の役割について …… 448
加藤 聖・根岸晃六
（金大・医・神経情報研・伝達）

108. 急性ストレス下のラット脳内ノルアドレナリン含量維持に対する
下垂体副腎皮質系の役割 …… 452
中川良一・田中正敏
河野康子・井田能成
飯盛健一郎・帆秋善生
長崎信行
（久留米大・医・薬理）

109. ストレスによるラット脳内 noradrenaline turnover 亢進に
及ぼす naloxone の影響 …… 456
田中正敏・河野康子
中川良一・井田能成
飯盛健一郎・帆秋善生
長崎信行
（久留米・医・薬理）

110. 長期拘束ストレスによる中枢神経諸核の tyrosine hydroxylase 活性の変化 …… 460
井上桂・鳩谷龍
（三重大・医・精神）
内村英幸
（国立肥前療養所）
中原辰雄
（九大・理・化学）

111. 牛脳より分離した Coated vesicles の性状と性質について …… 464
宇佐美美穂子・高橋章
門田健
（都精神研・神経化学）

112. ウサギ脊髄神経節における substance P の生合成とその遊離 …… 468
井上敦子・仲田義啓
瀬川富朗
（広島大・医・薬効解析）

113. 培養神経細胞の生産する Substance P 及び Leu-Enkephalin-
like Immunoreactivity …… 472
天野武彦・工藤佳久
（三菱化成生命研）

114. シナプトゾームよりの GABA 放出と Ca イオン …… 476
朝倉正・星野道雄
小林孝彰・松田誠
（慈恵医大・医化）

115. GABA release に対するTaurine の作用：
Presynaptic GABA-autoreceptors について …… 480
波間 美佐子・岡本 浩一
酒井 豊
（防衛医大・薬理）

116. マウス脳シナプトゾームにおける新しいGABA 生合成系路と
その負のフィードバック機構について …… 484
米田 幸雄
（京府医大・薬理）
Eugene Roberts
（シティオブホープ研究所・神経科学）

117. 視床下部視索上核，室旁核へのエンケファリンならびに
その非代謝性アナログの微量注入による抗利尿作用 …… 488
津島 宏美・森 真由美
松田 友宏
（名市大・医・薬理）

118. ラット大脳皮質切片における ^{45}Ca uptake に対する神経伝達候補物質の効果：
特にL-グルタミン酸の効果について …… 492
市田 成志・小田 泰雄
徳永 博
（近畿大・薬・生物化学）
喜多 富太郎
（同・薬理）

119. 痴呆患者体液中の神経伝達関連物質について …… 496

児玉和彦・貝谷寿宣
難波益之
（岐阜大・医・神経精神）
近藤俊英・三瓶文義
吉田弘道
（犬山病院）
佐藤寛一
（和合病院）
矢内原昇
（静岡薬大）

1　多発性硬化症患者の脳白質のホモジネートおよび精製ミエリン中のミエリン糖蛋白ならびに他のミエリン蛋白の定量的研究

佐藤修三*・R.H.Quarles・D. Johnson・R.O.Brady
(NINCDS, NIH,*現・新大・脳研・神経内科)

〔要　約〕

多発性硬化症(MS)8例の脳白質よりMS plaque, periplaqueおよびnormal appering white matter(NAWM)を離断後，ホモジネートをつくり，さらにNAWAよりミエリンを分離精製し，それぞれの蛋白成分を定量分析し，対照群と比較検討した。ミエリン塩基性蛋白(BP)およびプロテオリピッド蛋白(PLP)はポリアクリルアミドゲルによる色素結合能により，ミエリン糖蛋白(myelin associated glycoprotein：MAG)はRadioimmunoassay法により，2′, 3′-cyclic nucleotide-3′-phosphohydrolase(CNP)は栗原らの方法により測定した。MS脳のplaque, periplaqueにおいて，MAGの低下率が他の蛋白のそれよりも著しかった。NAWMにおいてもMAGは2.95±0.35(SE)μg/mg proteinと対照4.60±0.21と比べ有意に低値で，その平均値は対照の64.1%であった。BPは127±9 μg/mg proteinと対照の161±4と比べ79.1%，PLPは104±4で対照124±4の83.6%，CNPは1723±115 μmole/h/mg proteinで対照1904±103の90.5%であり，やはりMAGの低下率が最大であった。NAWMより精製したミエリンの分析では，MAGを含めてミエリン蛋白はMS例で有意の低下はみられなかった。脱髄においてMAGが低下する理由，MAGの役割などについて考察した。

Key words：Multiple Sclerosis (MS), Myelin Proteins, Myelin Associated Glycoprotein (MAG)

細胞膜の糖蛋白は細胞間の相互関係や認識などにおいて重要な役割を担っていると考えられている。末梢神経ミエリン中のPo蛋白は糖蛋白であることがEverly[2]らによって明らかにされたが，中枢神経ミエリン中にも微量ながら糖蛋白が存在することが明らかにされミエリン糖蛋白(myelin associated glycoprotein：MAG)と呼ばれている[8]。これは分子量約10万daltonで糖が約30%含まれている[10]。MAGはミエリン総蛋白のわずか1%程度の含有量ではあるが，神経軸索周辺に集積している[12]という特異な分布型式からミエリンと神経軸索の相互関係において重要な役割をもっていることが予測されている[9]。最近の免疫組織化学的研究によれば，多発性硬化症(MS)患者の脳において，MAGが他のミエリン蛋白，特にミエリン塩基性蛋白(BP)よりも早期に変性を受けるのではないかとされている[4]。ここではMS患者の脳白質ならびに精製したミエリンの各種蛋白を定量的に分析し，対照群と比較して脱髄におけるMAGの役割などについて考察した。

対象および方法：8例のMS患者の脳はHuman Neurological Specimen Bank (California, USA)より入手した。それらの剖検時の年令は34才～80才で平均54才であった。対照として使用した12例は非神経疾患にて死亡した例で，そのうち6例はMS脳と同施設より入手し，他の6例はBaltimore City Medical Examiner's Office (Maryland, USA)より入手した。対照の年令は19才～61才，平均39才であった。脳は凍結したままスライスし使用直前に融解，灰白質を離断し，白質のみ使用した。

MS脳は凍結スライスのままplaqueを確認し，plaqueそのもの(P)，plaqueの辺縁より2mm以内をinner periplaque(IPP)，その外側4mmをouter periplaque(OPP)，plaqueからはなれた部位で肉眼的に正常な白質をnormal appering white matter(NAWM)としてそれ

それ分離し，0.32Mの庶糖に浮遊させ，ホモジネートとした。対照脳の白質は全て肉眼的に正常であったのでNAWMとしてホモジネートした。ミエリンはMSと対照いずれもNAWMの庶糖浮遊液からNorton and Poduslo[7]の方法に準じて分離精製した。尚ミエリンの分離はこれに必要な充分量の白質を入手できた例にのみ行った。NAWMホモジネートおよびミエリンは凍結乾燥後，3:2(V/V) ethyl ether：ethanolにて脱脂した[3]。脱脂後の試料は1％(W/V) sodium dodecyl sulfate(SDS)，1.5％dithiothreitolおよび8％庶糖とともに2分間沸とう水中で加熱し，可溶化した[1]。蛋白の分離はLammeli[6]の方法に準じて，SDSポリアクリルアミド(12.5％W/V)スラブゲル電気泳動法にて行った。ゲルは7.5％methanol，7.5％酢酸にて脱色し，Schoeffel SD 3000 Spectrodensitometerにて540nmで走査し，各ピークを定量的に分析した。2′，3′-cyclic nucleotide-3′-phosphohydrolase(CNP)は栗原らの方法に準じて測定した。MAGはJohnsonら[5]のradioimmuno assay法にて測定した。

結果：MS脳のplaque，plaque周辺およびNAWMではいずれもMAGの低下率が最大で，特にDevic病と診断された急性例(#394)では，MAGの低下率と他のミエリン蛋白のそれとの差が著しかった(図1：対照の平均値を100％としている)。慢性型と思われるMS脳のplaqueではglial fibrillary acidic protein(GFA)が増加しており周辺では漸減していた。またDevic病の脳のplaqueではGFAの増加は軽く，代ってAlbuminと思われるbandが増加していた。MS脳と対照脳のNAWMホモジネートの比較では，表1のようにBP，PLP，MAGがMS脳において有意に低下していた。なかでもMAGは対照の平均値の64.1％と最も低下していた(図2：対照の平均値を100％，各バーは％表示

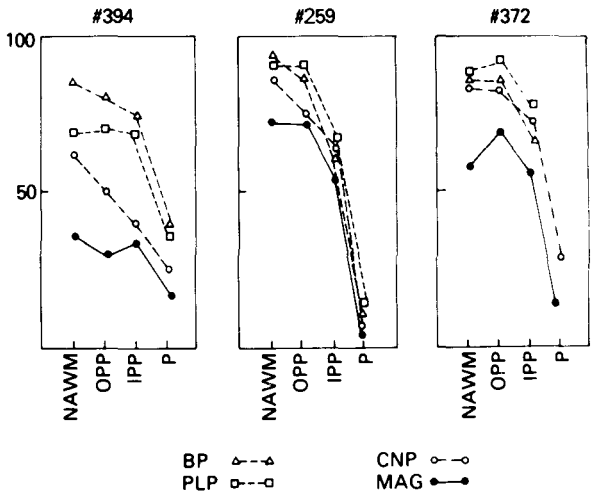


Fig. 1 : Percentage of each myelin constituent in homogenate of plaque(P), inner periplaque(IPP), outer periplaque(OPP) and normal appering white matter(NAWM) of multiple sclerosis brain. #394: acute case(Devic disease), #259 & 372: chronic cases.

した 1SD)。精製したミエリンにおいては，MS脳でMAGがやや低い傾向があったが有意差はなく，その他いずれの成分についても差はみられなかった（表1）。

考案：MS脳の plaque や periplaque において，MAG の低下率が最大であるという結果は，糸山ら[4]の免疫組織化学的検索の結果を裏づけている。特に Devic 病と診断された急性例について，MAGと他のミエリン蛋白の低下率の差が著しいという結果も，糸山らの報告と一致する。NAWM において免疫組織化学による定量検索は困難であるが，ここに示したように化学的および免疫化学的定量分析では，MAG をはじめ BP, PLP も低下していた。この理由として，肉眼的NAWMの中には微小な脱髄巣が含まれていてミエリン自体の総量が減少している可能性がある。一方，ミエリン自体の変性によるMAG および他の蛋白の低下も考えられた。次に行われた精製ミエリンの分析では，MAG をはじめその蛋白成分は対照とほとんど差がなかった。このことはMSのNAWMではミエリン総量が減少していることを示唆している。しかし単にNAWM中のミエリン含有量が少いことによるミエリン蛋白各成分の低下ならば，各成分がもっと均等に低下するべきであるので，MAGが最も低下しているのは別な理由が考えられる。ここで精製したミエリンはいわゆる compact myelin であるが，MAGは他の subfructionつまり single membrane や vesicle に多く，これが免疫組織化学的検索にてMAG が periaxonal 集積しているという結果を反映していると考えられる。つまりNAWMのMAGの低下は compact myelin 中の低下を反映しているのではなく，他の subfruction での低下を反映している可能性がある。脱髄における periaxonal の MAG の低下が，一次的か二次的か (oligodendroglia のdying back 現象などによる)疑問はあるが，他のミエリン蛋白よりも

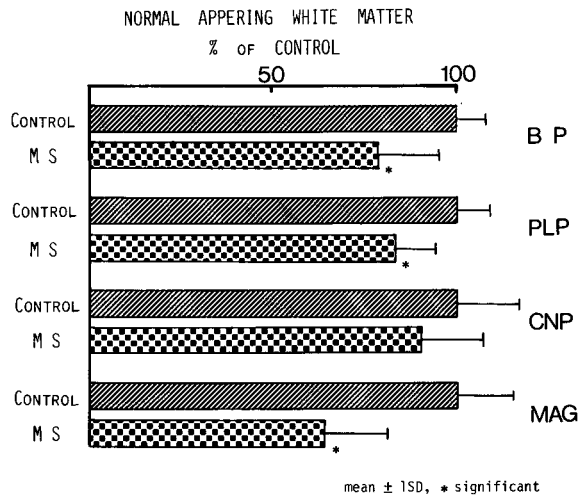


Fig. 2 : Comparison of percentage of each myelin constituent in homogenate of normal appering white matter between multiple sclerosis(MS) and control brain.

NORMAL APPERING WHITE MATTER

	BP (μg/mg prot)	PLP (μg/mg prot)	CNP (μmole/h/mg prot)	MAG (μg/mg prot)
M S	127 ± 9*(8)	104 ± 4*(8)	1723 ± 115 (8)	2.95 ± 0.35*(5)
CONTROL	161 ± 4*(10)	124 ± 4*(10)	1904 ± 103 (12)	4.60 ± 0.21*(11)

PURIFIED MYELIN

	BP	PLP	CNP	MAG
M S	247 ± 14 (6)	136 ± 14 (6)	2142 ± 163 (5)	4.80 ± 0.46 (5)
CONTROL	233 ± 19 (7)	144 ± 14 (7)	2032 ± 221 (5)	5.01 ± 0.64 (5)

mean ± SE, * significant

Table 1 : Values of each myelin constituent in homogenate of normal appering white matter and purified myelin from multiple sclerosis(MS) brain comparing with those of control brain. Numbers in parentheses are number of brains in this study.

早期に変性を受けることは確からしい。我々はその原因の一つとして，人のMAGが中性プロテアーゼに感受性が高いとの報告もしている[11]。膜糖蛋白としてのMAGはウイルスの receptor, remyelination における機能なども含めて，脱髄疾患において重要な役割を担っている可能性がある。

文献：

(1) Agrawal, H.C., Burton, R.M., Fishman, M.A. Mitchell, R.F. & Spohn, M. (1972) J.Neurochem. 19, 2083—2089.

(2) Everly, J.L., Brady, R.O., and Quarles, R.H. (1973) J. Neurochem. 21, 329—334.

(3) Greenfield, S., Norton, W.T. and Morell, P. (1971) J. Neurochem. 18, 2119—2128.

(4) Itoyama, Y., Sternberger N.H., Webster, H. deF., Quarles, R.H., Cohen, S.R. and Richardson, E.P. Jr. (1980) Ann. Neurol. 7, 167—177.

(5) Johnson, D, Sato, S., Quarles, R.H., Brady, R.O., and Webster, H.DeF (1981) J.Neuropath. Exp. Neurol. 40, 308.

(6) Laemmli, V.K. and Favre, M. (1973) J.Mol. Biol. 80, 575—600.

(7) Norton, W.T. and Poduslo, S.E. (1973) J. Neurochem. 21, 749—758.

(8) Quarles, R.H. Everly, J.L. and Brady, R.O. (1973) J. Neurochem. 21, 1171—1191.

(9) Quarles, R.H., McIntyre, L.J., and Sternberger, N.H. (1979) Soc. Neurosu. Symp. 4, 323—343.

(10) Quarles, R.H. (1979) In "Complex Carbohydrates of Nervous Tissue" New York : Plenum, P209—233.

(11) Sato, S. Quarles, R.H., and Brady R.O. (1981) Trans. Amer. Soc. Neurochem. 12, 80

(12) Sternberger N.H., Quarles R.H., Itoyama Y. and Webster H.deF. (1979) Proc. Natl. Acad. Sci. 76, 1510—1514.

2　各種神経・精神疾患患者における髄液中GABA濃度

黒田広生(岡大・医・Ⅲ内)・小川紀雄・(同・脳研)・山脇泰秀・貫名　至
・大藤　真(同・Ⅲ内)・山本光利・大月三郎(同・神経精神)

〔要　約〕

正常人および種々の神経・精神疾患患者における脳脊髄液中GABA濃度(CSF-GABA濃度)をGABA radioreceptor assay法(GABA-RRA法)を用いて測定した。今回我々が用いたGABA-RRA法ではCSF-GABA濃度は5 pmoles/mlまで測定可能であり臨床的測定法としても有用である事がわかった。測定の結果,正常人(N=16)のCSF-GABA濃度は143±16 pmoles/ml (Mean±SEM)であり,年令,性別による有意差は認められなかった。種々の疾患のうち有意な低値を示したものは,パーキンソン病(61±8 pmoles/ml),神経ベーチェット病(57±8 pmoles/ml),および脊髄小脳変性症(SCD)の中の late cortical cerebellar atrophy (55±11 pmoles/ml), olivopontocerebellar atrophy (46±2 pmoles/ml)であった。一方,髄膜炎群(309±65 pmoles/ml)は有意な高値を示した。特に変性疾患においてCSF-GABA濃度の有意な低下を認めた事は,病因,病態,病勢を知るうえでCSF-GABAの測定が有力な1手段となりうる事が考えられた。一方,有意な高値を示した髄膜炎群についても,血液脳関門の変化,GABA代謝の変化等が予想されるが,この種の炎症が特異な働きをするものかどうかは今後十分検討せねばならぬ課題と考えられた。

Key words :　CSF (cerebrospinal fluid)
GABA (gamma-aminobutyric acid)
radioreceptor assay

Gamma-aminobutyric acid (GABA)は無脊椎動物のみならず哺乳動物の脳内にも広く分布する抑制性神経伝達作用のある神経活性アミノ酸の1つと考えられている。GABAの生理学的ならびに生化学的特性に関する研究はかなり以前からすすめられているが,GABA-receptorに関する研究は1970年台半ばに開発されたradioreceptor assay法(RRA法)を用いて現在急速に進歩しているものの,まだ比較的新しい分野である。近年ある種の神経精神疾患においてGABA代謝の異常が指摘されるようになり,その病因,病態追求の為種々の方面からの研究がなされている。(2,3,8,) 脳脊髄液は脈絡叢で産生され中枢神経系を流れる液体で種々のアミノ酸やその他の物質が含まれており,脳の機能を知るうえで最も身近かな材料である。今回我々はGABA-RRA法を用いて正常群を含めた種々の精神・神経疾患患者総計100名の脳脊髄液中GABA濃度(CSF-GABA濃度)を測定し,RRA法の有用性ならびに各種疾患特性を検討した。

〔方　法〕

<u>コントロール群</u>：健康ボランティアおよび入院中の患者で全く投薬を受けずしかも神経・精神疾患を有さぬ者,計16名でその内訳は男性8名,女性8名であり,その平均年令は44±17才(Mean±SEM)であった。

<u>患者群</u>：何らかの神経・精神疾患を有する患者で,疾患名および各々の人数はFig. 2. に示すとおりであり総計84名であった。

<u>髄液採取法</u>：てんかん患者以外の全ての患者には腰椎穿刺2週間前より全ての投薬を中止し,16時間前より経口摂取を禁止したうえでベッド上での安静を保たせた。穿刺はAM9時に左側臥位にて行なった。Assayに使用する脊髄液は5cc目より10cc目まで

の5ccを採取し速やかに測定まで−70°Cに凍結保存した。

レセプター作製法：50匹雄ラット(200～250g)を断頭屠殺し，速やかに全脳を取り出し10容量の氷冷0.32M sucrose中でホモゲナイズ(Brinkman Polytron PT-10, dial set 7, 10sec×2)し，さらにガラスホモゲナイザーで軽くホモゲナイズした後，900×g，4°Cで10分間遠沈し，上清をさらに11,500×gで20分間遠沈した。その沈渣(P_2分画：mitochondria-synaptosome分画)を10容量Tris緩衝液(50mM-Tris/HCl buffer, pH 7.6)に懸濁して−70°Cで凍結保存した。使用時，保存P_2分画を100容量Tris緩衝液に懸濁し，50,000×g，4°Cで20分間遠沈して得られたpelletに100容量Tris緩衝液(0.05%のTriton X-100含有)を加え37°Cの温浴中で振盪しながらインキュベートし，さらに50,000×g，4°Cで20分間の遠沈を2回くり返した後，pelletを20容量Tris緩衝液にて懸濁しreceptorとした。(最終蛋白濃度は1.2mg/ml)

アッセイ法：GABA-RRA法は原則的にはEnnaらの方法に準じて行なった。(3,6) 0.2mlのTris緩衝液，0.1mlの6.4nM, ^{3}H-GABA(specific activity 57 Ci/mmol)，0.2mlのCSFをガラス試験管に混じ，最後に0.5mlのreceptorを入れ氷水中で30分間インキュベートした。B/F分離にはglass-fiber filter(Whatman GF/C)を用いて吸引沪過し，filterに付着したreceptorをfilterごとcounting vialに入れβ-counterで測定した。

〔結　果〕

今回のGABA-RRA法では5pmoles/mlの濃度までCSF-GABAの測定は可能であった。又，Fig. 1.に示すごとくCSFのdilution curveはStandard curveと平行関係を示した。正常コントロール群および各種疾患群についての各々の症例数およびCSF-GABA濃度(Mean±SEM)はFig. 2.に示した。正常コントロール群のCSF-GABA濃度は143±16pmoles/mlでそのうち男性($N=8$)は127±22pmoles/ml，女性($N=8$)は159±23pmoles/mlであり両者の間には有意差はなかった。年令とCSF-GABA濃度との関係についても検討したが有意な相関関係は見い出せなかった。($r=0.16$) 各疾患群のうちで有意な低値を示したのはパーキンソン病(61±8pmoles/ml)(Mean±SEM)，神経ベーチェット病(57±8pmoles/ml)で最も低値だったのは脊髄小脳変性症(SCD)のなかのlate cortical cerebellar atrophy(LCCA)(55±11pmoles/ml)，olivopontocerebellar atrophy(OPCA)(46±2pmoles/ml)であった。初老期痴呆であるアルツハイマー病，ピック病

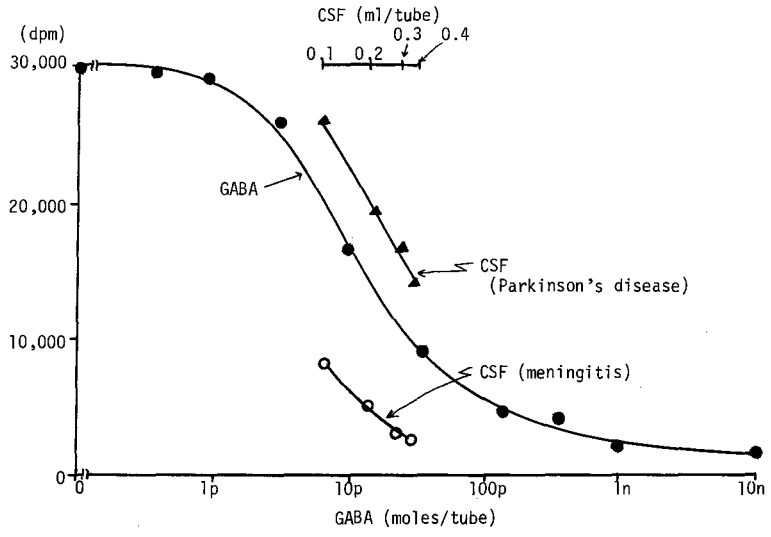


Fig. 1. Standard curve of GABA-RRA and dilution curve of CSF

も 60 pmoles/ml 台とかなりの低値を示した。一方，有意な高値を示したものは髄膜炎群(N=5)でその濃度は 309±65 pmoles/ml であった。他の疾患群においては正常コントロール群との間に有意差は見い出せなかった。

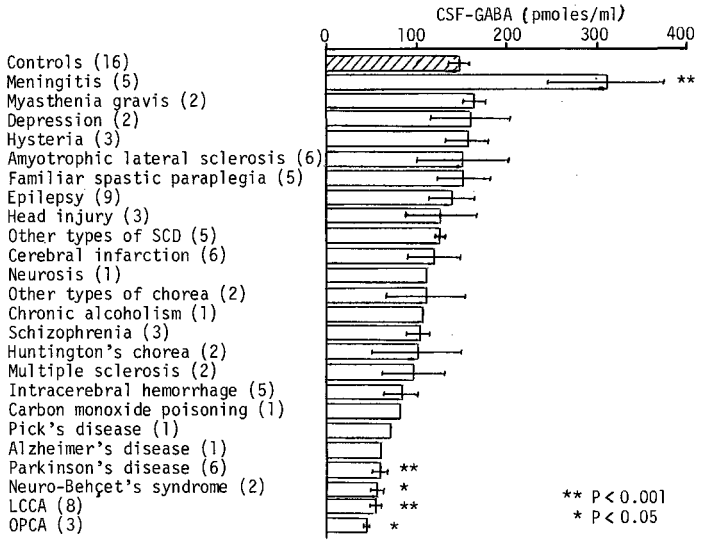


Fig. 2. CSF-GABA levels in normal controls and patients with various neurological and psychiatric diseases.
( )内は症例数，Mean±SEM にて表示

[考　按]

今回我々は各種神経・精神疾患患者における CSF-GABA 濃度を測定し疾患特性の有無を検討したが，同様の試みは今日までにいくつかの報告がある。(4, 8, 9) 正常コントロール群の値において，今回の我々のデータは他の報告に比しやや低めであった。Fig. 2. に示すように最も低値を示したのは脊髄小脳変性症(SCD)の一型である OPCA，次いで LCCA であり，これらの CSF-GABA 濃度は正常コントロール群の約½であった。これらの変性疾患はともに小脳の著明な変性萎縮を呈する事がその特徴とされている事は衆知の事実である。脳内 GABA 分布においては Okada ら(12)の報告によると黒質に最も多く，以下淡蒼球，視床下部，上丘の順となっており，小脳皮質(虫部)や大脳皮質では低濃度であるが，各々の領域での全 GABA 量を比較すれば小脳にはかなりの量があり，この部位の変性萎縮が起これば当然全 GABA 量は減少し，この低下は CSF 中の GABA 濃度の低下に大きな影響を与えるものと考えられる。実際，今回対象となった脊髄小脳変性症群においては CT scan 上著明な小脳萎縮を認めるものがほとんどであった。この事は CSF-GABA 濃度の測定が変性・萎縮の程度を知るうえでの重要な指標となるばかりでなく，SCD 群の各 type の鑑別にも十分役立つものと考えられる。CT scan 上の小脳萎縮の程度と CSF-GABA 濃度との関係については他の機会に発表の予定である。

神経ベーチェット病患者2例の CSF-GABA 濃度も有意に低値であった。この疾患の脳病変は小血管系に主座があり，特に大脳基底核，脳幹，小脳，髄膜の血管周囲の炎症反応が強く，病気の進行とともにびまん性の脳萎縮がみられる傾向にある。本例では CT scan 上軽度の脳萎縮しか認められなかったが，GABA に富んだ領域の微細病変がかなり進んでいる事が予想された。6例のパーキンソン病の患者群の CSF-GABA 濃度も 60 pmoles/ml 台と正常コントロール群の約 43% と有意の低値 ($P<0.001$) を示した。これらの症例はいずれも Yahr 分類の亜度以上の進行したものであった。Manyam ら[5]はパーキンソン病の CSF-GABA 濃度を ion exchange-fluorometric method で測定しているが，

レボドーパ未治療群に比べ治療群ではCSF-GABA濃度の低下が有意に改善したと報告(9)する一方で，同疾患のCSF-GABA濃度の低下はその罹病期間，寡動・固縮・振戦等の臨床症状，投薬期間等とは有意な相関関係は示さなかったとする報告(10)もしておりCSF-GABA濃度の変化を十分説明するに至っていない。Lloidらによると GAD (glutamic acid decarboxylase) の脳内分布量は未治療のパーキンソン病患者で低下しているにもかかわらずレボドーパ治療患者では正常に近い量があるとしながらも，両者の脳内GABA量は不変であったと報告している。(5, 7) これらの事実はGABA turnover rateの変化が存在する事を示唆するようでもあるが，より多くの症例について CSF-GABA濃度と病期，罹病期間，臨床像，薬物療法の有無と量等との関係について十分検討し臨床的側面からの明確な関係を把握しておく事がより basicな結論を引き出すうえでも重要と考えられる。初老期痴呆群の低値も大脳皮質前～側頭葉皮質と関係している事が予想される。なぜなら，大脳皮質のGABA濃度は黒質，淡蒼球の40%ほどであるが，容量の大きい事を考えると広範な萎縮によるGABA量の低下はかなりの量になると考えられるからである。一方，著明な高値を示した症例は髄膜炎で内訳はウィルス性と思われるもの3名で，2名は病因不明であった。この群のCSF-GABA濃度は正常コントロール群の2.2倍量を示した。髄膜炎患者のCSF-GABA濃度に関する研究はBuryakovaらの報告(1)があるが，彼らは小児髄膜炎患者を対象とし，その内容は細菌性髄膜炎患者のCSF-GABAのみ定量可能で他の原因のものは測定不能であったとして，この測定が髄膜炎の鑑別に役立つと述べている。今回の我々のデータは成人のもので，しかも細菌性の患者は一人もなく彼らの報告とはくい違っているが，CSF-GABA濃度がこの群で高値を示した点では一致しており，この疾患による変化が特異的なもので血液脳関門のGABAの逆返性やGABA metabolismに変化を与える事が予想されるが詳細は不明といわねばならない。いずれにせよ今回の各種疾患群の中で有意な高値を示したのは髄膜炎群のみでありこの疾患の病態を考えるうえで重要な所見と言えよう。

［文　献］

1. Buryakova,A.V., Cand,M.S., and Sytinsky,I.A., (1975) Arch. Neurol., 32, 28-31.
2. Enna,S.J., Stern,L.Z., and Wastek,G.J., (1977) Life Sci., 20, 205-212.
3. Enna,S.J., and Snyder,S.H., (1976) J. Neurochem., 26, 221-224.
4. Enna,S.J., Stern,L.Z., Wastek,G.J., and Yamamura,H.I.,(1977) Arch. Neurol., 34, 683-685.
5. Hornykiewicz,O., Lloid,K.G., and Davidson,L., (1976) In GABA in Nervous System Function. (Robertis,E., Chase,T.N., and Tower,D.B., ed.) pp 479-485, Raven Press, New York.
6. 黒田広生，小川乾雄，山脇泰秀，大藤真，(1981) 脳研究会会誌，7，42-43.
7. Lloid,K.G., and Hornykiewicz,O., (1973) Nature, 243, 521-523.
8. Manyam,N.V.B., Hare,T.A., Katz,L., and Glaeser,B.S., (1978) Arch. Neurol., 35, 728-730.
9. Manyam,N.V.B., Katz,L., Hare,T.A., Gerber,J.C., and Grossman,M.H., (1980) Arch. Neurol., 37, 352-355.
10. Manyam,N.V.B., Hare,T.A., and Katz,L., (1980) Brain Res. Bull., 5, suppl. 2, 741-745.
11. Meldrum,B.S., (1975) In International Review of Neurobiology. (Pfeiffer,C.C., Smythies,J.R., ed.) vol. 17, pp 1-36, Academic Press, New York.
12. Okada,Y., et al., (1971) Exp. Brain Res., 13, 514-518.

3　ヒト尿中アセチルアスパラギン酸と精神・神経疾患

森野日出緒・三宅正治・柿本泰男
（愛媛大・医・神経精神）

〔要　約〕

尿中N-アセチルアスパラギン酸（NAA）およびN-アセチルアスパラチルグルタミン酸（NAAG）の高感度なガスクロマトグラフィーによる定量法を開発し、これら化合物の尿中排泄量を種々の精神・神経疾患で調べた。

1) 尿中NAA排泄量 ― 正常値は、15歳以下で 50～110 μmole/g creatinine，15歳以上で、20～80 μmole/g creatinine であった。脳血管障害・脳性麻痺のような急激な或いは広範囲な脳器質性障害患者に、排泄量の増加を見た。一方、慢性変性疾患（パーキンソン病・脊髄小脳変性症など）では、排泄量の増加は見出さなかった。精神分裂病患者は、すべて正常値を示したが、躁うつ病では、一部の者のが高排泄者であった。

2) 尿中NAAG排泄量 ― 正常値は、15歳以下で 30～70 μmole/g creatinine，15歳以上で 10～40 μmole/g creatinine であった。脳性麻痺患者で排泄量の低下をみた。

3) 脳手術後或いは脳血管障害発症後2週間以内に、尿中NAAは増加する。

以上、脳特異性アシルアミノ酸誘導体の尿中定量を行ない、脳器質性疾患の診断や病態解明への手掛りを得ようと試みた。

Key words： N-Acetylaspartic acid , Human urine , Diseases of CNS

N-アセチルアスパラギン酸(NAA)やN-アセチルアスパラチルグルタミン酸(NAAG)は、中枢神経系に高濃度に局在しているが、その生理学的役割は不明である。我々は、これら化合物をヒト尿中で同定し、これら化合物が尿中に排泄されることを見出した[1]。そこで昨年報告した組織中での定量法[2][3]を応用して、これら化合物の尿中排泄量を測定する方法を考案し、種々の精神・神経疾患患者尿で定量した。

<実験方法>

1) 尿試料

患者対象は、愛媛大学医学部附属病院・国立療養所愛媛病院・県立松山中央病院の入院および外来患者或いは県立今治養護学校の生徒であり、その対照として健康人を年令分布が合致するように選んだ。尿試料としては、出来る限り早朝尿を採取した。尿にはイソプロピールアルコールを加え、-20℃で凍結保存した。

2) 尿中N-アセチルアスパラギン酸およびN-アセチルアスパラチルグルタミン酸の定量

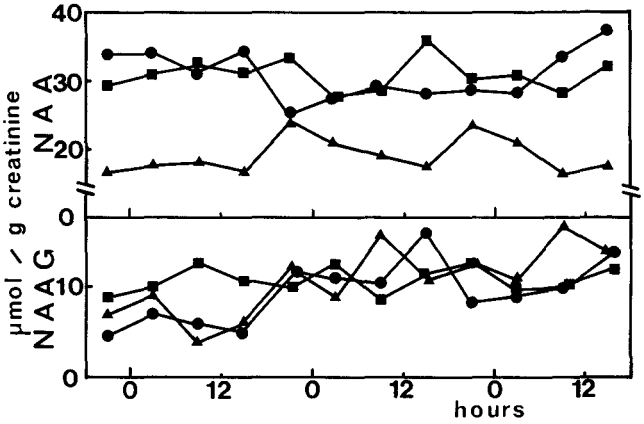
尿中のNAAとNAAGの定量は、図1に示したように尿を部分精製した後（回収率 NAA; 91.2%，NAAG; 87.7%）、昨年報告したガスクロマトグラフィーによる定量法[2][3]を用いた。尿中クレアチニンは、ピクリン酸法で定量した。尿中のNAAおよびNAAG排泄量

図1　尿中NAAとNAAGのガスクロマトグラフィーによる定量の前処理

Human urine (5mg creatinine)
↓ 1x5cm column of Dowex 1x8, formate form
↓ washed with 10ml of water
Eluate with 25ml of 3M formate
↓
Dried residue
↓ 1x3cm column of Amberlite IRA-400, formate form
↓ washed with (1) 10ml of water
(2) 20ml of 0.1M formate
Eluate with 20ml of 1M formate
↓
Dried residue
↓ dissolved in 2ml of water
and neutralized with 0.1ml of pyridine
↓ 1x5cm column of DEAE-cellulose equilibrated with 0.2M pyridine-acetate buffer, pH 5.3
↓ washed with 10ml of the same buffer
Eluate with 20ml of 2M pyridine-acetate buffer, pH 5.3
↓
Dried residue

は、クレアチニン当量で示した。一般に尿中の化合物の排泄量をクレアチニン当量で示した場合、小児では尿中クレアチニン濃度が低いため、それを基準にした化合物の排泄量は高く出る。そこで結果を15歳以下と15歳以上に分けて示した。

図2　尿中NAAおよびNAAG排泄量の日内変動



〈結果〉

1) 尿中N-アセチルアスパラギン酸とN-アセチルアスパラチルグルタミン酸排泄量の日内変動

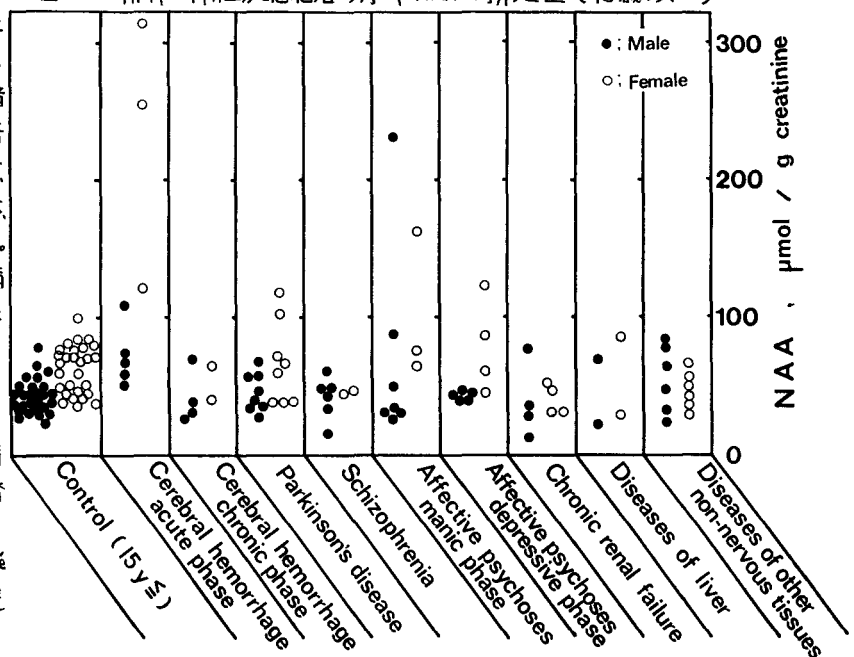
図2は、3人の健康成人の3日間の6時間尿でのNAAとNAAGの濃度変化を示したものである。NAAの排泄量は、食餌などの影響を受けず、一定している。一方、NAAGの排泄量は、やや変動を認めるが、それほど著明なものではない。

2) 精神・神経疾患患者の尿中N-アセチルアスパラギン酸の排泄量

図3·4に、精神·神経疾患患者と正常者の尿中NAA排泄量を示した。正常値は、15歳以上で男子; 20～60 μmole/g creatinine, 女子; 30～90 μmole/g creatinine, 15歳以下で男子; 50～100 μmole/g creatinine, 女子; 50～110 μmole/g creatinine である。

脳血管障害患者を発症後1ヶ月以内の者とそれ以後の者に分けて示した。急性期の者では、8名中4名は100 μmole/g creatinine以上で、そのうち2名のクモ膜下出血患者は、正常値の数倍に増加した。一方、慢性期の患者では、正常範囲にあった。

図3　精神·神経疾患患者の尿中NAAの排泄量（15歳以上）



パーキンソン病患者は、2名の者を除いて正常範囲にあった。図には示していないが、Creutzfeldt-Jacob病1名, Huntington舞踏病1名, Vogt-小柳病1名, Guillain-Barré症候群1名, 脊髄小脳変性症2名でも測定したが、C-J病で152 μmole/g creatinineを示した以外は正常範囲にあった。

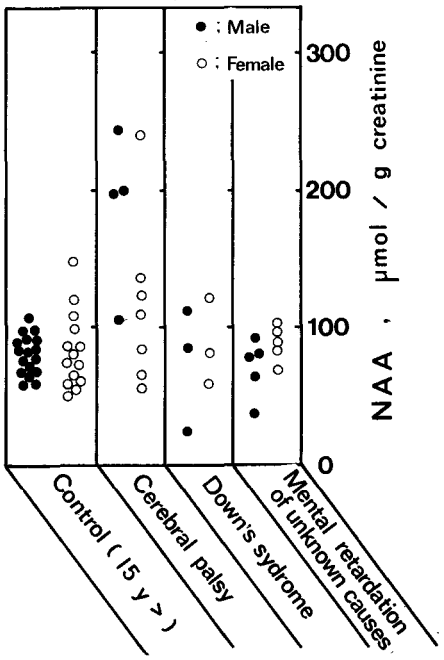
精神病については、精神分裂病8名と躁うつ病24名（躁期10名，間歇期5名，うつ期9名）で、尿中NAA排泄量を測定した。精神分裂病患者は、すべて正常範囲内にあった。一方、躁うつ病患者で、躁期2名、うつ期1名の高排泄者がいた。これら3名は、炭酸リチウム投与例であることが注目されたが、残りの正常排泄者の中にも投与例が4名含まれており、リチウム投与と排泄量の増加との相関関係は、明らかでない。

精神発達遅滞を示す脳性麻痺・ダウン症候群・原因不明例それぞれ11名，6名，10名で、尿中NAA排泄量を調べた(図4)。脳性麻痺のうち4名が高排泄者であった。他の疾患群では高排泄者は認めなかった。脳性麻痺のうちで、高排泄者と正常排泄者の病像を較べると、高排泄者は特に高度の知能低下と運動障害を認める強い脳損傷を持つ患児であった。

慢性腎不全、肝疾患(肝炎・肝硬変)、その他の臓器の疾患では、排泄量の変動は、認めなかった。

これらの結果から、脳に急速な或いは広範囲な器質的な障害があると、NAAの尿中への排泄が、増加することが考えられた。

図4　精神・神経疾患患者の尿中NAAの排泄量（15歳以下）

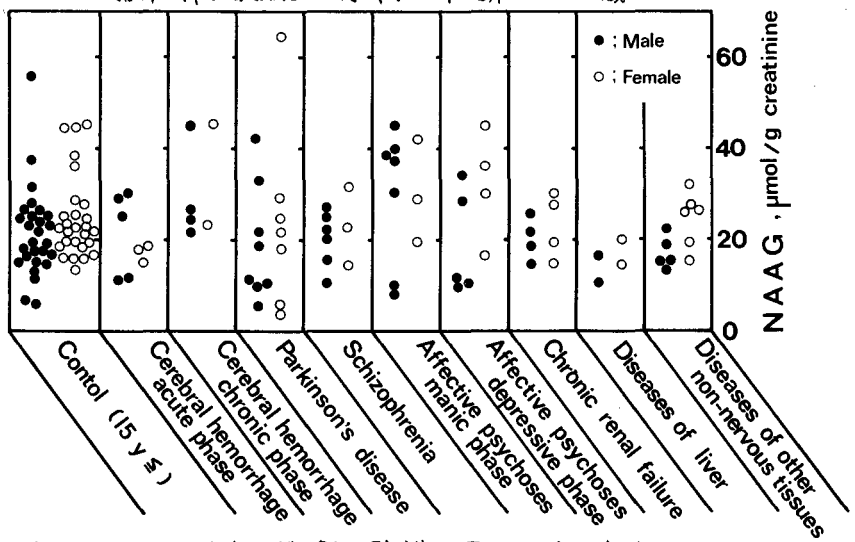


3) 精神・神経疾患患者の尿中N-アセチルアスパラチルグルタミン酸の排泄量

NAAと同時に、同一の患者尿と正常者尿でNAAG排泄量を測定した(図5・6)。正常値は、15歳以上では、男子；10～30 μmole/g creatinine，女子；15～40 μmole/g creatinine，15歳以下では，男女とも30～70 μmole/g creatinineであった。

患者尿で、正常者尿と有意に異なるNAAG濃度を示すのは、脳性麻痺である。脳性麻痺患者で、排泄量が低下したものが6名認められ、このうち4名は、NAAの高排泄者であった。

図5　精神・神経疾患患者の尿中NAAGの排泄量（15歳以上）

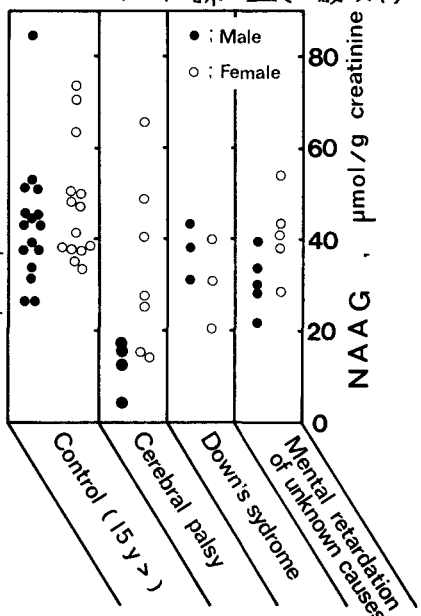


4) 脳損傷後の尿中N-アセチルアスパラギン酸およびN-アセチルアスパラチルグルタミン酸排泄量の経時的変化

脳損傷により、尿中のNAA排泄量が増加するかどうかを確かめるために、脳腫瘍患者の手術後の経過或いは脳血管障害患者の発症後および手術後の経過を追って、尿中のNAAとNAAG濃度を調べた。図7は、23歳・男子の第4脳室腫瘍患者の腫瘍摘除後約1ヶ月間のNAAおよびNAAGの排泄量を示したものである。この患者の術後経過は順調であったが、尿中NAAは、術後4日目には術前の約3倍に増加して、術後21日目には術前の値にほぼ回復していた。一方、尿中NAAG排泄量は、ほとんど変化しなかった。

脳内出血2名と脳腫瘍1名の患者でも尿中NAAは、発症後或いは手術後2週間以内をピークとする増加を示し、尿中NAAGは、ほとんど変動しないということを確かめた。

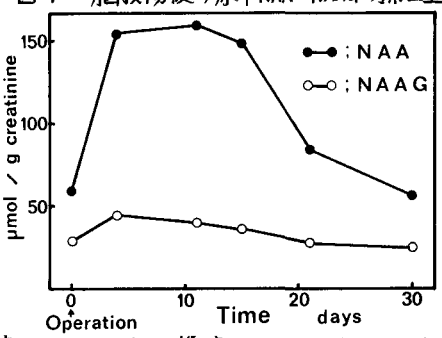
図6　精神・神経疾患患者の尿中NAAGの排泄量（15歳以下）



<考察>

尿中に排泄されるNAAやNAAGは、次の理由から、主として中枢神経系に由来すると考えられる。(i) NAAやNAAGは、中枢神経系に高濃度で局在するが、非神経組織では存在しないか或いは極めて微量しか存在しない。[2)3)4)5)] (ii) 脳以外の組織のスライスは、NAAを取り込み、分解できるが、合成出来ない。[6)] (iii) 腹腔内或いは脳内に投与されたNAAの一部は、尿中へ排泄される。[7)] (iv) 我々も、ヒト脳脊髄液中でNAAやNAAGを検出している。

図7　脳損傷後の尿中NAAとNAAGの排泄量



そこで、脳内の病態の化学的診断の一助とすることが可能かどうか。或いはNAAやNAAGの尿中での変化から逆に脳での生理学的役割の手掛りを得れないかと考え、精神・神経疾患患者尿でNAAやNAAGの定量を行ない、尿中への排泄量の変化を調べた。

脳血管障害・脳性麻痺・躁うつ病の躁期で尿中NAAが増加する場合がある。例数が少ないが、腎臓・肝臓・その他の臓器の疾患、即ち末梢組織での代謝機能の低下が予想される場合でも、尿中排泄量は変わらないので、尿中NAAの増加の原因は、脳にあると考えられ、その機序としては、脳出血などでは、神経細胞の壊死・脳血液関門の透過性の変化が考えられる。

今後症例を増し、経過を追って定量し、症状や治療との関連も明らかにする必要があろうし、尿中での増加の機序を明らかにするために、動物実験も行なう予定である。

<文献>

1) 三宅ら（1978） 生化学，50，956，2) 森野ら（1980） 神経化学，19，322-325 3) Miyake,M., et al.(1981), J.Neurochem., 36, 804-810, 4) Tallan,H., et al. (1956) J.Biol.Chem., 219, 259-264, 5) Miyamoto,E., et al. (1966) J.Neurochem., 13, 999-1003, 6) Benuck,M., et al. (1968) Biochim.Biophys.Acta, 152, 611-618, 7) Berlinguet,L., et al. (1966) Can.J.Biochem. 44, 783-789

4 初老期・老年期痴呆における脳蛋白の変化(V)
— 神経原線維変化の構成蛋白について —

多田國利・播口之朗・武田雅俊
尾崎　哲・窪田耕輔・西村　健
(阪大・医・精神)

〔要　約〕

アルツハイマー病や老年痴呆患者の脳から病的なneurofibrilを分離し，その構成蛋白の分析を行った。

1)痴呆患者の脳ミエリン層から、axon内の病理的なneurofibrilであるneurofilament様neurofibril(A-NF)を蔗糖密度勾配法により分離精製した。A-NFはSDS濃度勾配ポリアクリルアミドゲル電気泳動(PAAE)で5種の蛋白に分かれる(分子量はa:54000, b:41000, c:36000, d:32000, e:30000)。　2)痴呆患者大脳皮質の水不溶性画分から、神経細胞体内神経原線維変化(B-NF)を多量に含む分画を蔗糖密度勾配法により分離精製した。この分画をThioflavin-S染色し、螢光顕微鏡下で個々の神経原線維変化を採集した。B-NFはSDS濃度勾配PAAEで分子量f:62000, g:59000, h:54000の3種の蛋白に分離した。バンドhはA-NFのバンドaと同一の移動度を示した。　3)バンドa蛋白は抗人脳tubulin血清と反応し、バンドb蛋白は抗ニワトリ筋actin血清と反応した。またバンドcは抗ヒト50P血清と反応した。また、A-NFのバンドaとB-NFのバンドhの電気泳動上の移動度の一致から、tubulinがB-NFの主要構成蛋白となっていることが示唆された。

Key words：　neurofibrillary change,　Alzheimer's disease,　microtubule

われわれは、これまでに初老期痴呆に属するアルツハイマー病や老年痴呆における脳蛋白の変化を調べてきた。これらの疾患の脳では水溶性蛋白の溶解性が著明に低下していることを示し、その変化が神経原線維変化や老人斑などの病理学的変化に対応するものである可能性を示唆した。

これらの疾患の神経組織では、神経原線維(neurofibril)は形態的に2種に分類されており、一方は神経細胞体内にあるneurofibril(twisted tubuleから成る神経原線維変化)であり、他方は軸索内にあるneurofilament様neurofibrilである。今回は、これらの線維構造をそれぞれ別個に分離精製する方法を考案して、その構成蛋白を明らかにし、一部の構成蛋白を同定した成績を報告する。

材料と方法

a)材料：患者材料は死後剖検時に採取され、対照人脳は司法解剖に際して得られた。b)ポリアクリルアミドゲル電気泳動(PAAE)：SDS濃度勾配PAAEには、Pharmacia製GE-4電気泳動装置及びgradient gel PAA%を使用した。c)線維性蛋白の分離精製：neuro tubule蛋白はShelanski[5]らの方法で凍死人脳皮質，モルモット脳より粗精製し、Jameson[3]らの方法でtubulin dimerを分離精製した。neuro filament蛋白はShelanskiら[6]の方法に従い、凍死人脳白質から精製した。このneuro filament蛋白は6M urea-0.2% SDS-5%PAAE上で6本の主バンドに分離される。(図2)それぞれのバンドの分子量は、200K, 160K, 68K, 55K, 50K, 20Kである。Coomassie brilliant blue Rで染色した各バンドを切り

出し、1% SDSを含む 0.01M Phosphate bufferでゲル中の蛋白を抽出した。actinは Regenstein ら[4]の方法でニワトリ骨格筋から精製した。d）抗血清の作成：分離精製した上記の蛋白を家兎に注射し、それぞれの抗血清を得た。

結果

1）軸索内 neuro filament 様 neurofibril（以下 A-NF と略す）の構成蛋白：図1に示すようにAlzheimer病あるいは老年痴呆患者の大脳白質から蔗糖密度勾配法で、まずミエリン画分（F1）を分離し、さらに分画遠沈を繰返すと、F1・3・2に細かい線維状の画分が得られる。[2] この線維は電顕で観察すると、径10 nmの neuro filament 様の細線維で構成されている。この画分の精製度は高いが、僅かに破砕膜や無構造の顆粒が混在している。この線維性画分（F1·3·2）は Alzheimer 病と老年痴呆の脳からは多量に得られるのに対して、対照脳からは痕跡程度にしか得られない。従って F1·3·2 は Alzheimer病や老年痴呆の軸索内の neuro filament様 neurofibril（A-NF）を集めたものと考えられる。

次に、精製された A-NF を構成する蛋白をSDS濃度勾配PAAEで分析すると、図2に模式的に示すように、A-NFは5本のバンドに分れる。これらのバンドの分子量を泳動距離から概算すると、a：54000, b：41000, c：36000, d：32000, e：30000である。5本のバンドの量比は概ね a：b：c：d：e＝8：13：2：1：4でありバンドaとバンドb蛋白の含量が多い。以上の結果は Alzheimer 病，老年痴呆の A-NF が単一の蛋白 subunit のみから成るものではなく、複数の蛋白により構成されていることを示している。

2）神経細胞体内の神経原線維変化（B-NF）の分離精製と構成蛋白：すでに報告した

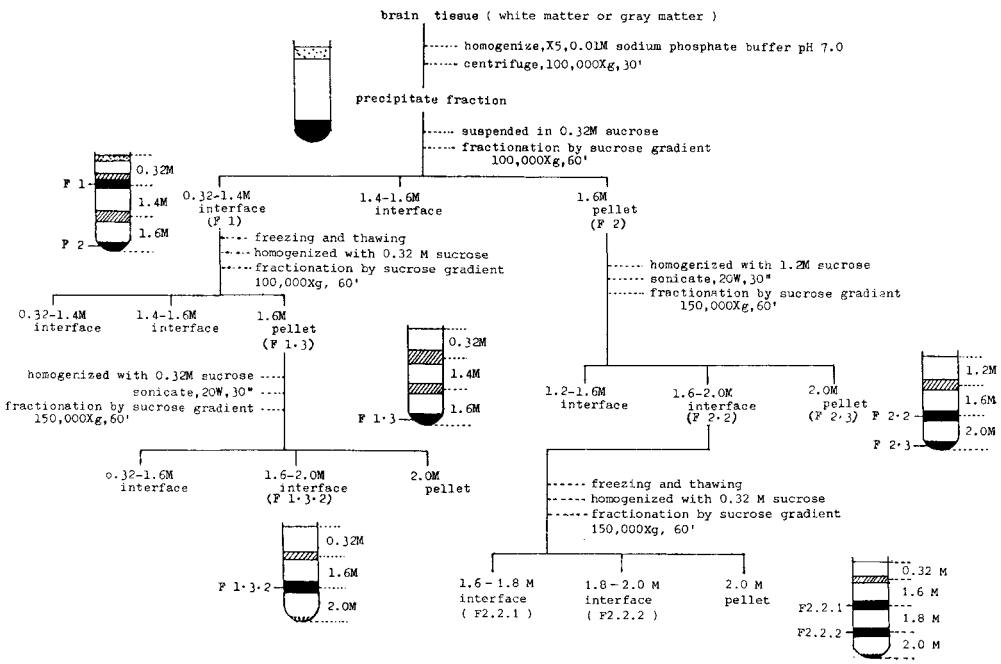


Fig.1 Fractionation procedure

ように[1),(2)]、Alzheimer病あるいは老年痴呆患者の大脳皮質の水不溶性画分を蔗糖密度勾配法により分画遠沈すると,F2・2（図1）に twisted tubule richな画分が得られる。しかし、F2・2には、なお神経細胞、astroglia，小顆粒などが含まれている。そこで今回は、このF2・2をさらに精製しB-NFを単離する方法を考案した。F2・2を蔗糖密度勾配法でさらに分画すると、1.8～2.0M interface（F2・2・2）に多量のB-NFと極く少量の小顆粒や細線維断片より成る画分が得られる。1.6～1.8M interface（F2・2・1）には神経細胞，astroglia，細線維断片，小顆粒などが観察される。分画遠沈法を用いてさらにF2・2・2を精製することは困難である。そこでF2・2・2中のB-NFをthioflavin-Sで螢光染色し、螢光顕微鏡下でマイクロマニュプレーターを用いて個々のB-NFを採集した。採集したB-NFは38980個で、この一部をSDS濃度勾配PAAEによるB-NF構成蛋白の分析に供した。図2にみられるごとく、B-NFは3本の明瞭なバンドから成っている。これら3本のバンドの分子量は、f：62000，g：59000，h：54000であり、その量比は概ねf:g:h=2:1:2である。SDS濃度勾配電気泳動上のバンドhの移動度はA-NFのバンドaと完全に一致する。バンドfとバンドgはともに対照人脳水溶性蛋白の電気泳動パターン上で認められ，水不溶性蛋白でも少量認められるバンドである。

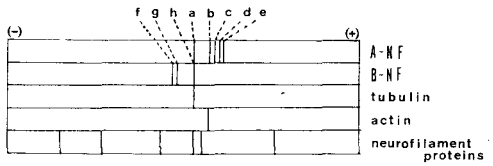


Fig.2 4-30 gradient SDS polyacrylamide gel electrophoresis

3）A-NF構成蛋白の同定：A-NFを構成する5本のバンド蛋白を同定する目的で，neurotubule蛋白、neurofilament蛋白，actinなどの線維性蛋白を分離精製し，その抗体を作成した。SDS濃度勾配PAAEで分離したA-NFの各バンドをゲルから切り出し，1％SDSを含む0.01M sodium phosphate buffer pH7.2でバンド蛋白を抽出した。この抽出蛋白と、上記の線維性蛋白抗血清との間の反応を、1％寒天ゲルを用いた免疫拡散法で検討した。バンドaは抗人neuro tubule蛋白血清および抗人tubulin dimer血清と反応し明瞭な沈降線を生じる。抗ニワトリ筋actin血清はバンドbとの間に明瞭な沈降線を生じる。neuro filament蛋白のうち分子量68000の蛋白の抗血清はいずれのバンド蛋白とも反応を示さないが、分子量50000の蛋白（50P）の抗血清はバンドCと反応し明瞭な沈降線を生じ、バンドa，d，eともかすかではあるが沈降線を生じる。以上の結果はA-NFにはtobulin，actin，およびneurofilament蛋白の一部が含まれていることを示唆している。

考　察

神経原線維変化の形成機序に関しては、この変化が線維構造を示すことから、正常神経細胞に存在する線維性構造の増生の関与が推測されてきた。特に、neurotubuleやneurofilamentは形態学的な類似性から注目され、二者択一的な成績が報告されているが、結論を得るには至っていない。今回の我々の成績によると、軸索由来のA-NF（10nm neurofibril）は、少なくとも5種の蛋白、神経細胞体由来のB-NF（twisted tubule）は少なくとも3種の蛋白から成っており、このことは神経原線維が単一の蛋白subunitによって構成されているのではなく、複数の蛋白によって構成されていることを示している。

A-NF構成蛋白のうちの主要蛋白が、tubulin, actin, 50P の抗血清と反応したという成績は、これら複数の線維性蛋白が A-NF の形成に関与している可能性を示唆している。バンドCと明瞭な沈降線を生じる抗 50P 血清は、バンドa, d, e との間にも、かすかではあるが沈降線を生ずる。50P は、neurofilament 蛋白、neurotubule蛋白、あるいは astrocytic acidic protein に由来することが推測されており、抗50P血清の交叉免疫反応は、このことを反映しているのかもしれない。現時点では、われわれのneurofilament 蛋白のうち、200Kに対する抗体が十分な力価をもっていないので、この蛋白の A-NF 形成への関与を示すことはできなかった。

B-NF は、顕微鏡下で個々に採集されたものであり、極めて高純度に精製されたといえる。3種の蛋白のうち、バンドf蛋白は少量であるため、免疫拡散法を行なえなかったが、バンドfの電気泳動上の移動度が A-NF のバンドaのそれと完全に一致することから、バンドfは、tubulin である可能性が高い。以上のことから、tubulin は、A-NF と B-NF に共通の主要構成蛋白であるといえる。

文　献

1. 播口之朗, 西村 健, 金子仁郎 (1971) 神経化学 10,51.
2. 播口之朗, 西村 健, 多田國利, 金子仁郎 (1977) 神経化学 16,149.
3. Jameson,L.,Frey,T.,Zeeberg,B.,Dalldorf,F.and Caplow,M. (1980) Biochemistry 19,2472.
4. Regenstein,J.M.and Szent-Györgyi,A.G. (1975) Biochemistry 14,917.
5. Shelanski,M.L.,Gaskin,F.,Cantor,C.R. (1973) Proc.Nat.Acad.Sci. 70,765.
6. Shelanski,M.L.,Albert,S.,De Vries,G.H.and Norton,W.T. (1971) Science 197,1242.

5 陳旧性パーキンソン病におけるNE補充療法としてのL-Threo-3,4-Dihydroxyphenylserine(L-Threo-DOPS)治療

楢村博太郎・近藤智善（順天堂大・医・脳神経内科）
林　昭・鈴木友和（阪大・医・III内）

〔要　約〕

パーキンソン病（PA）においては，脳内DA低下とDOPA治療が主として注目されてきたが，陳旧例においてはNEの低下も著しく，またその合成酵素であるDβHの低下も指摘されている。演者はNEの前駆物質であるL-threo-DOPSの投与によってNE低下を補充する治療を試みた。なお，脳内移行を促進するため末梢性脱炭酸酵素阻害剤であるCarbidopaを併用した。

本治療によって著明に改善する症状は，これまでL-DOPAその他の薬物によって全く改善の余地のなかった歩行，発語，書字等におけるすくみ現象（freezing）であり，その効果を16㎜フィルムその他によって呈示すると共に，客観的な定量的症状計測についても述べる。また他方，筋強剛，マスク様顔貌，振戦等も中等度に軽快することが認められた。このことは，PAがもっぱらDA含量低下によるものとする考え方に対し，再検討を促すものであり，PAは，むしろカテコールアミン代謝系全般にわたる障害によるものであることを示唆する。なお，このような効果を裏付けるものとしてDOPSの血中動態および髄液濃度についても述べる。

Key words：　Parkinson's disease，L-threo-DOPS，Freezing

Parkinson病（以下PA）に対しては、今日脳内DAの低下を補充する意味でのL-DOPAの持続的投与が治療の基本とされるが、数年ないし10年以上の長期経過の症例においては、L-DOPAが強剛や振戦に対しては充分の効果を示しているにもかかわらず、さらにすくみ症状freezing phenomenonが前景に出現してくることはよく知られている(4)。本症状はL-DOPAの増量によってむしろ増悪し、他の薬剤や手術的治療も全く無意味に近い。現在の薬物治療の限界を示す症状と考えられる。PAの陳旧例においては、DAの低下と共にNE含量の低下の存在することも知られており、さらにNE生合成酵素であるDopamine-β-hydroxylase（DβH）もまた著明に低下していることが永津等によって指摘されている(1)。

演者は、陳旧例にみられるこのようなすくみ現象がNE低下に対応するものと考えてNEの前駆物質であるL-threo-3,4-dihydroxyphenylserine（以下L-threo-DOPSと略す）を投与し、臨床的に著効を得たので報告する。本病におけるすくみ現象は極めて特徴的な症状であり、強剛や振戦はこれまでの治療によって殆んどみられず、また筋力の低下や麻痺、筋緊張の低下等も存在しないにもかかわらず、平面床上の歩行に全く足がふみ出せない。すくんだように床面から足をあげることができない。ことに狭い通路や入口、駅の改札口を通る時に困難は著しくなる。しかし、階段の上り下りは何ら支障なく行うことができ、正常に近いという paradoxical な症状、現象である（paradoxical akinesia）。またこの障害は中村等によって「くり返し随意運動」repetitive voluntary movement におけるリズム形成の障害として分析されている(2)。

＜症 例＞

すくみ現象は L-threo-DOPS の投与と共に改善、消失し、患者は平面床上もsmooth に歩行しうるようになる。また書字も、次第に小さくなっていく小書症 micrographia が消失して、正常に近い書字が可能となる。

1)第1例は 68才の男子。発病以来12年間の歴過をもつ陳旧 PA の症例である。左下肢の歩行障害に初発し、2年の間に四肢に及んだ筋の強剛と軽度の振戦を主とする PA であり、L-DOPA治療、ついで（L-DOPA 100mg + Benserazide 25mg）錠を最大1日5～6錠服用することによって、その筋強剛はほとんど完全に消失したが、1年前より次第に歩行の「すくみ」が強くなり、1日数十回も家庭内で転倒するようになり、ほとんど臥床の生活を送っている症例である。

L-threo-DOPS の投与はその D-L 型 200mg 錠（したがって active な L 型は 100mg）を1日6錠を2日間、9錠を2日間、その後12錠を投与した。投与3日目頃から転倒の回数が少なくなり、歩行も大巾になって、subnormal に近い歩行が可能となり、「すくみ足」frozen gait は殆んど消失した。それと共に小書症の改善（図1）、マスク様顔貌の改善、わずかに存在した強剛と振戦の軽快、等もみられたが、他方、精神的な活発化と共に少し易怒性が昂まった。血圧の変化はほとんどみられなかった。

2)第2例は 73才の男子。PA ではなく、樋林等によってはじめて記載された pure akinesia の症例である[3]。本例には PA におけるような振戦や筋の強剛は全く認められず、筋緊張はむしろ多少低下している。また筋力の低下や麻痺、小脳症状等は全くみられない。主症状は、前症例と類似した著しいすくみ足と小書症であり、2年前に発症、次第に重度となっている。L-DOPA によってこれらの症状はむしろ増悪した。

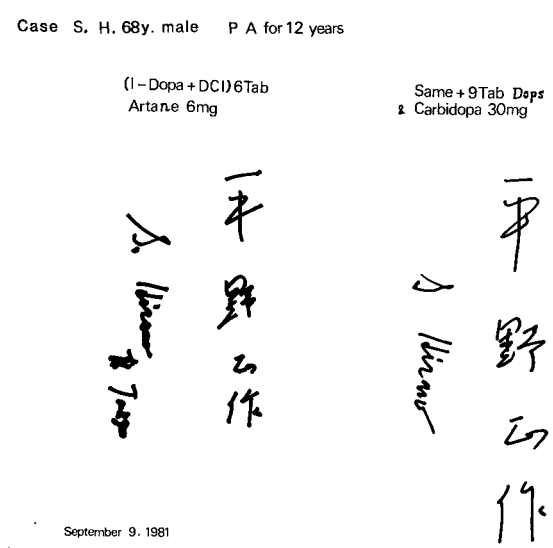


図1. 症例1における小書症の改善
(L-threo-DOPS 服用前，後)

L-threo-DOPS の投与は D-L 型で 200mg 錠を1日 6T → 9T → 12T と前症例と同じく増量し、同時に末梢性の脱炭酸酵素阻害剤である Carbidopa 60mg を投与した。12T に達した後にすくみ足は消失し、正常に近い歩行が可能となった。上記2症例の歩行の改善を 16mm フィルムによって呈示する。また上記2症例後に最近観察された1例における運動反応時間の改善を図2に示す。

＜薬理学的分析＞

上記のような臨床的改善に対応するものとして L-threo-DOPS と NE の血中動態の検索、ならびに髄液

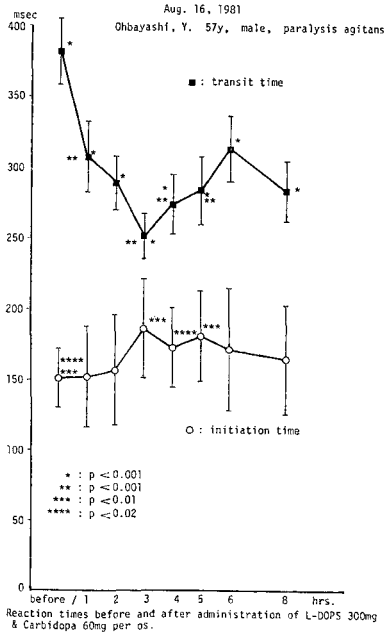


図 2. L-threo-DOPS 服用後の上肢運動の反応時間（上段）

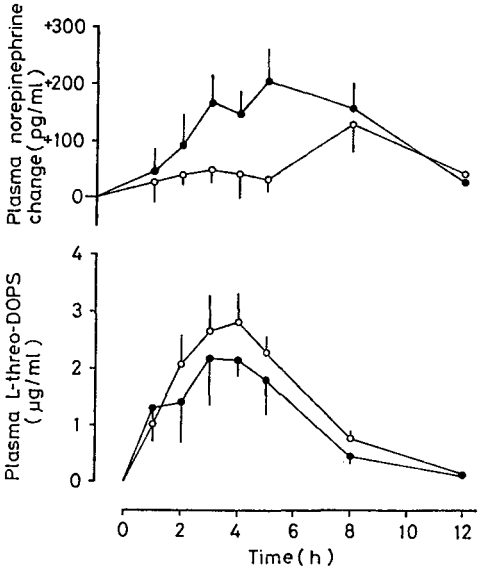


図 3. L-threo-DOPS 投与後の血中 L-threo-DOPS ならびに NE の血中動態。

○ は 末梢性脱炭酸酵素阻害剤併用時
● は L-threo-DOPS のみ

への移行が検索された。このことについては既に鈴木等によって報告されている。すなわち、L-threo-DOPS の消化管よりの吸収速度は L-DOPA よりも緩徐であるが、その吸収は良好であり、また血中での NE への転換も良好であること、さらに末梢性脱炭酸酵素阻害剤である Benserazide と併用することにより、その髄液への移行が明らかに認められる。このような代謝分析の所見は、今回呈示した2例の患者におけるものではないが、臨床的改善と対応するものと考えられる。図3は1例における L-threo-DOPS と NE の血中動態を計測したものであるが、末梢性脱炭酸酵素阻害剤である Carbidopa の併用によって NE への転換が抑制されていることが明らかである。

＜考 察＞

PA の陳旧例における主としてすくみ現象を、中枢における NE 低下に対応するものと考え、NE の前駆物質である L-threo-DOPS を投与し、上記症状に著しい効果をみた。このことは、本疾患を単に DA の代謝障害と考えてきた流れに対して、NE もまた重要であり、PA はカテコールアミン代謝系の全般にわたる障害であることを考えさせるものである。

＜文 献＞

1. Nagatsu, T., Kato, T., Nagatsu, I., Kondo, Y., Inagaki, S., Iizuka, R. and Narabayashi, H. (1979) In: Advances in Neurology, Vol. 24 (L.J. Poirier, T.L. Sourkes and P. J.

Bedard, Eds.), Raven Press, New York, pp. 283-292

2. Nakamura, R., Nagasaki, H. and Narabayashi, H. (1976) In: Advances in Parkinsonism (W. Birkmayer and O. Hornykiewicz, Eds.), Roche, Basle, pp. 258-268

3. Narabayashi, H., Imai, H., Yokochi, M., Hirayama, K. and Nakamura, R. (1976) In: Advances in Parkinsonism (W. Birkmayer and O. Hornykiewicz, Eds.), Roche, Basle, pp. 335-342

4. Narabayashi, H. (1980) J. Neural Transmis., Suppl. 16, 129-136

6　オリーブ・橋・小脳萎縮症の小脳における神経伝達物質の変化

村本　治・金澤一郎
（筑波大・臨床医系・神経内科）

〔要　約〕

3例のオリーブ・橋・小脳萎縮症(olivo-ponto-cerebellar atrophy)の剖検脳の小脳における神経伝達物質ならびにその合成酵素を測定し，対照脳と比較してその変化を検討した。Glutamate, aspartate, GABAは，低下を示す症例と変化のない症例とがあり，各症例によって変化は異なっておりPerryら[9]の報告に一致するものと思われた。Noradrenaline ならびに dopamine-β-hydroxylase 活性は，小脳以外の系の変性を伴う case 2, 3 では低下傾向であるのに対し，小脳以外の系の変化の乏しいと考えられる case 1 では逆に上昇傾向が認められ，この変化は遺伝失調マウスで報告したnoradrenaline 代謝亢進状態[7]と共通するものと思われた。Choline acetyltransferase 活性も小脳以外の系の変化を伴うcase 2,3 でのみ低下を認め，同様に，この変化には小脳以外の系の関与が推定された。

今後これらの生化学的変化と対照させて，小脳とともに小脳以外の系の変性をも病理組織学的に検索し，これらの変化の意義を検討していく予定である。

Key words : Olivo-ponto-cerebellar atrophy, Neurotransmitter, Cerebellum

〔はじめに〕

Parkinson病，Huntington病などに比べると脊髄小脳変性症 (spinocerebellar degeneration 以下 SCD)の神経伝達物質の変化に関する研究は少なく，僅かにPerryらのアミノ酸伝達物質に関する研究[8,9]があるに過ぎない。一方著者らは，従来ヒト小脳失調症のモデル動物と考えられている Rolling mouse Nagoyaを始めとする遺伝失調マウスの神経伝達物質の研究を行ない[6,7]小脳のアミノ酸伝達物質の変化やcatecholamine(CA)系の変化について報告してきた。特に失調

Summary of Clinical and Pathological Data

	Age (years)	Sex	Pathological diagnosis	Duration of illness (years)	Time interval from death to autopsy(h)
SCD patients					
case 1	46	F	Olivo-ponto-cerebellar atrophy (OPCA)	4	11
case 2	54	M	Multisystem atrophy—OPCA	6	1.6
case 3	63	M	Multisystem atrophy—OPCA + Striatonigral degeneration	9	3
Control patients					
	44	M	Pulmonary carcinoma		1
	70	F	Gastric carcinoma		2
	73	M	Pulmonary carcinoma		1.5
	45	M	Gastrointestinal bleeding		12
	76	M	Peritonitis		2
	66	M	Urinary bladder carcinoma		1.5

マウスの小脳を主とするnoradrenaline(NA)の代謝亢進状態[7]については，近年SCDの治療薬として用いられつつあるTRHの作用機序との関連で注目されており，TRHがこの小脳におけるNA代謝異常を是正するという仮説が出されている。[4] しかしヒトのSCDにおいても同様なNA代謝異常がそもそも存在するか否かについては，従来知見は得られていないのが実情である。

本研究では3例のolivo-ponto-cerebellar atrophy(以下OPCA)の剖検脳における主要な神経伝達物質ないしその合成酵素を測定して対照脳と比較し，未開拓のSCDにおける神経伝達物質の解明のいとぐちを示すことを目的とした。なお本研究は現在進行中であり，今回は小脳の結果を主として発表したい。

[[材料と方法]]

症例：検索した3例の臨床，病理の概要はTableに示す通りである。いずれも孤発型OPCAの範疇に入るが，case 2, 3はmultisystem atrophyの病理診断がついており，病変は錐体外路系の一部にも及んでいる。なおこれらの病理組織学的な詳細な検討は現在進行中である。対照脳はTableに示す通りの6例の非神経疾患患者である。

脳の切り出し：-80°Cで保存してあった半切脳から小脳のanterior vermis(central lobule & culmen), posterior vermis(uvula & nodule), hemisphere(水平裂の直上，正中より約2cm外側)と大脳のfrontal cortexをcold box内で切り出した。

アミノ酸定量：Graham & Aprison[2]の螢光法によった。

NA定量：別に報告した方法[7]によりアルミナ抽出後，電気化学的検出器付高速液体クロマトグラフィーで定量した。

Dopamine-β-hydroxylase(DBH)活性測定：Kato et al[3]の二波長分光法によった。

Choline acetyltransferase(CAT)活性測定：Fonnumの方法[1]によった。

蛋白定量：Lowry et al[5]の方法によった。

Fig 1 Glutamate concentration (mM)

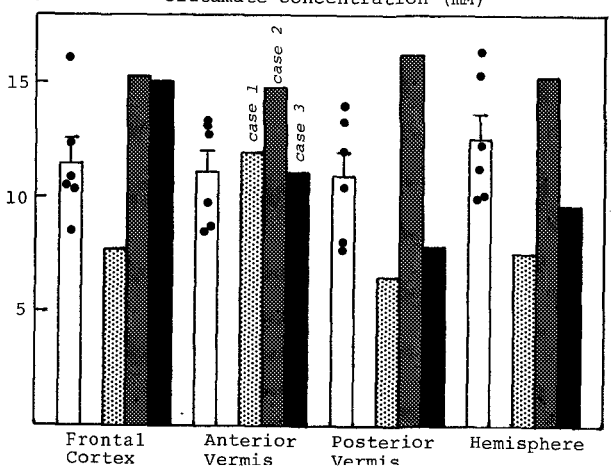
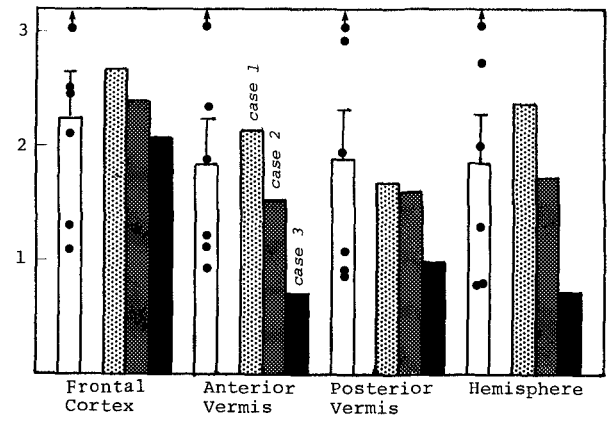


Fig 2 Aspartate concentration (mM)



[[結　果]]

アミノ酸：Glutamate(Glu)はcase 1,3のposterior vermisとhemisphereにおいて，またcase 1のfrontal cortexで低下傾向が認められた(Fig 1)。Aspartate(Asp)はcase 3のみで小脳のすべての部位で低下が明らかであった(Fig 2)。一方gamma-aminobutyric acid(GABA)はcase 3のanterior vermisとpos-

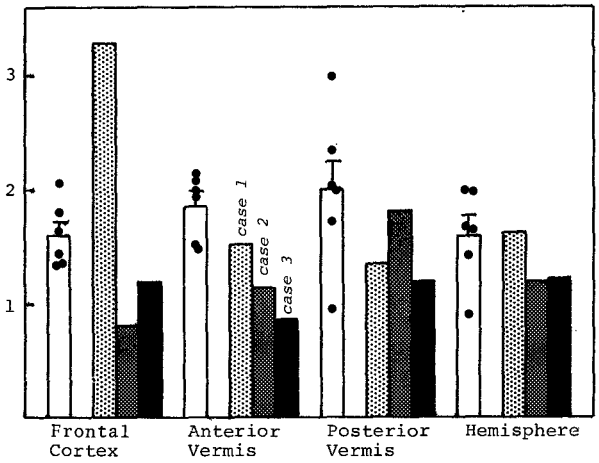
terior vermisで, case 2のfrontal cortex と anterior vermisで軽度の減少を示し, case 1のfrontal cortex では上昇を示した(Fig 3)。

NA(Fig 4): Frontal cortex のNA濃度は3例とも低下傾向を示した。小脳ではcase 3がすべての部位で低下傾向を示したのに対し, case 2ではposterior vermis でのみ軽度の低下を示し, 一方 case 1の小脳では著変は見られなかった。

DBH活性(Fig 5) :case 1 ではfrontal cortex および小脳のすべての部位で上昇傾向が見られたが, 一方case 2,3 ではこれと対照的にすべての部位で低下傾向が見られた。

CAT活性 (Fig 6) :case 2,3 ではfrontal cortex および小脳のすべての部位において低下傾向が見られたのに対し, case 1 ではfrontal cortexで上昇傾向が見られ, 他の部位では著変がなかった。

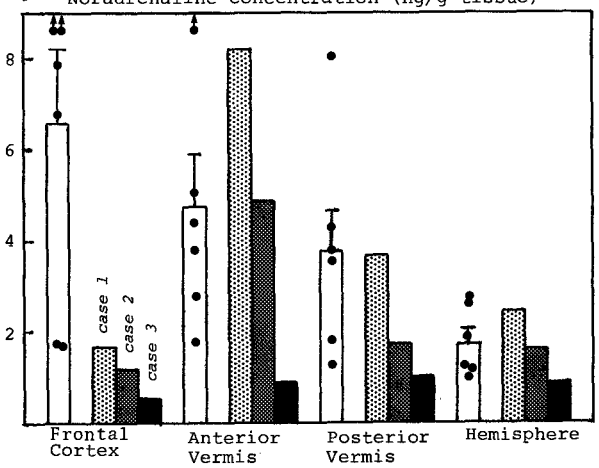
Fig 3 Gamma-aminobutyric acid concentration (mM)



[[考　察]]

アミノ酸伝達物質について: case 1 では小脳の一部でGlu が減少していたが Aspは変化なく, GABAも低値傾向にはあるが明らかな変化とは言い難い。case 2はGluはすべての部位でむしろ上昇傾向にあり, Aspには変化なくGABAは軽度の低値傾向を認めた。一方case 3ではGluとGABAは小脳の一部で低値を示し, Aspは各部位で明らかな低値を認めた。ヒト剖検脳のアミノ酸の死後変化についてはGluは変化せず, Aspは4時間まで変化なくそれ以後上昇し, GABAは2時間まで上昇した後120時間は変化がないといわれている[9]。このことを今回の結果と照合してみると, case 1でAspが全般的に高目であったり, frontal cortexでGABAが高値であることの一部に死後変化の差が関与していることも考えられる。しかしPerryら[9]によれば同じ遺伝性のOPCAであってもAspやGluが減少するものもしないものもあり, 生化学的な変化によっていくつかのtypeに分けられるという。これによれば我々のcase 2はAspもGluも減少しないtypeであり, case 3は両者が減少するtype, case 1はその中間となるであろう。このようなアミノ酸伝達物質の変化の多様性が病理学的な変化の何に対応するのかは, 病理組織学と対応させた今後の検討が必要であろう。

Fig 4 Noradrenaline concentration (ng/g tissue)



CA系について: 前述の通り遺伝失調マウスで報告したNA代謝異常やTRHの失調症状への作用機序から注目されるCA系については, case 1ではDBH活性は全般的に上昇傾向にあり, NA自体もanterior vermisで上昇傾向にあり, NA代謝の亢進を示す遺伝失調マウスと共通の変化のように見える。しかしcase 2,3ではDBH活性は全

般的に低値であり，NA自体もcase 3では全般的に，case 2では部分的に低下しており全く逆の変化のように見える。この違いに関してはcase 1が錐体外路系や脳幹部CA含有細胞に著変のないOPCAであるのに対し，case 2,3はこれらにも病変を伴うmultisystem atrophyに属する症例である点が最も関係していると思われる。case 1で示された結果は，CA含有細胞に変化のこないOPCA症例では遺伝失調マウスと同様のCA代謝異常が存在している可能性のあることを示唆していると言えよう。なおfrontal cortexでは3例ともNAの著明な低下を認めているが，この意義については大脳皮質の組織学的変化や，臨床的な痴呆状態の存在と関連させて検討していきたい。

CATについて：小脳のコリン作働系ニューロンについては苔状線維の少なくとも一部には存在するといわれるが詳細は明らかではない。今回のCAT測定の結果をみるとDBHと同様，case 1と2,3とではかなりはっきりした違いがあり，前者ではほぼ正常範囲内であるのに対し後者では全般的な低下を示している。この意義づけについても病理組織学と対照させた今後の検討が必要だが，CA系の場合と同様，case 2,3における"小脳外"の病変が何らかの関連を有していることが想像される。

Fig 5 Dopamine-beta-hydroxylase activity (nmoles/g tissue/h)

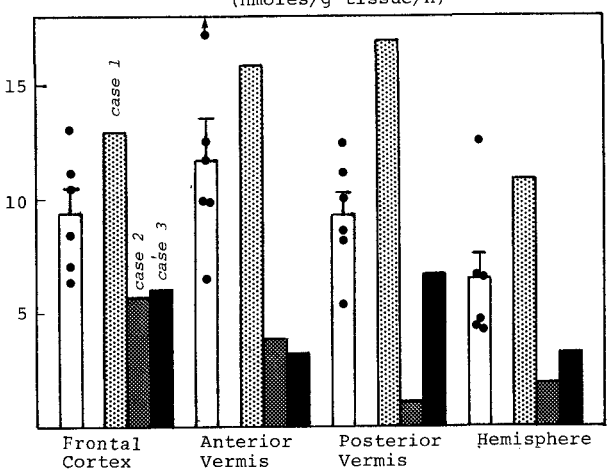
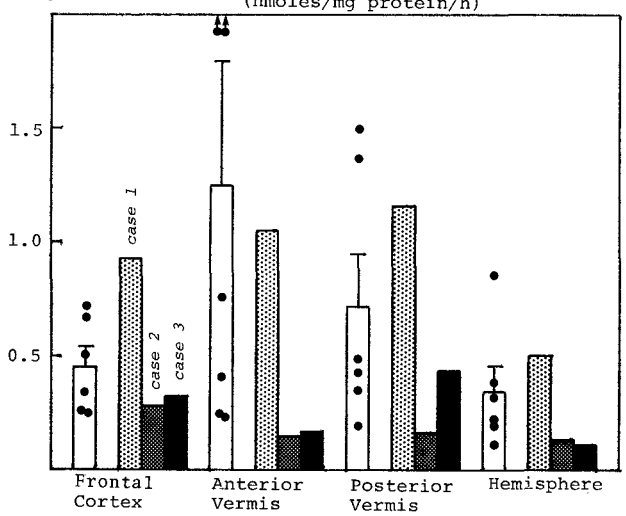


Fig 6 Choline acetyltransferase activity (nmoles/mg protein/h)



[謝辞] Case 2,3は国立療養所東京病院神経内科，栗崎博司先生，郭伸先生の御好意により検索させて頂いた。またcontrol脳は筑波大学病理学，小形岳三郎先生の御好意により提供頂いたものである。これらの諸先生に深謝申し上げる。

[[文　献]]

1) Fonnum, F. (1975) J. Neurochem. 24 407-409.
2) Graham, L.T. & Aprison, M.H. (1966) Analyt. Biochem. 15 487-497.
3) Kato, T., Wakui, Y., Nagatsu, T. & Ohnishi, T. (1978) Biochem. Pharmacol. 27 829-831.
4) 小長谷正明，島柳晢也，室賀辰夫，足立皓芳，祖父江逸郎 (1980) 臨床神経 20 181－188.
5) Lowry, O., Rosebrough, N., Farr, A. & Randall, R. (1951) J. Biol. Chem. 193 265-275.
6) Muramoto, O., Kanazawa, T. & Ando, K. (1981) Brain Res. 215 295-304.
7) Muramoto, O., Ando, K. & Kanazawa, I. (1981) Brain Res. (in press)
8) Perry, T.L., Currier, R.D., Hansen, S. & MacLean, J. (1977) Neurology 27 257-261.
9) Perry, T.L., Kish, S.J., Hansen, S. & Currier, R.D. (1981) Neurology 31 237-242.

7　重水素標識アミノ酸を用いた in vivo の代謝変化の研究

鈴木恵美子・林　時司・成瀬　浩（国立神経センター）
高橋　良（長崎大・医・精神）

〔要　約〕

ヒトにおいてアミノ酸の代謝の変化と，脳の精神機能変化の関係が問題になっているがこの点の研究のためには，*in vivo* のアミノ酸代謝回転の研究が必要である。このために，われわれは，安定同位体標識物質を用いた分析方法をとりあげ，アミノ酸およびその関連物質の生体内代謝の研究を行なっている。

安定同位体標識アミノ酸を用いて，ヒトのアミノ酸代謝動態を分析したのは*Curtius*らが最初であるが，彼らは多量のアミノ酸を用いたため，アミノ酸濃度を変化させ，代謝動態を変えてしまっている。そこでわれわれは，ごく少量の重水素標識*Phe*を用い，*PKU*および高*Phe*血症患者の*Phe*，*Tyr*の代謝回転を分析し，古典的PKUにおいても*Phe*代謝の不均一性があることを見出した。

さらに，この分析法を躁うつ病患者の臨床生化学的研究法に応用し，多くの内因性うつ病と神経症性うつ病患者に*Tyr*の代謝回転の著明な低下を見出した。しかし一部の患者にはこの所見が見られなかった。目下この点をより詳しく分析するために，重水素標識*Tyr*，重水素標識*Try*を用いた分析法の研究を開始しており，これらについても概要を報告する。

Key words：　stable isotope,　hyperphenylalaninemia,　depression

新生児マススクリーニングの普及に伴い，古典的PKUの他に高*Phe*血症といわれる疾患が発見されている。高*Phe*血症の一部はプテリジン代謝異常であり，一部は*Phe*水酸化酵素の不完全欠損によるが，これらの区別は必ずしも容易ではない。近年，*Curtius*らにより重水素標識*Phe*を用い，*Phe*水酸化酵素の*in vivo*の活性を測定する方法が考案された。そこで，われわれも高*Phe*血症の鑑別のために彼らの方法を改良し，わが国の新生児スクリーニングに導入することを志した。こうして重水素標識*Phe*を用いて*Phe*，*Tyr*の*in vivo*での代謝回転を測定することにより，古典的*PKU*も*Phe*代謝からすると均一でないことを見い出した。

また，この方法は高*Phe*血症以外の疾患の研究にも役立つことを知り，まず躁うつ病の臨床生化学的研究に応用した。そして，うつ病患者において*Tyr*代謝に異常を示す群と示さない群とが存在することを発見した。*Tyr*代謝に異常を示した群に関しては，カテコールアミン異常の可能性があるため重水素標識*Tyr*の投与研究を開始し，異常を示さなかった群に関しては，セロトニン異常を考え重水素標識*Try*の投与研究を開始した。

安定同位体標識物質を用いた*in vivo*の代謝研究は，臨床神経化学の一分野として重要な方法であると考え，われわれの研究の概要を報告する。

〔対象と方法〕

1．重水素標識アミノ酸の合成方法

L-[2,3,4,5,6-d]Phenylalanine (Phe-d5)は，*Matthews*らの方法を改良し，

合成した（交換率98.6%）。L-[2,3,5,6,-d]Tyrosine（Tyr-d4）は，猪久ら[6]の方法により合成した（交換率94.6%）。L-[2,4,5,6,7-d]Tryptophan（Try-d5）は，Matthewsらの方法により合成した（交換率94.0%）。

2．対象および採血条件

高Phe血症状態の患者：高Phe血症およびPKUと診断された患者11名と対照として同年代の他疾患者1名について検討した。午前11時に，Phe-d5を5mg/kg（特殊例のみ30mg/kg）服用させ，30′，60′後（特殊例は30′，60′，90′，120′後）に採血した。

躁うつ病患者：内因性単極型うつ病患者8名，神経症性うつ病患者1名，躁病患者2名の合計11名と対照としてうつ状態の自律神経失調症患者1名，分裂病患者1名，健康成人6名について検討した。午前11時に，Phe-d5を5mg/kg服用させ，10′～150′後まで必要に応じ採血した。

3．前処理および誘導体化法[5]

血しょう0.5mlをTCAにて除蛋白後，上清をpH3.0に調整しDowex 50W×2（200～400mesh，H^+型）のカラム（8mmφ×50mm）に添加し，2.5mMピリジン・ギ酸緩衝液（pH3.0）60mlにて洗浄した。Phe，Tyrの画分はpH4.5の同緩衝液40mlにて流出させ，Phe，Tyr，Tryの画分はpH4.5の同緩衝液50mlにて流出させた。この流出液の半量を減圧乾固後反応管に移し，アセトニトリル，トリフルオロ酢水酢酸，ジアゾメタンを用いてTFA-methyl Esterとした。

4．分析条件

Finniganの四重極質量分析計4000型を用いて分析した。EI法，CI法（メタン，イソブタン）を用いた分析の比較検討を行ない，擬分子イオンピークが最も強くフラグメンテーションも少ないCI法（イソブタン）を用いたSelected Ion Monitoringを行なった。イオン源温度は200°C，イオン化電圧は100eV，印加電圧は1500V，イオン源圧は0.15 torrに設定した。カラムは3% OV-17 on Gas Chrom Q（80～100mesh）を充てんした2mmφ×1.5mのガラスカラムを使用し，注入口および検出部の温度は240°C，Phe，Tyrの分析時のカラム温度は160°C，Tryの分析には215°Cに設定した。キャリアガスにはHeを用い，流量は15ml/minにて分析を行なった。

〔結果と考察〕

1．Phe-d5投与実験

Curtiusらは，Phe-d5を100mg/kg投与し，血中のPhe濃度を変化させてしまっている。われわれの場合は，5mg/kgであり血中のPheの濃度の変化はなく，生体内の代謝回転を正確に把握し得たものと思われる。Phe-d5およびそれから生成されたTyr-d4の推移を追うために，重水素をもたないPhe（Phe-d0）とTyr（Tyr-d0）との比を求めた。Phe，Tyrの濃度と上記の比

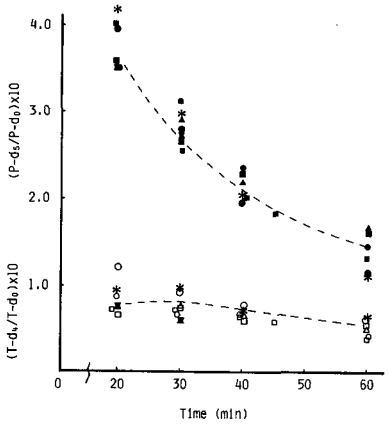


Fig. 1 Changes of Phe-d_5 and Tyr-d_4 in the control group

からPhe-d_5, Tyr-d_4の絶対量を計算し，またそれらの減少曲線からPhe，Tyrのhalf life timeを計算した。

Fig. 1に対照群（健康成人）にPhe-d_5を与えた時のPhe-d_5, Tyr-d_4の変動を示した。この群ではPheのhalf life timeは30'～50'(平均35')，Tyrは35'～75'(平均53')であった。30'以後のPhe-d_5/Phe-d_0, Tyr-d_4/Tyr-d_0の比は各アミノ酸の減少率と言えよう。

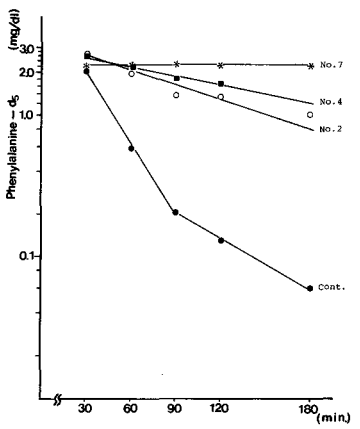


Fig. 2 Disappearance rate of Phe-d_5 in PKU patients

10名のPKUおよび臨床的に高Phe血症を疑われた1名の患者に，Phe-d_5を投与した。高Phe血症を疑われた1名も30'～60'でPhe-d_5の減少が全くなく，Tyr-d_4も生成されていないのでPKUと判断された。

他のPKU 7名は30'～60'でPhe-d_5の減少がなく，Tyr-d_4の生成もなかった[5]。しかし3名は臨床的には古典的PKUと診断されており，Tyr-d_4の生成がないにもかかわらず30'～60'でPhe-d_5の減少が確認された。Fig. 2には，上に示した典型的PKU (No. 7)，Phe-d_5の減少を示した2例(No. 2, No. 4)，対照児のPhe-d_5の絶対量の減少カーブを示した。これから計算したhalf life timeは，No. 7で3時間以上であるのに対し，No. 2では112'，No. 4で160'，対照児で48'であった。臨床的には問題のないPKUでも，Phe代謝からみると少なくとも2群に分けうることが証明された。目下この詳細について検討中である。

躁うつ病患者11名にPhe-d_5を投与し，その代謝回転を追った。内因性単極型うつ病患者8名において，Tyrの代謝回転の著明な低下を示した群（6名，A群と称す）と全く代謝回転に異常を示さない群（2名，B群と称す）とに別かれた。神経症性うつ病患者1名はA群に属し，躁病患者2名ではPhe，Tyrの代謝回転の異常はみられなかった。Fig. 3にA群の7名の患者のPhe-d_5, Tyr-d_4の変化を示した。図中のD1～6は内因性単極型うつ病，D7は神経症性うつ病患者である。Phe-d_5の変化は対照と有意な差はないが，Tyr-d_4については有意な差がありTyrの代謝回転の著明な低下を示している。この患者7名のTyrのhalf life timeは，150', 155', 162', 168', 200', 300', 300'以上と対照に比べ著明に延長している。この中の2名については，治療前，治療中，治療後にPhe-d_5投与を行なった。1例は162'→72'→40'，他の1例は300'→50'であり，症状の改善に伴いhalf life timeの変化がみられた。なお，内因性単極型うつ病のA, B両群の間には臨床的な差はみられていない[6]。

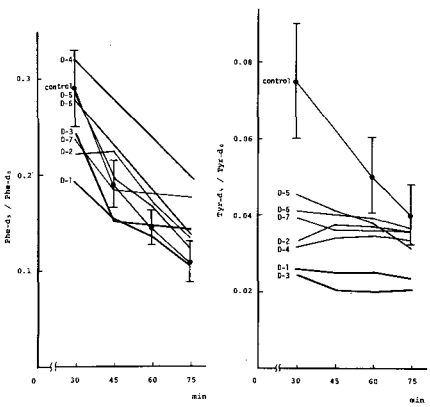


Fig. 3 Changes of Phe-d_5 and Tyr-d_4 in A group of depressive patients

A群においてはTyrの代謝障害が考えられ，こ

れはカテコールアミン合成と関連があるかもしれない。この点を解明するためにTyr-d4を合成し，うつ病患者のTyr代謝についての分析を行なっている。また，うつ病患者はTryの異常を示すという報告も多いので，Try-d5を合成し，うつ病患者におけるTryの代謝分析も行なう予定である。

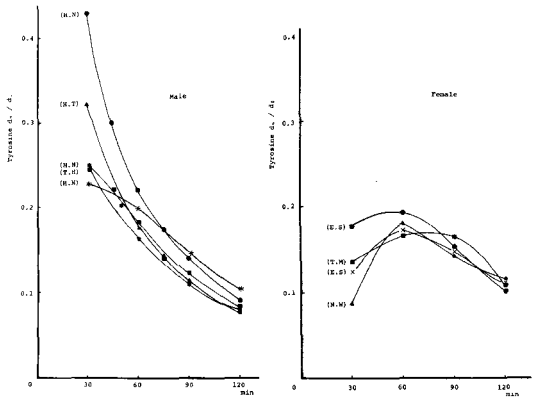


Fig. 4 Changes of Tyr-d_4 in the control group

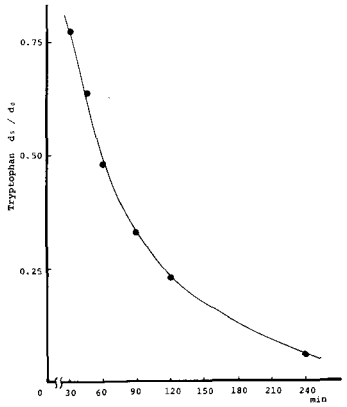


Fig. 5 Change of Try-d_5 in a adult control

2. Tyr-d4, Try-d5投与実験

Fig.4には，対照群にTyr-d4を投与した時のTyr-d4の推移を示した。男性においてはPhe-d5投与時の推移とほぼ同じであるが，女性では明らかに異なっている。このような性差がどのような原因に由来するかは不明である。しかし，アミン代謝には性差のあることが知られており，Tyr代謝にも性差のみられたことは興味深い。現在，Tyrの他にカテコールアミンあるいはその代謝産物についても，代謝回転を測定するため，負イオン化学イオン化質量分析法を用いた分析方法を検討中である[2)]。

Fig.5は，健康成人にTry-d5を投与した時のTry-d5の推移を示したものである。Try-d5とPhe-d5は同時投与が可能であることがわかった。目下セロトニンあるいはその代謝産物の代謝回転の測定法についても検討中である。うつ病患者にTyr-d4, Try-d5を投与した時の結果は分析中であり，会場で報告する。

〔謝辞〕

PKU患児の試料を供与いただいた熊本大学小児科 松田一郎教授に深謝致します。なおこの研究の一部は医用マス研究会，New Vistas in Depression，日本生物学的精神医学研究会に報告予定である。

〔文献〕

1. Curtius, H. Ch. et al. (1977) Helv. Paediat. Acta, 32, 461-469.
2. 林 時司 他 (1981) 医用マス研究会講演集
3. Matthews, H. R. et al. (1977) Bioch. Biophy. Acta, 496, 1-13.
4. Naruse, H. et al. (1981) New Vistas in Depression (in press).
5. 鈴木恵美子 他 (1981) 医用マス研究会講演集
6. Tokuhisa, S. et al. (1980) J. Nutr. Sci. Vitaminol., 26, 77-85.

8　うつ病における5 HTPresponderの研究
— うつ病患者に対するL-5HTPester点滴静注時の精神症状と血中パラメーター —

大島直和・金子元久・沼田吉彦・星野仁彦
山本俊昭・渡辺　厚・渡辺　実・熊代　永
（福島県立医・神経精神）

〔要　約〕

うつ病における5HTP（5-hydroxytryptophan）responderの特徴を知るため，うつ病患者12例，正常成人16例を対象にして，5HTP esterを負荷投与し，精神症状や血中パラメーターの変化などを検討した。5HTPesterの投与方法は，benserazideを前投与後5HTPester 2mg/kgを点滴静注し，血中5HT，prolactinなどを測定した。つぎに，うつ病患者では，負荷テスト終了後より5HTP 150mgとbenserazide 180mgを2週間経口投与し，臨床的な改善のみられたresponderと改善のみられなかったnon responderとに分け，retrospectiveに負荷試験の結果を比較し，次の結果を得た。①うつ病患者に5HTPを2週間経口投与した場合のresponderは8例であり，non responderは4例であった。②5HTPester静注により，正常群とnon responderでは気分の昂揚が認められたが，responderでは認められなかった。また，responderでは口腔温の上昇もみられなかった。③血中パラメーターの変化は，responderでは正常群に比し血中5HTが低値で推移し，また，non responderではProlactin分泌の遅延傾向がみられた。以上から5HTP負荷テストにおいて，5HTP療法のresponderとnon responderでは差異が見出された。

Key words：　depression, 5-hydroxytryptophan,　5HT hypothesis

L-5HTPの抗うつ抗果については，佐野[6]が内因性うつ病に対する有効性を報告して以来，うつ病の病因に関連するものとして多大の関心を集めてきた。今日におけるL-5HTPの抗うつ効果の評価は二重盲検法によってimipramineに優るとも劣らない効果が報告されている[5]が，一方，これに対する反論も多く，まだ評価は定まっていない。この不一致は，おそらくうつ病の生化学的異種性が主な理由と考えられ[3]，5HTPresponderの特徴を知ることは，うつ病の治療のみならず病態生理の面でも意義深いものと思われる。

そこでわれわれは，この5HTPresponderの特徴を明らかにするため，内因性うつ病患者に対してL-5HTPesterを点滴静注法により負荷投与し，この時の精神症状の変化や血中パラメーターの変化などを検討したので報告する。

〈対象と方法〉

まず，基礎的研究として本学男子学生8名（平均22歳）に5HTPesterを点滴静注してその効果をみた。5HTPesterの投与方法は，前日夜より被験者は絶対安静とし，当日まず午前8時に，5HTPの中枢作用の増強と末梢性の副作用の防止を目的として，末梢性脱炭酸酵素阻害剤benserazide（Ro4-4602）60mgを経口投与した。つぎに，午前8時30分よりRinger液250mlに溶解したL-5HTPester（Ro3-5940）2mg/kgを1時間かけて点滴静注法により投与した。5HTPester投与時の精神症状ならびに自律神経症状の評価は2名の精神科医により行ない，その程度は，0=なし，1=軽度，2=中等度，3=重度，4=極めて重度の5段階評価で行なった。精神症状についてはCPRG躁病評価尺度表を参考とした。採血は肘静脈より，benserazide投与前の午前8時，5HTPester点滴静注前の8時30分，点滴終了直後の9時30分，さらにその後は1時間間隔で3時間後の12時30分まで行なった。また，

血圧，脈拍，口腔温の測定は採血と同時刻に行なった。

このような方法で，5HTPesterの効果を十分に確認し得たので，つぎに，同じ方法でうつ病患者に5HTPesterの負荷試験を行なった。うつ病患者は，表1に示すように内因性うつ病と診断された入院患者12例（男:女=5:7，年齢：18～54歳，平均42歳）である。これらの患者は今回のうつ状態に入ってからは薬物を服用していない。この正常対照群は，うつ病群の性，年齢を考慮して，医師，看護者8名を用いた。その内訳は男3例（年齢32-48歳，平均39歳），女5例（年齢23~53歳 平均38歳）である。

表1　Clinical Effects of 5HTP Treatment in Depressed Patients

No.	Name	Sex	Age	Diagnosis[1]	GSR[2]	Hamilton's Score before and after 5HTP Treatment[3]		Clinical Response to 5HTP treatment[3]
1	S.Y.	F	29	first episode	3	36	2	marked
2	M.O.	M	48	first episode	3	31	11	marked
3	S.T.	M	32	bipolar	2	27	7	marked
4	T.N.	F	45	first episode	2	25	5	marked
5	Y.K.	F	18	unipolar	2	25	8	moderate
6	H.E.	M	49	unipolar	3	34	14	moderate
7	T.T.	M	36	unipolar	2	32	16	moderate
8	K.R.	F	48	unipolar	2	26	14	moderate
9	I.H.	F	52	bipolar	3	30	23	non
10	K.I.	F	54	bipolar	3	33	27	non
11	T.S.	M	43	first episode	3	32	27	non
12	M.U.	F	48	first episode	2	25	22	non
	(M.±S.D.)		42±11			30±4	15±9	

1. Depressed patients were classified into three subtypes:unipolar depression, bipolar depression, and first episode depression.
2. GSR(General Severity Rating) was scored for 5 grades:not ill=0, slightly ill=1, moderately ill=2, severely ill=3, and very severely ill=4.
3. L-5HTP(150 mg daily) in combination with benserazide(180 mg daily) was administered orally for 2 weeks.

血中パラメーターの測定方法は，血漿遊離型tryptophan(free TRP)はAmicon製セントリフロー（CF25）を用いて透析液を得た後，Denckla ら[2]の方法で，血中5HTはYuwiler ら[7]の方法で，血漿cyclic AMP(cAMP)は中畑ら[4]のprotein binding法で，cyclic GMP(cGMP)はYamasa assay kitによりradioimmunoassay法で，また，human growth hormon(HGH)とProlactin(PRL)はダイナボット社製のRIA kitにより2抗体法radioimmunoassay法で測定した。

有意差の検定はStudentのt-検定で行なった。

うつ病患者における臨床的な5HTPresponderの判定は，本負荷テスト終了後より，5HTP療法としてL-5HTP150mgとbenserazide180mgを1日3回に分けて経口投与し，2週間後の全般改善度とHamiltonうつ病評価尺度表の得点により，著効，有効，微効および無効の4段階に分け，このうちの著効，有効例をresponderと，また，微効，無効をnon responderと判定した。そして，responderのみは，その後も退院するまで5HTPの投与を継続した。

〈結果〉

I.正常者に対する5HTPesterの基礎的研究

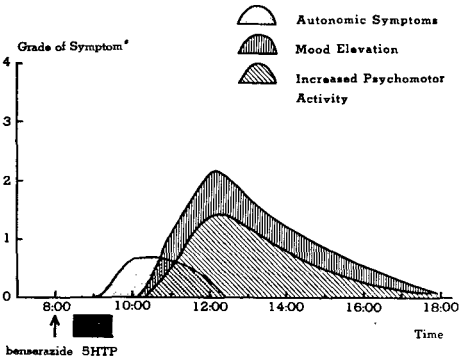
①精神症状と自律神経症状の変化：図1に示すごとく，基礎研究として学生を対象に5HTPesterを点滴静注したところ，全例に自律神経症状（頭重感，胃部圧迫感，軽度の悪心など）や気分の昂揚，精神運動の亢進などが一定の経過を示しながら認められた。とりわけ，気分の昂揚が著明で，自覚的には「爽快だ。」「愉快だ。」「可笑しい。」などと述べ，また，饒舌，多幸，浅薄な上機嫌などがみられた。

②血圧，脈拍，口腔温の変化：血圧は明らかな変化は認められなかった。脈拍は，5HTPester投与終了30分後より一過性の徐脈が認められた。口腔温は，図2(A)に示すごとく，benserazideとRinger液の投与（破線）では，点滴終了直後に上昇を示したが，これに

対して，5HTP ester投与（太い実線）では上昇は認められなかった。

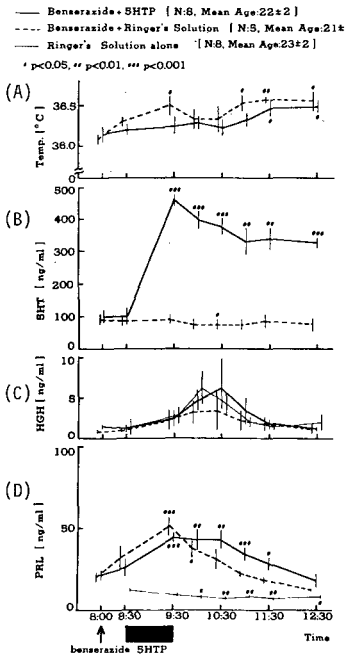
③血中パラメーターの変化：図2(B)に示すごとく，血中5HTは，5HTPester投与（太い実線）直後より著明に増加し，その後徐々に減少したが，投与終了3時間後でもなお高値を示した。また，benserazideの投与（破線）では10時30分に一過性の減少を示した。血漿PRLは，図2(D)に示すごとく，Ringer液の投与（細い実線）で減少を示した。一方，benserazideの投与（破線）により，血漿PRLは増加を示したが，これに対して，5HTPの投与（太い実線）はこの増加を持続させた。血漿cAMPは5HTPester投与終了2時間後に一過性の増加が認められた。血漿free TRP，cGMP，HGH（図2(C)）は有意な変化はみられなかった。

図1
Time Courses of Autonomic Symptoms, Mood Elevation and Increased Psychomotor Activity after Intravenous Loading Dose of 5HTP Ester in Normal Subjects
[N:8, Mean Age:22±2]



* Grade of symptoms were scored for 5 grades: non=0, slight=1, moderate=2, severe=3, and very severe=4.

図2
Changes of Oral Temperature, Blood 5HT, Plasma HGH and Plasma PRL after Intravenous Loading Dose of 5HTP Ester in Normal Subjects



Ⅱ.うつ病患者の5HTP療法における5HTPresponderの判定

表1に示すごとく，L-5HTP, benserazide 経口投与の臨床効果は著効4例，有効4例，無効4例であった。これより，著効および有効の8例をresponderと，また，無効の4例をnonresponderと判定した。

Ⅲ.うつ病患者に対する5HTPester点滴静注時の効果

①精神症状と自律神経症状の変化：図3(A)に示すごとく，正常対照群は先の基礎研究にみられた学生の結果と同様であった。つぎに，図3(B)に示すごとくnon responderでは4例中1例に自律神経症状がみられ，また，全例に対照群より程度は軽いが気分の昂揚や精神運動の亢進など抑うつ症状の改善が認められた。これに対して，図3(C)に示すresponderでは8例中3例に自律神経症状を認めたが，気分や精神運動の変化は全く認められなかった。

②血圧，脈拍，口腔温の変化：血圧，脈拍はresponder, non responderとも対照群とくらべて明らかな差異は認められなかった。口腔温は，図4(A)に示すごとく，benserazide投与前の午前8時の基準値は，対照群とくらべて，non responderでは差は認められなかったが，responderでは高値を示した。また，5HTPester投与によりnon responder（破線）では上昇を示したのに対し，responder（太い実線）では上昇は認められなかった。

③血中パラメーターの変化：図4(B)に示すごとく，血中5HTの基準値は，対照群とく

らべて，non responderでは差はみられなかったが，responderでは低値を示した。5HTPester投与後は，non responder（破線）では対照群（細い実線）と同様の変化を示したが，responder（太い実線）では低値の傾向で推移した。血漿PRLについては，図4(D)に示すごとく，午前8時の基準値は，対照群とくらべて，responderでは低値を，また，non responderでも低値の傾向を示した。

図3

Time Courses of Autonomic Symptoms, Mood Elevation and Increased Psychomotor Activity after Intravenous Loading Dose of 5HTP Ester in 5HTP Responder and Non Responder in Depressed Patients

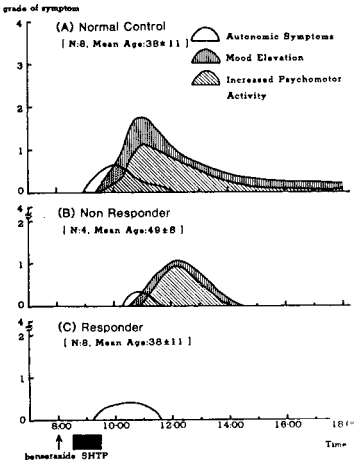
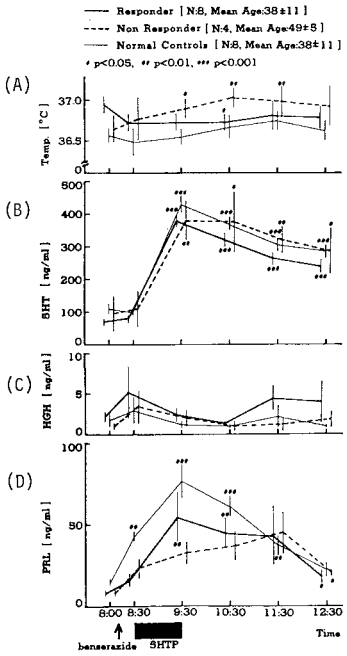


図4

Changes of Oral Temperature, Blood 5HT, Plasma HGH and Plasma PRL after Intravenous Loading Dose of 5HTP Ester in Responder and Non Responder in Depressed Patients



benseraziderと5HTPesterの投与により，responder（太い実線）は対照群（細い実線）と同様の変化を示したが，これに対して，non responder（破線）は低値で推移し，かつ，ピークは遅延していた。血漿cAMPは対照群では一過性の増加を示したが，responder，non responderでは変化は認められなかった。HGH（図4(C)）とcGMPは明らかな差異はみられなかった。

〈考察〉

L-5HTPester点滴静注により，正常群では一過性の自律神経症状と気分の昂揚や精神運動の亢進が認められた。口腔温については日内変動による上昇を抑制する効果を示した。血中パラメーターについては，血中5HTの著明な増加とPRL分泌の促進が認められ，また，血漿cAMPの一過性の増加がみられた。Puhringerらは5HTPesterによるHGH分泌の増加が気分の昂揚と相関するとしているが，そのような相関はみられなかった。

つぎに，うつ病患者に対する負荷試験では，non responderの4例のみが，正常群と同様な気分の昂揚を示したが，responderの8例ではこのような気分の昂揚は認められなかった。responderでは，正常者やnon responderとくらべて，口腔温の上昇はみられず，また，血中5HTは低値の傾向で推移した。一方，non responderでは血漿PRLが正常群に比し低値で推移し，かつ，そのピークが遅延していた。以上の結果から負荷テストとしての5HTPester点滴静注に対するresponderとnon responderの反応には明らかな差異が認められた。

本研究の一部は，昭和55年度厚生省神経疾患研究委託費（80-06-12）によった。

〈文献〉

(1) Angst,J., Woggon,B. and Schoepf,J.: Arch. Psychiat. Nervenkr., 224, 175-186 (1977)
(2) Denckla,W.D. and Dewey,H.K.: J. Lab. Clin. Med., 69, 160-169 (1967)
(3) 金子元久，新国 茂，熊代 永：臨床精神医学，8, 931-947 (1979)
(4) Nakahata,N., Numata,Y. and Oshima,N.: Radioisotopes, 27, 251-254 (1978)
(5) Puhringer,W., Wirz-Justice,A., Graw,P., Lacoste,V. and Gastpar,M.: Pharmakopsychiat., 9, 260-268 (1976)
(6) 佐野 勇：精神経誌，73, 809-815, (1971)
(7) Yuwiler,A., Plotkin,S., Geler,E. and Ritvo,E.R.: Biochem. Med., 3, 426-436 (1970)

9　脊髄小脳変性症におけるβ受容体感受性に関する研究

小山　司・岡　五百理・加沢鉄士
松原繁広・三国雅彦・山下　格
（北大・医・精神）

〔要　約〕

脊髄小脳変性症の病態ことに運動失調の発現機構を明らかにする目的で本症のβ-adrenergic receptor感受性を検索し、さらにcyclic AMP phosphodiesterase阻害剤であるphthalazinolの影響を検討した。本症25例において、adrenaline 0.2 mg皮下注後の血漿cyclic AMPの経時的変化を健常対照群と比較検討したところ、cyclic AMP上昇反応の有意な低下を認めた。病型別の検討では、脊髄小脳型でより明瞭な低下が確認された。脊髄小脳型17例において、Castroviejo keratomeを用いて作成した厚さ200 μmの表皮層をadrenaline含有Hanks' BSS中でインキュベートし、cyclic AMPの蓄積をみた検討でも同様の有意な低下が認められた。さらにphthalazinol療法の奏効をみた脊髄小脳型17例において、治療中、同様の検索をおこなったところ、cyclic AMPの上昇反応、蓄積反応はともに正常域に復していた。glucagon 1 μg/kg静注による血漿cyclic AMP上昇反応には健常群との間に差を認めなかった。本知見から本症、特に脊髄小脳型におけるβ-adrenergic receptorの感受性低下が推定された。対照としておこなったglucagon receptorの検索結果も勘案すると、本病態はβ-adrenergic receptorとadenylcyclaseとの連関の障害、すなわち受容体構成膜の何らかの病変を示唆するものと考えられる。

Key words：ß-adrenergic receptor, phthalazinol therapy, spinocerebellar degeneration

---

脊髄小脳変性症の病態ことに運動失調の発現機構については不明な点が多く、いまだ有効な治療法は確立されていない。

近年、小脳の唯一の抑制性出力路を形成するプルキンエ細胞に、青斑核からのnoradrenaline神経終末の分布[12]とcyclic AMPをsecond messengerとするβ-adrenergic receptorの存在[2]が確認されるにいたった。一方、TRHの運動失調症に対する影響が報告され、その効果発現に脳内noradrenaline代謝回転の亢進が関与していると推定されている。[13],[7]

われわれはこれらの知見に基づいて脊髄小脳変性症におけるβ-adrenergic receptor感受性を検索するとともに、石川および島本によって合成された強力なcyclic AMP phosphodiesterase阻害剤で、β-adrenergic receptorの感受性を増強すると期待されるphthalazinol[1]の運動失調症に対する効果を検討してきた。

phthalazinolの効果については、病型あるいは家系間ではっきりした差異が認められ、臨床的に脊髄小脳型と診断された症例に明瞭な改善が認められることをすでに報告した。[8],[9]　本学会では脊髄小脳変性症におけるβ-adrenergic receptor感受性の検索結果について報告する。

〈対象と方法〉

対象は脊髄小脳型5家系18例、OPCA　5例、LCCA　1例，運動失調を呈するShy-Drager症候群1例の計25例である。phthalazinal 600～1200 mgで治療を開始し、治療前後において、以下の方法で本症のβ-adrenergic receptor, glucagon receptorの感受性を検索した。

(1) Adrenaline 負荷による血漿 cyclic AMP の変動：少くとも30分間，ベット上で安静化の後，adrenalin 0.2mg 皮下注前後において経時的に採血し，直ちに 0.5M EDTA 液と混合して，遠心分離後，上清100μl を sample とした。血漿 cyclic AMP 測定は succinyl 化による radioimmunoassay 法[5] にしたがった。

(2) Adrenaline 添加による表皮 cyclic AMP の蓄積：Yoshikawa らの方法[4] に準じ，200 μm にセットした Castroviejo keratome を用いて表皮を採取し，0.5～1 cm² の小片に分割した後，体外側面を上にして Hanks' BSS 上に浮かべて，37°C 20分間，preincubate した。その後，表皮2片を theophylline 10mM，adrenaline 50mM，theophylline + adrenaline 同濃度を含有する Hanks' BSS 3 ml以上にそれぞれ移し，同様に5分間 incubate した後，直ちに dry ice ではさんで凍結させ，蓄積した cyclic AMP を定量した。表皮中 cyclic AMP 濃度は mg 蛋白量あたりで表示し，蛋白量は Lowry 法[11] を用いて測定した。

(3) Glucagon 負荷による血漿 cyclic AMP の変動：早朝空腹時，glucagon 1μg/kg 静注前後において経時的に採血し，血漿 cyclic AMP の上昇反応を検索した。Sample 処理，測定法は(1)と同様に行なった。

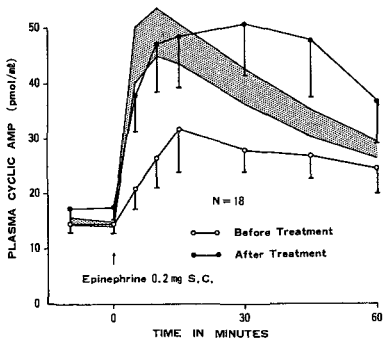


Fig.1 Plasma cyclic AMP response to epinephrine loading in patients with SCD (spino-cerebellar type).

〈結果〉

(1) Adrenaline 負荷による血漿 cyclic AMP の変動：病型によって2群に分け検討した結果，phthalazinol 療法が奏効した脊髄小脳型17例において，血漿 cyclic AMP 上昇反応の有意な低下が認められた（Fig. 1）。負荷前値では健常対照群との間に差を認めないが，反応値は有意な低下を示し，最大上昇反応は負荷前値の約2～3倍にとどまった。OPCA を含む他の群では対照群との間に差異を認めなかった（Fig. 2）。

脊髄小脳型において，phthalazinol 療法中，さらに同様の検索を行なった結果，血漿 cyclic AMP の上昇反応の正常化が確認された（Fig. 1）。この際，最大反応時間が負荷後30分に遷延していることが注目された。

(2) Glucagon 負荷による血漿 cyclic AMP の変動：β-adrenergic receptor 感受性の低下を推定させる結果を得た脊髄小脳型において，対照として，さらに glucagon 負荷による血漿 cyclic AMP の経時的変動を検索したが，健常群との差異は認められなかった（Fig. 3）。

(3) Adrenalin 添加による表皮 cyclic AMP の蓄積：脊髄小脳型17例において，表皮 cyclic AMP 蓄積反応の有意な低下を認めた。すなわち表皮 cyclic AMP

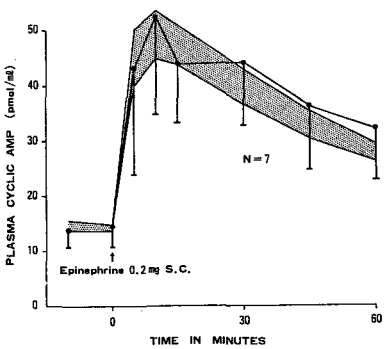


Fig.2 Plasma cyclic AMP response to epinephrine loading in patients with SCD (OPCA and others).

濃度には健常群との間に差を認めないが、adrenaline添加によるCyclic AMP蓄積反応は有意に低下していた。それに対し、adrenalineとtheophyllineとの混合添加による検索では低下傾向を示すが、健常群との間に有意差を認めなかった(Fig.4)。

Phthalazinol療法中、さらに同様の検索を行なった結果では、adrenaline添加、adrenalineとtheophyllineの混合添加による蓄積反応はともに治療前値と比較して有意に増加していた。

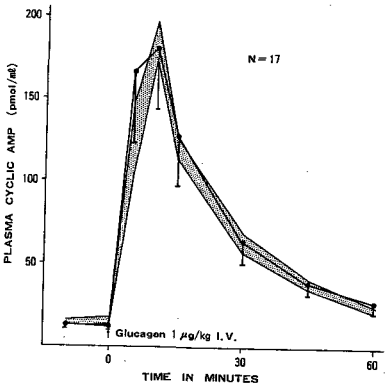


Fig.3 Plasma cyclic AMP response to glucagon loading in patients with SCD (spino-cerebellar type).

以上、β-adrenergic receptorのagonistであるadrenalineに対する血漿ならびに表皮cyclic AMPの反応を検索することにより、脊髄小脳変性症、特に脊髄小脳型におけるβ-adrenergic receptorの感受性低下を示唆する知見が明らかとなった。さらにPhthalazinol療法による運動失調の改善に対応して、このβ-adrenergic receptorの病態が正常化することが明らかとなった(Fig.5)。

〈考察〉

Cyclic AMPはβ-adrenergic agonistや種々のホルモンのsecond messengerとして働くと想定されており、その血漿中濃度は組織内のcyclic AMPの量的変化を忠実に反映し、agonistに対する各受容体の感受性を表現する優れた指標となることが確かめられた。[3),10)]

一方、Bloon[2)]らはiontophoresis実験により、小脳の抑制性出力路を形成するプルキンエ細胞にcyclic AMPをsecond messengerとするβ-adrenergic receptorの存在を証明し、cyclic AMP phosphodiesterase阻害剤によってnoradrenalineの作用が増強されることを報告した。

これらの知見から、adrenaline負荷による血漿cyclic AMPの変動に関するわれわれの検索結果は、脊髄小脳変性症、特に脊髄小脳型のβ-adrenergic receptor感受性低下を示唆すると考えられる。同様の知見は表皮β-adrenergic receptor感受性の検索において

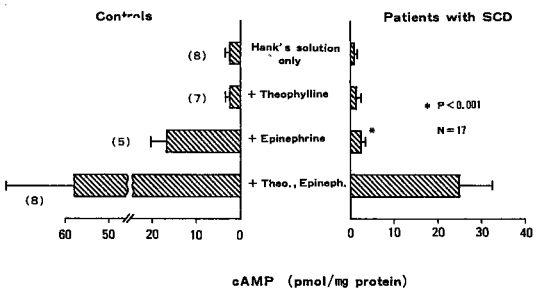


Fig.4 Cyclic AMP response to epinephrine by the epidermal slices from patients with SCD (spino-cerebellar type) before phthalazinol therapy.

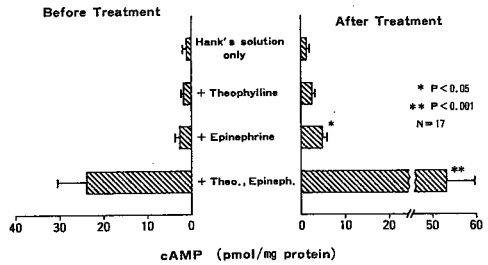


Fig.5 Cyclic AMP response to epinephrine by the epidermal slices from patients with SCD (spino-cerebellar type) after phthalazinol therapy.

も確認された。本症のβ-adrenergic receptorの病態はβ-adrenergic-adenylcyclase系の何らかの障害を反映するものと考えられる。さらにPhthalazinol療法による運動失調の改善に対応して、β-adrenergic receptorの感受性低下を示唆する所見が正常化したことから、本症におけるβ-adrenergic receptorの病態は運動失調の発現機構に深く関与しているものと推定された。

β-adrenergic receptorとadenylcyclaseはそれぞれの機能をもった1つの蛋白質分子ではなく、生化学的に異なった2つの蛋白質であり、あそらくはこれの異なった遺伝子によって規定されているという概念は現在広く受け入れられている。[4),6)] Glucagon負荷による血漿cyclic AMPの上昇反応に関するわれわれの検索結果は、β-adrenergic receptorとは対照的に正常反応を示したことから、本症のβ-adrenergic receptorの病態はadenylcyclaseそのものの病態というよりは、β-adrenergic receptor：adenylcyclase連関の障害と考えられる。すなわちβ-adrenergic receptor構成膜の何らかの病変が一次的と推定される。

本研究の一部は文部省科学研究費（No.577346）に依った。また本研究に御協力をいただいた北大皮膚科の飯塚一氏に深く感謝します。

＜文献＞

1 Adachi, K. and Numano, F. (1977) Japan. J. pharmacol. 27, 97
2 Bloom, F.E. et al. (1971) Brain Res. 25, 501
3. Broadus, A.E. et al. (1970) J. Clin. Invest. 49, 2237
4. Greaves, M.F. (1977) Nature 265. 681
5. Honma. M et al. (1977) Biochem. Med. 18. 257
6. Insel. P.A. et al. (1976) Molec. Pharmac. 12. 1062
7. Keller. H.H. et al. (1974) Nature 251. 528
8. 小山司他(1980) 臨床神経 20. 12.
9. Koyama T. and Yamashita I (1980) Abst. of the 12th CINP Congress, 209, Pergmon press. Oxford. New York.
10. Kunitada, S. et al. (1978) Europ. J. Pharmacol. 48. 159.
11. Lowry. OH. et al. (1951) J. Bial. Chem. 193. 265
12. Olson. L. and Fuxe, K. (1971) Brain Res. 28. 165.
13. 祖父江逸郎 (1977) 臨床神経 17. 791
14. Yoshikawa, K. et al. (1975) Brit. J. Dermatol. 93. 29.

10 Rolling Mouse Nagoyaの中枢神経系におけるGABAおよびグルタミン酸受容体ならびにリン脂質について

山口知子・林　恵齢　（東京女子医大・生化）
村上博彦・丸山勝一（同・脳神経センター・神経内科）

〔要　約〕

Rolling Mouse Nagoyaの中枢神経系について部位別のGABAおよびGluの受容体分析とリン脂質の分析とを行い考察を加えた。

1) GABA受容体分析はムスシモル結合能によって行い、間脳、小脳、橋、延髄においてその低下が見られこれは、さらにScatchard plot分析により受容体数の低下によるもので、受容体の性質は不変と考えられた。

2) Glu受容体分析はカイニン酸結能によって行い、前頭葉、視床下部、中脳、橋、小脳および脊髄において低下が認められた。

3) 間脳，中脳および小脳における脂質分析では、フォスファテジールセリン、フォスファテジール、エタノールアミンの減少と、スフィンゴミエリンの増加が見られた。

4) 以上の結果から、リン脂質特にフォスファテジールセリンが受容体の結合に密接に関与することが推測され、神経伝達機構とリン脂質代謝との相関に重要な示唆を与えるものと考えられる。

Key words：　GABA and Glu-receptors,　Rolling Mouse Nagoya (ataxic mutant),
Membrane phospholipid,

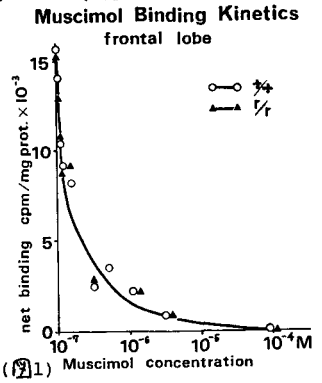
近年さまざまな神経伝達物質レセプターとリン脂質の機能上の相関が注目されてきている。[4][8] Rolling Mouse Nagoya(RMN)は著明な失調を呈するミュータントマウスであるが、その失調の神経化学的究明は必ずしも充分でない。[3][5] 著者らはRMNの部位別膜分画につき特に小脳の伝達物質と目されているGABAおよびGluの受容体分析を試み、rol/rolマウスでは間脳、中脳、小脳に受容体数減少を認めたので、更にそれらの部位におけるリン脂質の分析をも試みた。GABA受容体はムスシモルの結合能として、またGlu受容体はカイニン酸の結合能で検討したので必ずしも生理的なGABAおよびGluの受容体の変動を反映しているとはいえないが、失調の成因を解明する目的で脳の異常部位の検索は可能であり、細胞学的に検出出来ない失調の成因を分子上の機能の異常として捕えることを試みた。受容体の分子応答は、Ca^{2+}依存性プロテインキナーゼの活性化が起こり、この活性化は膜のリン脂質によって行われ[8]特にホスファテジルイノシトールが代謝回転の早いリン脂質として生理機能に関与していることが古くから注目されているが[2]その膜内における量は極めて少なく、それと同程度に活性化に関与しているといわれているホスファテジルセリンの分析を受容体の異常のある部位で対照と比較したところ、間脳においてはrol/rolでホスファテジルセリンが減少しており、また、リン脂質の分布はrol/rolの間脳、中脳、小脳、全般に至って、+/+の同部位に較べ、膜リン脂質のホスファテジルエタノルアミンが減少し、逆にスフィンゴミエリンが増加しており、リン脂質の代謝の偏りが遺伝的に存在することが推察された。単一の酵素欠損によるものか否かは現在解明されてはいないが、少くとも受容体とその機能に関与するリン脂質の異常を指摘することが可能と思われる。

〔実験方法〕

マウスを断頭してCNSを摘出しIversenら[1]の切除法に準じて脳の8部位と、全脊髄を摘出し水ホモジネートから105,000×gの沈渣を全膜分画として凍結・融解し、25°C 20分で二度インキュベートして膜を洗い、50mM tris-HCl緩衝液pH7.1に懸濁して膜を分画する。ムスシモル結合分析は全量2mlの中で[methylamine-3H]ムスシモル(9.5Ci/m mole) 26.3nM,膜分画をタンパク量で0.5~1.3mgになるように加え、また100μMの非放射性ムスシモルを加えた系を非特異的結合とみなして対照におき、[6] 4°Cで5分インキュベートしたのち遠心法で膜を集め、洗って放射能の膜結合をプロトゾルを加えて可溶化した試料を液体シンテレーションでカウントした。カイニン酸の結合能は、50mMトリス・クエン酸緩衝液pH7.1の2ml中で[G-3H]カイニン酸(5.6Ci/m mole) 44.6nMに、同様膜分画を加えて対照実験として、非放射性カイニン酸100μMを加えた系をおいて非特異的結合とし、4°C 20分インキュベートしたのち[7]遠心法で同様に膜への結合を液体シンテレーションで検出した。リン脂質の分析は、膜タンパク2.5~4.5mg/mlの0.5mlと19volのクロロホルム：メタノール(2:1)で抽出するBligh and Deyer法で実施し、ケイ酸カラムに吸着させ、中性脂質をクロロホルム、糖脂質をアセトンで溶出させたのち、メタノールで抽出した。減圧濃縮したのち、クロロホルム：メタノール(1:1)の少量に懸濁し、イアトロスキャンTri-10, Trc/FID分析にかけて分析した。この抽出法で四つの主な膜リン脂質が検出されるが、コレステロールも分画されてくる。全リン脂質の積分値の総和に対する各リン脂質の量比を比較した。

〔結果〕

ムスシモルの膜結合能が非放射性ムスシモルの存在によって、次第に特異的な結合が減少していくdisplacement curveが(図1)に示されている。即ち前頭葉の膜分画で実施したものであるが、rol/rolと+/+から得た膜分画で実験して同じカーブの描かれることを示している。このように非放射性リガンドの高濃度の存在下で結合する放射性リガンドの結合を非特異的結合として未添加の系から差し引いて特異的結合をみた結果が(表1)に示されている。rol-geneに関してヘテロのrol/+についても分析を試みて有意にrol/rolで+/+に較べて特異的結合能の低下が延髄・橋でみられたが間脳と小脳および脊髄でも低下している。この結合能の異常は受容体数の低下によるものか、あ

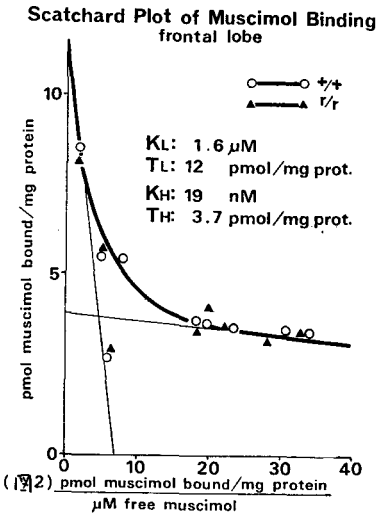


(図1) Muscimol concentration

(表1) Muscimol Binding Capacity in Membrane Fractions of CNS in Rolling Mouse Nagoya C3Hf/Nem-rol.

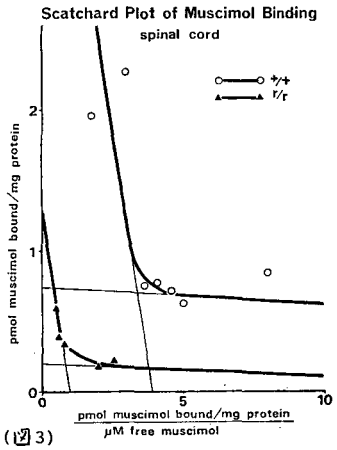
	p mole bound/ mg protein		
	+/+	rol/+	rol/rol
Frontal	1.64 ± 0.05	1.74 ± 0.36	1.75 ± 0.19
Lateral	1.26 ± 0.18	1.22 ± 0.44	1.19 ± 0.21
Striatum	0.81 ± 0.14	0.95 ± 0.01	0.89 ± 0.04
Hypo/Thalamus	0.85 ± 0.07	0.87 ± 0.13	0.74 ± 0.08*
Pons	0.42 ± 0.05	0.41 ± 0.03	0.33 ± 0.02***
Medulla	0.35 ± 0.03	0.32 ± 0.01	0.24 ± 0.05***
Midbrain	1.24 ± 0.08	1.18 ± 0.29	1.24 ± 0.05
Cerebellum	3.53 ± 0.15	2.96 ± 0.95	3.08 ± 0.41**
Spinal cord	0.26 ± 0.07	0.27 ± 0.10	0.20 ± 0.06*

*** $p<0.001$, ** $p<0.01$, * $p<0.1$.
Mean of 8 animals + s.d.



(図2)

るいは受容体の性質の相異によるものかをscatchard plotで解析すると(図2)は結合能に変化のみられない前頭葉の膜分画によって解析であり、(図3)は結合能がrol/rolで低下している脊髄の膜分画を両者で比較した図であるが、いずれも高親和性と低親和性の受容体の存在を思わせるカーブが得られ、図中に示した数字のKdと結合数(T)の価が求められる。脊髄における解析では、受容体数が低下しているが両カーブの傾き(Kd)に変化は認められない。つまり受容体の性質は同じで数の減少があるという結論が得られる。カイニン酸についても同じく分析を試みた結果が次の(表2)に示してある。ムスシモルと異り、カイニン酸の結合はin vivoでは、生理的にグルタミン酸より有効な応答を示すが結合が非可逆的であって、ついにはニューロンの変性をもたらせることが知られており、膜分画への結合も不可逆的な結合が起こるためかScatchard plotによる解析はムスシモルのような解析カーブは得られなかった。しかし、+/+に比べてヘテロ(rol/+)およびホモ(rol/rol)でパラレルの変化が認められ、前頭葉、間脳、中脳、小脳で+/+に比べて有意に減少しており、脊髄ではホモのみで減少がみられた。



(図3)

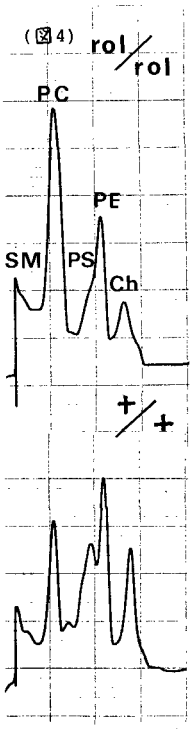
Kainate Binding Capacity in Membrane Fractio. of CNS in Rolling Mouse Nagoya

	f moles bound/ mg protein		
	+/+	rol/+	rol/rol
Frontal	651 ± 52	537 ± 111***	570 ± 83***
Lateral	547 ± 40	543 ± 110	492 ± 40
Striatum	474 ± 73	440 ± 35	486 ± 46
Hypo/Thalamus	399 ± 29	213 ± 28***	260 ± 37***
Pons	255 ± 15	118 ± 43***	108 ± 12***
Medulla	103 ± 22	83 ± 16	95 ± 21
Midbrain	229 ± 32	200 ± 11**	166 ± 24***
Cerebellum	476 ± 66	340 ± 67***	352 ± 63***
Spinal cord	104 ± 19	118 ± 14	60 ± 18***

Mean of 16 animals ± s.d.
*** $p < 0.001$, ** $p < 0.01$.

(表2)

次にリン脂質の分析を、受容体数の減少している間脳、中脳、小脳の膜分画で試みた。イアトロスキャンTH-10によるシリカロッドにリン脂質分画をスポットし、クロロホルム：メタノール：水＝70：35:3.5の系で18°C 20分展開しFIDで検出定量した間脳での分析例が(図4)に示されているが、四種の膜の総リン脂質に対する量比では、+/+において明瞭なホスファチジルセリン(PS)のピークがrol/rolではホスファチジルエタノールアミン(PE)のピークの肩になり定量的に低い値を示した。間脳、中脳、小脳全般に認められる変化は、+/+に比べてrol/rolではPEの減少とスフィンゴミエリン(SM)の増加である。



(図4)

〔考察〕

Rolleng Mouse Nagoya における失調の成因を究明する目的で受容体の分析をプルキンエ細胞の伝達物質であるGABAおよび小脳顆粒細胞の伝達物質とされるGluにつき試みた結果、失調のあるrol/rolの膜分画における脊髄小脳経路部位における結合能の低下として観察され、解析により受容体数の低下という結果を得たが、受容体機構と密接に関与している膜のリン脂質の異常が結合能の変化をもたらせているのかもしれない。リン脂質の代謝の偏りが膜の構成成分を変えて受容体機構を制御しているとすると、遺伝的な受容体の部分欠損という帰結は得られないし、むしろリン脂質の代謝系酵素の異常が受容体の機能を低下させているものと思われる。全身のリン脂質症の疾患モデルとされるShambling mouse (shm/shm) にもRMNに似た失調がみられ、今後、失調の成因の解明に膜のリン脂質、特にホスホアチジルイノシトールやホスファチジルセリンはプロテインキナーゼCを活性化すること(4)およびcholinergicおよびadrenergic dopaminergicな刺激がホスファチジルイノシトールの代謝を活性化する(4)という知見から、神経伝達機構とリン脂質は密接に相関しているものと思われる。しかし、GABA nergicな刺激はホスファチジルイノシトールの代謝回転に影響がないところから、他のリン脂質、特にホスファチジルセリンが受容体の結合機構に密接に関与しているとも思われ、今後、個々の伝達系とリン脂質の相関が次第に解明されていくものと思われる。

〔文献〕

(1) Glowinski,J and Iversen,L.L. (1966) J.Neurochem. 13, 655-669

(2) Hokin,M.R. and Hokin,L.E. (1953) J.Biol.Chem. 203, 967-977

(3) 小長谷正明、高柳哲也、室賀辰也、足立皓岑、祖父江逸郎. (1980) 臨床神経学 20, 181-187

(4) Mitchell,R.H. (1975) BiochimBiophys. Acta. 415, 81-147

(5) 杉本治、安藤一也、金澤一郎 (1981) 臨床神経学 21, 64-70

(6) Schonsboe,A.,Thorbek,Hertz,L. and krogsgaard-Larsen,P. (1979) J.Neurochem. 33, 181-189

(7) Simon,J.R., Contrera,J.F. and Kuhar,M.J. (1976) J.Neurochem. 21, 141-147

(8) Takai,Y., Kishimoto,A., Iwasa,Y., Kawahara,Y., Mori,T. and Nishizuka,Y. (1979) J.Biol.Chem. 254, 3692-3695

11 正常ならびにうつ病モデルラットの脳セロトニンレセプター結合能に対する抗うつ剤の作用.II

廣中郁朗・立石紀昭・吉田秀夫
高橋　良　　(長崎大・医・精神)

〔要　約〕

うつ病の病因を生化学的に究明する為に、抗うつ剤の薬理学的効果が、種々の方法により調べられてきた。しかし、抗うつ剤の臨床効果が、健康者とうつ病者では、大きく異なることから、抗うつ剤の作用機序を調べる為には、正常ラットのみでなく、うつ病モデルを使用することが望ましいと考えられる。我々は、Tetrabenazine (TBZ) によるモデルうつ病ラットを作成し、抗うつ剤の作用機序を、生化学的、行動学的に調べてきた。[8]

今回、抗うつ剤 Clomipramine (CMP)の慢性投与を行ない、正常ラット、TBZ ラットにおける前頭葉皮質の 5-HT_2 receptor 活性の変化を調べた。CMP慢性投与は正常ラットでは Kd 値を有意に上昇させたが、TBZ ラットでは、TBZ により上昇した B max 値を引き下げた。行動学的には、5-HT_2 receptor[9]に高い親和性を有する Methysergide (MSG) の、TBZ ラットに対する効果を測定し、MSGは TBZ による行動静止を抑制する所見を得た。

これらの結果から抗うつ剤CMP には、5-HT_2 receptor の感受性を低下させる作用のあることが推測された。

Key words : Tetrabenazine model depression rat, Tricyclicantidepressants, 5-HT_2 receptor

---

Ⅰ. はじめに

うつ病の生化学的研究をすすめる場合、抗うつ剤の臨床効果が健康者とうつ病者では大きく異なり、かつ脳を直接研究するためにモデル動物についても抗うつ剤の作用機序を研究することが望ましいと考えられる。我々は、人においてもうつ病を生じる TBZ をラットに使用し、モデルうつ病を作成してきた。TBZ モデルの行動静止と serotonine (5-HT) の代謝回転の亢進が強い時間的相関を有することから、[5] 抗うつ剤の作用機序について、5-HT receptor を中心に調べている。

近年 Leysen らによりラット前頭葉皮質の [^{3}H]-Spiroperidol (SPP)結合部位は、5-HT伝達系と強い相関をもつといわれ[11] Snyder らによって 5-HT_2 receptor と提唱されるようになった。[9] 今回我々は、この 5-HT_2 receptor に対する三環系抗うつ剤CMP の慢性投与による効果を正常並びに TBZ モデルラットを使用して測定した。あわせて、前頭葉皮質における 5-HT_1 receptor についても同様に測定した。

Ⅱ. 方法

雄性 S-D 系ラット (B.W 250～350g) を、23℃～25℃の恒温条件下で、20:30～8:30 を明期とし、3週間以上順応させて使用した。新しい明暗条件への順応は行動活性及び肝酵素活性より確認している。

ラットには、2週間にわたって CMP (25 mg/kg) 又は等量の生食水を毎日 12:30 に腹腔内投与した。この慢性投与の最終日の 8:30 に TBZ (30 mg/kg) 又は等量の生食水を腹腔内投与し、同日 16:30 に断頭し標本を作製した。

前頭葉皮質 (FC) は Thompson の Atlas[10] を参考にして切り出し、Pyriform cortex、lat.

orfactory tract、medial forebrain bundle、corpus callosum を除いた。得られた FC は2～3匹分をプールし、Snyder らの方法[6]により Radio receptor assay に供した。5-HT$_1$ RRA は、同様の部位を使用し前回の報告[12]と同様に行なった。

[^{3}H]-SPP は、New England Nuclear 製 35.9 Ci/m mol を使用し、0.07～2.8 nM の濃度域で使用した。Sample 800 μl、[^{3}H]-SPP 100 μl を合わせ 37°C 10分間インキュベイトし、1 nM SPP 100 μl を加えてさらに10分間インキュベイトした後、Whatman GF/B filter で吸引下に濾過し、Scintilation cocktail X 10 ml に、18時間以上浸出させた後、Aloka LSC-903 を使用して、放射活性を測定した。

TBZ モデルラットの行動活性の測定は、Animex DS を使用し、移動を伴なうラットの行動数を計測した。ラットは12時間以上の測定室への順応を行ない、9:00 に MSG (1 mg/kg) の前処置を行ない 9:30 に TBZ (30 mg/kg) を投与し、12時間にわたって行動を計測した。

Ⅲ. 結果

ラット FC への [^{3}H]-SPP の全結合、非特異的結合、これらの差による特異的結合を Fig 1. に示す。この特異的結合から Scatchard plot により、B max、Kd 値を求めた。(Table 1) CMP の慢性投与により、B max 値に有意の差はないが、Kd 値に有意の上昇をみとめた。TBZ ラットでは、B max 値の有意の上昇を見たが、CMP の慢性投与を行なった TBZ モデルラットでは、この B max 値の上昇は見られず、Kd 値の上昇も見られなかった。

次にラット FC における [^{3}H]- 5-HT の B max Kd 値を Table 2 に示す。FC においては、CMP 慢性投与、また TBZ 投与によっても有意の変化は見られなかった。

Table 3 に、in vitro における抗うつ剤、抗 5-HT 剤等の 5-HT$_2$ receptor への阻害効果を示す。LSD、MSG は強い阻害を示し、CMP、Imipramine、Desimipramine は、同程度の阻害効果を有していた。

Table 3 より、5-HT$_2$ receptor に対し強い阻害効果をもつ MSG を前処置した TBZ モデルの行動測定の結果、通常は

Fig.1. Saturation of [^{3}H]-spiroperidol binding to frontal cerebral cortex synaptic membrane in normal rat.

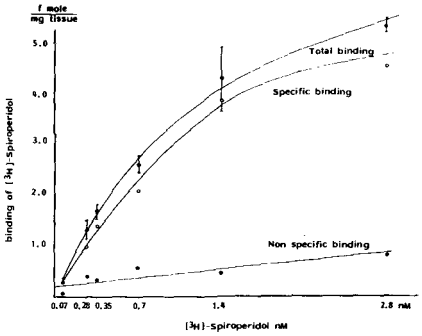


Table 1. Effects of Chronic Treatment with CMP on 5HT$_2$ Receptor Activity in Frontal Cortex of Normal and TBZ Depression Rat.

Treatment	Bmax (f mol/mg prot)	Kd (nM)
Saline + Saline (n=7)	31.485 ± 11.727*	0.332 ± 0.143**
CMP + Saline (n=5)	41.020 ± 10.300	2.181 ± 0.704**
Saline + TBZ (n=6)	81.529 ± 10.529**	0.826 ± 0.225
CMP + TBZ (n=4)	34.164 ± 11.516**	0.937 ± 0.397

n = no. of experiments, Mean ± SEM
* P < 0.01, ** P < 0.025

Table 2. Effects of Chronic Treatment with CMP on 5HT$_1$ Receptor Activity in Frontal Cortex of Normal and TBZ Depression Rat.

Treatment	Bmax (f mol/mg prot)	Kd (nM)
Saline + Saline (n=5)	80 ± 0.010	0.464 ± 0.073
CMP + Saline (n=4)	105 ± 0.008	0.587 ± 0.103
Saline + TBZ (n=6)	120 ± 0.027	0.532 ± 0.111
CMP + TBZ (n=4)	107 ± 0.030	0.571 ± 0.145
	ns	ns

n = no. of experiments, Mean ± SEM

Fig. 2

EFFECT OF METHYSERGIDE ON TETRABENAZINE - INDUCED SEDATION OF RAT LOCOMOTOR ACTIVITY

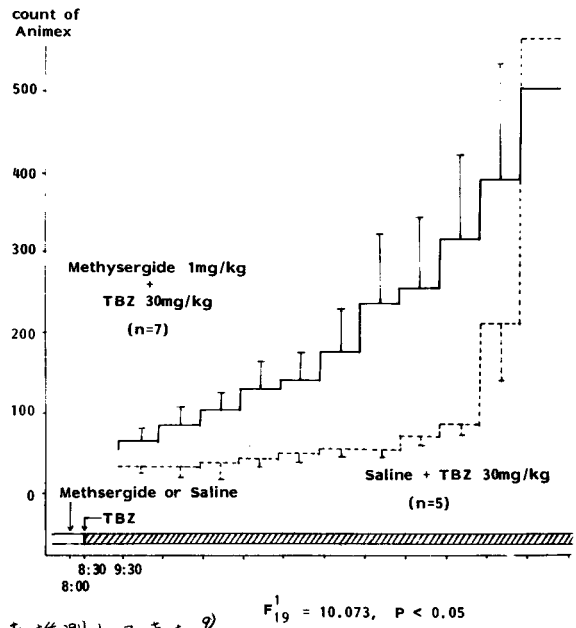


Table 3. Drug Effects on ^{3}H-Spiroperidol Binding in Rat Frontal Cerebral Cortex

	IC 50 (nM)	Ki (nM)
Spiroperidol	0.1	0.04
LSD	16	69
Methysergide	200	86
Clomipramine	1600	690
Desipramine	3200	1370
Imipramine	5000	2150
5-HT	160000	68000
DA	320000	137000

ラットの活動期に約8時間持続するTBZによる行動静止が、有意に抑制された。(Fig 2)

Ⅳ. 考察

我々はすでにTBZモデルうつ病ラットの行動静止が、中枢5-HT代謝回転の亢進によることを報告しており人のうつ病のある群においても、中枢5-HTの機能亢進が原因となることを推測してきた。[9]

この見地から、抗うつ剤の5-HT receptorに対する効果を測定し、前回[12]は、全脳5-HT$_1$ receptorに対し、その感受性を減少させることを報告した。

今回行なった5-HT$_2$ receptorに対するCMPの効果の研究で、正常ラットにおける解離定数の上昇、TBZモデルにおける最大結合数増加の有意の抑制がみられ、いずれも感受性を低下させる方向に働くが、その作用の仕方に違いがみられた。実際の臨床作用についても、抗うつ剤は、うつ病者に対し抑うつからの回復、活動性の増加等の作用を有するが、健康者に対しては疲労感、精神運動の低下等の作用を有する。この事実からも、正常とモデルラットのreceptorに対する効果の違いは興味深い。

さらに、5-HT$_2$ receptorに対する各種薬剤のin vitroの阻害効果については従来の報告[6]とよく一致しており、さらに、実際の使用量ともよく相関していた。

5-HT$_2$ receptorに対し強い阻害効果をもち、従来5-HT antagonistといわれてきたMSGのTBZモデルに対する効果は、行動静止を明らかに抑制し、TBZモデルうつ病が、5-HT伝達系の機能亢進によることを裏付けるとともに、5-HT$_2$ receptorの感受性を低下させることによってCMPが、TBZ行動静止を抑制する作用を有していることが推測される。

近年、[^{3}H]-5-HT receptorについて抗うつ剤が、感受性を低下させるという報告[2]や、感受性に変化はない[11]とする報告が、種々出ている。前回[12]我々は全脳において感受性を低下させた結果を報告したが、今回は、ラットFCについては変化のないことを確認した。従って5-HT$_1$ receptor活性に対する抗うつ剤の効果については、部位別によ

る効果の比較測定が必要と考えられる．いずれにしろ、今回までの我々の研究結果はCMPが5-HT系receptorの感受性を低下させるものであり、抗うつ剤の臨床効果は、これらのreceptor活性に対する低下作用と深く関係することを思わせ．最近の他の見解[3),4)]とも一致するものといえる．

（Cold - Spiroperidolを提供して下さったエーザイK.K.に謝意を表します。）

文 献

1) Lysen,J.E.Carlos., Niemegeers,J.E., Tollenaere,J.P. and Laduron,P.M. (1978) Nature, 272, 168-171.

2) 水田 正，野村靖幸，瀬川富郎，（1979）神経化学，18，48-51

3) Nagayama,H., Hingtgen,J.N. and Aprison,M.H. (1980) Parmac.Biochem.Behav. 13, 575-579.

4) Nagayama,H., Hingtgen,J.N. and Aprison,M.H. (1981) Parmac.Biochem.Behav. 15, 125-130.

5) 仲村永徳，立石紀昭，永山治男，桜井征彦，高橋 良（1972）精神薬療基金年報，4，49-54

6) Peroutka,S.J. and Snyder,S.H. (1979) Mol.Pharmacol. 16, 687-699.

7) Snyder,S.H. and Goodman,R.R. (1980) J.Neurochem 35, 5-15.

8) Takahashi,R., Tateishi,T., Nagayama,H. and Tachiki,K.H (1979) 長崎大神経情報研年報，6，47-65.

9) 立石紀昭，（1980）精神神経誌，82，216-233.

10) Thompson,R. (1978) A behavioral atlas of the rat brain, Oxford Univ. Press, New York.

11) Wirz,Justice, A.Krauchi,K., Lichtsteiner,M. and Feer,H. (1978) Life Eciences 23, 1249-1254.

12) 吉田秀夫，立石紀昭，廣中静朗，下田光太郎，高橋 良（1980）神経化学，19，214-217.

12 Methamphetamine 慢性投与による[^{3}H]-spiperone 高親和性結合部位の変化

秋山一文・佐藤光源・大月三郎
（岡山大・医・神経精神）

〔要　約〕

[^{3}H]-spiperone 結合部位には親和性の異なる部位があることが指摘されている。今回はラットの線条体と中脳辺縁領域の高親和性結合部位に及ぼす dopamine, serotonin 系薬物の影響と，methamphetamine (MAP) 慢性投与による同部位の変化を検討した。線条体，中脳辺縁領域ともに [^{3}H]-spiperone の高親和性，低親和性結合部位が存在し，ADTN, mianserin によって置換される dopamine 成分，serotonin 成分は高親和性結合部位に対応した [^{3}H]-spiperone 濃度域で飽和に達した。dopamine 作動薬 (dopamine, ADTN), dopamine 拮抗薬 (sulpiride) とも [^{3}H]-spiperone と競合するが価は，中脳辺縁領域よりも線条体においてより強く，serotonin 拮抗薬 (mianserin, methysergide) は両脳部位へ概ね等価に作用した。逆耐性現象の成立が既に確認されている MAP 慢性投与 (MAP 4 mg/kg/day, 14日間連日投与) 終了7日目の steady state で，線条体の高親和性，低親和性結合部位の Bmax は有意に減少し (-24%, -30%)，dopamine, serotonin 成分の Bmax も減少の傾向を示した。一方，中脳辺縁領域では高親和性結合部位の Bmax が，逆に有意に増加した (+23%)。これらの結果より，中脳辺縁領域の変化が"交叉逆耐性現象"(10) で想定された dopamine 受容体の感受性亢進を反映するものであることを考察した。

Key words : [^{3}H]-spiperone binding, mesolimbic area, reverse tolerance

---

周知のごとく，methamphetamine (MAP) の慢性投与は長期に持続する行動上の反応性増大（逆耐性現象）をもたらす。昨年の本学会では，逆耐性現象に対応して [^{3}H]-spiperone 結合部位の Bmax が中脳辺縁領域で増加することを報告した(1)。しかし [^{3}H]-spiperone 結合部位には高親和性，および低親和性結合部位が存在する(6)ほかその heterogeneity が指摘されている。そこで今回は昨年の成績の意義をより明らかにするため，次の2点について検討した。1) 線条体と中脳辺縁領域における [^{3}H]-spiperone の高親和性結合に及ぼす dopamine, serotonin 系薬物の影響 (IC_{50}) を求めた。2) MAP 慢性投与後の steady state について両脳部位の [^{3}H]-spiperone 結合部位を高親和性結合部位 (dopamine 成分と serotonin 成分) と低親和性結合部位に分けて検討した。

〔方法〕　対象：6時から18時を明期とする12時間毎の明暗サイクル下で飼育された，体重 200～250 g の S.D. 系雄ラット 100 匹を用いた。

[^{3}H]-spiperone 高親和性結合部位の検討：4°C の cold room 内で実体顕微鏡下に，線条体と中脳辺縁領域（側生核と嗅結節および中隔野の一部を含む）を切り出した。Ligand をできるだけ低濃度にして高親和性結合部位を得るため，Howlett & Nahorski (6) の方法を一部修正した方法を用いた。Buffer の組成は 25 mM Tris, 5 mM EDTA-Na_2, 10 μM pargyline, 0.02% ascorbic acid, pH = 7.6 とした。50,000×g の遠沈を2回行なって得られた final pellet を最終 150 倍容量の Tris buffer で懸濁し，receptor preparation とした。この 0.5 ml に [^{3}H]-spiperone (specific activity : 33～50 Ci/mmol, 最終 15～1200 pM)，各薬物および反応容量が最終 5 ml となるように相当量の buffer を加えた。Incubation は 25°C, 60 分間で振盪しながら行ない，ついで氷冷 Tris-buffer 5 ml で2

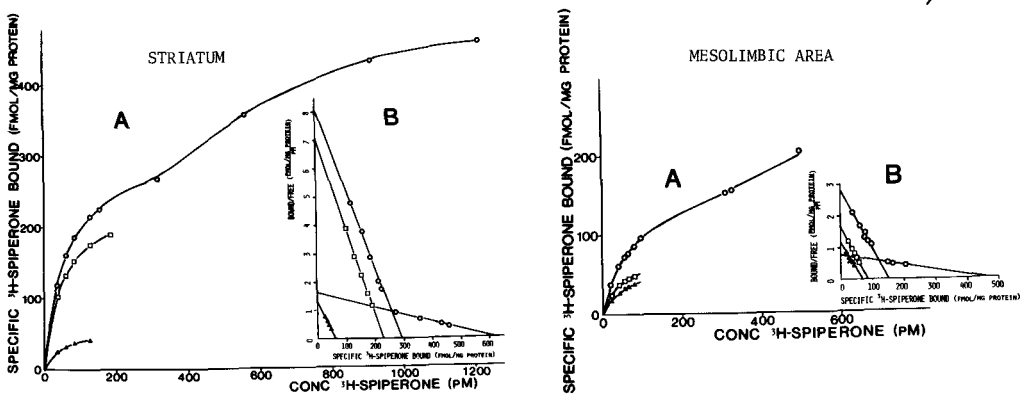
回洗滌しながら Whatman glass microfiber filter で吸引濾過した。特異的結合は、1 μM d-butaclamol の存在下，非存在下での結合の差として求めた。また 10 μM の ADTN (2-amino-6,7-dihydroxy-1,2,3,4-tetrahydronaphthalene), 0.2 μM mianserin の存在によって全結合から置換される結合を、それぞれ dopamine 成分，serotonin 成分とした。蛋白量は dowry 法(7)によって測定し，1 試験管あたり約 0.4mg になった。統計処理は，student's t test によった。

IC50 値の検討：1 μM d-butaclamol によって定められた線条体と中脳辺縁領域の特異的結合を 50% 阻害する，dopamine 作動薬(dopamine , ADTN), dopamine 拮抗薬(sulpiride) および serotonin 拮抗薬(mianserin , methysergide)の濃度(IC50)を検討した。各薬物は最低 9 段階の濃度をとった。[3H]-spiperone の濃度は高親和性結合部位の Kd に相当する 38 pM(線条体)，60pM(中脳辺縁領域)とした。

MAP 慢性投与スケジュール：慢性 MAP 群，対照群には、MAP 4 mg/kg，生食をそれぞれ毎日 1 回 14 日間腹腔内投与した。1~2 日毎に体重を測定し投与量の調節を行ない，投与終了から 7 日目の steady state で両群を断頭した。

〔結果〕 [3H]-spiperone の高親和性，低親和性結合部位：図 1 に示した Scatchard 解析で明らかなように、線条体，中脳辺縁領域とも高親和性結合部位，低親和性結合部位が存在し、それぞれの Kd，Bmax の値は、表の対照群に示すとうりで Howlett & Nahorski(6)の報告した値とほぼ一致している。10 μM，ADTN，0.2 μM mianserin によって置換される dopamine 成分，serotonin 成分は、両脳部位とも高親和性結合部位に対応した [3H]-spiperone 濃度域で飽和に達した。それらを Scatchard 解析すると、両脳部位とも dopamine 成分，serotonin 成分の Bmax の和は 1 μM d-butaclamol によって定められた高親和性結合部位の Bmax にほぼ等しい値を示した。

図 1　線条体と中脳辺縁領域における，A: saturation curve，B: Scatchard analysis

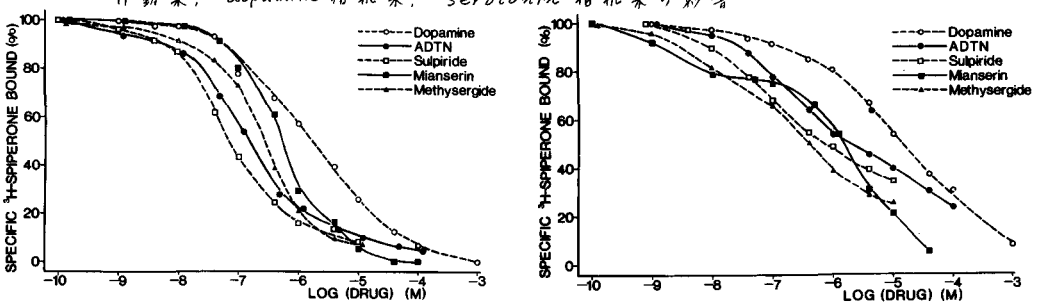


—○—：1 μM d-butaclamol による特異的結合。B では、その高親和性結合部位と低親和性結合部位の Scatchard analysis を示す。—□—：10 μM ADTN による特異的結合。—△—：0.2 μM mianserin による特異的結合。

線条体，中脳辺縁領域における各薬物の IC50 値：図 2 に示すごとく dopamine 作動薬

(dopamine, ADTN), dopamine 拮抗薬(suipiride)とも [³H]-spiperone と競合する力価は、中脳辺縁領域よりも線条体においてより強く、IC_{50} 比(中脳辺縁領域/線条体)はそれぞれ 7.2, 14.4, 18.7 であった。また dopamine に比べ、ADTN と sulpiride は [³H]-spiperone 結合部位への親和性が同程度に高かった。一方、serotonin 拮抗薬の mianserin, methysergide は両脳部位へ概ね等価に作用した。

図 2　線条体と中脳辺縁領域における特異的 [³H]-spiperone 結合に及ぼす dopamine 作動薬, dopamine 拮抗薬, serotonin 拮抗薬の影響



striatum, [³H]-spiperone = 38 pM　　mesolimbic area [³H]-spiperone = 60 pM

MAP 慢性投与後の steady state における [³H]-spiperone 高親和性, 低親和性結合部位の変化：線条体では高親和性結合部位全体および低親和性結合部位の Bmax は、MAP 慢性投与群で有意に減少し(-24%, -30%), dopamine, serotonin 成分の Bmax も減少の傾向を示した(表)。一方、中脳辺縁領域では高親和性結合部位全体の Bmax が MAP 慢性投与群で有意に増加し(+23%), dopamine 成分, serotonin 成分, および低親和性結合部位の Bmax は対照群と比べ変化はなかった。また、Ko は両脳部位とも慢性 MAP 群と対照群と比較して有意な差はなかった。

表　steady state における線条体, 中脳辺縁領域の [³H]-spiperone 高親和性, および低親和性結合

striatum

	Chronic Saline (N=6)		Chronic MAP (N=6)	
	K_D (pM)	Bmax (fmoles/mg protein)	K_D (pM)	Bmax (fmoles/mg protein)
High Affinity				
d-Butaclamol	39 ± 2	291 ± 51	39 ± 2	222 ± 51 *
ADTN	34 ± 4	236 ± 59	37 ± 2	179 ± 45
Mianserin	45 ± 10	65 ± 9	51 ± 15	56 ± 5
Low Affinity				
d-Butaclamol	397 ± 76	602 ± 114	384 ± 66	454 ± 78 *

*, P<0.05 vs chronic saline pretreated group

mesolimbic area

	Chronic Saline (N=5)		Chronic MAP (N=5)	
	K_D (pM)	Bmax (fmoles/mg protein)	K_D (pM)	Bmax (fmoles/mg protein)
High Affinity	—			
d-Butaclamol	58 ± 7	151 ± 18	61 ± 5	186 ± 25 *
ADTN	56 ± 7	92 ± 22	59 ± 3	118 ± 29
Mianserin	71 ± 8	64 ± 10	73 ± 10	75 ± 25
Low Affinity				
d-Butaclamol	594 ± 72	460 ± 64	506 ± 93	492 ± 65

*, P<0.05 vs chronic saline pretreated group

慢性 MAP 群, 対照群には、それぞれ MAP 4 mg/kg, 生食を 14 日間連日投与し、休薬 7 日目の steady state で両群を断頭した。

[考察]　[³H]-spiperone 結合部位は dopamine (D_2) receptor のみならず serotonin

(S_2) receptor を含むといわれる。今回は dopamine 作動薬である ADTN (9), serotonin 拮抗薬である mianserin (14) により、薬理学的に重要な意義をもつ高親和性結合部位の dopamine 成分, serotonin 成分を定めた。mianserin による [^{3}H]-spiperone 結合への抑制は、線条体では 10^{-7} M の濃度でごくわずかしかみられなかったのに対し、中脳辺縁領域では 10^{-8}~10^{-7}M に中間のプラトーをとる2相性の形をとることが明らかになった。したがって高親和性に [^{3}H]-spiperone と競合する serotonin 成分を、0.2μM の mianserin で置換できると考えた。この mianserin の値は Withy ら (14) の報告した値と一致している。Scatchard 解析によれば、高親和性結合部位全体の Bmax に対する dopamine 成分の Bmax の割合は中脳辺縁領域よりも線条体で高いと考えられる。

MAP 慢性投与後の steady state における [^{3}H]-spiperone 結合実験は、2週間にわたる MAP 連日投与が線条体と側坐核を主とする中脳辺縁領域に、休薬後も1週間持続する [^{3}H]-spiperone 結合数 (Bmax) の変化を残すことを示した。線条体での減少, 中脳辺縁領域での増加は昨年の報告 (1) を再確認したものであり、しかも高親和性結合部位における変化が初めて示されたものである。線条体での減少は Howlett & Nahorski (5), Nielsen ら (8) の成績を確認するものと考えられる。しかし Nielsen が用いた amphetamin pellet の植え込み実験では、常同行動の出現に耐性がみられた。このことは、線条体における [^{3}H]-spiperone 結合部位の減少が慢性投与にともなう行動変化と対応した変化でないことを示している。線条体での減少に対して, 少なくとも dopamine 受容体を含む [^{3}H]-spiperone の高親和性結合部位の Bmax が中脳辺縁領域で増加したことは、"交叉逆耐性現象" (10) で想定された dopamine 受容体の感受性亢進が同部位で生じている可能性を強く示唆するものである。中脳辺縁領域, なかでも側坐核は抗精神病薬の作用部位の一つであり (12), 精神分裂病患者の脳で dopamine (3), dopamine 受容体の増加 (4, 13) が報告されている。AMP, MAP による精神症状は haloperidol などの抗精神病薬により急速な改善がみられる (2)。佐藤ら (11) は慢性覚醒剤中毒の幻覚妄想状態に, 典型的な履歴現象型の急性再燃がみられ, 抗精神病薬の服用下で覚醒剤を注射しても急性再燃が起こらず阻止された6症例を報告している。これらの臨床的観察は, AMP, MAP 慢性投与により脳内の dopamine 受容体の感受性亢進が生じているという実験結果とよく符合すると考えられる。

[文献]

(1) 秋山一文, 佐藤光源, 大月三郎 (1980). 神経化学, 19;374-377. (2) Angrist, B., Lee, H.K. and Gershon, S., (1974). Am. J. Psychiatry, 131;817-819. (3) Bird, E.D. and Spokes, E.G.S. and Iversen, L.L. (1979). Brain, 102;347-360. (4) Cross, A.J., Crow, T.J., and Owen, F. (1981). Psychopharmacol., 74;122-124. (5) Howlett, D.R. and Nahorski, S.R. (1979). Brain Res., 161; 173-178. (6) Howlett, D.R. and Nahorski, S.R. (1980). Life Sci., 26;511-517. (7) Lowry, O.H. et al. (1951). J. Biol. Chem., 193;265-275. (8) Nielsen, E.B., Nielsen, M., Ellison, G. and Braestrup, C. (1980). Eur. J. Pharmacol., 66;149-154. (9) Quik, M., Iversen, L.L., Larder, A. and Mackay, A.V.P. (1978). Nature, 274;513-514. (10) 佐藤光源 (1979). 精神経誌, 81;21-32. (11) 佐藤光源他 (1981). 第7回西日本精神経学会で発表. (12) Stevens, J.R. (1973). Arch. Gen. Psychiatry, 29;177-189. (13) Tyrone, L. and Seeman, P. (1980). Am. J. Psychiatry, 137;191-197. (14) Withy, R.M., Mayer, R.J. and Strange, P.G. (1980). FEBS Lett., 112;293-295.

13 β-フェニルエチルアミンのラット脳内ドーパミン代謝と常同行動におよぼす影響
— メトアンフェタミン投与ラットと比較して —

中河原通夫・渡辺明子・石井一平
本橋伸高・斉藤彰一・仮屋哲彦
(東京医歯大・神経精神)

〔要　約〕

β-phenylethylamine (PEA) 75mg/kg をラットに投与した際にひきおこされるhead bobbing の最大出現時と終了時に，脳内3，4-dihydroxyphenyl acetic acid (DOPAC) とhomovanillic acid (HVA) 濃度を striatum，mesolimbic area，lateral hypothalamusの三部位で測定した。PEA投与により，striatum，mesolimbic area で，DOPAC とHVA 濃度の増加が認められた。lateral hypothalamus においては，DOPAC およびHVA はいずれも濃度の変化を認めなかった。一方，PEA 投与時とほぼ同程度のhead bobbing を示すmetlamphetamine 6mg/kg をラットに投与して測定した。脳内HVA 濃度はstriatum において増加が認められたが，他の部位においては変化は認められなかった。以上の結果から，PEA はmethamphetamine と比較して，作用が一部異なり，dopamine neuron の神経終末において，dopamineのreleaseが主たる働きであり，releaseされたdopamine のreuptakeの阻害は，ほとんどみられないか，阻害があっても少ないと考えられた。また，このPEA のdopamine neuronに対する作用は，striatum のみならず，精神症状との関連が注目されているmesolimbic area においても認められた。

Key words：　β-phenylethylamine,　head bobbing,　dopamine metabolites

---

PEAは，家兎の臓器より見出されたアミンで[10]，臨床においては精神分裂病や躁うつ病などの精神症状をもつ患者の尿中で排泄量の異常が報告され[9,11,12]，精神疾患との関連が興味をもたれている。

PEAは微量ではあるが人間および動物の脳内に分布しており[2,4,13]，しかも構造式が人間では幻覚妄想状態などの精神症状をひきおこすamphetamineと類似している点が注目されている。amphetamine はdopamine やnorepinephrine に影響をおよぼし，多動状態や常同行動をひきおこすことが知られているが[6]，PEA についての詳細な研究はきわめて少ない。従来の報告は動物にmonoamine oxidase 阻害剤とPEAを併用して検討した研究が多いが，われわれはPEA を単独で急性に投与したマウスでも多動状態と常同行動の出現を認め，同時に測定した脳内dopamine やnorepinephrineとの関連について以前に報告した[8]。

今回，われわれはPEAにより ひきおこされる脳内dopamine 代謝におよぼす変化をさらに明らかにするため，PEAを投与したラットの脳内部位別DOPAC およびHVA濃度を常同行動の最大出現時と終了時に測定し，検討を行なった。また，常同行動が，PEA 75mg/kg 投与時とhead bobbingの測定尺度で同程度の最大値を示すmethamphetamine (MAP) を投与したラットのHVA 濃度を測定し比較検討した。HVAの測定部位は，nigrostriatal pathway の神経終末であるstriatum，mesolimbic pathwayの神経終末であるN. accumbensを中心としたmesolimbic area，これらのneuronの軸索が通過するlateral hypothalamus の三部位である。

〈実験方法〉

実験動物はWistar系成熟ラットの雄220～260gを用いた。注射薬はPEA 75mg/kg, MAP 6mg/kgを用い、すべて動物の腹腔内に注射した。常同行動測定の指標として head bobbing を用いた。行動測定は内径縦28cm, 横58cm, 高さ33cmの透明なプラスチックのケージの中で測定した。常同行動は表1に示すように3分間における head bobbing の合計出現時間を測定し、0～4の5段階に評価した。

表1　ラットの head bobbing 測定尺度

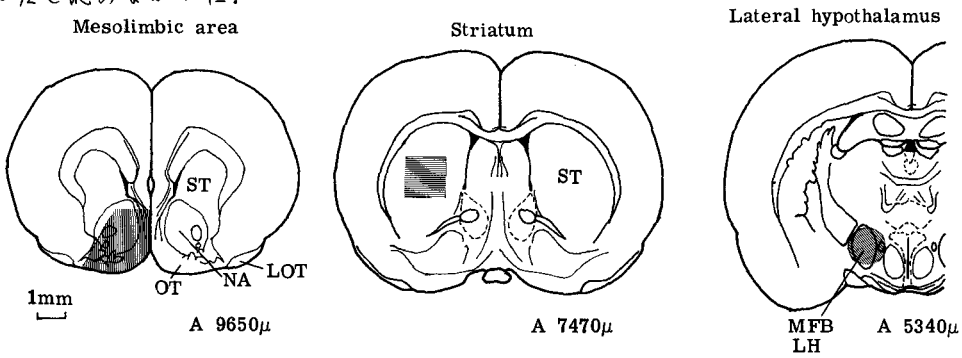
Score	3分間における合計出現時間
0	全く出現しない
1	45秒以下　(25%以下)
2	45～90秒　(25～50%)
3	90～135秒　(50～75%)
4	135秒以上　(75%以上)

脳内DOPACおよびHVA濃度の測定はラットにPEAもしくはMAPを投与した後, head bobbing が最大に出現する時刻と head bobbing が終了した時刻に行なった。head bobbing が最大となる時刻は、PEAは投与17分後, MAPは投与60分後を選び、また、終了時は、PEAでは投与60分後, MAPでは投与210分後とした。ラットの断頭は head bobbing の出現と終了を確認した上で行なった。ラットの脳は断頭後直ちに冷凍解剖機内(-10℃)でとり出し、ミクロトーム(-15℃)で切片にした後, KönigとKlippelのアトラスに従って図1のようにstriatum, mesolimbic area, lateral hypothalamusをパンチとマイクロナイフを用いて切り出した。DOPACおよびHVAの測定は俣賀らの高速液体クロマトグラフィー・電気化学検出法[7]により行なった。

〈実験結果〉

1) PEAおよびMAP投与時の head bobbing の変化

PEAを投与した際の head bobbing は、図2左に示すようにPEA投与6分後より出現し, 15～24分後に最大となり、54分後には終了した。一方、MAP投与ラットでは図2右に示すように, MAP投与15分後より head bobbing が出現し, 24～81分後に最大となり、投与183分後に終了した。PEA 75mg/kg投与による head bobbing は、MAP 6mg/kg投与時に比較し, 出現時刻, 終了時刻がはやいが、最大出現値は、両者に差を認めなかった。



ST: striatum, NA: nucleus accumbens, OT: olfactory tubercle
LOT: lateral olfactory tract, MFB: medial forebrain bundle
LH: lateral hypothalamus

図1. ラットの脳内HVAおよびDOPAC濃度測定部位

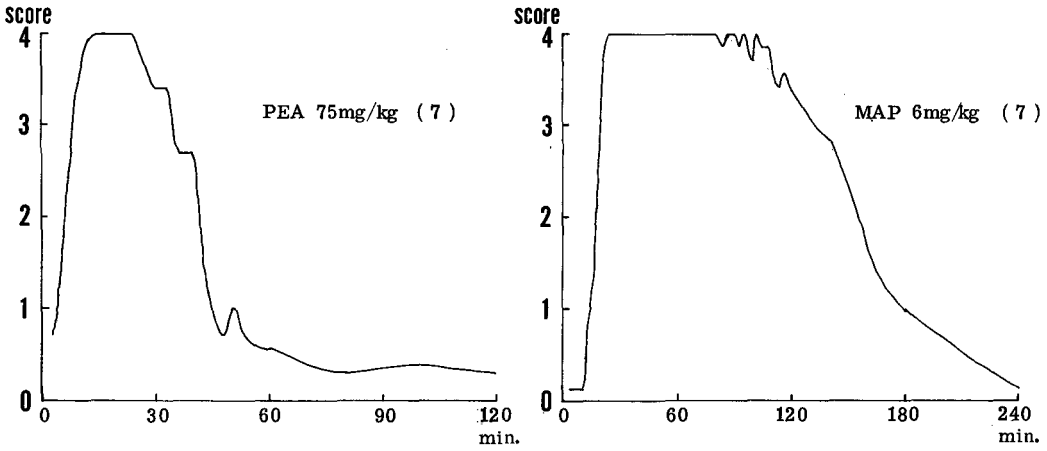


図2. PEAおよびMAP投与によるhead bobbing出現の時間的経過

2) PEAおよびMAP投与時の脳内HVA濃度とPEA投与時のDOPAC濃度の変動

PEAを投与した際のHVA濃度は図3左に示すようにstriatumではPEA投与60分後に増加を示し，mesolimbic areaではPEA投与60分後に増加を認めたが，lateral hypothalamusでは投与17分と投与60分後のいずれの時刻でも変化を認めなかった。

一方，MAPを投与したラットのHVA濃度は図3右に示すように，投与60分後にstriatumで増加を示したが，他の部位では変化を認めなかった。このstriatumにおけるHVA濃度の増加は，PEA投与時のstriatumのHVA濃度と比較して増加率は低かった。 PEAを投与した際のDOPAC濃度は，図4に示すように，PEA60分後ではstriatumとmesolimbic areaにおいて，著明な増加を認めたがlateral hypothalamusにおいては変化を認めなかった。

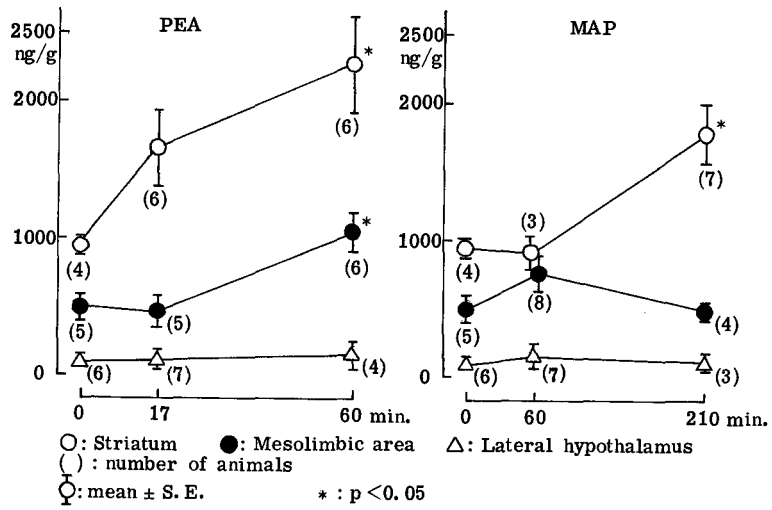


図3. PEAおよびMAPのラット脳内HVA濃度におよぼす影響

〈考察〉

PEAとMAPによりひきおこされたhead bobbingは，投与後の出現時刻や消失時刻においては異なっていたが，最大出現値は一致していた。

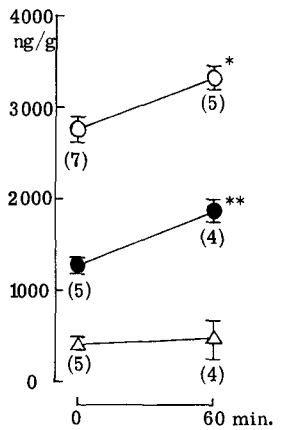


図4. PEAのラット脳内DOPAC濃度におよぼす影響

脳内HVA濃度は、MAP投与ラットでは、head bobbing終了時にのみstriatumでHVAの増加を認めたが、他部位では変化を認めなかった。この結果は、MAPの作用として、dopamine neuronの神経終末においてsynaptic vesicleからのdopamineのreleaseの他、synaptic cleft内にreleaseされたdopamineのreuptakeを阻害する作用があり、[6]この両者が関与しているものと思われる。

一方、PEAを投与した際には脳内HVA濃度は、striatum, mesolimbic areaで増加し、lateral hypothalamusでは変化を認めなかった。すなわち、PEAは、dopamine neuronの軸索部であるlateral hypothalamusではHVAに変化を与えず、神経終末が多く存在しているstriatumとmesolimbic areaで増加をひきおこしたと考えられ、この結果は、以前に報告したPEA投与マウスのdopamine濃度の減少[8]とあわせ考え、PEAがdopamine neuronの神経終末でのdopamineのreleaseをひきおこしていると思われる。また、PEAを投与した時のDOPAC濃度は、striatumとmesolimbicで増加を示しており、この結果は、PEAがsynaptic cleftにreleaseされたdopamineのreuptakeをほとんど阻害しないか、阻害しても、ごくわずかであることを示していると考えられる。さらに、PEA投与17分後の脳内PEA濃度をガスクロマトグラフィー・質量分析法(GC-MS)で測定した結果、投与前に比較してPEA濃度の増加を認めており、PEA投与時のDOPACおよびHVAの変化がPEAによりひきおこされたものと考えられた。これらの結果から、PEAはラットの脳内dopamine neuronに作用して、常同行動をひきおこす際に、その作用がMAPとはかなり異なり、神経終末におけるdopamineのreleaseが主となる点が明らかになった。また、PEA投与時の脳内HVAの変化についての報告は少なく、Braestrupらが全脳で、またAntelmanらがstriatumで投与60分後に増加を認めている。[1,3]これらの結果はわれわれの結果と一致していたが、今回、われわれは、striatumのみならず、精神症状との関連が注目されているmesolimbic areaにおいても、DOPACとHVA濃度の増加を認めた。この結果は、mesolimbic areaにおいても、striatumと同様、PEAによりdopamineの神経終末からdopamineのreleaseがひきおこされていると考えられ、このmesolimbic areaにおける変化は、精神症状出現時の尿中PEA排泄量の増加を示す患者の病態を解明する際に、何らかの手がかりとなる可能性をもつと思われる。

〈文　献〉

1) Antelman, S. M., Edwards, D. J. & Lin, M. (1977) Brain Res. 127, 317-322. 2) Boulton, A. A. (1976) Trace amine and the brain. (ed. Usdin, E. & Sandler, M.) 21-39. 3) Braestrup. C. & Randrup, A. (1978) Noncatecholic phenylethylamine. part 1 (ed. Mosnaim, A. D. & Wolf. M. E) 245-269. 4) Karoum, F., Nasrallah, H., Potkin, S., Chuan, L., Moyer-Schwing, J., Phillips, I. & Wyatt, R. J. (1979) J. Neurochem. 33, 201-212. 5) König, J. F. R. & Klippel, R. A. (1963) The rat brain. 1-162. 6) Lewander, T. (1977) Drug addiction II (ed. Martin, W. R.) 33-246. 7) 俣賀, 西川, 仙波, 高嶋, 融 (1981) 医学のあゆみ 116, 216-220. 8) 中河原, 仮屋, 渡辺, 石井, 島薗 (1979) 精神薬療基金研究年報 11, 122-126. 9) 中河原, 渡辺, 仮屋 (1981) 蛋白質核酸酵素 26, 1259-1265. 10) Nakajima, T., Kakimoto, Y& Sano, I. (1964) J. Pharmac. Exp. Ther., 143. 319-325. 11) Potkin, S. G., et al. (1979) Science 206, 470-471. 12) Spatz, H. & Spatz. N. (1978) Noncatecholic phenylethyl amine. 447-474. 13) Suzuki, O. & Yagi, K. (1976) Anal. Biochem. 75, 245-269.

14 逆耐性現象形成ラットの常同行動発現時の線条体・中脳辺縁領域における dopamine 代謝

西川 徹・俣賀宣子・高嶋瑞夫・融 道男
(国立神経センター・疾病III)

〔要 約〕

逆耐性現象に伴う dopamine (DA) ニューロンの反応性変化を調べる目的で、ラットに d-methamphetamine (MAP) 6mg/kg/day を14日間反復投与し、最終投与15日後に無処置ラットには常同行動を惹起しない量の MAP (2mg/kg) を再投与し、投与30分および120分後に行動観察とともに、線条体および中脳辺縁領域で tyrosine 水酸化酵素 (TH) 活性, DA, 3,4-dihydroxyphenylacetic acid (DOPAC), homovanillic acid (HVA) を測定した。

1) MAP を反復投与したラットでは、対照群で 2mg/kg MAP の再投与にみられた中脳辺縁領域 TH 活性の有意な低下が見られなかった。線条体でも有意な活性低下の持続時間が短縮した。2) DA 量は線条体で120分後まで対照より有意に低値を示し、中脳辺縁領域では30分後に低値を示した。3) DOPAC は、両部位とも30分後および120分後に対照群に比し有意に高い値を示した。4) HVA は、線条体では対照群とほとんど変化なく、中脳辺縁領域では120分後に高値を認めた。5) DOPAC/DA 比は、中脳辺縁領域では0分30分120分で、線条体では30分120分後に有意な高値を認めた。

以上の結果から、MAP 前処置群では再投与時に DA の代謝回転が亢進することが示されその背景に TH の調節機構の変化が関与していることを測定条件を変更して検索した。

Key words : methamphetamine, reverse tolerance, tyrosine hydroxylase.

ヒトの amphetamine (AMP) 精神病では、分裂病様症状の発現に関して連用した薬物に対する感受性増強が長期間持続し、精神分裂病の発症ならびに再発機構との関連が考えられている。この現象は薬物に対する耐性が生じないという観点から、逆耐性現象とよばれるが、動物では種々の dopamine (DA) 作動薬の反復投与による常同行動惹起作用、移所運動量増加作用などに認められている。逆耐性現象は後シナプス DA 受容体を遮断すると考えられている抗精神病剤の前処置によって抑制され、反復投与した薬物以外の DA 作動薬の再投与によっても惹起される（交差逆耐性）ことから、脳内 DA ニューロンと密接に関係していると推測されている。本実験は逆耐性発現時の DA ニューロンの反応性の変化を明らかにする目的で d-methamphetamine (MAP) をラットに慢性投与した後急性投与では常同行動をおこさない少量の MAP を再投与した際の線条体および中脳辺縁領域の tyrosine hydroxylase (TH) 活性, DA, 3,4-dihydroxyphenylacetic acid (DOPAC) および homovanillic acid (HVA) の経時的変化を行動と合わせて検討したものである。

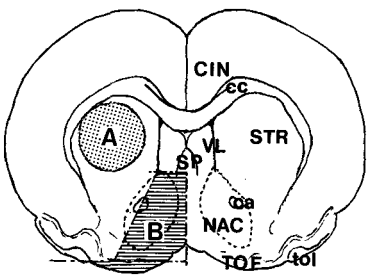


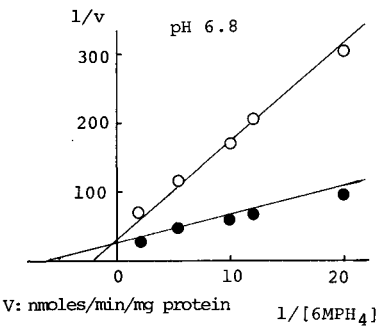
Fig.1 脳部B位の切り出し方
A 線条体　B 中脳辺縁領域
ca: 前交連　SP: 中隔　VL: 側脳室
cc: 脳梁　STR: 線条体
CIN: 帯状回　TOF: 嗅結節
NAC: 側坐核　tol: 外側嗅索

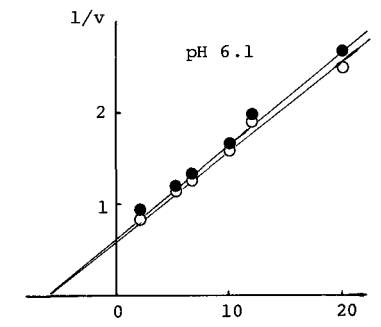
[方法] 薬物の投与法：雄性 Wistar 系ラット (MAP 投与開始時 180-200g) を1ケージに5匹

すつ入れ、24°C, 湿度 50%, 照度は床面で約 150lx, 7-19 時を明期とする条件下で飼育した。 Haloperidol (HAL) 急性投与実験では 1mg/kg を腹腔内投与し、2 時間後に断頭した。 MAP 急性投与実験では d-methamphetamine hydrochloride 注射液を用い、2mg/kg を腹腔内投与した後30分で断頭した。対照群には MAP に対しては同容量の生理的食塩水を、HAL に対しては同容量の注射液溶媒を投与した。

MAP の慢性投与実験では 6mg/kg を 1 日 1 回一定時刻 (10 時 - 11時) に腹腔内に投与した。対照群の動物には体重あたり同容量の生理食塩水を注射した。 14 日間の反復投与後休薬し、休薬15日目の10時 - 11時に 2mg/kg の MAP を再投与し、注射後 0, 30, 120 分に 5 分間の行動観察を行って断頭した。 行動評価: MAP によって生ずる常同行動は、Borison ら[1]の作成した表を参考とし、用量を展開した急性投与実験に基づいて 8 段階の尺度で評価した。 脳部位の切り出し: 断頭後、0°C 以下に保持した冷凍箱内で開頭し、脳は直ちに -80°C の低温槽で凍結させた。次に凍結切片作製機中 (-10°C) で 600 μl の前額断切片をつくり、-15°C の冷凍箱内で直視下に中脳辺縁領域として側坐核, 嗅結節, 中隔の一部などを含む部位または線条体を切り出した (Fig.1)。 MAP 投与実験群では各1匹の左半側を TH 活性の測定に、右半側の組織を DA, DOPAC および HVA の定量に供した。 TH 活性の測定: TH 活性は渡部ら[2]の方法を用いて測定した。水酸化反応は pH6.1 あるいは pH6.8 で行ったが、前者では 0.1 M Na acetate buffer (pH 6.2) を、後者では 0.1 M K phosphate buffer (pH 6.8) を緩衝液として用いた。 DA,DOPAC,HVA の定量: 半側の脳組織に 0.4 N perchloric acid (PCA) 130 μl, 0.1 N PCA に溶した内部標準物質 3,4-dihydroxybenzylamine, p-hydroxyphenylacetic acid 10μl を加え超音波破砕した後、蛋白定量用に 10μl とり、冷却遠心分離した。上清を 2 分し一方を DA 定量に用い、他方で DOPAC および HVA を測定した。[4] 蛋白量は Lowry 法[3]に従って測定した。

[結果] 1) HAL 急性投与の線条体の TH 活性に与える影響: 1mg/kg HAL 投与 2 時間後の線条体で





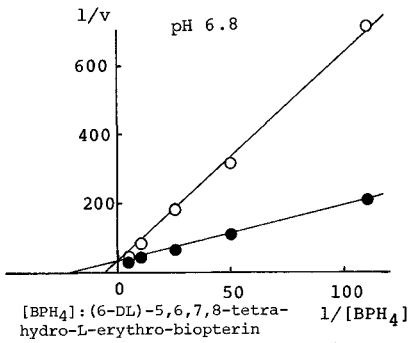


Fig.2 Haloperidol (1mg/kg) 腹空内投与2時間後のラット線条体における TH 活性。Pteridine 補酵素に対する反応定数の pH による変化。
●: Haloperidol
○: 注射溶媒

Table 1 MAP (2mg/kg) 腹空内投与30分後のラット線条体における TH に対する pH の影響。

	pH 6.1	pH 6.8
Saline n=8	1.045±0.024 (100±0.03)	0.0258±0.0006 (100±2.40)
MAP n=7	1.064±0.017 (101.90±0.02)	0.0203±0.0004 (78.44±1.47)

mean±S.E.M. (nmoles/min/mg protein)
( ): % of control

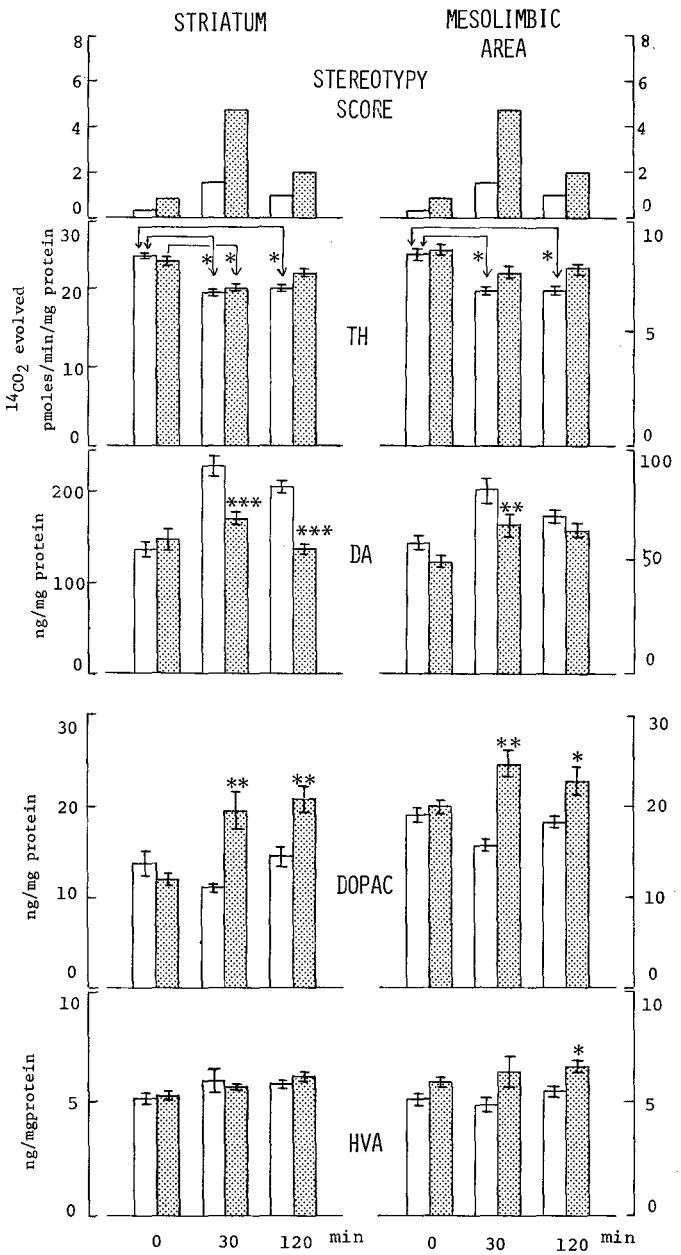


Fig.3 MAP2mg/kg 投与に対するMAP慢性投与の影響

MAP前処置群　対照群　mean±S.E.M.　n=7-8

* P < 0.05　Student's t-test：比較は同時間の対照群に対して行った。THについては線で結んだグループ間における比較を示す。
** P < 0.01
*** P < 0.001

L-tyrosine の濃度を 100-150μM に固定し、6MPH$_4$の濃度を 50-200μM まで展開して Lineweaver-Burk プロットにより TH の反応定数を求めたところ、pH6.8ではVmax値はほとんど変化ないがKm値は対照群の約1/4に減少した。pH6.1ではこの効果は認められなかった。pH6.8では、BPH$_4$についても6MPH$_4$の場合と同様、Km値の減少が見られたがVmax値はほとんど変化がなかった(Fig. 2)。2) MAP急性投与の線条体TH活性に与える影響：2mg/kg MAP 投与30分後の線条体でL-tyrosine の濃度を 100μM,6MPH$_4$の濃度を200μMに定めて、TH活性を測定したところ、pH6.1ではほとんど変化がなく、pH6.8では対照群に比して有意に低下していた(table 1)。3) MAP 2mg/kg 投与に対するMAP慢性投与の影響 (Fig.3) i) 常同行動：生理食塩水を14日間投与した動物ではMAP 2mg/kg 投与によっては常同行動を生じないのに対し、MAP 6mg/kg を14日間反復投与した動物では30分後に明らかな常同行動が見られ、逆耐性が形成されていることがわかった。ii) TH活性の変化：pH6.8における活性の変化について検討したところ、

対照群では線条体、中脳辺縁領域ともに2mg/kg のMAP 投与により120 分後まで続く活性の有意な低下を認めた。MAP 前処置群では低下する傾向はみられたが投与30分後の線条体を除いて有意な変化ではなかった。iii)DA 量の変化：線条体において0分では両群に有意差を認めなかったが、30分後、120分後にはMAP 前処置群の方が有意に低い値を示した。中脳辺縁領域では30分後にのみ有意に低い値を示した。iv) DOPAC 量の変化：線条体、中脳辺縁領域とも30分と120分後にMAP 前処置群の方が有意な高値を示した。v) HVA 量の変化：線条体では0分，30分，120分後いずれも両群の間に有意な変化は認められなかったが、中脳辺縁領域では120分後にMAP 前処置群の方が高値を示した。vi) DOPAC/DA 比の変化：中脳辺縁領域では0分から、MAP で前処置したラットの方が有意に高い値を示し、再投与後にはこの効果がさらに強められた。線条体では、0分では両群に有意差はなく30分後、120分後にMAP 前処置群の方が高値を示した（Fig.4）。

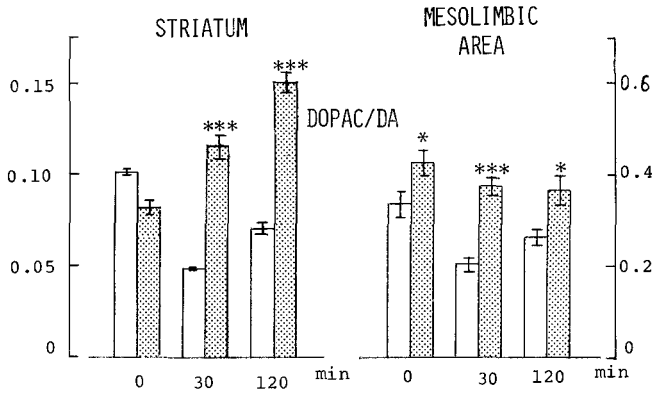


Fig.4 MAP2mg/kg投与に対するMAP 慢性投与の影響

＊p＜0.05　＊＊＊p＜0.001　Student's t-test

〔考察〕HAL の急性投与動物における線条体TH の反応定数を検討した結果pteridine 補酵素に対するKm はpH6.1 では変化なく、pH6.8 では低下を示した。この結果はBakhit ら[5]によっても得られており、HAL の急性投与によって脳内DA 神経終末に生ずるDA代謝亢進の事実から考えて、線条体TH についてはpH6.8 における水酸化反応がより生理的な条件を反映していると考えられる。2mg/kgのMAP を急性に投与した動物の線条体におけるTH の変化についてもpH6.8で認められた活性の低下が生体内の変化を示している可能性がある。

DA とその代謝産物の測定から逆耐性現象を形成した動物でMAP の再投与により常同行動を呈した時に、線条体および中脳辺縁領域でDA の代謝亢進することが示唆された。これには前シナプス側におけるTH 活性の調節機構の変化が関与している可能性がある。MAP 慢性投与ラットではHAL によるDA の代謝亢進作用が、線条体およびとくに中脳辺縁領域で著しく増強されることから[6]、逆耐性現象の発現には前シナプスの自己受容体の感受性低下も関与していると考えられる。

〔文献〕1) Borison, R. L., et al. ; Life Sci., 21; 117, 1977　2) Watanabe, S. et al.; J. Neurochem., 36:266,1981　3) Lowry, O.H., et al.;J. Biol. Chem., 193:265, 1951　4) 保崎宣子他；医学のあゆみ, 116: 216, 1981　5) Bakhit, C. and Gibb, J. W. ; Life Sci., 25: 1389, 1979　6) Toru, M., et al. ; Psychopharmacol., in press.

15 『微細脳障害症候群モデル』ラットにおける脳 dopamine 受容体

渡 部 修 三(国立神経センター・疾病III)
P.Seeman(トロント大・薬理)

〔要　約〕

微細脳障害症候群の一つのモデルとして提唱されている新生仔期6-hydroxydopamine処置ラットが一過性に示すlocomotor hyperactivity の受容体学的背景を探る目的で、中脳辺縁領域及び線条体の二つのタイプのdopamine 受容体の変化を検索した。

1) ^{3}H-SPIPの親和性が高い D_2 sitesは、線条体で対照群に比しBmax の増大で示されるoverdevelopment の方向、中脳辺縁領域ではBmax の減少で示されるunder-developmentの方向での変化が認められた。DA 受容体に作用すると考えられる各種薬物の生物学的力価が D_2 sitesを標識する ^{3}H-SPIP結合を阻害する効果と相関していることから、この D_2 sitesの変化の部位差はこれらラットに対するamphetamineなどの効果を考える上で意味ある所見と思われる。

2) ^{3}H-DAに親和性が高い D_3 sitesについては両部位共に明らかな減少を示したが、指標となる酵素などの測定により後シナプス側にはunderdevelopment が見いだされなかったことなどから、この D_3 sitesのおよそ50%は前シナプス側に存在することが推定された。

Key words : dopamine-receptors, 6-hydroxydopamine, neonate

新生仔期のクリティカルな時点で6-hydroxydopamine(6-OHDA)処置を受けて、発達途上にあるdopamine (DA) 神経終末が選択的に傷害されたラット仔は、生後3ないし4週に一過性に対照群に比して多動状態を示し、その後もある種の学習能力の障害を示すとされShaywitzらによって微細脳障害症候群のひとつのモデルとして提唱されている。[10] これらラットの示す特異な一過性の多動状態の受容体学的背景を探ることを目的に、locomotor activityを主として作動させていると考えられている中脳辺縁領域のDAシステムのDA受容体と線条体DA受容体について ^{3}H-spiroperidol (^{3}H-SPIP)と ^{3}H-DA[8]をリガンドとして、それぞれに親和性の高い D_2-タイプと D_3-タイプの結合部位について検索した。

〈実験方法〉

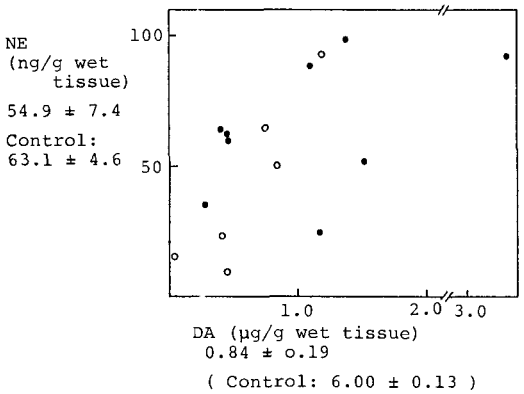
i) 動物および処置；Sprague-Dawley ラット新生仔は、出産後1日以内に母親ラット当り雄雌5匹ずつの計10匹に調整された。生後5日齢目にShaywitz らと同様Smith らの方法により、desmethylimipramine(DMI)(20mg/kg, i.p.)投与1時間後[4]に、0.04% ascorbate含有の生食25μl に溶かした100μg 6-OHDAを"大槽内"投与した。

ii) 脳組織ホモジネート調整；処置後14日、20日、30日目の定刻(11時±30分)に頸椎脱臼させたラット仔脳から取り出した線条体及び中脳辺縁領域を雄雌同数ずつTEAN 緩衝液(15mMトリス－塩酸、pH7.4, 5mM Na_2 EDTA, 0.02% ascorbate, 12.5μM nialamide) 25容ポリトロンを用いてホモジナイズした。40ml 同緩衝液で39000 xg4回遠沈洗浄[9,5]した後、各Binding アッセイに適当な蛋白濃度になるよう同緩衝液にサスペンドした。

iii) 受容体結合アッセイ； 各アッセイ当り displacer 溶液あるいは緩衝液0.2ml, ^3H-リガンド 0.2ml, 組織サスペンション0.2mlの計0.6mlで3～4重に20°-21°C下で ^3H-DA 結合は45分、^3H-SPIP結合は60分インキュベートした。蛋白濃度は ^3H-DA結合で0.4mg/アッセイ、^3H-SPIP 結合で0.2mg/アッセイが通常用いられた[4)5)]。各アッセイから0.5mlをとり Whatman GF/B で吸引濾過した。

D_2-受容体に対する ^3H-SPIPの特異結合は 10^{-7} M (+)-butaclamol (BTC)で阻害される部

Fig. 1-A DA and NE Contents in Striata of 25-day-old Rats Neonatally Treated with 6-OHDA/DMI



1-B DA and NE Contents in Mesolimbic Areas of 25-day-old Rats Neonatally Treated with 6-OHDA/DMI

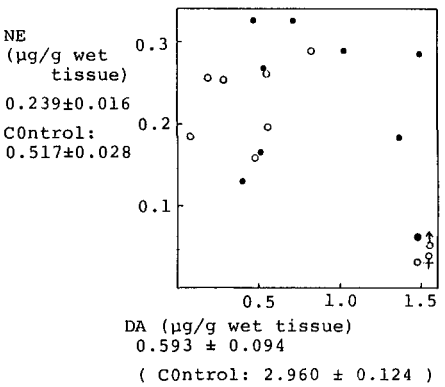
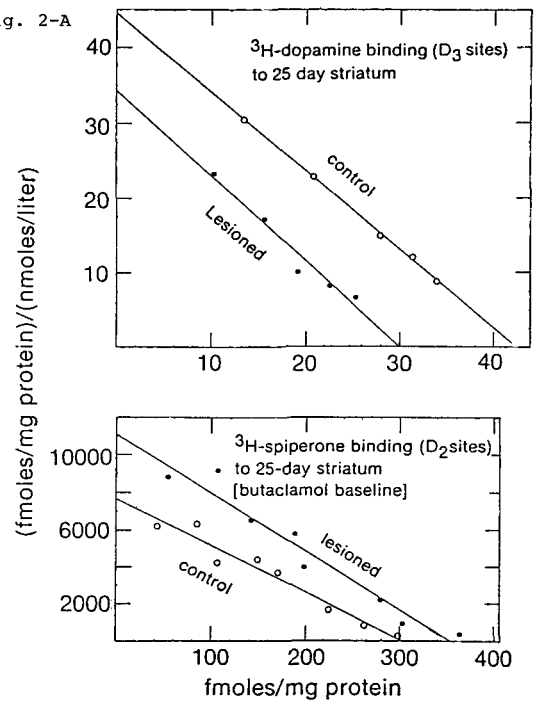


Fig. 2-A



2-B

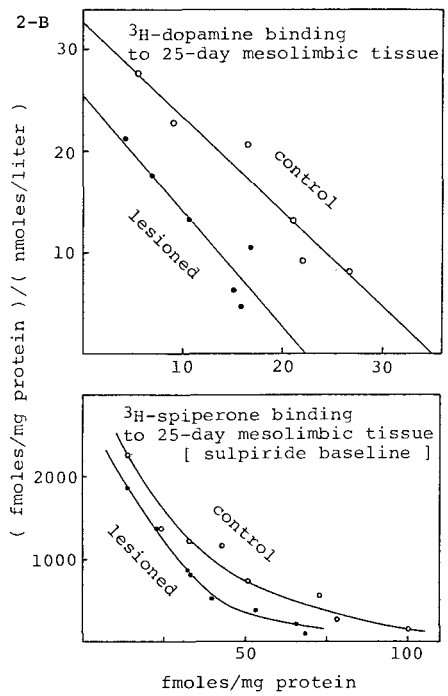


Table 1 Bmax and Kd of ^{3}H-DA and ^{3}H-SPIP binding Sites

(A) to the Striatal Tissues of Rats Neonatally Treated with 6-OHDA/DMI

D. of Age		19	25	35
^{3}H-DA Binding (10^{-6}APO)	Control	27.4±3.7(0.97±0.11)	44.3±6.4(1.38±0.36)	91.0 (1.68)*
	Treated	17.2±3.4(0.89±0.21)	27.5±2.2(1.12±0.15)	35.7 (1.48)*
^{3}H-SPIP Binding (10^{-7}(+)-BTC)	Control	172.5 (0.05)*	237.8±26.6(0.04±0.00)	312.4 (0.03)°
	Treated	198.9 (0.05)*	269.4±31.4(0.04±0.00)	342.1 (0.04)°

(B) to the Mesolimbic Tissues

^{3}H-DA Binding (10^{-6} APO)	Control		34.8 (1.06)°	45.0 (1.14)*
	Treated		22.3 (0.87)°	25.7 (0.75)*
^{3}H-SPIP Binding (10^{-5} Sulp.)	Control	58.0 (0.04)°	66.0±11.3(0.04)	88.1 (0.04)°
	Treated	58.0 (0.04)°	55.3±10.7(0.03)	74.3 (0.04)°

° : single determination
* : average of 2 determinations (Mean ± S.E.M.)

分であるが、この結合にはserotonin性S2受容体も含まれるため中脳辺縁領域の場合は10^{-5}M sulpirideが一部用いられた。[5] D2結合部位に対する^{3}H-DAの特異結合は10^{-6}M apomorphine (APO)で阻害される部分とした。[8]

iv) その他；Choline Acetyltransferase (cAT)とGlutamate Decarboxylase (GAD)測定はFonnumの方法、[1)2)] GABA定量はOkadaらの方法、[7)] DAとnorepinephrine (NE)定量は保賀らの方法[6)]によった。

Table 2

(A) Choline Acetyltyansferase Activity in Caudate-Putamen of 25-day-old 6-OHDA Treated Rats

Ach formed	Control (6)	Treated (6)	
nmol/min/mg.protein	7.12 ± 0.27	8.91 ± 0.35	p<0.005
nmol/min/mg.tissue	0.86 ± 0.03	1.02 ± 0.05	p<0.04
nmol/min/r.striatum	21.03 ± 1.12	21.68 ± 0.83	NS

(B) Glutamate Decarboxylase Activity

CO_2 evolved	Control (6)	Treated (6)	
nmol/hr/mg.protein	137.4 ± 4.4	139.1 ± 3.3	NS
nmol/hr/mg.tissue	16.8 ± 0.7	15.7 ± 0.5	NS
nmol/hr/r.striatum	418.4 ± 40.1	353.2 ± 22.0	NS

(C) GABA Content

NADPH formed	Control (8)	Treated (8)	
nmol/mg.protein	28.19 ± 1.27	32.74 ± 1.85	p<0.07
nmol/l.striatum	68.47 ± 4.54	70.44 ± 5.32	NS

(Mean values ± S. E. M.)

<結果と考察>

6-OHDA処置群では体重、脳重、組織重量に有意な発育遅滞が認められ実験時点で対照群のそれらに比し、約9~18%小なかった。データの分析にはこれが考慮されねばならない。

Fig. 1-A および -B に示されるように両部位共に DA 神経終末により特異的な減少が認められた。線条体で 99%以上の DA 減少を見た一部の群では NE の減少は 33%に達したが平均では DA が 86%減少し、NE の減少は 13%であった。同一群の中脳辺縁領域では DA の 80%減少に対し NE の減少は 54%に達しており、これはこの部位の NE 量が線条体の約 10 倍量であることと、6-OHDA に対する脳部位の反応に差異があることによるのかもしれない。

Table 1 及び Fig. 2 に示されるように、線条体では 25 日齢において処置群で ^{3}H-SPIP 結合（D_2 部位）の Bmax の平均 13%の増加および ^{3}H-DA 結合（D_3 部位）の Bmax の平均 39%の減少が見られ、いずれにおいても K_D に有意な変化は認められなかった。この 25 日齢における変化の傾向は 19 日齢および 35 日齢でも同様であった。これに対し中脳辺縁領域では D_3 部位の Bmax は線条体におけると同様に明らかに減少した。D_2 部位についてはベースラインを (+)-BTC とした[5]場合明らかな曲線となり、その様相から高親和性コンポーネントである D_2 部位の減少が推定された。従って (+)-BTC よりもより D_2 特異性が高いとされる sulpiride (10^{-5}M) をベースラインとして検討したところ、やはり緩い曲線にはなったものの処置群の方が対照群より減少の方向を常に示して線条体との差異が認められた。線条体において D_2 部位の処置群における十数%の増加は蛋白量の発育増加にも遅滞が認められることを考慮すればむしろ D_2 受容体の総量としての差異はほとんどないわずかながらの overdevelopment であり、機能的には eusensitive ～ hypersensitive と考えられる。一方中脳辺縁領域における処置群での D_2 部位の underdevelopment の方向は機能的には hyposensitive と考えることができよう。D_2 受容体が turning, stereotypy, emesis 等と関連している[8]ことを考慮すれば、他の伝達物質で作動するシステムの変化も考慮せねばならぬとはいえ、この差異はこうした状態にある動物への薬物の作用の仕方を考える上で興味深い。一方 D_3 部位の明らかな減少はこの結合部位の局在を考える上で重要である。つまりこの実験でのような発育時点で 6-OHDA/DMI 処置がなされた場合、成熟ラットで線条体で形成しているシナプス結合の大部分を占める axo-spinous contact はほとんど形成されていないので成熟ラットを使用した場合問題になる transsynaptic degeneration[3]を考慮しなくてもすむので、6-OHDA の効果を pre-site に限って考えることができる。CAT, GAD, GABA の測定結果からは D_3 部位の減少を説明し得るような post-site の underdevelopment は見いだされないし、また、残存している DA 神経終末以外に局在している D_3 部位におそらく生じているであろう supersensitivity を考慮すれば、この実験での 25 日～35 日齢で対照群の値の 38～61%減という結果から、D_3 結合部位の少なくとも半分は pre-site に局在していると考えることが可能であろう。

謝辞：この研究に御助力下さった Mrs. C. Ulpian、野田恭平、保富宣子、高嶋瑞夫、大内敏彦の諸氏に感謝致します。

付：本研究の一部は 8th International Congress of Pharmacology で発表した。

1) Fonnum,F.A.(1969)Biochem.J.,115,465-472 2) Fonnum,F.A.(1970)Brain Res.,20,259-275
3) Hattori,T.et al.(1973)Exp.Neurol.,41,599-611 and his personal communication
4) Hedreen,J.(1975)in Chemical Tools in Catecholamine Research Vol.1(Jonsson,G. et al., eds)pp.91-100,North-Holland,Amsterdam 5) List,S.J. et al.(1981)Proc.Nat.Acad.Sci.USA, 78,2620-2624 6)[illegible],N. et al.(1981)[illegible],116,216-220 7) Okada,Y. et al.(1971)Exp.Brain Res.13,514-518 8) Seeman,P.(1980)Pharmacol.Rev.32,229-313 9) Seeman,P. et al.(1975)Proc. Nat.Acad.Sci.USA,72,4376-4380 10) Shaywitz,B.A. et al.(1976)Science,191,305-308
11) Smith,R.D. et al.(1973)J.Pharmacol.Exp.Ther.,185,609-619

16 ビリルビン性脳症：Gunn ラット脳における DNA 量および化学伝達関連酵素活性

大野 拓夫(愛媛大・医・生理)

〔要　約〕

遺伝的高ビリルビン血症を呈するGunnラットにおいて、脳へ移行し、蓄積したビリルビンは特定の部位での神経終末に著るしい生化学的変化を引き起し、また、部位によっては、コリン作動性ニューロン系の遅れが見られた。一方、jjラットでは、 j+ラットに比較して明らかな小脳の低形成が認められ、この病因として、ビリルビンによる DNA合成の障害が報告されている。そこで、Gunnラット脳各部位の DNA量を測定し、これを基礎に、化学伝達関連酵素活性を測定した。成熟期の雄のGunnラットの小脳半球、小脳虫部前葉、小脳虫部後葉、嗅球、嗅結節、新線状体、海馬、視床下部、視床、脚間核、黒質を切り出し、 DNA量、タンパク質量、コリン一アセチル基転移酵素(CAT)、 グルタミン酸脱炭酸酵素(GAD)、 チロシン水酸化酵素(TOH)　活性を測定し、jjラットと j+ラットとで比較検討した。CAT、GAD、TOH 活性のGunnラット脳における分布を、単位 DNA量あたりで示し、jjラットと j+ラットとで比較すると CAT活性は、小脳、嗅球、海馬、視床下部、視床で、 GAD活性は、嗅球、新線状体、海馬、視床、脚間核、黒質で著るしい差が見られ、 TOH活性は、差が見られる部位はなかった。単位タンパク質量あたりの DNA量は、jjラットでは、 j+ラットと比較して、新線状体、扁桃体では増加し、嗅球、海馬、黒質では減少した。これらの結果と、遺伝的高ビリルビン血症を呈するGunnラットに見られる神経症状と、どのように関連するかを説明することは、現時点では、困難である。疾患モデル動物における神経症状をどのような示標で表現するかは、Gunnラットにみられるビリルビン脳症をも含めて、今後の課題である。

Key words : Bilirubin encephalopathy

遺伝的高ビリルビン血症を呈するGunnラットにおいて、脳へ移行し、蓄積したビリルビンは特定の部位での神経終末に著るしい生化学的変化を引き起す(7)。すなわち、嗅球でのコリン一アセチル基転移酵素 (CAT)活性の上昇、扁桃体、黒質での CAT活性の低下、新線状体、脚間核でのグルタミン酸脱炭酸酵素 (GAD)活性の低下であり、非抱合ビリルビンによる選択的神経毒性を示唆する。遺伝的高ビリルビン血症を呈するGunnラットの脳は全体的に濃く黄染されるが、嗅結節、海馬、視床、視床下部、小脳皮質（半球部）でのCAT、GAD活性にはほとんど差が見られなかった。中枢神経系の特定の部位での神経終末に対する非抱合ビリルビンの毒性を調べるため、成長期および成熟期の雄のGunnラット脳各部位のCAT、GAD活性を分析し、核黄疸ラット(jj)脳における活性を対照ラット（j+）脳における活性と比較したところ、jjラットのGABA作動性神経終末には何らの影響もおよぼさないが、嗅結節、海馬、新線状体、視床、視床下部でのコリン作動性神経路に発達の遅れが見られた。しかし、この遅れも成熟期には、 j+ラットとほとんど差が見られないほどに回復した(8)。一方、jjラットでは、j+ラットに比較して明らかな小脳低形成が認められ(6,9,10)、この病因としてビリルビンによる DNA合成の障害が報告されている(10)。そこで、Gunnラット脳各部位の DNA量をjjラットと j+ラットとで比較検討した。

（実　験　方　法）

当教室で維持しているGunnラットで、成熟期の雄のヘテロ接合体(j+：表現型、正常）とホモ接合体（jj：表現型、黄疸）とを用いた。エーテル麻酔下で断頭し、ラットの全脳を可及的速かにとり出し、氷冷下で小脳半球、小脳虫部前葉、小脳虫部後葉、嗅球、嗅結節、新線状体、扁桃体、海馬、視床下部、視床、脚間核、黒質などを鋭角に割ったブレードで切り出した。小脳半球は、Sulcus paravermianus を小脳虫部との境界とし、小脳虫部は、第一裂から小節吻側端に向った斜め下方に割

を入れ、前葉と後葉との境界としたので、小脳虫部後葉には小節も含まれる。他の部位の切り出しはKönig とKlippel により著わされた脳定位図により行なった(4)。試料は直ちに、0.1% Triton X—100 溶液0.3 ～0.6 mlでホモゲナイズし、酵素活性測定の検体とした。アセチルコリン、ガンマーアミノ酪酸およびドーパミンの合成酵素活性、すなわち、コリンアセチル基転移酵素(CAT)、グルタミン酸脱炭酸酵素(GAD)、チロシン水酸化酵素(TOH) 活性を測定した。これらの酵素活性は、放射性同位元素を用いた同位元素トレーサー法により、1 mg以下の微量組織について測定した。

CAT活性は、コリンと ^{14}C—アセチル—CoA とを基質とし、反応生成物アセチルコリンをカリグノスト液体イオン交換法で抽出分離することにより検定した(2)。 GAD活性はグラスーラバーバイアル法を用い測定した。1 μmole のα—カルボキシル基標識 ^{14}C—グルタミン酸と0.1 μmole のピリドキサール燐酸とを含む反応液と酵素液とを窒素ガス存在下で反応させ、生成産物である放射活性炭酸ガスをアルカリ捕獲して測定し見積った(1)。 TOH活性は、カルボキシル基標識 ^{14}C—チロシンを基質にし、 6—メチルプテリディンをCofactorとして生成するドーパに豚腎より部分精製した過剰量のドーパ脱炭酸酵素を加えたグラスーラバーバイアル中での第二段反応から得られる放射活性炭酸ガスをアルカリ捕獲して測定し見積った(11,12)。

DNA量は、GoldとShochat の方法(3)を用いた。 DNAを6～50 μg含む試料液0.1 mlをテフロンライナー付ねじ口試験管に置き、0.1N硫酸0.1 mlを加え 1時間、100°C で加水分解した。 5分間、冷却後、5分間、低速(2500 rpm)で遠心分離した。その後、過ヨー素酸試薬(0.1M メタ過ヨー素酸ナトリウム—9.0M燐酸) 0.1 mlを加え、充分に混和し、20分間、室温に放置した。そして、亜ヒ酸溶液(10% 亜ヒ酸ナトリウム—0.5M 硫酸ナトリウム—0.1N 硫酸) を加え、過剰の亜ヒ酸ナトリウムを分解した。黄褐色にヨー素が発色するが、激しく混合することにより消失した。室温に10分間、放置後、チオバルビツール酸溶液(0.6% 2—チオバルビツール酸—0.5M 硫酸ナトリウム) 3.0ml を加えた。充分に攪拌し、ねじ蓋をつけ、15分間、100°C で加熱した。水浴中(20°C)に浸した後、発現する淡紅色の色素原を抽出、濃縮するために、シクロヘキサノン 1.0ml を加えた。充分に攪拌し、 5分間、2500 rpm で遠心分離し、シクロヘキサノン液の分離を促がした。上部シクロヘキサノン層の淡紅色の吸光度を 532nmで測定した。図1 に子牛胸腺 DNA(Sigma, Type I) により得られた検量線を示した。

タンパク質量は Lowryらの方法(5)を用い測定した。

このようにして測定したウイスターラット脳における DNA量(mg／g タンパク質)は、嗅球で、20、嗅結節で、26であった。

(結 果)

jjラットは、すべて、著るしい小脳低形成を示し、 j+ラットと比較して、重量で70%の減少を示した(表1)。対照的に、小脳以外の部分ではほとんど差が見られなかった(6,10)。jjラットの小脳半球の重量は、 j+ラットと比較して、78%の減少、小脳虫部では、66%の減少であり、前葉と後葉とでは、減少率には著るしい差は見られなかった。

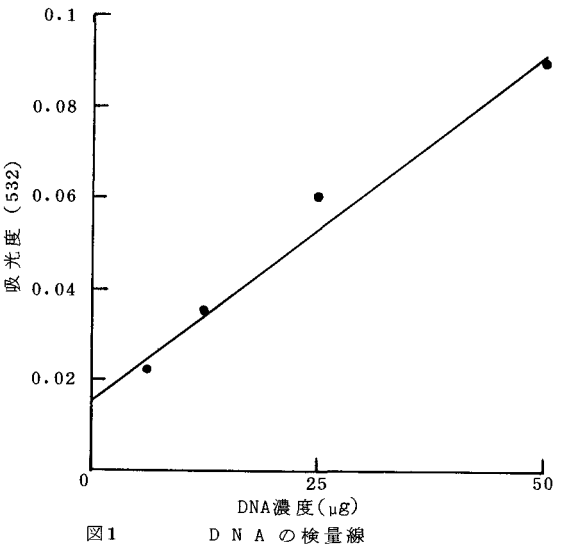


図1 D N A の検量線

表1　成熟雄Gunnラットの体重、全脳重および小脳重

	体重 (g)	全脳 (g)	小脳 (mg)	小脳半球 (mg)	小脳虫部 (mg)	小脳虫部前葉(mg)	小脳虫部後葉(mg)
j+	175±14(10)	1.85±0.14(10)	293±21(10)	183±16(10)	110±9(10)	40±1(9)	71±5(9)
jj	167±12(8)	1.64±0.14(8)	89±8(8)	40±3(8)*	37±4(8)*	15±2(5)*	22±2(5)*

*j+との差の有意性 (Mann−Whitney U−test)　p<0.001.　平均値±標準偏差(実験数).

jjラット小脳の DNA量は、 j+ラットと比較して、40%の減少を示した(表2)。 jjラット小脳半球の DNA量は、 j+ラットと比較して36%の減少、小脳虫部では、57%の減少であり、前葉では、90%の減少、後葉では、67%の減少で、前葉での減少率は、後葉での減少率と比較して、著るしく大きかった。

表2　成熟雄Gunnラット小脳のDNA量 (mg／組織)

	小脳	小脳半球	小脳虫部	小脳虫部前葉	小脳虫部後葉
j+	1.16±0.16(6)	0.511±0.0414(6)	0.458±0.0849(6)	0.346±0.0274(4)	0.380±0.0219(4)
jj	0.692±0.08(3)**	0.329±0.0179(3)**	0.197±0.0589(3)**	0.0369±0.00231(3)*	0.125±0.00379(3)*

**j+との差の有意性 (Mann−Whitney U−test)　p<0.012.　*p<0.028.　平均値±標準偏差(実験数).

jjラット小脳における単位タンパク質量あたりの DNA量は、 j+ラットと比較して、54%の減少を示した(表3)。 jjラット小脳半球では、 j+ラットと比較して、46%の増加、小脳虫部では、52%の減少であり、小脳半球と小脳虫部とでは対照的な結果を示した。更に、小脳虫部においても、前葉では、25%の減少、後葉では、32%の増加となり、対照的な結果を示した。

jjラット脳各部位における単位タンパク質量あたりの DNA量を、 j+ラットと比較して 表4に示し

表3　成熟雄GunnラットのDNA量 (mg／g タンパク質)

	小脳	小脳半球	小脳虫部	小脳虫部前葉	小脳虫部後葉
j+	42.7±2.57(6)	32.4±2.92(6)	47.0±4.54(6)	68.6±2.91(6)	41.2±3.24(6)
jj	19.7±2.60(4)*	47.4±1.77(4)*	22.6±1.89(4)*	51.7±2.22(4)*	54.4±1.24(4)*

*j+との差の有意性 (Mann−Whitney U−test)　p<0.005.　平均値±標準偏差(実験数).

た。単位タンパク質量あたりの DNA量における著るしい変化が、嗅球、新線状体、扁桃体、海馬、黒質で明らかに示されている。jjラットでは、 j+ラットと比較して、新線状体、扁桃体では増加し、嗅球、海馬、黒質では減少した。

表4　成熟雄GunnラットのDNA量 (mg／g タンパク質)

	嗅球	嗅結節	新線状体	扁桃体	海馬	視床下部	視床	脚間核	黒質
j+	56±5(6)	54±6(6)	43±4(6)	49±5(6)	40±1(6)	49±9(6)	48±5(6)	177±16(6)	160±17(6)
jj	23±3(4)*	57±3(4)	70±5(4)*	67±5(4)*	10±2(4)*	52±6(4)	56±4(4)	230±45(4)	60±21(4)*

*j+との差の有意性 (Mann−Whitney U−test)　p<0.005.　平均値±標準偏差(実験数).

コリン作動性、GABA作動性、ドーパミン作動性神経終末に係る酵素系のGunnラット脳における活性分布を、単位 DNA量あたりで示すと 表5のとうりである。jjラット脳における活性分布を j+ラット脳における活性と比較すると、 CATの活性は、小脳、嗅球、海馬、視床下部、視床で、 GADの活性は、嗅球、新線状体、海馬、視床、脚間核、黒質で著しい差がみられ、 TOHの活性は、差がみられる部位はなかった。

(考　察)

遺伝的高ビリルビン血症を呈するGunnラットにおいて、化学伝達関連酵素活性を単位 DNA量で示す

表5　成熟雄Gunnラットの化学伝達関連酵素活性

	CAT		GAD		TOH	
	μmole／hr／mg DNA		μmole／hr／mg DNA		nmole／hr／mg DNA	
	j＋	jj	j＋	jj	j＋	jj
小脳	0.12±0.01(5)	0.07±0.03(5)*	2.78±0.19(5)	3.11±0.38(5)		
小脳半球	0.15±0.01(4)	0.07±0.02(4)*	3.51±0.12(4)	1.87±0.23(4)		
小脳虫部	0.08±0.00(4)	0.05±0.02(5)*	1.94±0.11(4)	1.78±0.22(5)*		
小脳虫部前葉	0.07±0.00(5)	0.07±0.02(5)	1.56±0.11(5)	1.80±0.22(5)		
小脳虫部後葉	0.10±0.00(5)	0.06±0.02(5)*	2.21±0.11(5)	1.67±0.20(5)		
嗅球	0.28±0.10(8)	1.16±0.17(7)**	2.28±0.28(7)	5.67±0.70(6)**		
嗅結節	1.12±0.09(4)	1.16±0.20(4)	2.42±0.35(4)	1.94±0.17(4)	29±13(5)	34±7(5)
新線状体	1.98±0.50(8)	1.23±0.38(7)	3.15±0.40(8)	1.87±0.19(6)**	83±14(6)	64±14(4)
扁桃体	0.79±0.14(8)	0.47±0.18(7)	3.27±0.88(8)	3.02±1.27(7)		
海馬	0.22±0.01(4)	0.40±0.03(4)*	3.37±0.27(4)	2.61±0.16(4)*		
視床下部	0.24±0.04(5)	0.49±0.13(4)*	4.42±0.10(5)	4.56±0.65(4)	7±2(8)	6±3(7)
視床	0.66± .06(4)	0.44±0.11(4)*	4.06±0.58(4)	2.98±0.43(4)*		
脚間核	3.59±1.02(7)	3.98±1.06(7)	1.54±0.19(7)	1.16±0.37(6)**		
黒質	0.19±0.02(7)	0.18±0.06(7)	1.68±0.34(7)	5.28±1.02(6)**	5±3(4)	23±4(4)

**j＋との差の有意性 (Mann－Whitney U－test)　$p<0.001$.　*$p<0.014$.　平均値±標準偏差(実験数).

限りでは、特定の部位での、コリン作動性、GABA作動性神経路の発達に障害が見られた。しかしながら、これらのコリン作動性、GABA作動性神経路の発達における障害が、遺伝的高ビリルビン血症を呈するGunnラットに見られる神経障害（不安定な歩行、間断なく続く動揺）と、どのように関連するかを説明することは困難である。疾患モデル動物における病態をどのような示標で表現するかは、議論の的であるが、化学伝達関連酵素とビリルビン脳症とを合理的に説明することは今後の課題である。

（文　献）

（1）Albers, R.W., and Brady, R.O. (1959) J. Biol. Chem. *234*, 926—928.

（2）Fonnum, F. (1969) Biochem. J. *115*, 465—472.

（3）Gold, V.D., and Shochat, D. (1980) Analyt. Biochem. *105*, 121—125.

（4）Konig, J.F.R., and klippel, R.A. (1963) The Rat Brain：A Stereotaxic Atlas of the Forebrain and Lower Parts of the Brain Stem. Krieger.

（5）Lowry, O.H., Rosenbrough, N.J., Farr, A.L., and Randall, R.J. (1951) J. Biol. Chem. *193*, 265—275.

（6）Mikoshiba, K., Kohsaka, S., Takamatsu, K., and Tsukada, Y. (1980) J. Neurochem. *35*, 1309—1318.

（7）Ohno, T. (1980) Brain Res. *196*, 282—285.

（8）Ohno, T. (1981) J. Neurochem. *37*, 1061—1063.

（9）Sato, H., Semba, R.K., and Kashiwamata, S. (1977) Biol. Neonate *32*, 158—165.

(10) Sawasaki, Y., Yamada, N., and Nakajima, H. (1976) J. Neurochem. *27*, 577—583.

(11) Segal, D.S., and Kuczenski, R. (1974) Brain Res. *68*, 261—266.

(12) Waymire, J.C., Bjur, R., and Weiner, W. (1971) Analyt. Biochem. *43*, 588—600.

17 Gunnラット小脳におけるタンパク濃度の低下機構について

仙波りつ子・柏俣重夫
（愛知県コロニー・周生期）

〔要　約〕

Gunnラット小脳の頻度分布とタンパク濃度の加齢変化、ホモ接合体(nn)の低タンパク濃度の原因を検索した。13日齢以後nn小脳重は全体としては正規性を示さなかったが、10日齢のnnと類似の分布を示す比較的小脳重の低いグループ(nn-S)が各日齢に存在した。nn-Sタンパク濃度は10日から15日齢で全く増加しなかった。10日から30日齢のnnタンパク濃度と小脳重の正の相関は有意であり、10,13日齢で一次式、15,20日齢で小脳重の平方根の一次式、25,30日齢で二次式に従った。またほぼ一定値を示す20日齢以後のnnタンパク濃度と小脳重の相関関数は対照群の信頼下限値と小脳重76.0mg（10日齢のnn小脳重の信頼上限84.6mgに近い）で交差した。小脳重当りの乾燥重量は13日齢で小脳重と直線的正の相関を示したが30日齢ではnn-Sでわずかに低いにすぎなかった。小脳重と脂質濃度は30日齢で負の相関曲線に従い、同じ日齢のタンパク濃度曲線と鏡像関係にあった。^{14}C-leucineの小脳タンパクへのとりこみは13日齢のnnで低く、生後一週間内にみられるOrnithine Decarboxylase活性の増加のピークがnnではなかった。以上、10日齢以後の低タンパク濃度は水分および脂質含量の増加で説明され、nn小脳でタンパク合成、分解速度または内在性leucineのいずれかに変化があることが示唆された。

Key words：　Bilirubin, Cerebellar hypoplasia, Gunn rats

われわれは遺伝的高ビリルビン血症を示すGunnラットホモ接合体(nn)[8]の小脳重が15日齢以後非常にばらつき、加齢にともなうタンパク濃度の増加速度はヘテロ接合体(n+)に比してnnラットでは有意に遅いことをすでに報告した[13]。今回Gunnラット小脳重の頻度分布およびタンパク濃度の加齢変化について日齢および例数を増して詳細に検討した。さらにnnラットにおいて観察される低タンパク濃度の原因を追求するため水分、脂質含量の定量をすると同時にタンパク合成および分解系の変化（いづれかまたは双方）について知るために^{14}C-leucineのとりこみおよびOrnithine Decarboxylase (ODC)活性の加齢変化について検討した。

〔実験方法〕

Gunnラットnnおよびn+はrandom samplingをしたが酵素活性測定には同腹仔を用いた。タンパク量はLowryら[9]の方法に準拠し、乾燥重量は協和真空乾燥機で48時間凍結乾燥後ただちに重量を測定した。脂質はBligh-Dyer[3]の方法で抽出し、上層をメタノール：水（1:0.9）で3回洗浄後evaporatorで乾固し重量法によって求めた。^{14}C-leucineのとりこみは6μCi/100gの^{14}C-leucineを皮下注射したこと以外は基本的にはGreenfield-Majumdar[7]に従った。ODC活性の測定はAnderson-Schanberg[1]の方法を改良して行なった。小脳を9vol.の0.5mM DTT, 0.4mM PALPを含む10mM TES butter, pH 7.4でhomogenizeし酵素標品とした。活性測定には10mM TES butter, 0.5mM DTT, 0.4mM PALP, 150μM L-[1-^{14}C] Ornithine（比活性：5.429-6.036×10^{3}c.p.m/nmole）, 0.1ml酵素標品を含む反応系を用い37°C, 20min. incubateした後、10N H_2SO_4 10μlで反応を止め生成したCO_2をHyamineに完

本研究の一部は昭和54,55年度文部省科学研究費（NO.448131）の援助を受けた。

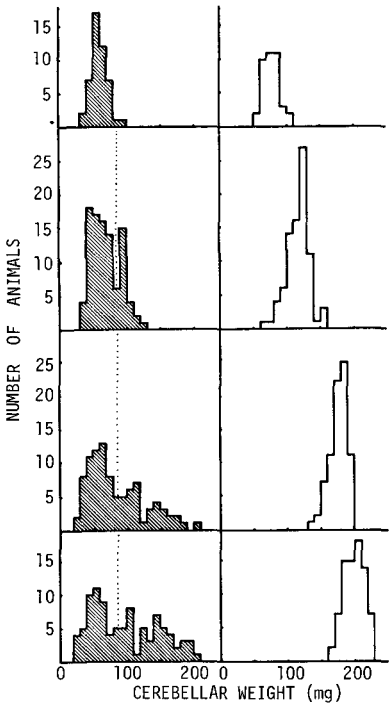


図1 Gunnラット小脳重の頻度分布のヒストグラム
上段より 10, 13, 20, 30 日齢
▨ ++ラット, □ +-ラット

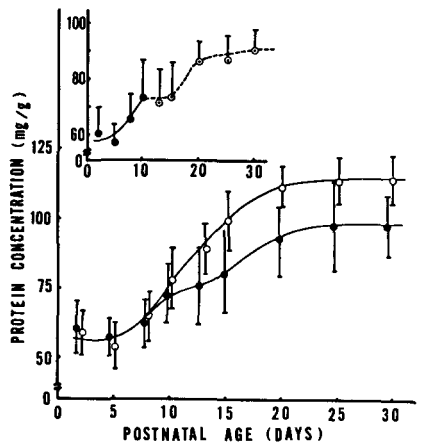


図2. Gunnラット小脳のタンパク濃度の加齢変化
●++, ○+-, ⊙--S; ++, +-: 28日齢は10例, 他の日齢は25例以上, --S: 15例以上の平均値

全に吸収させるためさらに60 min incubateした。

〔結 果〕

++ラットの小脳重は全日齢で正規分布をしその平均値は加齢とともに増加した。これに対し+-ラットでは10日齢までは正規性を示したが、13日齢以後では正規性を欠いた(図1)。さらに13日齢以後の+-ラットでは各日齢に10日齢の+-とよく似た分布をもち、かつ個々の小脳重が10日齢の+-の信頼限界(平均値±2σ)の上限値(84.6 mg)に含まれる+-のグループ(+-S)が観察された。+-Sの平均小脳重は13日から30日齢までほとんど変化せず10日齢の値とよく似ていた。+-ラットのタンパク濃度は10日齢までは++ラットとほぼ同じパターンで増加したが10日から15日齢の増加速度は極めて遅く15日から20日齢まで再び増加しそれ以後ほぼ一定値になった(図2)。この傾向は+-Sでもっとも顕著であり10日から15日齢では増加がまったくみられなかった。+-ラットの小脳重とタンパク濃度の正の相関は有意であり10,13日齢で直線($y=0.644x+29.9$, $y=0.460x+41.7$), 15,20日齢で小脳重の平方根の一次式($y=4.98\sqrt{x}+37.7$, $y=4.16\sqrt{x}+54.8$), 25,30日齢で二次式($y=-0.687x+18.2\sqrt{x}-16.4$, $y=0.0493x+3.86\sqrt{x}+66.1$)に従った(図3)。20日齢以後のタンパク濃度はほぼ一定になるので小脳重の関数としてすべての+-ラットの値をプロットするとこの曲線と対照群の信頼下限(95.7mg)との交点は小脳重76.0 mgであった(図4)。76.0 mg以下の小脳重をもつ+-ラットのう

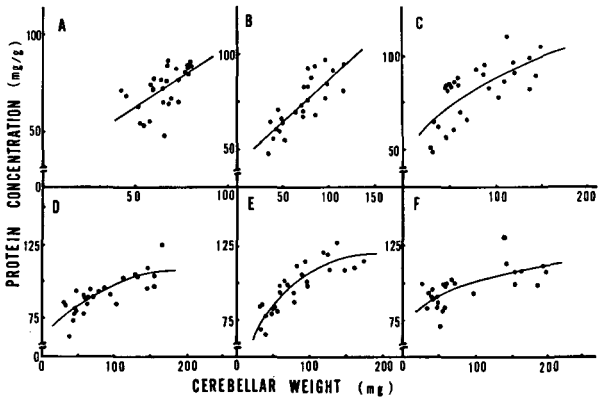


図3. +-ラットタンパク濃度と小脳重の相関
A: 10日, B: 13日, C: 15日, D: 20日, E: 25日, F: 30日

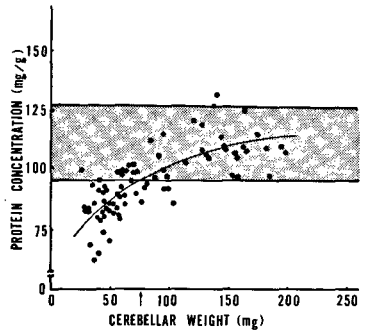


図4. 20, 25, 30日齢のddラットタンパク濃度と小脳重の相関

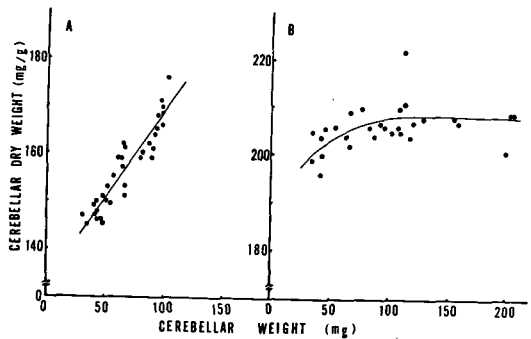


図5. ddラットの小脳重当りの乾燥重量と小脳重の相関
A：13日，B：30日

ち約90％が対照群の範囲より低いタンパク濃度をもっていた。小脳重当りの乾燥重量は13日齢で小脳重と直線的正の相関を示したが($y=0.353x+13.3$, $n=34$, $r=0.934$)(図5A)，30日齢ではdd-Sでわずかに低い程度であった(dd-S：203.7 ± 4.22, $n=11$, d+：208.6 ± 5.40, $n=25$, $P<0.02$)(図5B)。これに反し脂質濃度(mg/g wet weight)は13日齢では変化がなく(図6B)(乾燥重量当りの含量は増加(図6A))，30日齢では小脳重の低下とともに増加し($y=0.206x-5.18\sqrt{x}+105.2$)(図6D)，乾燥重量当りの相対量も同様の傾向を示した(図6C)。^{14}C-leucine の小脳へのとりこみ実験の結果を表に示す。小脳以外の脳部分の酸可溶性，不溶性画分へのとりこみは6，13，30日齢においてddとd+の間で全く変化がなかった。小脳では30日齢において酸可溶性画分へのとりこみがddでわずかに低く，タンパクへのそれは13日齢で有意に低かった。小脳タンパクへのとりこみは小脳重当り，タンパク当りであらめしても小脳以外の脳部分に比べていづれの日齢においても高かったが，小脳重当りのとりこみはタンパク当りよりもddとd+ラットの間で差が顕著であった。タンパク当りの小脳ODC活性はd+ラットで生後5日に小さなピークを示し，10日齢まで急速に，30日齢まで徐々に減少した(図7)。これに反しddラットでは生後初期の活性増加がみられず8日齢以後はd+と同様に減少した。生後5，6，7日においてddラットの活性の平均値はd+に比べて有意に低かった($P<0.01$)。小脳重当りの活性も同様の傾向を示した。

〔考　察〕

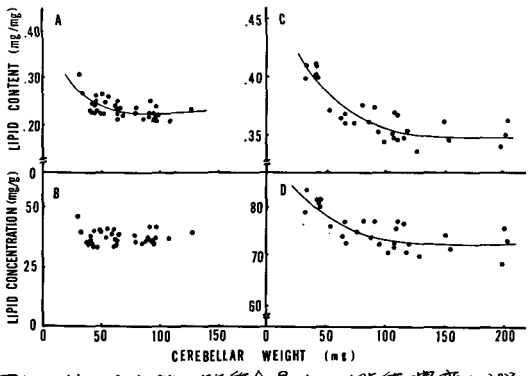


図6. ddラット小脳の脂質含量および脂質濃度と小脳重の相関　A，B：13日，C，D：30日

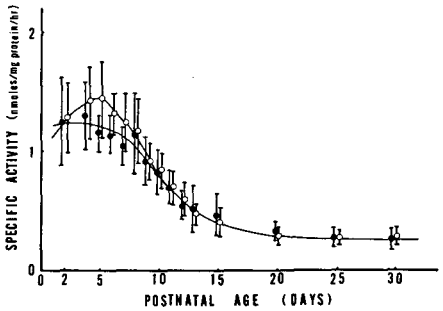


図7. 小脳のODC活性の加齢変化
● dd，○ d+，2，11，12日齢は10例，他の日齢は15例以上の平均値

Gunnラットにみられる小脳低形成は遺伝的小脳ミュータントと異なり生後急激に増加する血中ビリルビンの小脳への移行によって生ずる。Gollanら[5], Grahamら[6], 佐藤ら[12]によって報告されるように環境条件が組織へのビリルビンの移行量に影響し、生後の小脳発達にも顕著な影響があらわれるであろうと推定される。今回のjjラット小脳重の頻度分布の結果と小脳低形成の臨界期[2]を考え合わせると、生後10日までの環境条件が以後の小脳低形成の程度に大きな影響を及ぼすであろうと思われた。jjにみられた生後のタンパク濃度の低下はjj-Sで顕著なように10日から15日齢の濃度増加の停滞に依存していることが明らかになった。20日齢以後のjjラットタンパク濃度の値をすべて小脳重に対してプロットした時、その相関関数が対照群の信頼下限値と交わる76.0mg以下の小脳重をもつjjラットでは、約90%が対照群の信頼下限値を下まわるタンパク濃度を示し、しかもこの小脳重値は10日齢のjjラットの小脳重の信頼上限値に近かった。ビリルビンによる小脳障害は小脳重80mg前後からタンパク濃度などの生体物質レベル[2)13)]にも顕著な変化があらわれており、小脳重の分布から一つのグループとして考えたjj-Sグループは単に小脳重が低いというだけではないことが示された。タンパク濃度の低下は日齢に依存した二つの原因、すなわち13日齢の水分含量の増加、30日齢の脂質含量の増加によって説明できた。特に30日齢の小脳重とタンパク濃度または脂質濃度との相関関数はちょうど鏡像関係にあり、タンパク濃度の低下は脂質濃度の上昇でほぼ説明できることを示している。^{14}C-leucineのとりこみ実験はタンパク合成、分解速度および内在性leucine濃度のいずれかまたは二つ以上の原因による差異がjjとj+の間にあるであろうことを示唆している。さらに生後一週間以内にみられるODC活性の上昇[4]がjjラットでは観察されないという事実は10日齢以後のタンパク濃度の低下と関係があるかもしれない。thymidine kinase[11]と同様低ODC活性の観察される時期は小脳低形成の臨界期[2]と一致している点では興味深い。

^{14}C-Leucine incorporation into the cerebellum in Gunn rats at 6, 13 and 30 days of age

AGE (days)		No.[1]	TCA-SOLUBLE (c.p.m./g/hr)	No.	TCA-INSOLUBLE (c.p.m./g/hr)	(c.p.m./mg protein/hr)
6	jj	10	19.35 ± 6.45[2]	10	55.90 ± 6.57	1220.9 ± 145.5
	j+	10	15.79 ± 3.13	11	58.71 ± 6.31	1223.5 ± 117.5
13	jj-s	9	12.16 ± 1.16	9	55.08 ± 4.48	1074.5 ± 59.9*
	jj[3]	3	13.75 ± 3.21	3	68.45 ± 2.77	1146.2 ± 76.7
	j+	10	11.46 ± 1.74	10	70.30 ± 4.08	1198.1 ± 78.3
30	jj-s	9	12.26 ± 1.15**	9	32.07 ± 6.10	510.2 ± 89.5
	jj[3]	2	13.73, 10.42	2	35.06, 36.99	497.6, 529.3
	j+	10	13.98 ± 1.80	10	34.47 ± 5.72	501.6 ± 61.5

1 number of rats, 2 standard deviation, 3 homozygous Gunn rats with cerebellar weight over 80 mg, * P<0.01, ** P<0.05 vs. j+ at each age.

〔文　献〕

1. Anderson, T. R. and Schanberg, S. M. (1972) J. Neurochem. 19, 1471-1481
2. 青木 典子, 仙波りつ子, 柏俣 重夫 (1980) 神経化学 19, 186-189
3. Bligh, E. G. and Dyer, W. J. (1959) Can. J. Biochem. Physiol. 37, 911-917
4. Gilad, G. M. and Kopin, I. J. (1979) J. Neurochem. 33, 1195-1204
5. Gollan, J. L., Hole, D. R. and Billing, B. H. (1979) Clin. Sci. 57, 327-337
6. Graham, D. L., Hasenstab, L. L., Kinney, L. and Kuntz, J. A. (1980) Dev. Psychobiol. 13, 55-60
7. Greenfield, S. and Majumdar, A. P. N. (1974) J. Neurol. Sci. 22, 83-89
8. Gunn, C. K. (1938) J. Hered. 29, 137-139
9. Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L. and Randall, R. J. (1951) J. Biol. Chem. 193, 265-275
10. Sato, H. and Semba, R. (1978) Experientia 34, 221-222
11. Sawasaki, Y., Yamada, N. and Nakajima, H. (1976) J. Neurochem. 27, 577-583
12. Semba, R., Sato, H., Tooyama, S. and Murakami, U. (1977) Teratology 16, 120 (Abstr.)
13. 仙波りつ子, 青野 幸子, 青木 典子, 柏俣 重夫 (1979) 神経化学 18, 316-319

18 小脳低形成とGunnラット小脳のArylsulfatase, Succinate Dehydrogenase, Lactate Dehydrogenase, Arylesterase, Acetylcholine Esterase 活性の加齢変化

青木英子・仙波りつ子・柏俣重夫
（愛知県コロニー・周生期）

〔要　約〕

遺伝的高ビリルビン血症を有するGunnラット小脳のArylsulfatase (AryS), Succinate Dehydrogenase (SDH), Lactate Dehydrogenase (LDH), Arylesterase (AryE), Acetylcholine Esterase (AchE) 活性の加齢変化および活性と小脳低形成の程度との関連を検討した。木毛接合体(H)のArySの小脳重当りおよびタンパク当りの活性（SA-I, SA-II）は10日齢以後ヘテロ接合体(H)の活性より高く、20日齢で最大となり、Hの20日齢のSA-IIはHの2倍であった。Hでは小脳重とAryS SA-I (10-20日齢), SA-II (10-30日齢) の間にそれぞれ負の相関がみられた。HのSDHは13日齢以後のSA-IIにのみ有意な高値が観察され、同時に小脳重との間に負の相関があった。LDH, AryEのSA-I, SA-IIは全日齢を通して両ラットの間で差がなかった。HのAchE SA-I, SA-IIは10日齢以後はHより高くなり（SA-IIは30日齢でHの2倍）小脳重との負の相関は10-20日齢、10-30日齢でそれぞれ有意であった。以上、10日から20日齢のH小脳のライソゾーム酵素の活性増加はH小脳がビリルビンによって障害を受けた結果生じており、4-8日齢というビリルビンによる小脳低形成の臨界期のあとに細胞障害とこれに続く破壊が進行していることを暗示している。また低小脳重ラットのAchE SA-I, IIの高値は小脳外から侵入する吾状線維の相対量の増加に依存していると推定された。

Key words : Gunn rats, Cerebellar hypoplasia, Lysosomal enzyme

---

Gunnラットはビリルビン:UDPグルクロン酸転移酵素活性の遺伝的欠損があり、生涯を通じて高ビリルビン血症を呈する[10]。脳組織内に移行したビリルビンは脳障害を誘発するが、中でも小脳低形成はその顕著な例として知られている[17,18]。木毛接合体(H)小脳ではプルキンエ細胞の変化が著しく、顆粒層の厚さも薄く[18]、前葉での障害が強いこと[17]、生化学的にはThymidine Kinase活性の低下、DNA合成障害[23]が知られている。これらの障害は光線療法によってほぼ（90%）予防でき[16]、その臨界期は生後4～8日とされている[19]。われわれはGunnラット小脳で細胞機能発達の指標として数種の酵素の加齢変化に注目し、本学会ですでにCNPase[21], GAD, Na^+,K^+-ATPase[2]について報告した。今回はライソゾーム、ミトコンドリア、細胞質、マイクロソームの指標であるArylsulfatase (AryS), Succinate Dehydrogenase (SDH), Lactate Dehydrogenase (LDH), Arylesterase (AryE) と興奮性neuronの指標としてAcetylcholine Esterase (AchE) 活性の生後発達を検討した。

〔実験材料および方法〕

GunnラットHおよびHは5, 8, 10, 13, 15, 20, 25, 30日齢において10例以上の同腹仔を用いた。小脳は9容のTES bufferを用いてhomogenizeし、これを酵素標品とした。AryS, SDH, LDH, AchE活性の測定は、それぞれShephardら[22]、Pennington[15]、Hohorst[8]、Ellman[6]らの方法に準拠した。AryE活性は3.85mMのindoxylacetateを用いたこと以外はEasterの方法[5]に従い、タンパクの定量はLowryらの方法[11]で行った。酵素の比活性は小脳重当り（SA-I）、およびタンパク量当り（SA-II）で表示した。

〔実験結果〕

本研究の一部は昭和55年度文部省科学研究費（No.448131）の援助を受けた。

図1-a は全ArylS活性の加齢変化を表わしたものであるが、♂では20日齢まで直線的に増加し、以後減少した。♀でも♂と同様な増加曲線を示したが、10日齢以後♂より低い値になり30日齢では♂の半分であった。他の4つの酵素の全活性は同じような傾向を示したので、典型的な例としてSDHの全活性の変化を図1-bに示した。♂の全SDH活性は10日齢以後30日齢まで急速な直線的増加を示したが、♀は20日齢までゆるやかに増加し以後変化しなかった。10日齢以後の♀は♂より有意に低くなり30日齢では♂の半分の値を示した。図2にArylS SA-Iの加齢変化を示す。♂♀ともに20日齢に最大値をもつが、13日齢以後の♀SA-Iは♂に比べ有意に高かった（13日：152.5%, 15日：143.3%, 20日：156.2%, 25日：129.5%, 30日：118.1%; $P<0.01$）。♂のArylS SA-IIは日齢によって大きな変化はみられないが、♀のArylS SA-IIはSA-Iと同様20日齢で最大となり、10日齢以後♂より有意に高かった（10日：120.5%, 13日：185.1%, 15日：181.3%, 20日：195.7%, 25日：162.8%, 30日：148.7%; 10日：$P<0.05$, 13, 15, 20, 25, 30日：$P<0.01$）。一方♀では、SA-Iは10日から20日齢までの各日齢において、SA-IIは10日以後の全日齢において、小脳重との間に負の相関がみられた（図3）。SDH SA-Iは全日齢を通して両ラット間で差はみられなかったが、SDH SA-IIでは13日齢以後♀の平均値が♂より有意に高かった（図4）。またSDHでは♀のSA-IIのみ小脳重との間で、13日から30日齢において負の相関が有意であった（20日：$P<0.05$; 13, 15, 25, 30日：$P<0.01$）。LDH SA-I（図5）、SA-IIは♂♀ともにS字型増加曲線を描き、両ラット間で有意差はみられなかった。♂♀のAryE SA-Iは5日から20日齢まで直線的に増加し20日齢以後は変化せず、全日齢において両者間で差はなかった。

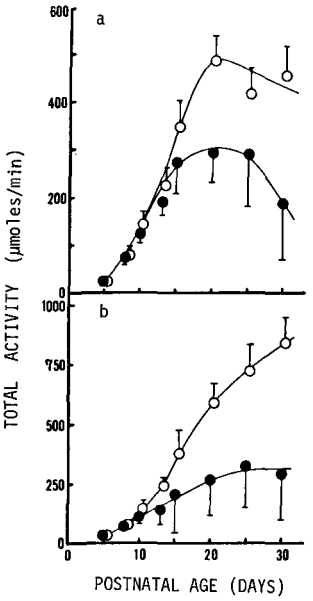


図1、小脳のArylS と SDHの全活性の加齢変化
a. ArylS b. SDH ●♂ ○♀

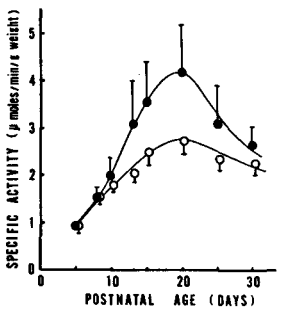


図2、小脳 ArylS SA-Iの加齢変化 ●♂ ○♀

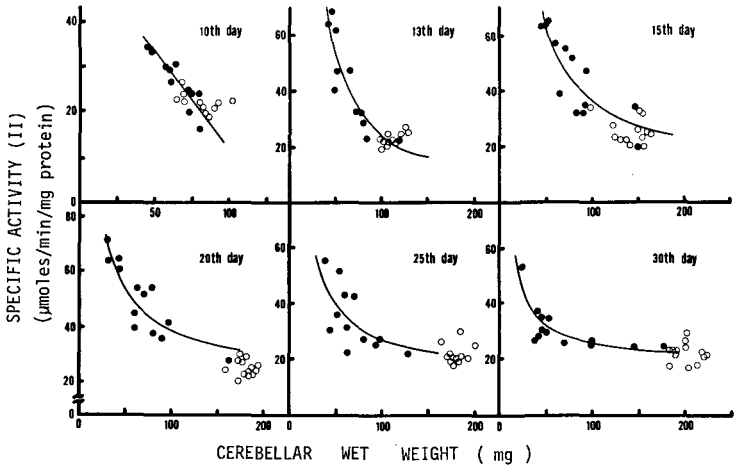


図3、小脳重と小脳ArylS SA-IIとの相関 ●♂ ○♀

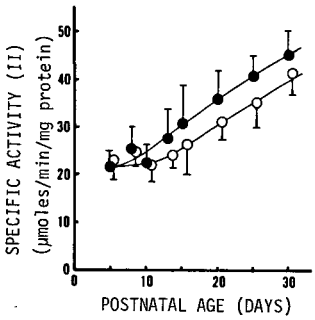


図4、小脳 SDH SA-Ⅱの加齢変化 ●♂ ○♀

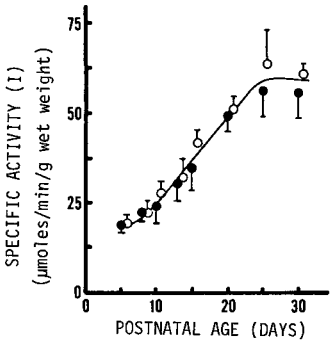


図5、小脳 LDH SA-Ⅰの加齢変化 ●♂ ○♀

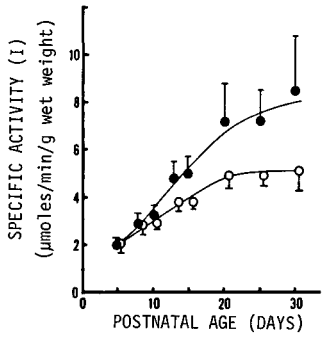


図6、小脳 AchE SA-Ⅰの加齢変化 ●♂ ○♀

た。♂♀のAryE SA-Ⅱは5日から30日齢において変動がなく、両者間での有意差はみられなかった。♀のAchE SA-Ⅰは5日から20日齢まで直線的に増加し、20日齢以後は変化を示さなかった。♂では20日齢以後も増加を続け、13日齢以後の♂のAchE SA-Ⅰの平均値は♀より高かった（13日：127.5%, 15日：136.0%, 20日：148.3%, 25日：137.7%, 30日：171.5%, 図6）。一方AchE SA-Ⅱの平均値は♂では全日齢を通して変化しなかったのに対し、♂では日齢とともに直線的に増加した。10日齢以後の♂のAchE SA-Ⅱの平均値は♀より有意に高かった（10日：126.9%, 13日：156.5%, 15日：177.9%, 20日：187.6%, 25日：153.1%, 30日：201.6%; 10日：$P<0.05$, 13, 15, 20, 25, 30日：$P<0.01$）。AchE活性も♂では、SA-Ⅰでは8日齢から、SA-Ⅱでは8日齢からの各日齢において小脳重との間に負の相関がみられた。

〔考察〕

ライソゾーム酵素は現在70種類知られており、AryS はその標識酵素の一つとして繁用されている。ライソゾーム顆粒は異物貪食機構と自己貪食機構という重要な機能をもち、細胞が障害を受けるとライソゾームが出現し細胞内消化系の中心的役割を果たすと言われている。[13] ♂のAryS 比活性が10日齢以後急増し、20日齢以後著しく減少していることから、♂小脳では生後10日から20日の頃にライソゾームが急激に増していることが推測される。生後4-8日というビリルビンによる小脳低形成臨界期における細胞障害と、これに続く破壊が進行していることを暗示している。20日齢以後はAryS活性が急速に低下していることから、♂のライソゾーム機能はAryS活性を指標としてみた限りでは♀と同じ定常状態に近づいていくと思われる。また小脳重とAryS活性との間に負の相関があることから、小脳重の低いもの程ライソゾームが多い、すなわち生後4日～8日頃により著しい障害を受けていることが推測された。このことは我々の研究室で酵素組織化学的にも証明されている（未発表）。組織学的には♂小脳でPurkinje細胞のミトコンドリアの膨大が電顕上観察され[18]、酸化系酵素の活性減弱が報告されている[7]。さらにビリルビンによるミトコンドリアの機能障害はin vitroの系ではみられるが[3,9]、in vivoの系ではみられない[20]という生化学的報告がある。さらに伸長しつつあるPurkinje細胞dendriteのミトコンドリア量は著しく多く[1]、♂ではPurkinje細胞およびそのdendritic arborizationが障害を受ける[4]ことが明らかにされている。そこで♂小脳におけるミトコン

ドリアの生後発達に対するビリルビンの影響を知るために、指標酵素であるSDH活性を測定したが、dendriteの伸長する時期でのSDH SA-I, SA-IIとも低下はなく、むしろ13日齢頃からのSDH SA-IIの平均値は他より有意に高かった。また小脳重とSDH SA-IIとの間には負の相関がみられ、小脳重が低い程SA-IIは高くなる傾向を示した。これは小脳内のタンパク濃度が逆に小脳重と正の相関をもつことに依存している[21]。今回の実験からは、細胞質、マイクロソームの指標となるLDH, AryEの比活性は正常ラットのレベルと同じであった。Na^+K^+-ATPaseの場合と同様、低形成をおこしている小脳でも全体としてみるとこれらの酵素は正常に機能しているであろうと思われる。小脳内の興奮性neuronには顆粒細胞、登上線維、苔状線維のろつがあるが、アセチルコリンを神経伝達物質にするneuronは苔状線維であると言われ、酵素組織化学的にも細胞分画法によっても苔状線維終末がきこいるglomerulusにAchEの活性が強いと報告されている[14]。10日齢以後の小脳のAchE比活性は他より高値を示し、抑制性neuronの指標であるGAD比活性[2]とは逆の傾向にあった。これは成熟ラットなどで御子柴らも報告しているように[12]、苔状線維終末が小脳外からきており、低形成のある小脳では苔状線維が占める割合が相対的に多く、AchE比活性が見かけ上高くなったと考えられる。

〔文献〕

1. Altman, J. (1972) J. Comp. Neurol. 145, 399-464
2. 青木英子、仙波リつ子、柏俣重夫（1980） 神経化学 19, 186-189
3. Cowger, M. L., Igo, R. P. and Labbe, R. F. (1965) Biochemistry 4, 2763-2770
4. 出浦滋文、長崎幸雄、藤田雅文、藤田由美（1978） 解剖誌 53, 325-326
5. Easter, D. J. (1967) Ph. D. Thesis: University of Birmingham
6. Ellman, G. L., Lourtney, K. D., Andres, V. J. and Featherstone, R. M. (1961) Biochemical Pharmacology 7, 88-95
7. Hanefeld, F. and Natzschka, J. (1971) Neuropaediatrie 2, 428-438
8. Hohorst, H. J. (1965) Methods of Enzymic Analysis, Academic press, New York, 266-270
9. Kashiwamata, S., Niwa, F., Katoh, R. and Higashida, H. (1975) J. Neurochem. 24, 189-191
10. 柏俣重夫、仙波禮治（1979） 先天異常 19, 265-289
11. Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L. and Randall, R. J. (1951) J. Biol. Chem. 193, 265-275
12. Mikoshiba, K., Kohsaka, K., Takamatsu, K. and Tsukada, Y. (1980) J. Neurochem. 35, 1309-1318
13. 野田亮、酒井真弘、馬屋原宏、小川和朗（1981） 細胞 13, 2-16
14. Olshowka, J. A. and Vijayan, V. K. (1980) J. Comp. Neurol. 191, 77-101
15. Pennington, R. J. (1961) Biochem. J. 80, 649
16. Sato, H., Semba, R. K. and Kashiwamata, S. (1977) Biol. Neonat. 32, 158-165
17. Sawasaki, Y., Yamada, N. and Nakajima, H. (1976) J. Neurochem. 27, 577-583
18. Schutta, H. S. and Johnson, L. (1967) J. Neuropath. exp. Neurol. 26, 377-396
19. Semba, R., Sato, H., Tooyama, S. and Murakami, U. (1977) Teratology 16, 120 (abst.)
20. Semba, R. K. (1976) Brain Res. 113, 339-348
21. 仙波リつ子、青野幸子、青木英子、柏俣重夫（1979） 神経化学 18, 316-319
22. Shephard, E. H. and Hübscher, G. (1969) Biochem. J. 113, 429
23. Yamada, N., Sawasaki, Y. and Nakajima, H. (1977) Brain Res. 126, 295-307

19 脳障害ラットにおける脳脊髄液中エノラーゼ量の増加

仙波禮治(愛知県コロニー・周生期)
加藤兼房(同・生化)

〔要　約〕

脳組織が損傷されると神経細胞中の物質の一部が血流や脳脊髄液中に漏れ出るかもしれない。逆にこの量を測定して脳損傷の有無や程度を推定することが可能かもしれない。本研究では神経細胞特異タンパク質の一つであるエノラーゼアイソザイムがプルキンエ細胞の変性を示すラットや核黄疸のラットの血流、脳脊髄液中で増量しているかどうかを検討した。エノラーゼの定量は非常に高感度のイムノアッセイ法によったが、この方法は1 amol (10^{-18} mol) レベルまでの測定感度を有しているので1μlの試料中の各エノラーゼアイソザイム量を測定できた。8日齢のSDGRラットでは主としてプルキンエ細胞に空胞変性が生じるが、エノラーゼアイソザイムの内神経細胞特異タンパク質といわれているαα, ββの脳脊髄液中での量は正常の3-4倍の高値を示した。SDGRラットにbucolomeを投与して核黄疸を誘発するとαα, ββの値はそれぞれ正常の14, 37倍にも増量した。血漿中のエノラーゼ量は核黄疸ラットでγγが約2倍になっていた。以上の結果は生化学的手法によって中枢神経系の損傷の有無や程度を診断する上に明るい見通しを与えるデータであろう。

Key words : Enolase isozymes, Cerebrospinal fluid, Brain injury

---

中枢神経系が損傷されると、神経組織の構成成分の一部は脳脊髄液や血流中に漏れでるかもしれない。もしそうであれば、脳脊髄液や血液中では神経組織由来の物質が増加しているはずであり、逆に脳脊髄液や血液を採りその中の神経組織由来物質を測定することによって、脳損傷の有無や、損傷の程度を推定することができるかもしれない。この推定に用いる神経組織由来物質はいくつかの条件にかなうものでなければならない。まず、神経組織特有の物質でなければならない。さもなければ、脳脊髄液や血液中での増加がみられても、脳損傷がおこっていることを示す根拠とならないからである。またこの物質は脳脊髄液や血液によく溶け、安定で、できれば脳内の量が多いことが必要になろう。そうでなければ試料中の濃度を測ることは困難である。脳のエノラーゼアイソザイムはこれらの条件をほぼ満している。脳のエノラーゼにはαα, αγ, ββの3型があり、このうちαα, ββ型はそれぞれ神経特異タンパク質14-3-3, 14-3-2と同一であることがわかっている[1,5]。エノラーゼは可溶性タンパクであり、vitroでもかなり安定であり、脳の可溶性タンパク質の約3%を占める[3]。

Gunnラットホモ接合体(gg)は高ビリルビン血症と小脳低形成を示す。小脳低形成は生後10日以降に出現するが、実験に用いた7-8日齢のラットでは小脳のプルキンエ細胞に変性像が見られるにすぎない[2]。一方Gunnラット(jj)にbucolomeを投与すると核黄疸が誘発されラットは3日以内に死亡する[2]。そこでこれらを軽症および重症の脳損傷モデルとして実験に供した。

小動物から得られる脳脊髄液の量はわずかであり、脳脊髄液中に漏れ出てくるエノラーゼの量もわずかであろうと予想されるので測定には非常に感度の高いイムノアッ

セイ法を用いることにした。この方法によればエノラーゼの3型を各々1 amol (10^{-18} mol)のレベルで測定することができる。

〔実験方法〕

Gunnラットの一系統で新たに開発したSDGR系ラットを用いた。このラットは従来のGunnラットに比べて血清ビリルビン値が高く小脳障害が重度で、同腹仔数が多く発育が良い等の特徴を持っている。ビリルビン値の高くない+/+または++のラット(A群)、高ビリルビン血症を示すjaundiceラット(C群)、ビリルビンのdisplacerであるbucolomeを投与する+/+または++ラット(B群)とjaundiceラット(D群)の4群を用意した。生後7日目の夕方、A, C群には生食水を、B,D群には生食水に溶かしたsodium bucolome, 100mg/kgを皮下注射した。翌朝、注射後16-18時間目に屠殺し、血液、脳脊髄液、脳を採取した。血液は右心房から直接ヘパリン処理ヘマトクリット毛細管に採り、ただちに遠沈しその血漿を測定に供した。脳脊髄液は通常腰部より採取した。採取の際には皮膚を切開した後、灼熱した針を刺してクモ膜下腔に達する小さな針穴をつくり、その穴から漏れ出る脳脊髄液をヘマトクリット毛細管に採取した。頭部を軽く圧迫することにより5-20 μlの脳脊髄液が採取できた。これらの試料のなかのエノラーゼ量の測定には3型のアイソザイムを各々測れるサンドイッチ法による高感度イムノアッセイ法[4]を用いた。取り出した脳は10%ホルマリンに固定し翌日実体顕微鏡下で核黄疸の有無を検討した。また各群2頭の脳は2%グルタールアルデヒド、1.6%ホルムアルデヒド、0.1Mリン酸緩衝液(pH 7.4)で固定後、準超薄組織切片として組織学的検討を加えた。

〔結果〕

形態学的検査によりA,B群の脳には異常所見はなかった。C群では肉眼的に異常は認められなかったが、組織学的検査によってプルキンエ細胞など一部の神経細胞に空胞、PAS陽性顆粒、osmium好性顆粒の出現等が認められた。D群においては多数の神経核にビリルビンによる黄染、すなわち核黄疸が認められ、黄染した神経核には多数の変性または壊死におちいった神経細胞が見られた。

脳脊髄液中エノラーゼ濃度は図1に示すごとくA群すなわち正常群でαα, αγ, γγがそれぞれ2.0±0.4, 0.21±0.03, 0.09±0.02 pmol/ml (mean ± S.D.)であった。B群の値はA群とほぼ同様であった。プルキンエ細胞等に変性の見られたC群ではαγ, γγの値が各々0.88±0.25,

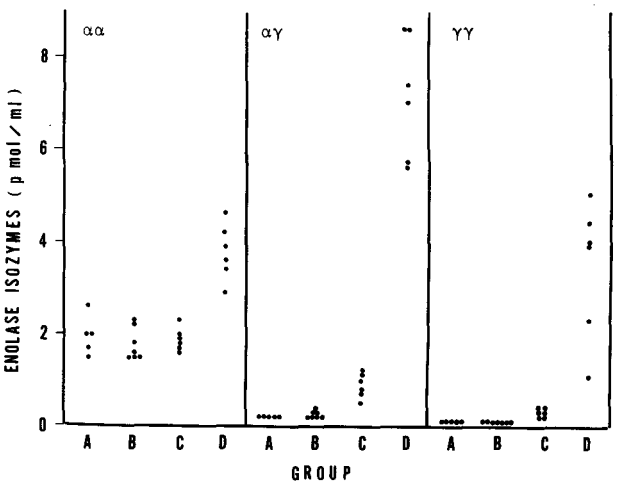


Fig. 1. Concentrations of three forms of enolase (αα, αγ, and γγ) in CSF of young rats with normal, slightly damaged or severely damaged brain. A. Nonjaundiced rats with no treatment. B. Non-jaundiced rats after bucolome injection. No brain damage was found in these 2 groups. C. Jaundiced rats with degenerating Purkinje cells. D. Jaundiced rats suffering kernicterus induced by bucolome injection. Each point represents the mean of duplicate assays determined by a sandwich-type enzyme immunoassay.

0.29 ± 0.08 Pmol/ml と A群の 3-4 倍の高値を示した。核黄疸によって多数の神経核が障害された D群では αα, αγ, γγ が各々 3.8 ± 0.6, 7.2 ± 1.0, 3.5 ± 1.5 と A群の各々 2, 3.4, 3.7 倍の高値を示した。血漿中のエノラーゼ量を図2に示したが、αγ は脳脊髄液中の約20倍も高濃度に存在していた。各型エノラーゼ量は A, B, C群間に差は認められなかったが、D群においては αγ の値が A群で 1.1 ± 0.2 pmol/ml であったのに対し 2.6 ± 0.6 pmol/ml と2倍余りの高値を示した。

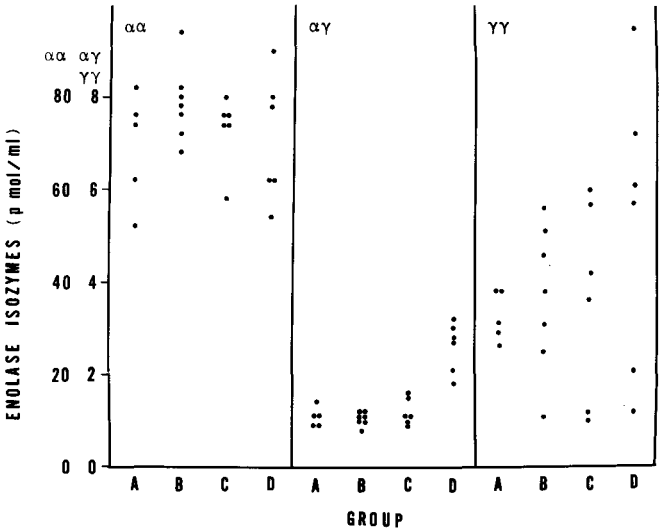


Fig. 2. Concentrations of three forms of enolase (αα, αγ, and γγ) in blood plasma of young rats with normal, slightly damaged or severely damaged brain. A. Non-jaundiced rats without brain damage. B. Nonjaundiced rats treated with bucolome with no pathological finding in the brain. C. Jaundiced rats with degenerating Purkinje cells. D. Jaundiced rats suffering kernicterus induced by bucolome.

〔考　察〕

正常ラット(A群)の脳脊髄液中のエノラーゼ3型の量を比較すると αα が最も多く、次いで αγ, γγ の順であった。脳脊髄液は脈絡叢から分泌されるが、この脈絡叢には α サブユニットが多く γ サブユニットはほとんどないことが免疫組織化学的に知られている[3]ので、脳脊髄液中の αα の大部分は脈絡叢に由来するものであろう。脳脊髄液中の αγ エノラーゼ濃度については神経特異型エノラーゼがヒトにおいて 0.1 または 0.02 pmol/ml とする2つの報告がある[2,6]。これらの報告をみると原理的に αγ と γγ を区別できない方法を用いているので、今回の値と比較するには αγ と γγ の和すなわち 0.3 pmol/ml と比較するのが適当であろう。そうするとラットの値はヒトの 3-15 倍高値であることになる。

ビリルビン値の低いまたは ++ のラットに bucolome を与えても脳脊髄液中のエノラーゼの増加はみられなかった(B群)。bucolome は血清中のアルブミンとビリルビンの結合を解離させ、アルブミンから離れたビリルビンは各組織へはいり脳等を障害する[9]。しかしビリルビン値の低い個体では当然このような障害はおこらずエノラーゼの漏出もおきないであろう。組織学的に脳損傷が見られなかったこととも一致する。

γγ の SDGR ラットは成長に伴いやがて高度の小脳低形成を必発するが実験に用いた8日齢ではプルキンエ細胞等少数の神経細胞に変性像が見られるのみである(C群)。またプルキンエ細胞は3型エノラーゼアイソザイムをすべて含むことが示されている[4]。脳脊髄液中ではエノラーゼのうち αγ, γγ が3-4倍の高値を示していた。また各個体の αγ と γγ の値の間には有意な正の相関 ($r=0.83, \lambda=7$) が認められた。これらの結果は脳脊髄液中の αγ あるいは γγ 型エノラーゼの定量が比較的軽度の脳障害を診断する上で有用らしいことを示すものであろう。

Bucolomeの投与によって核黄疸をおこしたddY SDGR ラット(D群)では脳の広範な損傷が認められ、脳脊髄液中のαG, βGの著しい増加がみられたほかにαAの増加もみられた。核黄疸は神経細胞のみを障害する疾患とされているので増加したαA, αGは神経細胞に由来すると考えられ、神経細胞はβGだけでなくαA, やαGも持っているとする説[4]を支持する結果といえる。血漿中のαGの量にも増加がみられたがこれが中枢神経からの漏出によるか、それとも末梢神経、内分泌臓器等からの漏出によるかは不明である。いづれにせよ核黄疸などの重症の脳障害の際には脳脊髄液のみならず、血漿を用いても診断できる可能性があることを示していると言えよう。

以上の結果は生化学的手法によって中枢神経系の損傷の有無や程度を診断する上に明るい見通しを与える結果といえよう。

本研究の一部は第26回未熟児新生児研究会において発表の予定である。また、本研究は大同生命厚生事業団と文部省科学研究費(No. 557068)の援助を受けた。

REFERENCES

1. Bock, E., and Dissing, J. (1975) Scand. J. Immunol. (Suppl. 2) 4, 31-36
2. Brown, K.W., Kynoch, P.A.M., and Thompson, R.J. (1980) Clin. Chim. Acta 101, 257-264
3. Kato, K., Suzuki, F., and Umeda, Y. (1981) J. Neurochem. 36, 793-797
4. Kato, K., Suzuki, F., and Semba, R. (1981) J. Neurochem. in press
5. Marangos, P.J., Zomzely-Neurath, C. and York, C. (1976) Biochem. Biophys. Res. Comm. 68, 1309-1316
6. Parma, A.M., Marangos, P.J., and Goodwin, F.K. (1981) J. Neurochem. 36, 1093-1096
7. Schmechel, D.E., Brightman, M.W., and Marangos, P.J. (1980) Brain Res. 190, 195-214
8. Schutta, H.S., and Johnson, L. (1967) J. Neuropath. Exp. Neurol. 25, 377-396
9. Semba, R., Sato, H., and Yamamura, H. (1978) Arch. Dis. Child. 53, 503-505

20 低栄養環境下における実験的小頭症ラットの脳発育

中原 務・永吉道子・田丸政男
早川洋一・松谷天星丸
(保健衛生大・医・総医研・発達生理)

〔要 約〕

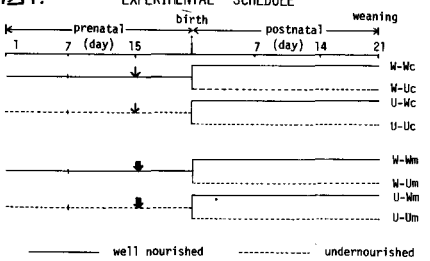
実験的小頭症ラット(MAMラット)の低栄養環境下における発育及び脳内物質の変化について検索した。(1)低栄養の条件は、胎生期は母動物に与える飼料を飽食群の半分量とし、授乳期は母動物に飼育させる仔動物の匹数を飽食群の2倍(16匹)とした。(2)低栄養群の母動物の体重は、対照及びMAMラット共に出産直前で、飽食群の約70%であった。(3)仔動物の体重は生下時において、対照及びMAMラット共に低栄養群は飽食群の90%で、生后21日令では50%であった。(4)大脳半球当りのDNA量及びその脳重は生后21日において、対照ラットの低栄養群は飽食群の80%、MAMラットでは低栄養群は飽食群の約70%で、これを対照飽食群に比較すると、約43%に減少した。大脳半球の変化については特にMAMラットは胎生期の低栄養の影響が強く、この点対照ラットと異った。(5)セロトニン量は生后21日の大脳半球において、低栄養群は飽食群に対し、対照ラットでは約1.5倍、MAMラットでは約1.9倍に増加し、その変化には対照及びMAMラット共に胎生期の低栄養が影響する傾向であった。

以上のことからラット胎生期にDNA合成阻害物質の侵襲があった場合には、胎生期の栄養の可否が、大脳の細胞発育の上に強く影響することが示された。

Key words : undernutrition, developing rat brain, methylazoxymethanol

---

図1. EXPERIMENTAL SCHEDULE



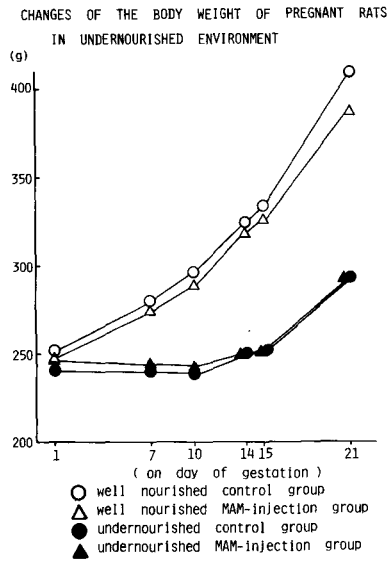
↓ saline injection to pregnant rat on day 15 of gestation
↓ MAM 20mg/kg injection to pregnant rat on day 15 of gestation
c; control m; MAM treated
W-W group (well nourished), W-U group (postnatal undernourished)
U-W group (prenatal undernourished),
U-U group (pre and postnatal undernourished)

幼若期における栄養の低下が、脳の発育に大きな影響を与え、知能発育を障害することは、cape coloured children[1]やserbian children[2]などの報告からも示唆され、幼若期の低栄養と脳の発育について、神経化学的分野の研究が活発に行われはじめたのはまだそう古いことではない。脳が正常に発育出来る低栄養のminimumの限界はどこか? 又他の脳発育障害因子が働いているような状態ではその発育に対して栄養の可否がどの程度の役割を演じるか?を探ることは、"低栄養と脳の発育"の研究の上で必要な課題と考える。私共は既に本学会において実験的小頭症ラットの脳内では、DNA量の減少に伴い、モノアミン量が増加する事実から、実験的小頭症ラットの脳ではモノアミナージックシナプス形成に異常が考られることを報告した。そこでこれらの物質が低栄養環境によってどのように変化するかを検索した。

〔実験方法〕 1) 脳発達障害動物の作製と低栄養環境の条件: 実験動物はWistar-Imamichi系白鼠を用いた。実験的小頭症動物(以下MAMラットと称す)の作製は、妊娠15日目の母ラットにmethylazoxymethanol (MAM) acetate 20mg/kgを用い、対照群には同時に生食水を腹腔内に1回投与を行った[3]。図1に示すように、胎生期低栄養はラットに妊娠期間中(妊娠4日目より出産まで)オリエンタル(MF)飼料を飽食させた

飽食群（well nourished group：W）と、飽食の半分量を与えた低栄養群（undernourished group：U）を作り、生直后より授乳期間中母ラットに飼育させる仔ラット数を8匹としたものを（W群）とし、16匹としたものを（U群）とした。以上の方法で、胎生期、授乳期とも飽食（W-W）、胎生期飽食、授乳期低栄養（W-U）、胎生期低栄養、授乳期飽食（U-W）、胎生期及び授乳期とも低栄養（U-U）の4つのgroupについて、対照（生食水投与ラット）とMAMラットについて比較検討した。この各群について、妊娠期間中の母ラット及び、出生直后及び21日令の仔ラットの体重測定を行った。生后21日令において瀉血断頭により屠殺し、摘出脳を大脳半球、脳幹部に分け、脳内物質の生化学的測定に供した。　2）生化学的測定：DNAはSchmidt-Thannhauserの変法[4]により抽出し、Burton法[5]により、蛋白量はLowry法[6]を用い、比色定量した。セロトニン量はCurzon & Greenの方法[7]に従い螢光測定により定量した。

図2.



〔実験結果及び考察〕

1）MAM投与母ラットの体重変化：　母ラットの妊娠期間中の体重は対照及びMAMラットの低栄養群は共に、妊娠15日までその増加抑制が著しく、以后体重は増加してくるが、低栄養群では、MAMの障害の有無にかかわらず、出生直前の母ラットの体重は対照及びMAMラットで、それぞれの飽食群の約75%であった（図2）。　2）MAMラットの体重変化：　表1に示すようにWc、Wm群をそれぞれ100とした場合、Uc及びUm群の生下時体重は10%の減少を示し（$P<0.001$）、それぞれの対照に対する減少率はほぼ等しかった。Um群は、Wc群に対し13%の減少でUc群の生下時体重よりとくに小さい値は示さなかった。　生后21日までの体重変化を図3(a)、(b)に示した。　21日令のU-Wc群は、W-Wc群の10%減、U-Wm群はW-Wm群の9%減で、胎生期低栄養群を生后授乳期飽食

表1. EFFECT OF UNDERNUTRITION ON BIRTH WEIGHT OF OFFSPRINGS FROM THE CONTROL AND MAM-TREATED MOTHER RAT

	experimental group		birth weight (g)	decrease (%)
control	well nourished	(Wc)	5.70 ± 0.30(24)	100
	undernourished	(Uc)	5.11 ± 0.34(20)*	90
MAM-treated	well nourished	(Wm)	5.56 ± 0.34(24)	100
	undernourished	(Um)	4.94 ± 0.39(24)*	89

Results are the mean ± S.D. and numbers in parentheses indicate the number of animals.　* Significantly different ($p < 0.001$) from control.

図3.　BODY WEIGHT OF OFFSPRINGS FROM THE UNDERNOURISHED MOTHER RAT

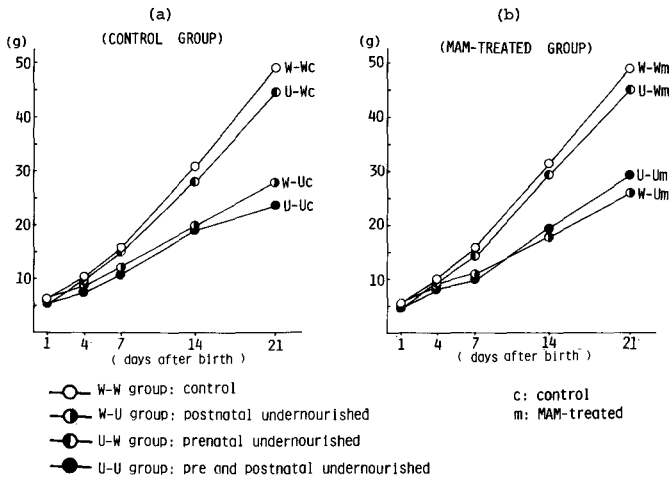
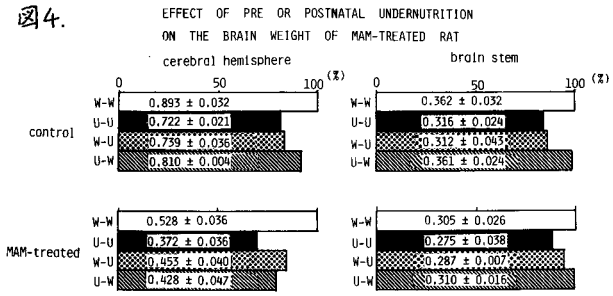


図4.



W-W: well nourished group, U-U: pre and postnatal undernourished group
W-U: postnatal undernourished group, U-W: prenatal undernourished group
Animals were killed at 21 days after birth.
Numbers in column indicate brain weight(g).
Results are the mean ± S.D. of four animals.

にもどすと、生后21日における体重はそれぞれの対照に対し生下時にみられた差と同程度の約10%の低下であった。しかしW-Uc群はW-Wc群に対し42%の減少、W-Um群はW-Wm群に対し48%の減少を示し、又U-Uc群はW-Wc群に対し49%、U-Um群はW-Wm群の41%の減少を示した。以上のことは低栄養群は、対照及びMAMラット共に、それぞれの飽食群に対し、約40-50%の体重増加抑制を示し、特に授乳期の低栄養が体重増加抑制に強い影響を示したものである。

3) 脳重増加及び脳内DNA量の変化：生后21日令において、大脳半球重量及び大脳半球当りのDNA量は、U-Uc群はW-Wc群に対し、約80%に、U-Um群はW-Wm群に対し約70%に減少を示し、MAMラットは対照ラットより低栄養の影響が強く示された。又U-Um群はW-Wc群の43%であった(表2)。脳幹の重量及び脳幹当りのDNA量の変化は大脳半球の値より小さかった(表3)。対照ラットの大脳半球及び脳幹の重量の低下には、授乳期の低栄養の影響が示されたが、MAMラットの大脳半球のみは、胎生期低栄養が影響を示した(図4)。

4) 脳内セロトニン量の変化：生后21日令における湿重量当りのセロトニン量は、大脳半球では、U-Uc群はW-Wc群に対し、1.5倍に、U-Um群はW-Wm群の1.7倍に増加を示した。脳幹部では、U-Uc群はW-Wc群の1.3倍に、U-Um群はW-Wm群の1.4倍に増加を示し、MAMラットは対照より増加の度合がやや多く認められた。大脳半球では胎生期低栄養の方がセロトニン増加に影響を示し、この傾向は、対照群もMAM群も同じ傾向であった(表4)。

表2. EFFECT OF PRE AND POSTNATAL UNDERNUTRITION ON DNA CONTENTS IN THE CEREBRAL HEMISPHERE OF MAM-TREATED RAT

experimental group		cerebral hemisphere (CH) (g)	DNA content mg/g-wet wt.	DNA content mg/CH	(%) of W-Wc or W-Wm	(%) of W-Wc
control	W-Wc	0.893 ± 0.032(4)	0.90 ± 0.02(4)	0.804	100	100
	U-Uc	0.722 ± 0.021(4)	0.91 ± 0.02(4)	0.657	82	82
	W-Uc	0.739 ± 0.036(4)	0.95 ± 0.06(4)	0.702	87	87
	U-Wc	0.810 ± 0.004(4)	0.88 ± 0.02(4)	0.713	89	89
MAM-treated	W-Wm	0.528 ± 0.036(4)	0.92 ± 0.08(4)	0.486	100	61
	U-Um	0.372 ± 0.036(4)	0.93 ± 0.06(4)	0.346	71	43
	W-Um	0.453 ± 0.040(4)	0.99 ± 0.03(4)	0.445	92	55
	U-Wm	0.428 ± 0.047(4)	0.92 ± 0.03(4)	0.394	81	49

c: control, m: MAM-treated
W-W: well nourished group, U-U: pre and postnatal undernourished group
W-U: postnatal undernourished group, U-W: prenatal undernourished group
Animals were killed at 21 days after birth.
Results are the mean ± S.D. and numbers in parentheses indicate the number of animals.

表3. EFFECT OF PRE AND POSTNATAL UNDERNUTRITION ON DNA CONTENTS IN THE BRAIN STEM OF MAM-TREATED RAT

experimental group		brain stem (BS) (g)	DNA content mg/g-wet wt.	DNA content mg/BS	(%) of W-Wc or W-Wm	(%) of W-Wc
control	W-Wc	0.362 ± 0.032(4)	0.99 ± 0.04(3)	0.358	100	100
	U-Uc	0.316 ± 0.024(4)	0.92 ± 0.04(4)	0.291	81	81
	W-Uc	0.312 ± 0.043(4)	0.99 ± 0.06(4)	0.309	86	86
	U-Wc	0.361 ± 0.024(4)	0.92 ± 0.02(4)	0.332	93	93
MAM-treated	W-Wm	0.305 ± 0.026(4)	0.91 ± 0.02(4)	0.278	100	78
	U-Um	0.275 ± 0.038(4)	0.98 ± 0.08(4)	0.270	97	75
	W-Um	0.287 ± 0.007(4)	1.01 ± 0.05(3)	0.290	104	81
	U-Wm	0.310 ± 0.014(4)	0.93 ± 0.05(4)	0.288	104	81

c: control, m: MAM-treated
W-W: well nourished group, U-U: pre and postnatal undernourished group
W-U: postnatal undernourished group U-W: prenatal undernourished group
Animals were killed at 21 days after birth.
Results are the mean ± S.D. and numbers in parentheses indicate the number of animals.

今回行った低栄養の条件は、摂取量の半減による低カロリー、低蛋白飼育である。従来胎児は母体によってよく保護されており、胎生期の低栄養の影響はうけにくく、授乳期の低栄養の影響が一般に強いという報告が多い。又胎生期の低栄養と"small for date" babyの出現との関係も重視されている[8]。本実験では、低栄養とMAM投与が

表4. EFFECT OF PRE AND POSTNATAL UNDERNUTRITION ON SEROTONIN CONCENTRATION IN THE CEREBRUM OF MAM-TREATED RAT

experimental group		cerebral hemisphere mg/g-wet wt.	(%) of W-Wc or W-Wm	brain stem mg/g-wet wt.	(%) of W-Wc or W-Wm
control	W-Wc	250.4 ± 22.4(4)	100	733.3 ± 91.1(4)	100
	U-Uc	378.7 ± 12.8(4)	151	994.5 ± 62.0(4)	136
	W-Uc	294.4 ± 26.3(4)	118	816.8 ± 91.3(4)	111
	U-Wc	316.1 ± 31.9(4)	126	746.8 ± 76.5(4)	102
MAM-treated	W-Wm	541.2 ± 77.5(4)	100	1015.5 ±193.1(4)	100
	U-Um	943.5 ± 87.9(4)	174	1459.2 ± 83.5(4)	143
	W-Um	556.4 ± 84.0(4)	103	973.8 ±122.1(4)	96
	U-Wm	726.1 ± 64.6(3)	134	1038.0 ± 82.7(4)	102

c: control, m: MAM-treated
W-W: well nourished group, U-U: pre and postnatal undernourished group
W-U: postnatal undernourished group, U-W: prenatal undernourished group
Animals were killed at 21 days after birth.
Results are the mean ± S.D. and numbers in parentheses indicate the number of animals.

共存しても、低栄養群の出産直前の母動物の体重及び生下時体重の低下の度合は、対照とMAMラットの間に殆んど差はなかった。しかし、脳重及び細胞数の生化学的指標となるDNA量は、大脳皮質の組織発生期にMAMの作用をうけ、脳細胞の産生障害を傷害の主体とするMAMラットの低栄養群(U-Um)においては、大脳半球当りのDNA量が対照低栄養群(U-Uc)に比して対照飽食群(W-Wc)に対する低下がより大きな割合を示しているのは、MAMによるDNA合成阻害に、更に低栄養による子ミジンのDNAへの取り込みの抑制のため[9]のDNA含量の低下が特に胎生期に相加されたため[10]と考えられた。対照では授乳期の、MAMラットでは胎生期の低栄養が、DNA量の低下に影響しているということは、MAMラットではneuronの、対照ではgliaの増殖に低栄養が関与しているためと考えられる。セロトニン量は、カロリーは変化させず蛋白のみ低下させた場合は、対照より低い値を示すことが報告されている。[8][11] 一方、飼料摂取量の制限によって、脳内セロトニン量が増加することも示されており、この秩序については、ホルモンとの相関を有することが報告されている。[12]

大脳半球における、W-Wm群のW-Wc群に対する約2倍のセロトニン量の増加については、私共は既に報告し、[13] これはMAMラットの大脳半球における セロトニン作動性シナプスの異常のためと考えているが、本実験における U-Um群のセロトニン量の増加は、MAMラットの本来の増加に、更に飼料摂取量の制限による変化が加わったためと考えられる。U-Um群とU-Uc群では、それぞれの飽食(W-W)群に対して、セロトニン量増加の割合がやや異るが、この差については なほ検索したいと考えている。何れにしても本実験から妊娠早期の栄養の可否が、他の因子による脳の発育障害の程度を、より軽度に止める一つの要素となることが示された。なほ成長に伴いこれらの物質の正常への復元について検討中である。

〔文献〕

(1) Stoch, M.B. & Smyth, p.m. (1963) Arch. Dis. Child. 38, 546
(2) Cabak, V. & Najdanvic, R. (1965) Arch. Dis. Child. 40, 532
(3) Spatz, M. & Laqueur, G.L. (1968) Pro. Soc. Exp. Biol. Med. 129, 705
(4) Schmidt, G. & Thannhauser, S.J. (1945) J. Biol. Chem. 161, 83
(5) Bruton, K. (1956) Biochem. J. 62, 315
(6) Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L. & Randall, R.J. (1951) J. Biol. Chem. 193, 265
(7) Curzon, G. & Green, A. (1970) Br. J. Pharmacol. 39, 653
(8) Gulzar, A. & Rahman, M.A. (1975) J. Nutrit. 105, 1090
(9) Lewis, P.D., Balazs, R., Patel, A.J. & Johnson, A.L. (1975) Brain Res. 83, 235
(10) Patel, A.J., Balazs, R. & Johnson, A.L. (1973) J. Neurochem. 20, 1151
(11) Fernstrom, J.D. & Wurtman, R.J. (1974) Adv. Biochem. Psychopharmacol. 11, 133
(12) Kohsaka, S., Takamatsu, K. & Tsukada, Y. (1980) Neurochem. Res. 5, 69
(13) Matsutani, T., Nagayoshi, M., Tamaru, M. & Tsukada, Y. (1980) J. Neurochem. 34, 950

21 筋ジストロフィーマウスと除神経筋の筋蛋白代謝

溝渕睦彦・三宅正治・柿本泰男
（愛媛大・医・精神）

〔要　約〕

筋ジストロフィーマウスの筋蛋白代謝の動態を知る目的で、その尿、各組織、筋蛋白及び筋から精製したアクチンとミオシン中の5種のメチルアミノ酸を測定した。さらに除神経筋についても同様の検討を行ない対比した。1)筋ジストロフィーマウスの尿では、筋ジストロフィー症患者尿と異なり、3-メチルヒスチジン(3-MeH)、と$N^{g}N^{g}$-ジメチルアルギニン($N^{g}N^{g}$-DMA)は有意に増加し、トリメチルリジン(TML)は減少傾向を示した。2)筋ジストロフィーマウスのメチルアミノ酸の変化は、筋肉に特異的な変化であり、3-MeHとTMLの減少は筋線維蛋白中に、$N^{g}N^{g}$-DMAの増加は筋漿蛋白画分に著明である。3)筋ジストロフィーマウスと除神経筋より部分精製したアクチンとミオシンの3-MeHとTML含量は正常で、$N^{g}N^{g}$DMAは存在しなかった。更に筋ジストロフィーチキンの浅胸筋から精製したミオシンとアクチンも対照チキンのそれと変らない。以上から尿中、筋肉中の3-MeHとTMLの変化は、筋ジストロフィーマウスの筋肉中のアクチンとミオシン(主にアクチン)の代謝回転が亢進した結果であり、$N^{g}N^{g}$DMAの増加は蛋白合成の調節に関するとされる蛋白の増加と考えられる。また、一般に蛋白代謝が亢進しているとされている除神経筋にも同様の変化を認めた。

Key words： Dystrophy mouse , Denervated muscle , Methylamino acid

---

生体内のある種の蛋白質はメチル化されて存在し、蛋白の分解に伴い放出されるメチルアミノ酸は、蛋白合成に再利用されずに尿中に排泄される。従って、尿中、組織蛋白中のメチルアミノ酸を測定する事により、メチル化蛋白の代謝を知る事ができる。我々は、一昨年本学会で筋ジストロフィー症患者の尿中3-MeHの排泄減少、$N^{g}N^{g}$DMAの増加を認め、同様の変化が筋ジストロフィーマウス及びラット除神経筋の筋線維蛋白中にもある事を報告した[1]。今回は、筋ジストロフィーマウスの尿、血、脳、筋組織および筋線維蛋白、筋漿蛋白さらにアクチン、ミオシン中のメチルアミノ酸を測定し、筋蛋白代謝を調べ除神経筋とも比較した。前回の報告で推論した蛋白の構造異常の可能性を否定し、筋蛋白代謝調節異常を支持する結果を得た。

＜材料と方法＞

筋ジストロフィーマウスは生後60～90日C57BL/6J-DY系マウスを用い、対照として同腹非発症マウスを用いた。ラットは体重600gの成熟雄ラットを用い、ラットの坐骨神経を腓腹筋から約4cm近位端で切断し、他側を対照とし術後14日目に処理した。

マウスの24時間尿は、飼育ケージ下に口紙を敷き、口紙から水で抽出した。筋組織は、9倍量の0.02M重曹でホモジネートとし、遠心により筋線維蛋白と筋漿蛋白画分に分けた[2]。アクチンとミオシンの部分精製は、Obinataの方法[3]を一部変更し、ピロリン酸でアクトミオシンから調製した[4]。また、生後110日の筋ジストロフィーチキンからHarverberg等の方法[5]で、精製アクチンとミオシンとを得た。

略語：3-MeH, 3-メチルヒスチジン：TML, トリメチルリジン；DML, ジメチルリジン：$N^{g}N^{g}$-DMA, $N^{g}N^{g}$-ジメチルアルギニン：$N^{g}N^{g}$DMA, $N^{g}N^{g}$-ジメチルアルギニン

すべての蛋白は、10%TCAで沈澱させ、エタノール、アセトンで洗った後酸水解しメチルアミノ酸を柿本・赤沢の方法[6]で定量した。

<結果>

1) 筋ジストロフィーマウスの尿中メチルアミノ酸量: 前回測定した筋ジストロフィー症患者尿のメチルアミノ酸の変化が、筋ジストロフィーマウス尿でも見られるかを知るために尿中メチルアミノ酸量を測定した。尿中メチルアミノ酸は、3-MeH、N^G,N^G-DMAともに筋ジストロフィーマウスで増加し、TMLはやや減少傾向を示した。筋ジストロフィー症患者尿では、3-MeHは減少していた点がマウスと異なる(表1)。

表1 筋ジストロフィーマウスの尿中メチルアミノ酸量

	Creatinine +Creatine mg/day	3-MeH	TML	DML	N^G,N^G-DMA	N^G,N'^G-DMA
		μ mol/g creatinine + creatine				
Control (N=5)	1.98±0.37	237±20	305±79	60±6	148±43	44±13
Dystrophy (N=5)	0.92±0.10	496±50**	248±51	64±15	198±28*	50± 3

* $p<0.02$ ** $p<0.01$

2) 筋ジストロフィーマウスの組織蛋白中のメチルアミノ酸量: 尿中メチルアミノ酸の変化がどの組織のメチル化の変化によるのかを明らかにするために、筋肉、脳、肝のメチルアミノ酸量を測定した(表2、図1)。筋肉中では、3-MeHとTMLの減少、N^G,N^G-DMAの増加がみられ、この変化は湿重量当りで一層著明であった。これらの変化は、肝や脳では認められなかった(図1)。この事から尿中メチルアミノ酸の変化は、主に筋肉に由来すると推定した。

図1 筋ジストロフィーマウスの筋肉、脳、肝のメチルアミノ酸量

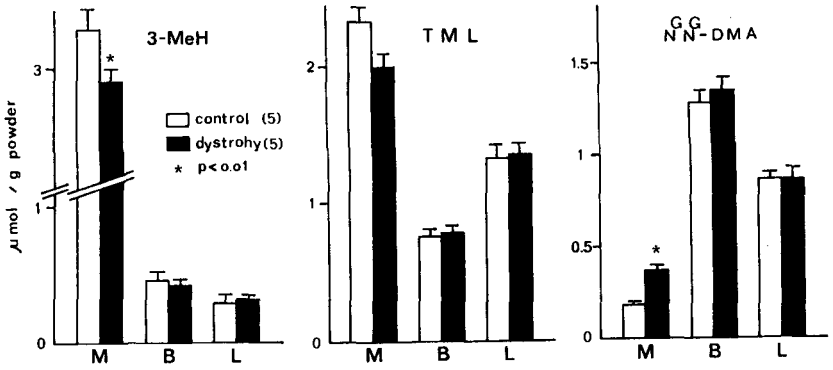


表2 筋ジストロフィーマウスの筋肉中のメチルアミノ酸量

	Muscle Weight g	Powder mg	3-MeH	TML	DML	N^G,N^G-DMA
			m mol /g tissue weight			
Control (5)	4.14±0.44	669±121	0.53±0.04	0.37±0.02	0.04±0.01	0.03±0.00
Dystrophy (5)	1.26±0.29	135±38	0.30±0.04*	0.21±0.03*	0.04±0.01	0.04±0.00*

* $p<0.01$

表3
筋ジストロフィーマウスの筋線維、筋漿蛋白画分中のメチルアミノ酸量

	Myofiber		Myoplasm	
	Control(5)	Dystrophy(5)	Control(5)	Dystrophy(5)
μmol /g powder				
3-MeH	6.54±1.33	2.87±0.21**	0.34±0.15	0.37±0.11
TML	2.52±0.23	2.11±0.10	1.55±0.45	1.99±0.77
N^G,N^G-DNA	0.26±0.05	0.36±0.04*	0.34±0.15	0.55±0.10**
m mol /g wet tissue				
3-MeH	0.75±0.16	0.28±0.04**	0.01±0.00	0.01±0.00
TML	0.29±0.02	0.20±0.02*	0.07±0.02	0.07±0.00
N^G,N^G-DMA	0.02±0.01	0.04±0.00	0.02±0.00	0.04±0.00**

* $p<0.02$ ** $p<0.01$

表4
除神経筋の筋線維、筋漿蛋白画分中のメチルアミノ酸量

	Myofiber		Myoplasm	
	Control(4)	Denervation(4)	Control(4)	Denervation(4)
μ mol /g powder				
3-MeH	6.67±0.61	4.60±0.47**	0.92±0.17	0.53±0.07
TML	2.83±0.25	2.15±0.09	0.80±0.27	0.69±0.19
N^G,N^G-DMA	0.25±0.01	0.42±0.03**	0.22±0.06	0.61±0.12**
m mol /g wet tissue				
3-MeH	0.92±0.05	0.57±0.12**	0.04±0.02	0.03±0.02
TML	0.42±0.03	0.27±0.04*	0.04±0.00	0.03±0.01
N^G,N^G-DMA	0.04±0.00	0.05±0.01*	0.01±0.01	0.03±0.00**

* $p<0.02$ ** $p<0.01$

3)筋ジストロフィーマウスと除神経筋中の筋線維，筋漿蛋白画分中のメチルアミノ酸量：
筋肉中のメチルアミノ酸の変化が、筋線維蛋白か筋漿蛋白にあるのかを知るために、筋線維と筋漿蛋白画分に分離して測定した(表3.4)。筋組織中の3-MeHの95%以上、TMLの約80%は筋線維蛋白中に存在し、筋ジストロフィーマウス、除神経筋共に、3-MeHは筋線維蛋白画分で有意に減少しているが、筋漿蛋白画分では変化は認められなかった。N^GN^G-DMAは、筋漿蛋白画分で有意に増加し、蛋白当りでは、筋漿蛋白中に高濃度存在した。

4)アクチンとミオシン中のメチルアミノ酸量：筋線維蛋白のメチルアミノ酸の変化が、筋線維の主蛋白でメチルアミノ酸を含んでいるアクチンとミオシンの変化であるかを知るために、アクチンとミオシンを精製した。筋ジストロフィーマウスの部分精製ミオシン中の3-MeH(表5)、TMLは対照マウスと差はなく、N^GN^GDMAは存在しなかった。部分精製アクチンの3-MeHも差が認められず、TML、N^GN^GDMA共に存在しなかった。除神経筋の部分精製ミオシン、アクチンも同様の結果を示した。以上の結果を確かめるために、筋ジストロフィーチキンの浅胸筋からミオシン、アクチンを精製単離した結果、ジストロフィーマウス同様、3-MeH、TMLには差はなく、N^GN^G-DMAは、存在しなかった。

表5 筋ジストロフィーマウスと除神経筋の部分精製ミオシン、アクチン中の3-MeH

	Control (N=5)	Dystrophy (N=5)	Control (N=5)	Denervation (N=5)
Myosin	2.90±0.68	2.53±0.16	4.15±0.05	4.04±0.23
Actin	8.20±0.53	6.95±1.24	8.56±1.31	8.01±1.07

μ mol /g powder

<考察>

筋肉中の3-MeHは、アクチンとミオシンに、TMLは主にミオシンと他の一部の蛋白に存在している。ラットのミオシンでは、成長に伴ない3-MeH量が増加し、$N^{G}N^{G}$-DMAが減少する。一昨年の本学会で我々は、筋ジストロフィーマウスの筋線維蛋白画分中の3-MeHの減少と$N^{G}N^{G}$-DMAの増加から、筋ジストロフィーマウス骨格筋のミオシンが幼若型である可能性を推察した。しかし、筋ジストロフィーマウスの精製ミオシン、アクチン中の3-MeH、TML含量は対照マウスと差がなく、しかも、$N^{G}N^{G}$-DMAは存在しなかった。この事より上記推論は修正せざるを得ない。3-MeHの尿中排泄量と筋肉中の含量からすると、筋ジストロフィーマウス全骨格筋中の3-MeH量は0.4mmol、対照マウスは2.2mmolであるが一日尿中排泄量は等しい。尿中の3-MeHの90%以上が筋組織由来であるので、アクチンとミオシン(主にアクチン)の代謝回転は正常の約5倍に亢進していると考えられる。次に、筋肉中の$N^{G}N^{G}$-DMA含有蛋白について考察する。$N^{G}N^{G}$-DMAは、細胞核内のheterogenous mRNA結合蛋白(hnRNP)、非ヒストンクロマチン蛋白の一つであるHMG蛋白とリボソーム蛋白中に存在が認められている[7)8)9)]。HMG蛋白は、多種の非ヒストン蛋白中精製された数少ない蛋白の一つで、クロマチン中で蛋白合成を調節している可能性が示唆されている[10)]。hnRNPは、DNAからmRNAが転写され成熟mRNAとして核外に出る前段階のhnRNAに結合した蛋白であり、機能は不明な点が多い。また、リボソーム蛋白は、蛋白合成の場でもあり、蛋白合成が高まれば増加するとされている[11)]。筋ジストロフィーマウス骨格筋中の$N^{G}N^{G}$-DMAの約50%は、筋漿蛋白画分に存在し、これは低塩濃度で抽出されやすいhnRNPであろう。筋線維蛋白画分にある残り50%は、0.02M重曹で抽出されにくいHMG蛋白とリボソーム蛋白であり、ミオシンやアクチン由来でない。除神経筋の$N^{G}N^{G}$-DMAの分布は、筋漿蛋白画分に30%、筋線維画分に70%であり、それぞれの由来は筋ジストロフィーマウスと同様であると考えられる。筋ジストロフィーマウスの尿中、筋肉中の$N^{G}N^{G}$-DMAの増加から、これらの筋蛋白質合成を調節している蛋白質の増加が考えられる。事実、蛋白代謝が亢進していると言われる除神経筋[12)]でも筋ジストロフィーマウスと同様の変化が認められた。

以上から筋ジストロフィーマウスの尿中3-MeHの増加は、アクチンとミオシン(主にアクチン)の代謝が亢進したためであり、$N^{G}N^{G}$-DMAの増加は、アクチンとミオシン由来でなく、これらの蛋白の合成を調節する蛋白質の増加であろうと推定した。

(表3.4の一部は、一昨年本学会で発表済みである。)

<文献>

1) 杜上良一. 三宅正治. 柿本泰男.(1979) 神経化学 18, 388

2) 杉田秀夫. 生化学実験講座 15 筋肉 134

3) Obinata,T. (1969) Arch.Biochem.Biophys. 132,184

4) Sreter,F. et al. (1972) J.Cell Biol. 55, 584

5) Harverberg,L.H.et al.(1974) Biochim.Biophys.Acta 371,226

6) Kakimoto,Y., et al. (1970) J.Biol.Chem. 245,5751

7) Karn,J., et al. (1977) J.Biol.Chem. 252, 7307

8) Boffa,L.C., et al. (1979) Biochem.Biophys.Res.Commun. 89,1322

9) Chang,F.N., et al. (1976) Arch.Biochem.Biophys. 172, 627

10) Levy-W.,B., et al. (1978) J.Biol.Chem.254, 609

11) Sirlin,J.L. (1972) Biology of RNA, Acad.Press,

12) Goldspink.,D.F(1976)Biochem.J.156,71

22 実験的ヘルペスウィルス(Type 1)感染脳の生化学的研究

阿部敏明(帝京大・医・小児)・藤原仁(同・病理)・小川希代子同・小児)
倉田毅(東大・医科研・病理)・平岩幹男・野中千鶴(帝京大・医・小児)
所安夫(同・病理)・青山友三(東大・医科研・病理)

〔要約〕

実験的にヘルペスウィルス(HSV)をマウス脳内(i.c.)及び歯槽内(i.g.)に接種して、脳のガングリオシドの含量、構成の変化を検討した。疾病の進行は、疾患マウスより採取された脳髄液中の蛋白質構成、血清中の抗体価の変動および種々の神経学的症状の観察によった。接種後、3日目頃より、マウス脳髄液中の蛋白質分布に変化が生じたが、血清中の抗体価上昇は6日目以降であった。

脳内のヘルペスウィルスの広がりは、切除した脳の螢光抗体法により形態学的に観察した。ガングリオシド含量は、i.c.では、最初は減少した後に著増したが、i.g.の場合には大きな変化を示さなかった。ガングリオシド構成では、GM1-ガングリオシドの変動が注目されたが、脳内のGD1aの含量の変動はi.c.において著明であった。ヘルペスウィルス感染は、被感染組織のガングリオシド代謝に、何らかの影響を与える事が示唆された。

Key words : Herpes Simplex Virus (HSV), Ganglioside, Animal model.

ある種のDNAウィルスが動物細胞に感染を起すと、その感染を受けた細胞の糖のトランスフェラーゼ活性に変化をきたし、感染細胞の複合糖質の糖鎖に変化を生じる事が知られている(1)。

ガングリオシドは、シアル酸を含有する複合糖質の一種であり、神経細胞などの細胞膜に高濃度に存在する事が知られており、神経機能の多様性に関与している事が知られている(2)。一方、ガングリオシドは、神経細胞などに存在している為に、ウィルス感染の結果、神経細胞膜などに障害を起す際の変化の指標としても有用な物質であるとも考えられている(3)。

以上の点から、ウィルス感染をうけた脳組織のガングリオシド分析をする事は、ウィルス感染によって起こされる神経細胞の障害の程度を推定し得ると同時にウィルスによって誘導されるガングリオシド代謝の変化をも推定し得ると考えられる。

私達は、昨年の本大会に於いて、種々のウィルス感染ヒト脳のガングリオシド分析を行ない、各々のウィルスに特徴的な変化が生じる事を報告した(4)。本年は、その結果を更に進展させる為に、実験的ウィルス感染マウスの脳のガングリオシド分析を行ない、特にヘルペスウィルス(I型)感染マウス脳分析では興味ある結果を得たので報告する。本研究の一部は発表予定である。(in Proceedings of International Symposium on Herpesvirus 1981)

〔実験方法〕動物：ほぼミエリン形成が終ったと思われる時期である5週令マウス(DDD系)を用いた。各々の群について、5匹以上のマウスを用いて検討した。

ウィルス：全身性ヘルペス感染症で死亡したヒト新生児の肝臓から分離し、培養細胞

を通したTomioka株を用いた（5）.
感染：マウスの大脳内又は歯槽部に各々 1×10^{3} pfu又は 2×10^{2} pfu を注入し、経過を観察した。立毛、けいれん、やせなどの症状を観察し、0，3，4，6日目に断頭し、前者は注入部を中心とした大脳を、後者は、ヌクレオ脳神経核が存在すると考えられる脳幹部を切除し、直ちに、−70°Cに凍結保存した.
脳髄液採取：感染の進行を調べる目的で、感染後0，3，6日目のマウスから脳髄液を大槽より採取した。脳髄液量は、左表に示すように、1日に約10 μl（最大量）であった。針は26 Gを用い、細いテフロンの管をつないで採取した.
蛋白電気泳動：採取した脳髄液の電気泳動は脳髄液を濃縮せずに、私達が考案したセミミクロポリアクリルアミド電気泳動(s-PEGE)（5）を行なった。対照として マウス以外には、白鼠、モルモット、犬、ヒトの脳髄液を各々、前記と同様に、濃縮せずに1〜5μl使用した.

表1 The Volumes of Cerebrospinal Fluid from Various Animals by Single Puncture of Major Cistern

Animals	Body Weight(kg)	Volumes(μl)
Human(10 y.)	30.0	10,000
Dog(Beagle)	10.0	1,000
Guinea Pig	0.5	200
Rat(Wistar)	0.3	100
Mouse(DDD)	0.03	10

血清の抗体価：ヘルペス脳炎の病変の変化を推定するために、脳髄液を採取した日と同じ日毎に血清を分析した。抗体価の測定は、補体結合反応、中和抗体法及び螢光抗体法に従った.
ガングリオシド分析：切除した脳組織をクロロホルム：メタノール混液（C/M）2：1で磨砕し、沪過する、残渣を更にC/M 1：1で洗い洗液を前者のC/M 2：1に加える減圧乾固する。残渣を更にC/M 2：1に浮遊溶解、沪過し、その沪液を減圧乾燥して、総脂質とした。総脂質からのガングリオシドの分離精製は、Ledeenらの方法に準拠したが、用いた試料が微量なので、若干の段階は、微量試料用に変法した（4）。ガングリオシドの定量は、シアル酸を標準物質として、Svennerholmによるレゾルシノール法に従った（8）。ガングリオシドの分布は、Joyce-Loeb Chromoscan 200, 201を用いたデンシトメトリー法に従った.
精製したガングリオシドを約1μg（シアル酸として）薄層板（シリカゲルG，HPTLC，メルク社，5×5 cm）にのせたのち、CM水（65：25：4，0.05% $CaCl_2$ を含む）又はCMアンモニア水（60：40：9）で展開し、レゾルシノール試薬を噴霧し、80°Cで20分間加熱し、呈色させたのちに.

表2 THE CONTENTS OF GANGLIOSIDES FROM MOUSE BRAINS OF VIRUS INFECTION

Virus	Inoculation	Periods (days)	Neurol. signs	Strain	Water content*	Lipid content**	Ganglioside content***
None	(−)	(−)	(−)	DDD	80±4	30±4	393±82
HSV	i.c.	3	(±)	DDD	80±5	32±3	279±60
HSV	i.c.	3	(+)	DDD	81±1	29±2	286±92
HSV	i.c.	4	(+)	DDD	81±2	37±2	552±83
PIV	i.c.	5	(+)	DDD	79±0	29±2	409±58
MHV	i.c.	2	(−)	DDD	80±0	31±5	405±61
MHV	i.c.	3	(+)	DDD	80±2	37±2 ㊞	385±17
None	(−)	(−)	(−)	DDD	80±1	34±4	423±83
HSV	i.g.	4	(±)	DDD	81±0	36±3	476±99
HSV	i.g.	4	(+)	DDD	80±1	38±3	460±32
HSV	i.g.	6	(+)	DDD	79±1	36±2	431±60
None	(−)	(−)	(−)	ICR	82±2	24±2	377±59
JEV	i.v.	5	(+)	ICR	82±0	29±3	582±82 ㊞

* % of tissue wet weight, ** % of tissue dry weight, *** μg/100 mg of tissue dry weight
# i.c.:intracerebrally injected, i.g.: inoculated in gingival region. Values represent the percentage of the subjects and expressed as the means±sem. ㊞ : $p<0.05$

写真をとりその陽画を反射光を用いてデンシトメトリーを行なって，ガングリオシドの分布を検討した(4)．

〔実験結果〕

ヘルペスウィルス感染の進行：ヘルペスウィルス感染巣の広がりは，切除した脳の螢光抗体法に従った．ウィルス感染をしたと思われる細胞は，螢光抗体によってよく染め出された．形態的には，明瞭な脱髄巣や神経細胞の脱落はなかったが，星状膠細

表3 THE COMPOSITION OF CEREBRAL GANGLIOSIDES FROM MICE WITH VARIOUS VIRUS INFECTION[a,b,c]

Virus	Injection	Periods (days)	Neurol. signs	Ganglisides G_{M1}	G_{D31}	G_{D32}	G_{D1a}	G_{T1a}	G_{D2}	G_{D1b}	G_x	G_{T1b}	G_{Q1b}
None	-	-	-	20.3±3.0	2.0±0.7	4.5±1.2	50.7±1.6	0.8±0.4	2.3±1.1	8.9±1.8	1.2±0.6	10.4±2.1	0.6±0.5
HSV	i.g.	4	-	13.2±2.8*	0.3±0.1*	2.0±0.6*	56.8±3.4	0.8±0.6	2.1±0.6	11.7±3.9	0.9±0.5	12.4±1.2	0.3±0.2
HSV	i.g.	4	+	14.0±0.9*	0.6±0.2*	2.4±0.5*	61.9±0.4	0.6±0.6	1.9±1.2	11.0±1.4	0.5±0.2	5.7±4.6	0.2±0.1
HSV	i.g.	6	+	16.7±2.2	1.5±0.7	6.6±2.2	50.7±7.9	1.7±1.1	3.1±1.5	11.0±2.6	0.6±0.3	9.9±3.1	0.4±0.2
None	-	-	-	9.3±3.0	1.0±0.4	3.2±1.4	48.4±1.1	2.1±0.5	3.1±0.8	7.2±1.2	5.8±0.8	17.6±1.9	2.0±1.3
HSV	i.c.	3	±	8.6±0.8	0.9±0.5	1.8±0.3	49.5±4.8	1.4±0.6	2.4±0.3	8.1±1.6	5.2±0.6	19.5±2.7	2.5±1.1
HSV	i.c.	3	+	1.36±3.2*	1.4±0.3	2.1±0.7	46.7±5.7	0.9±0.4*	1.4±0.5*	7.5±2.4	6.2±0.8	18.1±3.8	2.6±1.4
HSV	i.c.	4	+	10.0±0.6	2.1±0.7*	2.0±0.2	51.3±0.4*	1.3±0.2	5.8±2.0	5.3±1.7	5.4±1.1	14.5±1.0	2.5±0.3
MHV	i.c.	2	-	10.5±1.5	1.0±0.6	2.7±0.3	44.5±3.4*	1.5±0.5	1.9±0.5*	10.2±1.2*	6.6±1.1	21.4±2.9*	1.0±0.5
MHV	i.c.	3	+	11.2±2.5	2.1±1.2	4.2±0.9	45.9±1.7*	1.7±1.1	2.8±1.2	11.1±1.5*	4.4±1.0	16.1±1.4	1.0±0.5
PIV	i.c.	5	-	9.6±0.2	1.9±0.1*	3.0±1.2	48.0±1.9	1.4±0.6	1.2±0.2*	6.8±2.1	4.7±0.3	21.1±1.1	2.3±0.3
None	-	-	-	10.8±1.7	1.0±1.1	2.2±2.0	53.8±3.4	1.6±0.6	2.4±0.9	6.8±1.2	2.9±0.7	16.6±2.3	1.8±0.5
JEV	i.v.	5	+	11.5±2.2	0.7±0.3	2.4±0.7	57.4±1.2	1.7±0.5	2.4±0.9	7.7±1.9	2.4±0.4	13.7±2.3	1.3±0.5

a: Values represent the percentage of total NANA recovered and expressed as the means±sem. *: $p<0.05$
b: The strains of mice were DDD strain except for JEV virus experiment(ICR strain)
c: The age of mice was 28±1 days of age except for JEV virus experiment(15 days of age).

細胞の軽度の増殖が認められた．マウス血清中のウィルス抗体価は，補体結合反応により，6日目にZX(陽性)に上昇した．脊髄液の電気泳動像では，IgMおよびIgGの増加が認められると同時に，対照中には認められない新しいバンドが，クマジーブルー染色にてアルブミンより移動度の大きい部分に出現した．又，SDS－sPAGEでは，免疫グロブリンのH，L鎖の増加も認められた．

ガングリオシド含量：表2に示すように，水分含量や総脂質含量には，著変は認められなかった．ガングリオシド含量は，i.g注入とi.c注入の方法による差異が認められ，i.cの場合には，ガングリオシドの一過性の減少と著増が認められたが，i.gでは変化は認められなかった．対照として用いた他のウィルス(PIV，MHV)では変化はなかったが，JEVでは，増加が認められた．ウィルスの違いによるガングリオシド代謝の変化を推量させる．

ガングリオシド分布：表3にガングリオシド分布を示す．i.g.では，G_{M1}の減少が認められた．i.c.では，G_{M1}の増加の傾向が認められた．実際に脳内に存在する量(μg/100mg 乾燥重量)では，i.c.の場合のGM_1，G_{D1a}の一過性の減少とその後の増加が示され，i.g.ではG_{D1a}の変化は殆んど認められなかったが，前者と同様に，一時減減したのち漸増する傾向が示された．他のウィルス感染の場合には，著変は認められなかった．

〔考察〕本研究では，ヘルペスウィルス感染脳の総脂質含量や総水分含量に著変がなく，又，ミエリンの構成要素であるセレブロシドやサルファチドにも大きな変化は認

められなかった（結果未提示）ので．脱髄や変性又は脳浮腫などは殆んどなかったものと考えられる．これらの結果は，従来報告されたヘルペスウィルス感染時の形態学的変化には著変がなかったという報告（5）とも一致する．

ガングリオシド含量の変動はヘルペスウィルスの場合に認められた．又．ヘルペスウィルスの接種法の違いにより含有するガングリオシド絶量と分布にも変化を生じた．その理由は．現在は不明である．GM_1の変動が認められたが．GM_1はミエリンの構成要素であるのでミエリンの変化を予想させるが．前記の様な変化を来たす程度のミエリンの変化．ミエリン形成細胞の変化はない（5）ので．ウィルス感染によって．ガングリオシド代謝に変化を生じたものと考えられる．現在．培養細胞系を用いた感染細胞のガングリオシド構成の変化と分解および合成系の酵素を検討中である．

注入部位の差によるガングリオシド含量やその構成に変動を生じる理由は不明である．e.g.の場合には．局所から脳内に至るまでにウィルスの性質が量的質的に変化を来たし．脳内では．直接注入されたウィルスとは異なる挙動をするのかも知れない．

(REFERENCES)

(1)Fisherman,P.H., et al.:Proc.Nat .Acad.SCI.,71,298(1974) (2) Norton,W.T.,et al.:J.Neurosci.Res.1,57,(1975)
(3)Yu R.K.,et al.:Brain Res.,70,103,(1974) (4) 阿部ら：神経化学 19, 154 (1980)
(5)Kurata,T.et al.:Japan.J.Exp.Med.,48,427(1978) (6)Ebato,H.et al.:J.Biochem.,88,1765,(1980)
(7)Ledeen,R.et al.:J.Neurochem.,21,829,(1973) (8)Svennerholm,L.:Biochim.Biophys.Acta,24,603,(1957)

23 Pyrithiamine-induced Encephalopathy における脳浮腫の生化学的研究

高橋　弘・志村俊郎・中沢省三(日本医大・脳外)
吉野芳夫(同・II生化)

〔要　約〕

人のWernicke脳症の動物モデルとして知られているpyrithiamine投与ラットは、病理組織学的に、主病変が第3脳室周囲、脳幹被蓋部にある事は言うまでもないが、大脳皮質にも浮腫像がみられる事に注目し、大脳皮質の糖代謝を中心とする生化学的研究を行った。更にthiamine欠乏食のみでも長期にわたると同様の変化が軽度ながらみられ、これとの比較検討も行った。神経症状を示したラットの大脳皮質切片を[U-^{14}C]glucose添加培養液中でincubateし、組織呼吸を測定し対照群と比較した。更に切片を反応終了時に磨砕し、糖代謝中間代謝産物を分画し、化学的定量と^{14}Cの取り込みを測定した。その結果、pyrithiamine投与ラットのO_2消費に著変はなかったが、乳酸の組織濃度、^{14}Cの取り込みは著明に増加した。アミノ酸の組織濃度も増加したが、^{14}Cの取り込みは減少傾向を示した。脂質も組織濃度の増加傾向に比し、^{14}Cの取り込みは減少傾向にあった。

これらの結果から、pyrithiamineによる浮腫脳の大脳皮質では形態変化に比し生化学的変化が強く、糖代謝のみならず脂質、アミノ酸代謝も強く障害されていることが示唆された。なおthiamine欠乏食のみでは脳浮腫発現には時間がかかり、その間にprotein-calorie malnutrition様病態が加わることにより、異なる生化学的変動を示すものと思われた。

Key words： pyrithiamine, brain edema, glucose metabolism

中枢神経系の機能を保持するための代謝過程は、酸素とグルコースに対する依存性がきわめて高く、そのエネルギー源はほぼ絶対的にグルコースであることは周知の事実である。しかし、その代謝過程のすべてが明らかにされたわけではなく、特に中枢神経系の異常状態における代謝には未知の部分が少なくない。thiamine欠乏食で飼育したラットにthiamine代謝拮抗剤であるpyrithiamineを投与すると、第3脳室周囲、脳幹被蓋部に浮腫像が出現し、更に大脳皮質にも及んでいることが病理組織学的に認められた。そこでpyrithiamine-induced encephalopathyにおける大脳皮質の糖代謝を生化学的に観察すると共に、thiamine欠乏食のみで生じる浮腫脳における大脳皮質の糖代謝との比較検討も行った。

〔実験方法〕

1) 実験動物　体重50～60gの3週令Sprague-Dawley(SD)系雄ラットを1週間普通食で飼育した後、体重増加の不良のものを除外し、3群に分けた。すなわち、1) thiamine欠乏食＋pyrithiamine投与群(PT群) 2) thiamine欠乏食群(TD群) 3)対照群である。3群共、状態、行動を観察しつつ週3回体重測定を行った。PT群はまずthiamine欠乏食で飼育し、対照群に比し体重増加率が著明に減少する27日目よりpyrithiamine hydrobromide 50μg/100g体重を6～7日間連日腹腔内投与した。PT群ラットはpyrithiamine投与7日以内に失調性歩行及び痙攣の神経症状を示した。更に劇的な後弓反張、尾の旋回運動や持続性陰茎勃起などの異常行動を示したものもあった。TD群はthiamine欠乏食のみで6週間飼育したところ、まず背の弓状湾曲をきたしたのちPT群と同様の神経症状をきたした。対照群には、thiamine欠乏飼料100g当り2.4mgのthiamineを添加したコントロール飼料を自由に摂

取させた．そして3群にそれぞれ7匹を割り当て，その内PT群3匹TD群4匹対照群2匹は病理組織学的検索に供し，残りをthiamine血中濃度測定の為に使用した．次に15匹ずつ3群の同様の飼育実験を行い，その内10匹ずつを代謝実験に使用した．

2) 血中thiamine濃度測定　飼育実験開始時と，thiamine欠乏食ラットの体重増加が対照群に比し有意に減少した飼育18日目に，それぞれ3匹のラットをエーテル麻酔した後，大腿動脈より採血し，血中thiamine濃度を測定した．血中thiamine濃度の測定はチオクローム法を用いたが，thiamine吸着体としてパームチットの代りにAmberlite CG-50 resinを用い[6]，thiamine酸化剤としてHgCl2を用いて，総thiamine量を内部標準法にて定量した．

3) 代謝実験　PT及びTD群ラットが神経症状を呈した時点で素早く脳を取り出し，氷冷をしたガラス板上にて0.3mmの厚さの大脳皮質切片を作成した．そして2匹のラットの大脳皮質切片を混合して得られた200mgの大脳皮質切片群を0.2μCi [U-^{14}C] glucoseを添加したグルコース濃度100mg/dlのHEPES buffer中で，気相を純酸素に置換したWarburg装置を用いて，37°Cで90分間incubateし，O_2消費と$^{14}CO_2$発生を測定した．結果は同時期の対照群ラットのそれと比較した．更に切片を反応終了時に磨砕し，一部から脂質，グリコーゲンをそれぞれKates[4]，Chanら[17]の方法に準じて抽出定量し，^{14}Cの取り込みも測定した．残りは5%過塩素酸抽出液とし，これをGaitondeら[3]の方法に基いてDowex 50W-X8とAG1-X8のイオン交換カラムに乗せ，通過した非極性物質をグルコース分画とした．Dowex 50W-X8 resinにはアミノ酸が吸着されており，1Mアンモニア溶液にて溶出され，ニンヒドリン反応陽性のフラクションをアミノ酸分画とした．AG1-X8 resinを0.1N，1N酢酸と連続的に溶出するとタウリン分画，乳酸分画が得られた．更に0～1N塩酸を濃度勾配法によって流し，溶出液を乳酸脱水素酵素法でピルビン酸の定量を行うと2つのピークが出現するが，[2-^{14}C] pyruvateを用いた実験にて2番目のピークがピルビン酸であることが判明し，この部分をピルビン酸分画とした．

各分画は，いずれも溶出後ただちに-40°Cで凍結保存し，一週間以内に一部を^{14}C assayに使用し，残部で化学的定量を行った．

4) 糖代謝の中間代謝産物の定量　脂質は重量法にて定量し，グルコーゲンよりamyloglucosidaseにより分解されたグルコース及びグルコース分画のグルコースはいずれも，Dahlqvist[2]の方法に準じてglucose oxidase法にて定量した．アミノ酸はRappら[5]のdinitrophenol法を応用して定量し，更にアミノ酸自動分析装置によるアミノ酸の分析定量も施行した．乳酸及びピルビン酸は市販のLactate UV test，Pyruvate UV testを用い乳酸脱水素酵素法により測定した．

〔実験結果〕

1) 病理組織学的所見　光顕では，対照群ラットに特に異常所見はみられなかったのに反し，PT群の大脳皮質表層には軽度のspongy stateがみられた．皮質神経細胞の多くは核がpicnoticとなっており，一部硬化萎縮像も認められた．これら脳浮腫所見は第3脳室周囲，脳幹被蓋部で著しく，更に同部にはうっ血とVirchow-Robin腔に小出血もみられた．PT群の電顕では，橋被蓋部でmyelin sheathの解離及び軸索周囲腔の拡大，あるいは血管内皮細胞周囲のアストログリアのend footの腫大と空胞化が認められた．

TD群も，光顕，電顕のいずれでもPT群と同様の変化が認められたがPT群に比しいずれも軽度であった．

2) 血中thiamine濃度　飼育実験開始日のラットの血中thiamine濃度は36.16±5.05μg/dlであり、飼育18日目には対照群が26.76±0.66μg/dlで統計学的に有意な減少はなかった。しかし同時期のthiamine欠乏食群の血中thiamine濃度は0.56±0.26μg/dlしかなく、対照群に比し有意な減少を認めた($P<0.001$)。

3) 大脳皮質切片の組織呼吸　酸素消費反応に関しては、PT, TD群共に対照群とほぼ同様の値を示し(Table 1)、3群間に特に差違は認められず、thiamine欠乏は組織呼吸に対しては強い影響を及ぼさないものと思われた。

Table 1

Effect of thiamine deficiency on oxygen uptake in rat cerebral cortex slices

Groups	No. of experiments	Oxygen uptake*
Control	18	0.49±0.02
Thiamine-deficient	18	0.49±0.03
Pyrithiamine-treated	16	0.43±0.02

*Mean±S.E.M. (μl/mg wet weight tissue/90min.)

4) 糖の中間代謝産物への^{14}C incorporation　Fig.1は[U-^{14}C]glucoseから各分画への^{14}Cの取り込みの比率をパーセントで示したものであるが、各群10匹のラットから得られた5個の結果の平均値で示してある。glucose分画の^{14}C-contentからは、どの群も添加量の約50%が代謝されたことがわかる。特徴的なのは、乳酸への取り込みがPT, TD群共に著明に増加したことである。しかしピルビン酸への取り込みは少なく変動もほとんど認められなかった。脂質, アミノ酸, タウリンへの取り込みは両群共に対照群に比し大きな変動を示さなかったが、PT群ではやや減少傾向を示した。

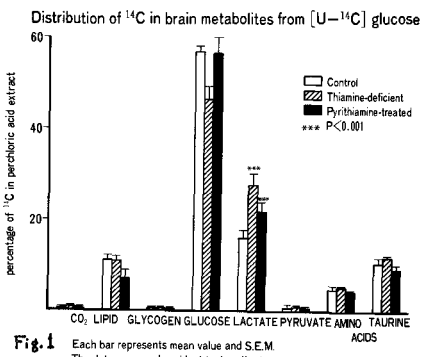


Fig.1 Each bar represents mean value and S.E.M. The data were analysed by t-test on the two groups. (Control vs Thiamine-deficient or Pyrithiamine-treated)

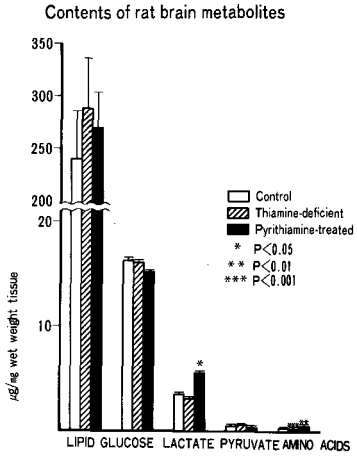


Fig.2 Each bar represents mean value and S.E.M. The data were analysed by t-test on the two groups. (Control vs Thiamine-deficient or Pyrithiamine-treated)

5) 糖の中間代謝産物の組織含量　各分画の化学的定量によって得られた組織濃度の平均値からみると(Fig.2)、グルコース, ピルビン酸については3群間に著しい変化は認められなかった。しかし、乳酸はPT群では著明に増大し、TD群では余り変動しなかった。アミノ酸は明らかにPT群で増大、TD群で減少と逆の動きを示した。脂質は両群共に対照群に比べ統計学的に有意差はなかったが増大傾向にあった。

〔考察〕

thiamineはthiamine pyrophosphate (TPP)の補酵素としての代謝上の役割と神経症状との関連について従来から検索が活発に行われてきているが、近年になって興奮膜との関連や、小脳の神経伝達機構に果す役割なども論じられ今だ結論をみていない。

今回の我々の研究からは、PT群でピルビン酸の酸化反応の障害による乳酸の蓄積が強く疑われた。更にアミノ酸、脂質の代謝障害が示唆され、これらの合成障害には、TPPを補酵素とするpyruvate dehydrogenaseとtransketolaseの活性低下が関与している可能能性が大きいと思われた。TD群にも同様の機序が働いているものと思われたが、PT群と異なり組織濃度が乳酸で増加せず、アミノ酸で減少していたことは興味ある結果である。これはthiamine欠乏が長期にわたった為に栄養摂取不足による貯蔵エネルギー源の喪失が著しく、protein-calorie malnutrition様病態が加味され、グルコースやアミノ酸プールの減少が既に生じていたことによるものと思われた。

この様に、pyrithiamine-induced encephalopathyでは脳浮腫は軽度であるにもかかわらず、糖代謝のみならず脂質、アミノ酸代謝も強く障害された。そしてこの病態は、TPPが補酵素として関与する酵素の機能異常に由来することが強く示唆された。

本発表論文の一部は、「第22回日本神経学会総会(1981年5月)」にて発表した。

〔文献〕

1. Chan,T.M., and Exton,J.H.(1976) Anal.Biochem.71,96-105
2. Dahlgvist,A.(1964) Anal.Biochem.7,18-25
3. Gaitonde,M.K., Nixey,R.W.K.,and Sharman,I.M.(1974) J.Neurochem.22,53-61
4. Kates,M.(1972) Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology(Brownlee, G.G, and Kate,M.,eds)Ⅲ, partⅡ, pp.347-353, North-Holland, Amsterdam
5. Rapp,R.D.(1963) Clin.Chem. 9,27-30
6. Schultz,A.L., and Natelson,S.(1972) Microchem.J. 17, 109-118

24 痙攣と脳内フリーラジカルについて

平松　緑・高知宏喜(岡大・医・脳研・機能生化)
河野雅弘(日本電子・応用研)・森　昭胤(岡大・医・脳研・機能生化)

〔要　約〕

私どもはさきに、Elマウスの痙攣準備状態，pentylenetetrazol(PTZ)痙攣の直前期及びsubmaximalECS時には小脳の還元型glutathione(GSH)／酸化型glutathione(GSSG)比が低下すること、またFeCl₃焦点組織では注入15分後にGSH/GSSG比が低下することを認め、glutathioneは酸化還元反応にともなう、free radical scavengerとして作用することが推定された。今回は、FeCl₃焦点組織の活性酸素を測定し、つぎにFeCl₃焦点組織と、Elマウス及びPTZ痙攣時の脳内free radicalをESRで測定し、痙攣発作発現機構に関連して、次のことを明らかにした。

FeCl₃注入15分後における焦点組織の活性酸素生成は対照に比し増加していた。脳組織においてはESRにより、free radicalのほかにG=6.00，4.32のFe^{3+}，G=2.05のCu^{2+}及びG=2.27の金属イオンが検出された。痙攣モデルの脳組織についての測定では、FeCl₃注入5分後に焦点組織のfree radical及びG=6.00のFe^{3+}が対照群に比し高値を示したこと、Elマウスの痙攣直前期にはG=6.00のFe^{3+}が、痙攣中にはfree radicalが増加すること、及びPTZ痙攣の痙攣中にはfree radicalが減少すること、及びElマウス脳内のfree radicalはddYマウスに比し高値であることが示された。

Key words : FeCl₃ focus, El mouse, free radical

Elマウスの痙攣準備状態、pentylenetetrazol痙攣の直前期及びsubmaximal ECS時には小脳において還元型glutathione(GSH)に対する酸化型glutathione(GSSG)の増加が認められ，glutathioneの酸化還元反応に関与したfree radicalのscavengerとしてのglutathioneの役割が指摘された(Hiramatsu, M. and Mori, A., Neurochemical Research, 6, 1981)[2,3]。Willmore[6]は、鉄イオンをラット大脳皮質運動領に注入して形成したepileptic dischargesをfree radical scavengerのα-tocopheral投与で抑制したことを報告しており、またSandersら[7]はラットの高圧酸素による痙攣をglutathioneの投与で抑制したことを認めている。これらはいずれも痙攣発現へのfree radicalの関与を示唆している。

私どもはまた、FeCl₃注入15，30分，1，2，3，6時間後にラット大脳皮質焦点組織中のGSH及びGSSGを分析した結果，FeCl₃注入15分後に著明なGSSGの増加，GSH/GSSGの低下を認め、その時期には脳波記録によると、対側にはepileptogenic spikeは出現しないが、焦点組織にはabnormal dischargesが出現していた。

これらの諸成績は痙攣の発現機構にはfree radicalの生成が関係していることを示している。今回は、FeCl₃によるてんかん源焦点組織での活性酸素の生成を分析し、またESRによりFe^{3+}焦点組織，Elマウス痙攣及びpentylenetetrazol(PTZ)痙攣時の脳内free radicalを測定し、痙攣発現機構におけるfree radicalの関与についての検索を行なった。

〔実験方法〕

1). 実験動物：SDラット雄(体重250g)，ddYマウス雄(生後8～9週令)及びElマ

ウス（生後3ヶ月）を使用した。

2). $FeCl_3$ によるてんかん源性焦点の作成：ラットの大脳皮質、左感覚運動領野に0.1 M $FeCl_3$ 5μl をマイクロシリンジで1分間に1μlの速さで注入した。対照群には同様にして生理食塩水を注入した。

3). ELマウス痙攣：ELマウスを生後4週令より放り上げ刺激を週に1回、板上で70回行なうと2~3週間後に100%に痙攣を誘発する。実験には、刺激により毎週痙攣を誘発する生後6ヶ月のマウスを、痙攣準備性を獲得した安静時群、痙攣直前期（固体に痙攣を誘発させる放り上げ刺激回数の3/4の回数を放り上げした）群、及び痙攣中期群に分けて使用した。対照には同週令のELマウス無処置群を使用した。

4). PTZ痙攣：PTZ 80mg/kg をddYマウスに腹腔内投与した。実験は痙攣直前期群、中期群及び正常対象群について行った。強直性痙攣は注入45~50秒後で誘発されるので、痙攣直前期はPTZ注入35~40秒後とした。

5). Active oxygen 生成の測定：ラットを液体チッ素で固定後氷上ですばやく $FeCl_3$ による大脳皮質焦点組織及び対側部位を摘出した。Active oxygen の測定は Chan & Fishman[1] の方法に従い、nitro blue tetrazolium から生成される nitro blue formazon を測定した。

Table 1. Active oxygen formation of $FeCl_3$ focus
(ng NBF wet weight, mean±S.D.)

	N	left	N	right
Control	7	16.5±9.9	8	17.6±9.2
$FeCl_3$ (15min after inj.)	7	27.8±8.4*	7	25.1±12.5

*$p<0.05$, compared with left control.

6). 電子スピン共鳴(ESR)測定用試料の作成：各動物を液体チッ素で固定後、摘出されたラットの全脳1匹分あるいはマウス全脳2匹分を3mm×40mmのガラス管に深さ4~5cmに注入した。

7). ESR測定：ESRは日本電子製JES FE3AX 電子スピン共鳴装置を用い、測定は、5GHz、3309±2500 pulse、-196°Cの条件で行なった。

〔結果〕

1). $FeCl_3$ 焦点組織の活性酸素の生成

$FeCl_3$ 注入15分後における注入部位の左焦点組織の活性酸素生成は、対照群に比し有意に増加していた。また焦点対側部位においても増加していた。

2). 脳組織のESR.

ラット、マウスの脳組織には、図1、2、3に示すごとく、G=2.01 の free radical のほかに、G=6.00, 4.32 の Fe^{3+}、

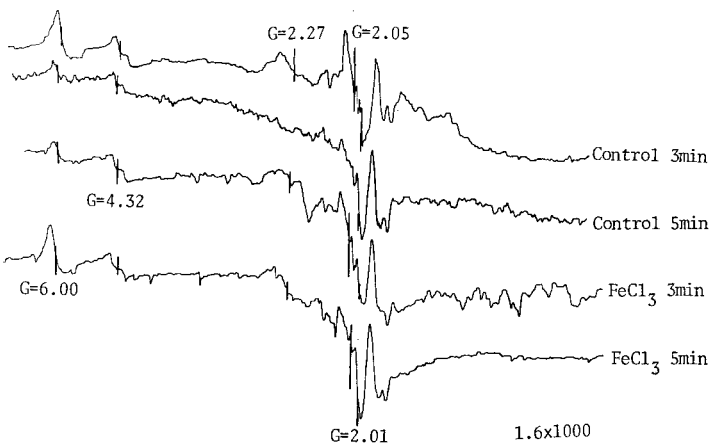


Fig 1. ESR signals of $FeCl_3$ focus

G=2.05 の Cu^{2+} 及び G=2.27 の金属イオンが検出された。① $FeCl_3$ 焦点組織. $FeCl_3$ を注入5分後には free radical 及び G=6.00 の Fe^{3+} が対照群に比し有意に増加していた（表1）。注入15分後においてもこれらは増加していたが. 有意差は認められなかった。対照群では注入3分後に一過性に Fe^{3+}、Cu^{2+} 及び金属イオンの上昇が認められたが、その後30分まではこれらはいずれも減少していた。②El マウス. 痙攣準備性を獲得した El マウスの安静時群には Fe^{3+} 及び Cu^{2+} の増加並びに free radical の減少が、正常無処置群及び安静時群に比し認められ、痙攣直前期には G=6.00 の Fe^{3+} が増加し、痙攣中には free radical が増加することが示された。③ PTZ 痙攣. 痙攣中には、Fe^{3+}, Cu^{2+} 及び free radical が痙攣直前期及び正常群に比し減少する傾向が認められた。また El マウスは dd マウスと比較すると、G=6.00 の Fe^{3+} の減少を除いて、その他の signal は高値であった。

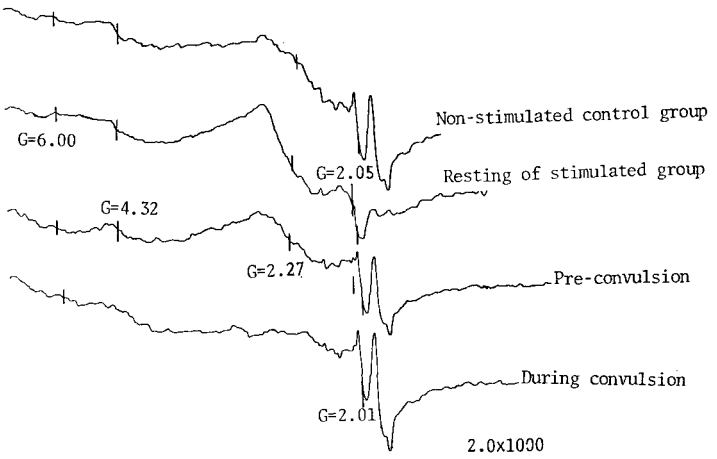


Fig 2. ESR signals of El mouse convulsion

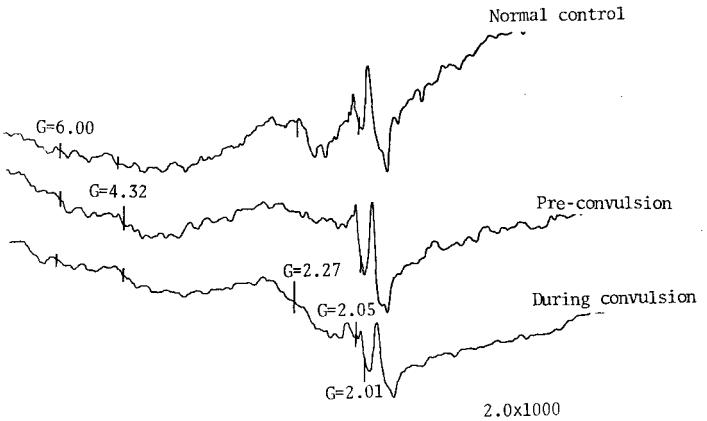


Fig 3. ESR signals of pentylenetetrazol induced convulsion

〔考察〕

$FeCl_3$ 注入15分後にラット大脳皮質 GSH/GSSG の低下を認めたが. 今回の実験でこの時期には活性酸素（O_2^-, ·OH, $^1O_2$, H_2O_2）の生成が増加することを認めた。また ESR 測定により、$FeCl_3$ 焦点組織では注入5分後に free radical の増加を認め、同時に G=6.00 の Fe^{3+} の増加をも認めた。又、El マウスの痙攣直前期にも G=6.00 の Fe^{3+} の増加を認めた。G=6.00 の Fe^{3+} は methohemoglobin (metHb) 結合のものであり、G=4.32 の Fe^{3+} は非 metHb である。

Table 2. ESR signals of $FeCl_3$ focus
(peak hight cm/g wet weight, m±S.D.)

	min	N	Fe^{3+} G=6.00	Fe^{3+} G=4.32	Metal ion G=2.27	Cu^{2+} G=2.05	Free radical G=2.01
Control	3	4	2.87±1.01	1.70±0.47	3.92±1.72	8.00±1.98	3.26±1.02
	5	4	1.61±0.56	1.52±0.42	2.18±1.82	7.01±0.84	3.63±0.78
	10	4	1.35±0.38	1.52±0.92	3.02±1.68	6.63±2.79	3.28±0.97
	15	3	1.08±0.91	1.36±0.37	2.02±0.49	5.77±1.83	3.26±0.49
	30	4	1.18±0.30	1.46±0.29	2.33±1.04	4.56±2.10	3.40±0.67
$FeCl_3$	3	4	1.24±0.37[a]	1.68±0.35	3.46±1.07	4.62±1.77[c]	2.88±0.26
	5	3	2.80±0.18[b,d]	1.93±0.64	2.80±0.89	6.38±1.78	3.83±0.07[d]
	10	4	1.47±0.52	1.81±0.27	2.60±1.22	5.94±1.92	3.04±0.99
	15	4	2.16±1.47	1.78±0.29	3.70±1.38	5.33±3.96	3.72±0.68
	30	3	1.19±0.63	1.38±0.29	3.41±1.62	4.68±2.11	3.15±0.39

a $p<0.05$, compared with control.

b $p<0.01$, compared with control.

c $p<0.001$, compared with control.

d $p<0.005$, compared with 3min after $FeCl_3$ inj.

すでに oxyhemoglobin及び oxy-chains からの O_2^- 発生については報告[4,5,8]があり、$FeCl_3$ 焦点組織は O_2^- の発生により形成されると推定されるが、El マウス及び ddY マウスの PTZ 痙攣の痙攣発現機構についてもこれらの free radical が関与していると示唆された。

1. Chan, P.H. and Fishman, R.A.(1980) J. Neurochem. 35, 1004-1007

2. Hiramatsu, M. and Mori, A.(1981) Neurochemical Research 6, 301-306

Table 3. ESR signals of El mouse convulsion
(peak hight cm/g wet weight, m±S.D.)

Group	N	Fe^{3+} G=6.00	Fe^{3+} G=4.32	Metal ion G=2.27	Cu^{2+} G=2.05	Free radical G=2.01
Non-stimulated control group	1	0.66	1.88	6.48	5.55	6.39
Stimulated group						
Resting	2	0.38	2.16	8.96	6.48	5.98
Pre-convulsion	3	0.96	3.03	8.01	6.74	5.18
During convulsion	4	0.52	2.10	6.92	6.60	8.99

Table 4. ESR signals of pentylenetetrazol induced convulsion
(peak hight cm/g wet weight, m±S.D.)

		Fe^{3+} G=6.00	Fe^{3+} G=4.32	Metal ion G=2.27	Cu^{2+} G=2.05	Free radical G=2.01
Normal control	2	1.01	1.46	2.93	3.84	4.68
Pre-convulsion	2	1.17	1.76	1.97	3.50	4.60
During convulsion	3	0.57	1.35	2.47	2.88	3.25

3. 平松緑, 新谷裕子, 松本幸治, 森昭胤 (1980) 含硫アミノ酸 3, 301-306

4. Misra, H.P. and Fridvich, I.(1972) J. Biol. Chem. 247, 6960-6962

5. Rachmilewitz, E.A.(1971) J. Biol. Chem. 246, 3356-3366

6. Rubin, J.J. and Willmore, L.J.(1980) Experimental Neurology 67, 472-480

7. Sanders, A.P., Currie, D. and Woodhall, B.(1969) Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 130, 1021-1027

8. Wever, R., Oudega, B. and Van Gelder, B.F.(1973) Biochim. Biophys. Acta. 302, 475-478

25 Elマウス脳RNAの発育期における変化

山上　栄・大野京介・辻　正記
森　浩一・川北幸男
（阪市大・医・神経精神）

〔要　約〕

発育期Elマウス脳のRNA量は、非痙攣性のddYやC57BL/6NCrjと同様に生後14日まで急速に上昇する。しかし、痙攣が誘発される生後56日以後では、Elマウスの RNA量は非痙攣性マウスより低値を示した。[^{3}H]-オロチン酸の脳内注射後、3時間において抽出した酸可溶性のuridine monophosphate（UMP）は、量的にも比放射能でもともに、Elマウスと非痙攣性マウスとの間で、いずれの時期においても有意差が観察されなかった。従って後述するRNA合成の差は、UMPプールの差によるものではないといえる。生後4日から20日までの間で、ElマウスのRNAの比放射能および相対比放射能はともに、ddYやC57BL系よりも有意な低値を示したが、1週1回痙攣を惹き起させた生後56日以後のEl(+)群では、比放射能および相対比放射能はともに高値を示した。この結果は、ElマウスのRNA合成が発育早期に比較的不活発で、痙攣が誘発されるにともなって、より活発になることを示唆している。また、この時期における低いRNA量からRNAの分解も促進されることが予想され、そのため合成・分解が不均衡となるのではないかと推測される。

Key words： El mouse brain, RNA synthesis, Convulsion.

我々[8]は既に非痙攣性マウスには存在しない高分子ポリ(A$^+$)RNAの存在をElマウス脳に確認し、このRNAが、Elマウスに特有な放り上げ刺激による痙攣によって急速に分解されることを示した[9]。こうしたRNA合成の変化が発育期のどの時期で生ずるかは興味あるところである。従って、今回は、ElマウスのRNA合成を非痙攣性マウスと比較し、その相違を見出したので報告する。

〔実験方法〕

1) 実験動物とアイソトープの注射

今回の実験には、当科で飼育・繁殖させたElマウスと、同一条件で飼育した非痙攣性のddY, C57BL/6NCrj系のマウスを対照として用いた。他にElマウスで、生後一度も放り上げ刺激を加えないEl(0)群を対照に加えた。El(+)群は、放り上げ刺激を生後28日より加え、生後40日～50日で強直・間代痙攣を生じ、以後1週1回の割合で刺激を加え、痙攣発作を継続したものである。生後14日までのマウスには、脳内に[^{3}H]-オロチン酸の10μCiを注射し、それ以後のマウスには20μCiを注射した。

2) 酸可溶性uridine monophosphate（以下UMPと略す）の分離

[^{3}H]-オロチン酸の注射3時間後に、マウスを断頭し、脳を液体窒素内に速やかに落し、凍結した。凍結した脳を冷却した0.6N-過塩素酸(PCA)中でホモジナイズし、遠心後、上清を分離した。沈澱を再度0.2N-PCAで懸濁し、生じた上清を上の上清と混和し、酸可溶性分画とした。この分画を2N-KOHで中和した後、沈澱を遠心で除去し、その上清を凍結乾燥した。乾燥した残渣を蒸留水に溶解し、上の沈澱・凍結の操作を2回繰返した。最後の残渣を1N-HClに溶解し、密閉した小試験管内で100℃，30分加熱し、

全てのポリヌクレオチドをモノヌクレオチドに転換した。この溶液を炭末カラムに通し、吸着されたモノヌクレオチドをエタノール：水：アンモニア混液（2：1：1,容）で溶出した。この溶出液を60℃の水中で蒸発・乾燥させ、乾燥した残渣に蒸留水と等量の0.1N-HClを加えて、溶解した。さらに、この溶液をDowex 50 カラムに通し、吸着されたUMPを0.1N-HClでKatz & Comb[5]の方法に従って溶出した。UMPの濃度は260mmの吸光度で測定した。なおUMPの同定は、アビセルSF セルロースの薄層クロマトグラフィーにより、95% エタノール：ホウ酸ナトリウムで飽和した1M-酢酸アンモニウム混液（50：50, 容）を用いて上昇法で展開した[2]。そのRfは0.372であった。

3) RNAの抽出とUMPの分離・定量

RNAの抽出は、上述した酸可溶性分画の抽出後、その残渣よりHutchinson-Munro法[4]に従って行なった。抽出したRNAからのUMPの分離・定量は、酸可溶性分画の項で述べたのと同じ方法に従った。なお、RNAの定量はorcinol法[6]で行ない、放射能の計測は、Rack beta 1215型液体シンチレーションカウンターを使用した。

〔結　果〕

発育期マウス脳におけるRNAの量的変化を図1に示した。El マウスのRNA量は、ddYやC57BL系と同様に生後14日まで

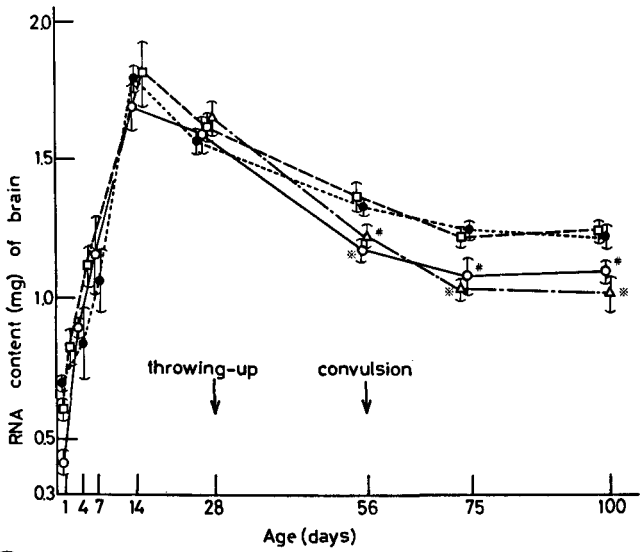


図1. Alteration of brain RNA contents of the stimulated El(+) and non-stimulated El(o) mice, and the non-convulsive ddY and C57BL/6NCrj strains with growth. (○—○);El(+), (△---△);El(o), (●---●);ddY, (□—□);C57BL/6NCrj. The results were expressed as the mean values ± S.E.M.. When the differences between ddY and other strains was significant, the P values were represented in terms of <0.001(※); <0.01(#).

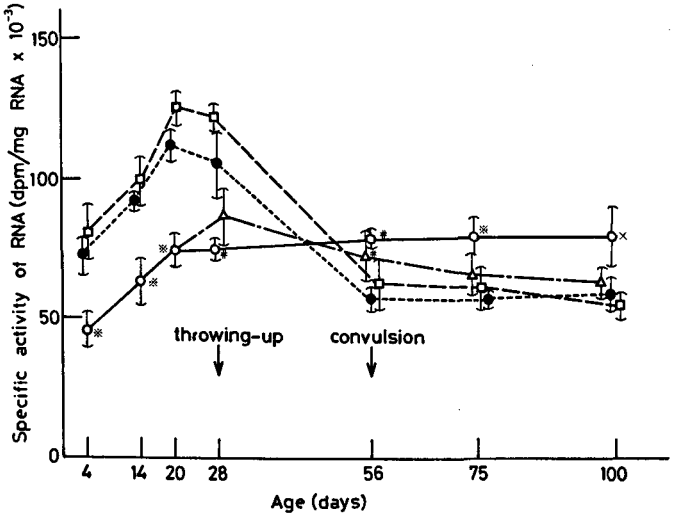


図2. Alteration of the specific radioactivities of brain RNA from El(+), El(o), ddY and C57BL/6NCrj mice during the development. The vertical bars represent the range of three separate experiments. When the difference between ddY and other mice was a significant, P values were expressed in terms of <0.001(※); <0.01(#); <0.02(×), (○—○);El(+), (△---△);El(o), (●---●);ddY, (□—□);C57BL/6NCrj.

増加し、その後軽度に減少した。痙攣が誘発される生後56日から100日の間では、El マウスのRNA量は、ddYやC57BL系より有意に低値であった。RNAの前駆物質としての酸可溶性UMPプールの変化を表1に示した。ここで得られた成熟マウスのUMPの値はMandel & Harth[7]によって報告されたUTPだけと全uridine nucleotideとの中間値を示した。いずれの系でもUMP量は生後14日目に最高となり、その後漸減な減少を示した。これらの結果はAdamsによって発育期ラット脳で示されたものとよく一致する。El と非痙攣性マウスとの比較では、いずれの時期においても有意差が認められなかった。UMPの比放射能でも、その量的な変化と同様に相違がなかった。このことはElマウスと他系との間で、UMPのプールに差がないことを意味している。図2にRNAの比放射能（以下SAと略す）の変化を示した。ddYやC57BL系では、生後20日に最大のSAを示したが、El(+)マウスは生後28日まで増加を継続した。しかし、この時期では、なお非痙攣性マウスのSAはEl(+)の場合より高かった。他方、生後56日以後では、El(+)群は他系に比べてかなり高

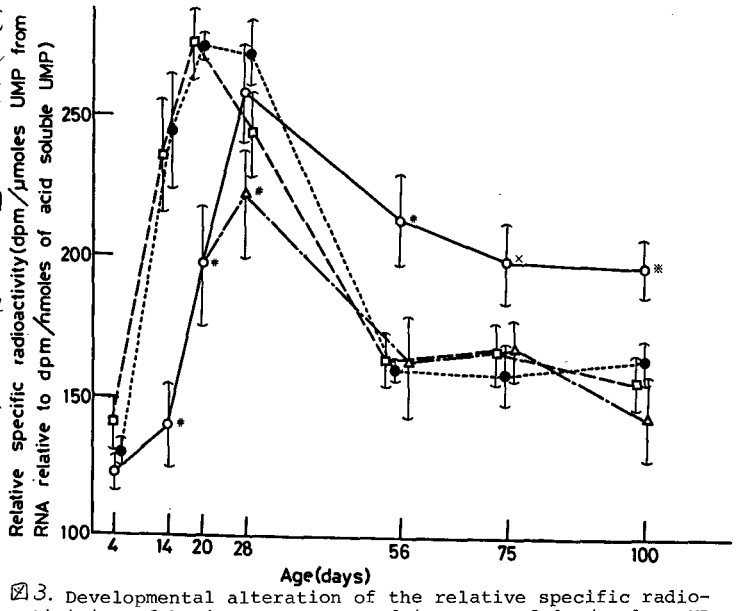


図3. Developmental alteration of the relative specific radioactivities of brain RNA, expressed in terms of dpm/μmoles UMP from RNA relative to dpm/nmoles of acid soluble UMP. The mean values were represented as the vertical bars. P values were expressed in terms of <0.001(※); <0.01(#); <0.02(×), (O—O);El(+), (●···●);ddY, (□–□);C57BL/6NCrj, (△···△);El(o).

表1. Content and specific radioactivity of acid soluble UMP

Age (days)		Strains			
		El(+)	El(o)	ddY	C57BL/6NCrj
4	C*	35.2 ± 3.4		32.3 ± 2.8	33.4 ± 3.4
	S.A.**	31.8 ± 2.6		32.1 ± 3.1	33.6 ± 2.8
14	C	36.5 ± 3.3		33.6 ± 2.5	38.6 ± 2.1
	S.A.	49.7 ± 3.8		45.6 ± 2.1	48.1 ± 0.3
20	C	34.4 ± 1.0		31.5 ± 2.7	33.2 ± 3.1
	S.A.	42.1 ± 3.5		44.0 ± 3.4	42.1 ± 3.9
28	C	24.9 ± 2.8	23.7 ± 0.9	23.1 ± 1.7	25.2 ± 2.7
	S.A.	43.5 ± 3.3	39.2 ± 1.5	39.2 ± 2.8	38.6 ± 3.8
56	C	23.4 ± 1.3	21.6 ± 1.7	23.0 ± 1.2	23.7 ± 1.1
	S.A.	24.8 ± 1.6	21.5 ± 2.8	25.9 ± 2.8	25.2 ± 1.9
75	C	20.3 ± 2.6	24.2 ± 2.7	23.8 ± 1.8	25.3 ± 2.0
	S.A.	23.8 ± 1.9	21.9 ± 2.8	20.2 ± 2.6	22.2 ± 1.8
100	C	24.0 ± 1.7	27.2 ± 0.3	22.0 ± 1.9	19.8 ± 1.5
	S.A.	23.6 ± 1.8	22.8 ± 2.2	21.9 ± 2.1	20.6 ± 1.8

* Content (μ moles/100 g wet tissues)

** Specific radioactivity (dpm/nmoles)

いSAを示した。生後一度も痙攣を起させなかったEl(0)マウスでは、生後75日以後のSAは非痙攣性マウスと近似していた。相対比放射能（以下RSAと略す）の変化を図3に示す。RSAはRNA内のUMPのSA(dpm/μ moles)/酸可溶性分画のUMPのSA(dpm/μmoles)として表わした。生後14日から20日までのRSAでは、ElマウスはddyやC57BLより遥かに低値を示した。逆に、生後56日以後では、El(+)群のRSAは他系に比べてかなり高値であったが、El(0)群とddy群との間には有意差がみられなかった。これらの結果は、Elマウスの RNA合成が発育早期には比較的不活発で、1週1回放り上げ刺激による痙攣が誘発される後期にはより活発になってくることを示唆している。

〔考　察〕

Elマウスの UMPプールが非痙攣性マウスと相違がないことを表1に示したが、このことは、後述するElマウスのRNA合成の変化が、UMPプールの変化によるものでないことを示唆している。ElマウスのRNA量が、生後56日以後、非痙攣性マウスより少なく、逆にRNA合成では、この時期にElマウスで活発であることが示されたが、このことは、この時期に痙攣によってRNase, Phosphodiesterase, RNase inhibitorのような諸因子の関与するRNA分解がより促進される可能性を推測させる。そのため、合成・分解のバランスが崩れ、一見RNA量の減少が起るように見えるのかも知れない。さらに、生後4日から28日までに見られるElマウス脳の比較的高いRNA量と不活発なRNA合成という不一致は、恐らくこの時期に新生される種々の細胞種や局所的なRNA合成の相違[3]などを反映しているのかも知れない。一般に今回の実験のように、全脳を用いてRNA量を測定すると、ニューロンRNAの増減が反映されることはなく、主としてグリア細胞の変化によることが多いといわれる[3]。そのため図1のRNA量はグリア細胞由来の変化と考えてよいであろう。反対に全脳のRNA合成はニューロンRNAの合成を反映する場合が多いから、図2や図3に示したElマウス脳の発育早期におけるRNA合成の低下は、ニューロンRNA合成の不活発さを反映していると解釈し得るかも知れない。

〔文　献〕

1) Adams, D.H.(1965) J. Neurochem., 12: 783.

2) Grippo, P., Iaccarino, M., Rossi, M. and Scarano, E.(1965) Biochim. biophys. Acta, 95: 1.

3) Guroff, G.(1980) Nucleic acid metabolism, In Molecular Neurobiology, Marcel Dekker Inc., New York, pp.238.

4) Hutchinson, W.C. and Munro, H.N.(1961) Analyst, 86: 768.

5) Katz, S. and Comb, D.G.(1963) J. biol. Chem., 238: 3065.

6) Majbaum, W.(1939) Hoppe-Seylers Z. Physiol. Chem., 258, 117.

7) Mandel, P and Harth, S(1961) J. Neurochem., 8, 116.

8) 山上　栄，大野京介，辻　正記，森　浩一，大西　博，川北幸男(1978)神経化学，17：97.

9) 山上　栄，大野京介，森　浩一，辻　正記，川北幸男(1979)神経化学，18：88.

26 扁桃核キンドリングラットにおける痙攣準備性と脳内環状ヌクレオチドとの関連について

沼田吉彦・金子元久・中西重雄・大島直和・森　則夫
深津敏彦・板垣　茂・渡辺　厚・田子久夫・熊代　永
（福島県医大・神経精神）

〔要　約〕

痙攣準備性とcyclic nucleotideとの関連を検討するため，扁桃核kindled ratにおける脳各部位のcAMP, cGMPの変化を調べ，さらに，cAMPのagonistといわれるdibutyril cAMP（db-cAMP）を扁桃核内に注入して，痙攣発作や脳波に及ぼす影響などを検討した。その結果，kindled ratの脳内cAMP濃度は，右側海馬や両側後頭皮質で有意な増加を示し，刺激部位の左側扁桃核で増加傾向が認められた。これに対して，cGMP濃度は，刺激部位の左側扁桃核，両側海馬，両側後頭皮質などで有意な増加を示し，cAMPと似たような変化を示したが，その増加はcGMPの方がより著明であった。つぎに，扁桃核内にdb-cAMP 1.0μgを注入したところ，徐発性棘波に一致するsingle jerkが認められたのみであったが，20μg投与では，facial twitchingやmasticationが出現し，60μgに増量すると，これらの症状のあとにforelimb clonusを呈する全身痙攣にまで発展した。さらに，100μg以上に増量すると，痙攣重積状態となった。すなわち，db-cAMPの投与量に相関した痙攣発作の進展が認められた。以上より，痙攣準備状態においては，cAMPもcGMPも共に増加するが，cGMPの増加がより重要な役割を果たしていることが示唆される。また，cAMPの増加は，痙攣準備状態のみならず痙攣の発展にも関連していることが推測される。

Key words： Amygdaloid kindling, cyclic nucleotide, seizure susceptibility.

痙攣発作の生化学的機序の一部に，cAMPやcGMPなどのcyclic nucleotideの関与が示唆されている。先に我々は，[5,10] ウサギの扁桃核電気刺激によるkindling preparationを用いて，痙攣準備状態とcyclic nucleotideとの関連を検討したところ，痙攣準備性の獲得と相関して脳内cAMPやcGMPが増加していることを見い出した。そこで今回は，種属を変えてラットを用い，さらに，従来の断頭凍結法からmicrowave照射法に変えて，痙攣準備性が獲得された時のcyclic nucleotideの増加の有無を調べた。さらに，痙攣に対するcAMPの関与を知るため；cAMPのagonistといわれるdibutyril cAMP (db-cAMP) をラット扁桃核内に注入して，痙攣発作や脳波に及ぼす影響などを検討したので報告する。

〔実験方法〕

実験には体重150~200gのWistar系雄ラットを用いた。動物は一定条件下で飼育し，飼料と水は随時十分に摂取できる状態にした。

1) kindling preparationの作製とcyclic nucleotideの測定：

pentobarbital麻酔下で深部電極を左側扁桃核に定位的に挿入し，術後8日目より，50 Hz, 300μAの正弦波で1秒間，1日2回刺激した。最終段階の全身痙攣発作が5回連続してみられた時に，kindling effectの完成とした。その後は電極を取りはずし，最終刺激から30日後に，頭部にmicrowaveを照射した。照射時の条件は，正午に行ない，拘束などによる影響を少なくするため，ホルダーに固定してから10分間放置した後に，4kw. 2秒間照射した。速やかに脳を取り出し，dry iceで冷却した槽内で，Körnig 5[8]のAtlasを参考にして，それぞれ左右の扁桃核，海馬，視床下部，視床，尾状核・被殻複合体，中脳，前頭皮質，後頭皮質，および小脳の18部位を分割した。各脳部位は重量

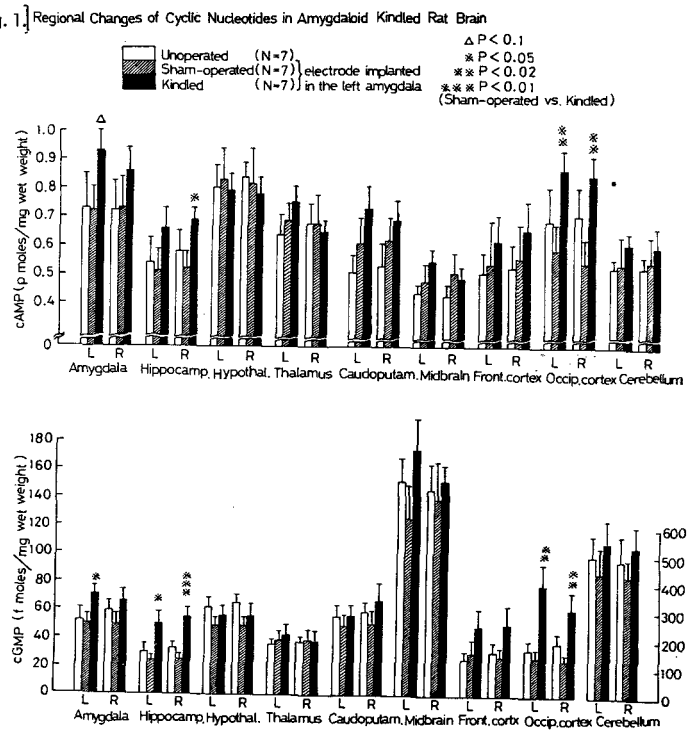
測定後，0.1N HCl 2ml加えてhomogenizeし，上清を凍結乾燥した。cyclic nucleotideは，Yamasa kitを用いたRIA法により測定した。対照群として，無処置群と電極は挿入したが通電刺激を行なわないsham-operation群の2群を用いた。Dataの統計処理には，Studentのt検定を用いた。

[Table 1.] Regional Changes of Cyclic Nucleotides in Amygdaloid Kindled Rat Brain

Regions	Cyclic AMP (p moles/mg wet weight) Unoperated (N=7)	Sham-operated (N=7)	Kindled (N=7)	Cyclic GMP (f moles/mg wet weight) Unoperated (N=7)	Sham-operated (N=7)	Kindled (N=7)
Amygdala L	0.73 ± 0.12	0.72 ± 0.09	0.93 ± 0.07$^{\Delta}$	52 ± 9	50 ± 7	71 ± 6*
R	0.72 ± 0.11	0.73 ± 0.11	0.86 ± 0.08	59 ± 7	49 ± 8	66 ± 8
Hippocampus L	0.54 ± 0.09	0.51 ± 0.08	0.66 ± 0.07	30 ± 6	24 ± 4	50 ± 9*
R	0.58 ± 0.07	0.52 ± 0.06	0.69 ± 0.04*	33 ± 4	25 ± 4	55 ± 6***
Hypothalamus L	0.80 ± 0.08	0.83 ± 0.13	0.79 ± 0.06	62 ± 7	49 ± 6	56 ± 7
R	0.84 ± 0.05	0.81 ± 0.13	0.78 ± 0.06	65 ± 6	49 ± 6	56 ± 9
Thalamus L	0.64 ± 0.07	0.69 ± 0.06	0.70 ± 0.04	36 ± 4	39 ± 7	43 ± 7
R	0.68 ± 0.07	0.68 ± 0.10	0.65 ± 0.04	38 ± 4	39 ± 8	39 ± 7
Caudoputamen L	0.51 ± 0.06	0.61 ± 0.09	0.73 ± 0.08	56 ± 8	49 ± 8	57 ± 7
R	0.53 ± 0.08	0.62 ± 0.08	0.69 ± 0.07	59 ± 7	51 ± 9	67 ± 13
Midbrain L	0.44 ± 0.03	0.48 ± 0.06	0.55 ± 0.04	152 ± 17	126 ± 24	175 ± 22
R	0.43 ± 0.04	0.51 ± 0.07	0.49 ± 0.04	146 ± 18	139 ± 27	152 ± 12
Frontal correx L	0.51 ± 0.07	0.57 ± 0.12	0.62 ± 0.09	26 ± 6	31 ± 9	50 ± 12
R	0.53 ± 0.08	0.56 ± 0.12	0.66 ± 0.10	32 ± 7	28 ± 6	51 ± 13
Occipital cortex L	0.69 ± 0.12	0.59 ± 0.09	0.87 ± 0.07**	34 ± 6	28 ± 6	79 ± 15**
R	0.71 ± 0.10	0.57 ± 0.09	0.85 ± 0.07**	38 ± 7	26 ± 4	62 ± 12**
Cerebellum L	0.53 ± 0.03	0.54 ± 0.10	0.61 ± 0.04	498 ± 74	439 ± 92	549 ± 82
R	0.53 ± 0.04	0.55 ± 0.09	0.60 ± 0.06	484 ± 88	428 ± 59	534 ± 74

The values are expressed as mean + SE.
The electrodes were implanted in the left amygdala of sham-operated group and kindled group. Animals were sacrificed by microwave irradiation (4kw. 2sec.). Cyclic nucleotides were measured by RIA using Yamasa assay kits.
Statistically significant differences between kindled group and sham-operated group are indicated by Δ for P<0.1, * for P<0.05, ** for P<0.02 and *** for P<0.001.

[Fig. 1] Regional Changes of Cyclic Nucleotides in Amygdaloid Kindled Rat Brain



[結果]

1) kindledラットにおけるcyclic nucleotideの変化：(表1，図1)

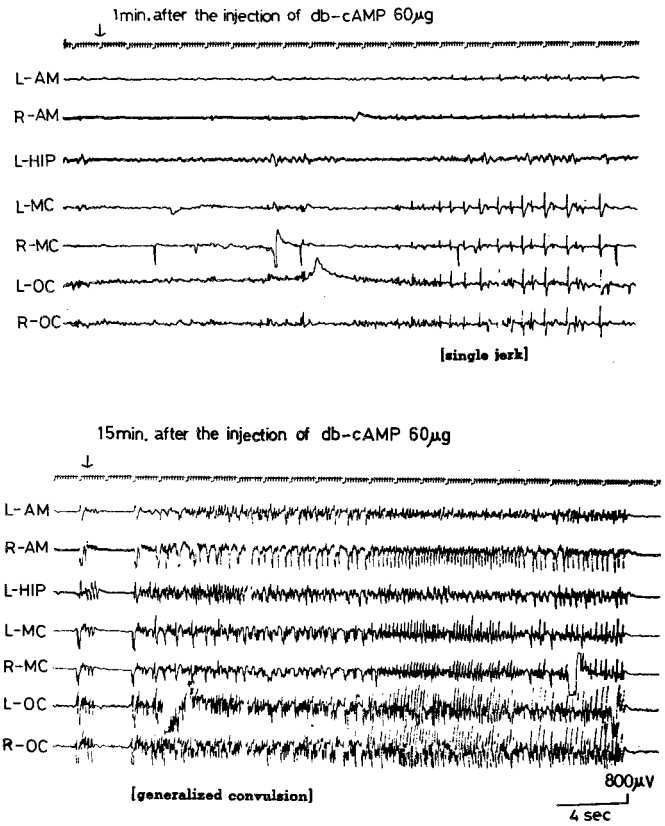
無処置群とsham-operation群のcAMP濃度とcGMP濃度は，いずれの部位でもともに差異

2) db-cAMPの前梨核内注入実験：

pentobarbital麻酔下で，左側前梨核に0.5mm外径の外筒および内筒管よりなるcannulaを植え込んだ。また，両側前梨核，中心灰質，後頭皮質などに脳波導出用の電極を植え込んだ。術後8日目に，Ringer液で溶解したdb-cAMP 1.0，20，60，100，300μgをそれぞれ別々のラットに注入し，この時の脳波および行動上の変化を観察した。この対照としては，Ringer液のみを同量注入した。

は認められなかった。つぎに，kindling群のcAMPについてみると，sham-operation群と比較して，右側海馬（$P<0.05$）や両側後頭皮質（左右とも$P<0.02$）で有意な増加を示し，また，刺激部位の左側扁桃核でも増加傾向が認められた（$P<0.1$）。これらに対して，kindling群のcGMPは，sham-operation群と比較して，刺激部位の左側扁桃核（$P<0.5$），両側海馬（左：$P<0.05$，右：$P<0.001$），両側後頭皮質（左右とも$P<0.02$）などで有意に増加し，cAMPと似たような変化を示したが，これらの変化はcAMPにくらべてより著明であった。すなわち，cAMPが海馬や後頭皮質でわずかに1.2倍～1.6倍の増加にすぎなかったのに対して，cGMPでは海馬や後頭皮質でいずれも2倍以上の増加が認められた。

[Fig. 2.] Effect of dibutyryl cyclic AMP injected into amygdaloid complex on EEG



2) db-cAMP投与による痙攣発作および脳波の変化：（図2）

db cAMP 1.0μgを扁桃核内に投与すると，約1分後に脳波上では散発性棘波が出現し，行動上ではこれに一致するsingle jerkが認められたのみであった。db cAMPを20μgに増量すると，facial twitchingやmasticationなどが出現するようになり，さらに60μgに増量すると，前述した症状を示した後に，forelimb clonus（kangaroo posture）を呈する全身痙攣まで発展した（図2）。100μg以上を投与した場合には，さらに痙攣重積状態となった。すなわち，db-cAMPを扁桃核内に注入すると，投与量に相関した発作型がみられ，kindling痙攣に類似した発作の発展が認められた。

［考察］

kindling preparationを用いて，痙攣準備性と脳内cyclic nucleotideとの関連をみた報告は，我々のもの以外には，Walker ら[11]の報告があるにすぎない。Walkerらは，今回の我々の方法と同様に，扁桃核刺激によるkindledラットを用いて脳内cyclic nucleotideを調べたが，有意な変化は認められなかったとしている。これに対して，先に我々は[5]，ウサギを用いて，kindling effect形成途上と形成後の脳各部位のcyclic nucleotide

の変化を検討したところ，痙攣準備性の獲得と相関してcyclic nucleotideが増加し，しかも脳部位によって異なって増加する傾向を認めた。今回のラットを用いた結果をみると，最終痙攣の1カ月後でさえも，刺激部位の扁桃核のみならず海馬や後頭皮質でも，cAMPとcGMPの増加が認められた。このことは，持続的な痙攣準備状態にはcyclic nucleotideの増加が密接に関連していることを示唆するものと思われる。Walkerらの結果と我々の結果のちがいについて述べると，Walkerらは，全身痙攣3回でkindling effectの完成とし，しかもその24時間後にsacrificeしていること，測定した脳部位が少ないこと，など点で我々の方法と異なっており，これらの相違からcyclic nucleotideの変化がみられなかったものとも考えられる。

つぎに，これらの2つのcyclic nucleotideのどちらがより痙攣発作の発現に関与するのか，両者はどのように関連し合っているのかなどについては，なお明らかではない。この点について，垣田らは[7]，choleratoxinのラット扁桃核内投与により，adenylate cyclaseの活性化とcAMPの増加を伴う痙攣発作を認め，痙攣発作出現におけるcAMP代謝系の異常を強調している。これに対して，Ferrendelliらは[2,3,4]，pentylentetrazolなどの各種のconvulsantによる痙攣時には，脳各位でcAMPもcGMPも増加するが，cGMPのみは痙攣に先行して増加しており，また，痙攣を誘発しない程度のsub-convulsantの量ではcGMPのみが増加していることを認めて，cGMPが痙攣の発現や進展に関連し，cAMPは痙攣の抑制あるいは終結に関連しているのではないかと推定している。

今回の結果よりcGMPの増加の方がcAMPの増加よりも大きかったこと，cGMPの増加がmuscarinic cholinergic receptorと密接な関係があること[9]，kindling成立には海馬におけるcholinergic receptorのsupersensitivityが関与する可能性が示唆されていること[1]などから，kindlingによる痙攣準備性獲得には，よりcGMPが関与していることが考えられる。しかし，cAMPについても，今回，これまでの報告[6,7]と同様にdb-cAMPにより痙攣発作が誘発され，しかも投与量に相関した発作の発展が認められた。このことから，cAMPも痙攣発現に促進的に作用しているとも考えられる。

本研究の一部は，昭和56年度厚生科学研究費補助金（医療研究事業）によった。

〔文献〕

1) Burchfiel J.L., Duchowny M.S. and Duffy F.H. : Science, 204:1096,1979.
2) Ferrendelli J.A. and Kinscherf D.A. : Epilepsia, 18:525,1977.
3) Ferrendelli J.A., Blank A.C. and Gross R.A. : Brain Res., 200:93,1980.
4) Ferrendelli J.A. : Advances in Cyclic Nucleotide Research, 12:199,1980.
5) 深津敏彦，熊代 永，青野悟彦，他：脳研究会誌，7：70，1981.
6) Gessa G.L., Krishna G., Forn J. et al. : Adv. in Biochem. Psychopharm., 3:371,1970.
7) 垣田清人，栗山欽弥：脳と神経，31：1129，1979.
8) Körnig J.F.R. and Klippel R.A. : The Rat Brain, Robert E. Krieger Publishing Co. Inc., New York, 1967.
9) Kuo J.F., Lee T.P., Walton P.L., et al. : Biol. Chem., 247:16,1972-
10) 新田 哉，沼田吉彦，熊代 永，他：神経化学，17：45，1978.
11) Wlker J.E., Mikeska J.A. and Crawford I.L. : Brain Res. Bull., 6:1,1981.

27 El系マウス脳の分離核のRNAポリメラーゼの諸特性とpoly (A) RNA 合成

大西　博・山上　栄・森　浩一
辻　正記・千頭孝史・川北幸男
（阪市大・医・神経精神）

〔要　約〕

*El*と*dd*系マウス脳から精製核を分離し、*in vitro* における核RNA合成を調べた。*El*と*dd*共にDNAの50μgまでRNA合成は直線的に増加し、30分のインキュベーションで、ほぼピークに達し、α-アマニチンで約30％にRNA合成の阻害を受けた。*El*と*dd*でパターンに大差はなかった。種々の条件におけるRNA合成を検討すると、反応混液の構成成分を除いた場合それぞれ合成低下が示された。α-アマニチンと硫安の影響から*El*でRNAポリメラーゼIIの活性が高いことが予測された。標準反応混液中で合成されたRNAを抽出し、電気泳動で分析すると*El*と*dd*でパターンに顕著な差はみられないが、18S前後の大きな分子種に*El*で^{3}H-UTPのやや高い取り込みを示した。この傾向は150mM硫安の存在下で顕著になり、*El*では*dd*にほとんどみられない28Sより大きなRNAが認められた。これらのRNAから*poly (U) sepharose*を用いて*poly (A)*を含むRNAを分離し電気泳動にかけると、やはり*El*で28Sより大きな*poly (A) RNA*の存在が示された。これらの結果から*El*の核RNAには*dd*にほとんど認められない*poly (A)*を含む大きなRNAの分子種が存在し、これが細胞質に*transport*され、われわれの報告した*El*のポリゾームに存在する巨大RNAに相当するものであろうと推測した。

Key words： El mouse, RNA polymerase, poly(A)RNA.

既に我々は*El*系マウス脳のポリゾームに、28Sより大きなDNA類似の塩基組成をもつ*poly (A)*を含む*lapidly labelled RNA*[1]の存在を報告している。今回は分離核において転写されたRNAについて検討を加え、*dd*系マウスとの相違に関して報告する。

実験方法

1. 核の分離[2]，*El*と*dd*系マウス脳から小脳と嗅脳を除いた部分に、冷却した溶媒A (0.32M *sucrose*, 50mM *sodium phosphate* (pH 6.5), 50mM KCl, 1mM *dithiothreitol*, 2mM $MgCl_2$, 0.1% *Triton X-100*) の15倍容を加え、ホモジナイズし、1000gで10分間遠心し、沈殿に再度溶媒Aを加えて懸濁し、遠心した。生じた粗核分画に溶媒B (2.2M *sucrose*, 50mM *sodium phosphate* (pH 6.5), 1mM *dithiothreitol*, 2mM $MgCl_2$) の28倍容を加えホモジナイズし、遠心管内の溶媒Bの10ml上に重層し、SW27ローターを用いて、22,000 rpm, 45分間遠心して精製核分画を分離した。それに少量の溶媒C (25% *glycerol*, 40mM *Tris*-HCl (pH 8.0), 1mM *dithiothreitol*, 10mM $MgCl_2$, 0.1mM EDTA) を加え懸濁し、1000gで10分間遠心し、沈殿した核を溶媒Cの適量に懸濁した。

2. DNAの定量，溶媒Cに懸濁した核の一部分をとり、*Schneider*の方法でDNAを抽出し、*Burton*の方法でDNAを比色定量した。

3. 核のRNA合成[2]，反応混液は12.5% *glycerol*, 40mM *Tris*-HCl (pH 8.0), 200mM KCl, 1mM *dithiothreitol*, 5mM $MgCl_2$, 2.5mM $MnCl_2$, 0.05mM EDTA, 5mM *creatine phosphate*, 25μg *creatine phosphokinase*, 1.25μCi ^{3}H-UTP, 各々0.15mMのATP, GTP, CTP, 20μg DNAで、全量を0.5mlとした。なお高塩濃度の条件では3M硫安を加えて最終濃度を150mMとした。この反応混液を37℃，30分間インキュベートし、反応終了後0.5mgの牛血清アルブミンと等量の

10% TCAを加えて遠心し、さらに沈殿を2回5% TCAで懸濁，遠心した後GF/C上に集め、95%エタノールで洗條、乾燥させ放射能を計測した。

4. 合成された核RNAの抽出[1),5)]，反応混液を10倍量とし、温度を25℃とした他は、上記と同様にインキュベートした。反応終了後DNaseの50μg/mlを加え25℃，10分間インキュベートした後、0.1M EDTAと5% SDSを加えそれぞれ最終濃度を0.01M，0.5%とした。等量のフェノールを加え65℃，10分間，撹拌し、冷却，遠心して水層，中間層，フェノール層を分離した。中間層とフェノール層を取りフェノールで再度撹拌，遠心し得られた水層をフェノールで除蛋白し、エタノールの3倍容で合成されたRNAを沈殿させた。

5. 0.5% agarose-1.5% polyacrylamide gel electrophoresisを用いたRNAの電気泳動，これらは前報[4)]に従った。markerとして肝リボゾーム28S，18S RNAと4S RNAを用いた。100mmゲルを2時間泳動後ISCOのGel Scannerを用いてAbsorbance Monitorでチャートし、ゲルを4mmごとにスライスし、Soluene-350の1mlを加え37℃，18時間インキュベートし、シンチレーター溶液の10mlを加えて放射能を計測した。

6. Poly (U) sepharose affinity chromatography，これは前報[6)]に従った。

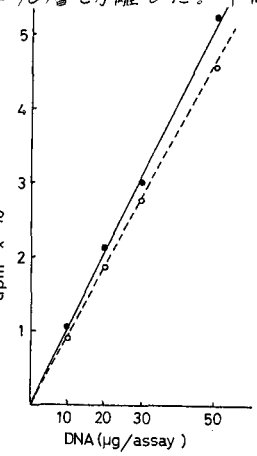


図1. Effect of DNA concentration on incorporation of ^{3}H-UTP nuclear RNA ●, El : ○, dd

結果と考察

1. 種々の条件における核RNA合成，反応混液中に種々のDNA濃度の核を加えた時のRNAへの[^{3}H]-UTPの取り込みの変化を図1に示した。El，dd共にDNAの50μgまでRNA合成は直線的に増加した。図2にインキュベーションの時間に対してRNA合成の変化を示した。10分まで急速にRNA合成は増加し、30分でほとんどピークに達し、以後60分まで合成は持続した。α-アマニチンの濃度の影響を調べると、0.1μgの低濃度でかなりのRNA合成の阻害がみられ0.5μgでは約30%に阻害され、1μgでも同様であった（図3）。この結果から、合成された核RNAの大部分はRNAポリメラーゼII[3)]によるものと考えられる。以上Elとddについて、そのパターンに顕著な差異は認められなかった。表1に反応混液中の各構成成分がRNA合成に及ぼす影響を検討した。Elとddでは大差は認められなく、$MnCl_2$の除去では約90%にRNA合成阻害が認められ、ATP賦活系の除去では約80%に阻害がみられた。ヌクレオチドの中ではATPの除去が

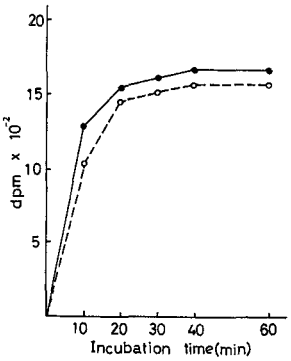


図2. Effect of various incubation on incorporation of ^{3}H-UTP into nuclear RNA. Nuclei were incubated under standard assay conditions. ●, El : ○, dd

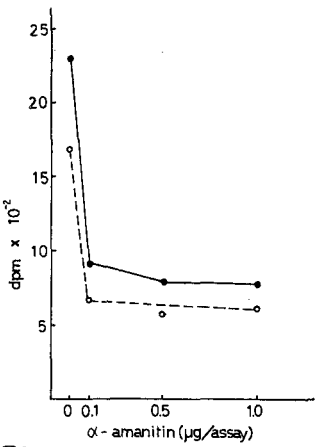


図3. Effect of α-amanitin on incorporation of ^{3}H-UTP into nuclear RNA. Nuclei were incubated under standard assay conditions. ●, El : ○, dd

最も合成阻害が強く、CTPでは約50%、GTPでは約80%に阻害がみられた。このことはGTPのendogenousなヌクレオチドプールが比較的大きいことを推測させる。反応混液に0.5μg α-アマニチンと高塩濃度の硫安を加えた場合のRNA合成の変化を表2に示した。0.5μg α-アマニチンの添加ではElとddで共に約30%までRNA合成の阻害がみられ、硫安150mMを加えるとElでは256%に、ddでは215%にRNA合成が増加した。さらに0.5μg α-アマニチン存在下で150mM硫安の状態では、Elで37%、ddで39%までRNA合成の阻害がみられた。150mM硫安の高塩濃度下でみられるRNA合成はElの方が多く、α-アマニチンの阻害もElの方がやや強い。このことはRNAポリメラーゼIIの活性がElで高いことを思わせ、合成されたRNAの分子種にddとの差が認められるかを次に検討した。

表1. Effect of elimination of components from the reaction mixture on incorporation of ^{3}H-UTP into RNA.

Conditions	El RNA (dpm/mg DNA)	El % control	dd RNA (dpm/mg DNA)	dd % control
Complete	106,650	100	101,600	100
- $MnCl_2$	97,000	91	89,850	88
- creatine phosphate, creatine phosphokinase	89,900	84	83,250	82
- ATP	46,300	43	30,650	30
- GTP	87,000	82	83,950	83
- CTP	58,700	55	52,800	52

Values are dpm of ^{3}H-UTP incorporated per mg DNA and are the means of duplicate determinations.

2. 合成された核RNAの分析：核を反応混液中で25℃、30分間インキュベートし、hot phenol法によりRNAを抽出し、2時間ゲル電気泳動したパターンを図4に示した。El, dd共に4Sより小さな分画に高いピークがみられ、18Sにかけて放射能の分布が認められた。Elとddとではそのパターンに大差はないが、大きな分子種ではElにやや高い[^{3}H]-UTPの取り込みを示し、4Sより小さな分子種ではddに取り込みの傾向が示された。150mM硫安の高塩濃度の存在下（図5）ではこの傾向が顕著になり、Elでは28Sより大きなRNAがみられるのに対してddでは28Sより大きなRNAはほとんど認められない。またこの大きな分子種のラベルもElの方が高かった。低分子のRNAの部分では逆にddで[^{3}H]-UTPの高い取り込みを示した。なお4Sより大きな部分にピークが出現し、全体に4Sより大きなRNAのラベルが増加した。このRNAがpoly(A)を含むRNAでありmRNAの前駆体と考えられるものかどうかを検討した。標準反応混液中でRNAを合成し、抽出したRNAをpoly(U) sepharoseにかけ、カラムに吸着したpoly(A)を含むRNAを85%ホルムアミドで溶出し、そのRNAを回収してゲル電気泳動にかけたパターンが図6である。4Sから18Sにかけてpoly(A)を含むRNAがみられElとddでそのパターンに大差はみられないが、Elにやや大きなRNAの存在が示された。なおpoly(U) sepharoseに吸着しない分画を電気泳動にかけると4Sより小さな部分にピークが出現し、4Sより大きな部分にはほとんどラベルの分散は認められない。

表2. Effect of addition of components into the reaction mixture on incorporation of ^{3}H-UTP into RNA.

Conditions	El RNA (dpm/mg DNA)	El % control	dd RNA (dpm/mg DNA)	dd % control
Complete	115,250	100	84,250	100
+ 0.5μg α-amanitin	33,950	29	27,400	33
+ 150mM $(NH_4)_2SO_4$	294,750	256	181,550	215
+ 150mM $(NH_4)_2SO_4$ + 0.5μg α-amanitin	43,200	37	32,650	39

Values are dpm of ^{3}H-UTP incorporated per mg DNA and are the means of duplicate determinations.

これは図4，図5で示された4Sより小さな部分でのピークに相当するものであり，poly(A)を含まないヌクレオチドであろう。さらに150mM硫安の存在下では，Elで28Sより大きなpoly(A)を含むRNAが認められ，ddでは28Sより大きな分子種はほとんど認めなかった。逆にddでは低分子RNAにやや高い[^{3}H]-UTPの取り込みを示した（図7）。これらの結果からElの核RNAには，ddではほとんど認められない28Sより大きなpoly(A)を含むRNAが存在し，これが細胞質にtransportされ，我々[7]の報告したElのポリゾームに存在する28Sより大きなrapidly labelled RNAに相当するものであろうと推測される。高塩濃度硫安の存在下で合成される核RNAはspecific activityが非常に高いものであり，今後hybridizationなどの検討により，痙攣素質との関連性について検索する積もりである。

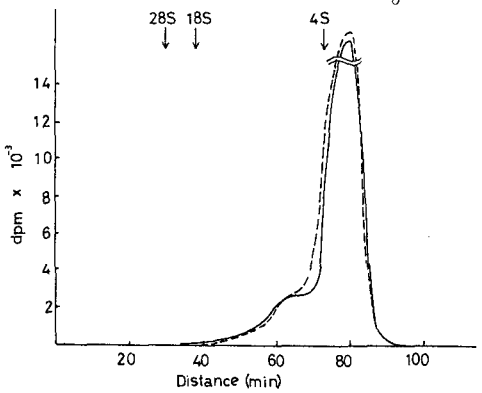


図4, Gel electrophoresis of nuclear RNA synthesized under standard assay conditions.
——, El : ---, dd

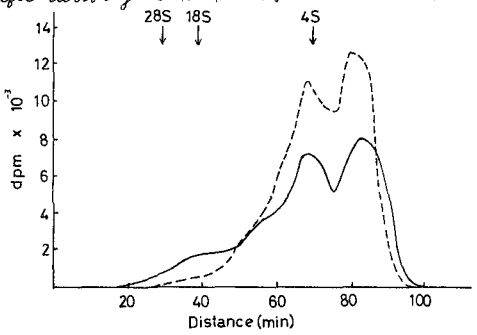


図5, Gel electrophoresis of nuclear RNA synthesized under high ionic strength conditions.
——, El : ---, dd

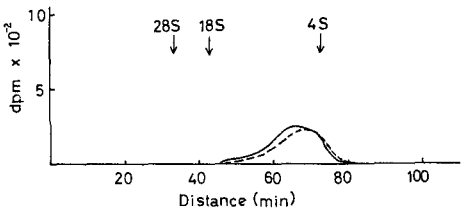


図6, Gel electrophoresis of poly(A) containing RNA obtained from poly(U) sepharose. RNA was synthesized under standard assay conditions.
——, El : ---, dd

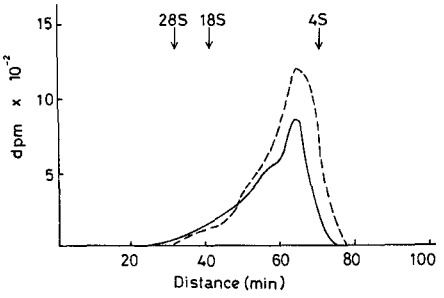


図7, Gel electrophoresis of poly(A) containing RNA obtained from poly(U) sepharose. RNA was synthesized under high ionic strength conditions.
——, El : ---, dd

REFERENCE

1) Banks, S.P. & Johnson, T.C. : Brain Research 62, 201-212 (1973).

2) Brown, I.R. : Proc. Nat. Acad. Sci. USA 7, 837-839 (1975).

3) Montanaro, N., Novello, F. & Stirpe, F. : Biochem. J. 125, 1087-1090 (1971).

4) 森 浩一，山上 栄，大西 博，辻 正記，大野京介，川北幸男：神経化学 17, 105-108 (1978).

5) Muramatsu, M., Hodnett, J.L., Steele, W.J. & Busch, H. : Biochim. Biophys. Acta 123, 116-125, (1966).

6) 大西 博，森 浩一，切池信夫，山上 栄，川北幸男：神経化学 15, 136-139 (1976).

7) 山上 栄，森 浩一，大西 博，切池信夫，川北幸男：神経化学，16, 193-196 (1977).

28 虚血脳における phospholipase A_1, A_2, lysophospholipase および acyl CoA:lysophospholipid acyltransferase の酵素活性

平島　豊・中田潤一・甲州啓二・遠藤俊郎・高久　晃(富山医薬大・脳外)
本田　昂・野田清美(同・RI実験施設)・高崎親久(東北大・理・生物有機)

〔要　約〕

虚血脳における phospholipase A_1, A_2, lysophospholipase 活性を従来の測定法をより簡便化，微量化した方法により測定した。また同時に虚血脳における acyl CoA: lysophospholipid acyltransferase活性も測定することにより，虚血時における脳生体膜 glycerophospholipid の deacylation-reacylation cycle の変化を検討した。

1) phospholipase A_1, A_2, lysophospholipaseの三酵素の虚血時間に伴う活性の変化は類似しており，虚血時間60分までは酵素活性の著しい変化はみられなかった。しかし60分より120分にかけて活性が最大となり，その後虚血時間の延長に伴い活性の低下を認めた。

2) acyl CoA: lysophospholipid acyltransferase は虚血時間の延長に伴いその活性の低下がみられた。虚血60分以内では脳内遊離脂肪酸が顕著に増加する事が知られているが，その間 phospholipase A_1, A_2 の活性化や acyl CoA ligase, acyl CoA: lysophospholipid acyltransferase の失活はそれほど顕著でないという事実より，脳内遊離脂肪酸増加の原因は脳内ATPの枯渇による acyl CoA ligase の作用の障害が最も有力と考えられた。60~120分の deacylation 酵素群の活性化の原因についてはなお検討の余地がある。

Key words　ischemic brain, deacylating enzyms, acylCoA:lysophospholipid acyltransferase

---

生体膜の glycerophospholipid は phospholipase A_1, A_2 で deacylation されるばかりでなく，acyl CoA: lysophospholipid acyltransferase 等の酵素により reacylation されていることがわかっている。脳生体膜においてもこの acyl 基の turn over は比較的速やかに行なわれていると言われている。[7] これらの deacylation-reacylation cycle が虚血の進行に伴いどの様な変化を示すかを犬虚血脳の phospholipase A_1, A_2, lysophospholipase, それに acyl CoA: lysophospholipid acyltransferase等の酵素活性を測定することにより検討した。

〔実験方法および結果〕

A) phospholipase A_1, A_2, lysophospholipase 測定の簡便化と微量化：脳 phospholipase A_1, A_2, lysophospholipase の活性測定は Gallai-Hatchard 等[4] 以来行なわれているがいずれも反応終了後に有機溶媒（クロロホルム，メタノール等）で脂質を抽出する操作を行っている。多数の標本のこれらdeacylation酵素群の測定のために抽出操作を省略し，簡便化と微量化を計った。測定方法は以下に述べるごとくであるが，これらの結果を従来の抽出法によった結果と比較対照した。簡便測定方法は凍結した脳（1g）をアセトン10mlとともに teflon homogenizer を用いて氷冷下で5分間homogenize し，3000 rpm 10分間遠心して上清を捨てる。同様にしてアセトン10mlで1回，n-ブタノールで4回脱脂する。最終沈殿物に1.5mlの生食を加え，homogenize後遠心分離し，上清をピペットで注意深く吸いとりメンブレンフィルターでろ過し，これを粗酵素液とした。phospholipase A_1, A_2 測定用として，L-α-[2-palmitoyl-1-^{14}C]phosphatidylcholine, dipalmitoyl (RCC Amersham, CFA 601) および cold carrier lipid として L-3-phosphatidylcholine, dipalmitoyl を基質に使用し，比放射能は 6 μCi ^{14}C/μmole とし，また0.3%トリトンX100溶液で濃度を2mMとした。(

基質：トリトンX100＝1：2，(mole/mole) また lysophospholipase 活性測定用には L-lysophosphatidyl choline, 1-[1-^{14}C] palmitoyl (RCC Amersham, CFA 633)，および cold carrier lipid として，lysophosphatidyl choline, palmitoyl を用いた。比放射能は2μCi ^{14}C/μmole として，H_2O で濃度を2mMにした。反応は基質溶液20μl，0.1M Tris-塩酸緩衝液（PH7.0）10μl，粗酵素液20μlを各々ミクロ試験管に注入し，37°Cの恒温槽で10時間 incubate し，その後2N塩酸5μlで反応を停止した。脳 lysophospholipase 活性がかなり高いため本反応系では phospholipase A_1，A_2 を個々に正確に測定できないので反応開始前に phospholipase A_1，A_2 測定の粗酵素液を lysophospholipase が失活する様に[2] 70°C，5分間 preincubate した。反応停止後，反応液15μlを直接20cm×2cmの硅酸薄層（S&S F1500）上に移し乾燥後，クロロホルム：メタノール：酢酸：水混合液（25：15：4：2，V/V/V/V）を用いて展開を行った。展開終了後十分乾燥しラジオ薄層クロマトグラフ Thin Layer Scanner II（Berthold）を用い薄層板に分離展開された放射能を自動的に測定記録した。記録紙上のピークに一致する薄層板の部分を切断し，液シン用バイヤル中にスパチュラを使用して硅酸を削り落とした。これに水1ml，次いでシンチレーター（Amersham, ACS® II）10mlを混ぜ液体シンチレーションカウンター（Aloka, LSC-671型）で放射能を測定した。各ピークの同定は palmitic acid については L-α-[2-palmitoyl-1-^{14}C] phosphatidyl choline, dipalmitoyl にエラブウミヘビ毒より精製された phospholipase A_2-I[10]（25μg/ml）を作用させて遊離させることにより，また phosphatidyl choline, lysophosphatidyl choline については それぞれ 販ラベル標品を薄層上に展開させることにより行った。（図1） phospholipase A_1 活性は

$$\frac{\text{lysophosphatidyl choline 部放射能}}{\text{薄層上の全放射能} - \text{palmitic acid 部放射能}} \times 100\ (\%)$$

phospholipase A_2 活性は

$$\frac{\text{全放射能} - \text{palmitic acid 部放射能}}{\text{全放射能}} \times 100\ (\%)$$

lysophospholipase 活性は

$$\frac{\text{palmitic acid 部放射能}}{\text{全放射能}} \times 100\ (\%)$$

として求める事にした。本簡便法を用いて phospholipase A_1，A_2 の PH と酵素活性について調べたものが図2である。至適PHは phospholipase A_1 が4.5，phospholipase A_2 が5.0であった。この結果は Coop等[2] が抽出法によって報告している rat および人脳の phospholipase A_1，A_2 の至適PHと極めて似た値を示した。また抽出法と簡便法による同一標本での酵素活性測定では両者に著しい差はみられなかった。

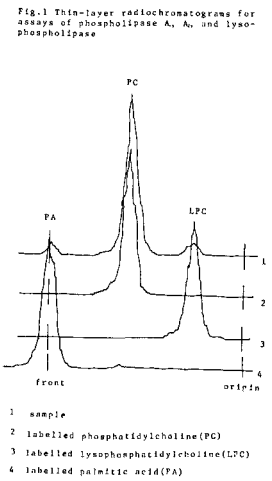


Fig.1 Thin-layer radiochromatograms for assays of phospholipase A_1, A_2, and lysophospholipase

1 sample
2 labelled phosphatidylcholine(PC)
3 labelled lysophosphatidylcholine(LPC)
4 labelled palmitic acid(PA)

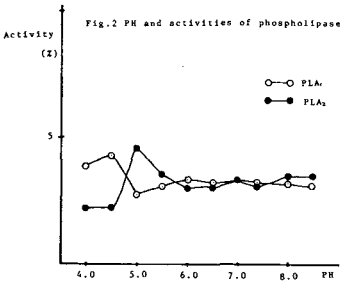


Fig.2 PH and activities of phospholipase A_1 and A_2

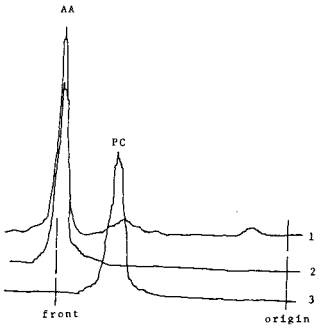
B）虚血脳における deacylation 酵素群と acyl CoA: lysophospholipid acyltransferase の測定：虚血脳としては田中等[8] の方法に従い，大脳半球無血流モデル犬を作成した。虚血30，60，120，180，240，360分の時点でスプーンにて脳を採取し，瞬時に液体窒素（-180°C）で凍結した。また遮断時間0分の標本は開頭，硬膜切開後同様操作にて脳を採取，凍結した。遮断時間0，30，60，120，180，240，360の標本はそれぞれ4，5，5，6，4，4，4頭であり，計32頭について測定を行った。即ち phospholipase A_1，A_2，lysophospholipase活性はA)で述べた我々の簡便法により測定し，また acyl CoA: lysophospholipid acyltransfe-

rase活性は Corbin 等[3] の方法に準じて測定した。acylCoA: lysophospholipid acyltransferase活性用粗酵素液は Webster 等[9] の方法で得られたミクロゾーム分画を再懸濁したものを使った。基質として [1-^{14}C] arachidonic acid (RCC Amersham, CFA 504) と cold carrier として arachidonic acid を用いて比放射能を2 μCi/μmole とし，クロロホルムで溶解した。反応はまず基質 0.375 μmole (0.75 μCi) を試験管に注入し，窒素気流で乾固した。次いで 500mM Tris-塩酸緩衝液 (PH7.0)，100mM $MgCl_2$ 溶液，1mM CoA 溶液，1mM DTT 溶液，25 mM ATP 溶液，5mM lysophosphatidylcholine 溶液，1.25M NaF 溶液をそれぞれ 0.1 ml 加え，これに粗酵素液 0.3 ml を加えて 37℃，1時間，shaking rate を 20 strokes/min の条件で incubate した。次にクロロホルム-メタノール混合液 (2:1, V/V) 4 ml を反応液に加え激しく撹拌して反応を停止させた。次に 3000 rpm, 10 分間遠心し，下層の organic phase より 0.5 ml 採取し窒素乾固し，クロロホルム 50 μl を加え再溶解し，これをマイクロピペットで 20 cm × 2cm の硅酸薄層に移した。乾燥後クロロホルム：メタノール：水混合液 (100：40：6) で展開を行った。次いでラジオ薄層クロマトグラフを使用し，放射能ピークを記録し，同部の硅酸中の放射能を液体シンチレーションカウンターで測定した。(図3) acylCoA: lysophospholipid acyltransferase の活性は

$$\frac{\text{phosphatidylcholine 部の放射能}}{\text{薄層上の全放射能}} \times 100\ (\%)$$

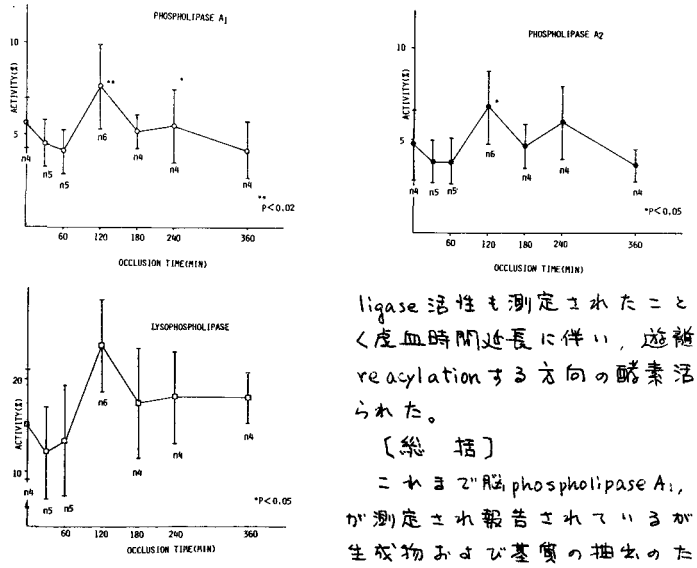
とした。虚血時間の変化に伴う phospholipase A_1, A_2, lysophospholipase 活性の変化は図4に示す通りである。三者とも極めて似かよった傾向を示している。つまり虚血時間が 60 分までの間は酵素活性はそれほど変化がないが，60分から120分の間で大きく変化し (**P<0.02, *P<0.05)，活性が最大となり，その後は虚血時間の延長とともに活性が低下する傾向を認めた。一方 acyl CoA: lysophospholipid acyltransferase 活性に関しては，本反応系では同時に acyl CoA ligase 活性も測定されたことになるが，図5に示す如く虚血時間延長に伴い，遊離脂肪酸が lysophospholipid に reacylation する方向の酵素活性が低下する傾向が認められた。

Fig.3 Thin-layer radiochromatograms for assay of acylCoA:lysophospholipid acyltransferase



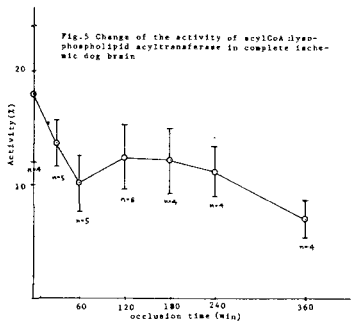
1 sample
2 labelled arachidonic acid(AA)
3 labelled phosphtidylcholine(PC)

Fig.4 Changes of the activities of phospholipase A_1, A_2 and lysophospholipase in complete ischemic dog brain



〔総　括〕

これまで脳 phospholipase A_1, A_2, lysophospholipase 活性が測定され報告されているが，いずれも酵素反応後の生成物および基質の抽出のためにクロロホルム，メタ



ノール等の有機溶媒が使用されており，確立した方法ではあるが，多くの標本を処理する際にはほん雑で，より簡便化された方法が望まれてきた。今回我々は抽出操作を略し，簡便化する方法の開発を試み，その結果，抽出法による結果と差がなく有用な測定法であることがわかった。しかも，この簡便化により使用する基質も極めて微量化された。抽出操作を省略しても結果に差をみなかった大きな原因は溶媒中の界面活性剤の働きにより，反応生成物，基質等の脂質をミセル状態にして均等に溶解されるためであろうと考えている。lysophosphatidylcholine はそれ自体でミセルをつくるため，この基質の溶媒中の界面活性剤の有無にかかわらず同様の効果は期待されるものと思う。

さてこれまで虚血脳に遊離脂肪酸の著しい増加が認められるという報告はあるが，rat[1]，スナネズミ[5]によるもので虚血時間50分以内の検討であり，虚血脳における脳生体膜の glycerophospholipid の deacylation - reacylation cycle に関しての詳しい研究はみあたらない。遊離脂肪酸増加の原因として①phospholipase A_1, A_2 の作用による phospholipid の分解によるとする考えや②ATPが枯渇するため遊離脂肪酸が acyl CoA に変換されず遊離脂肪酸が増加するとする考えがなされてきた。[7] 我々の今回の実験では少くとも虚血1時間以内では phospholipase A_1, A_2, lysophospholipase 活性は増加しておらず，また acyl CoA ligase，acyl CoA:lysophospholipid acyltransferase 活性もこの間にそれほど大きい変動を示さなかった。従って遊離脂肪酸の急激な増加の主要な原因としてはATPの枯渇があげられると考えたい。嘉山等[6]はATPは虚血5分でほぼ0レベル近くまで低下するとしており，ATPが枯渇すればacyl CoA ligase が働かなくなり，従って遊離脂肪酸は蓄積増加するものと考えられる。なお一方虚血時間60分～120分の間では phospholipase A_1, A_2, lysophospholipase は著しく活性化されるがその原因に関してはいまだ不明であり更に検討すべきと考える。

〔文献〕

1) Bazan, N.G.Jr. (1970) Biochim. Biophys. Acta. 218, 1-10.

2) Cooper, M.F. and Webster, G.R. (1970) J. Neurochem. 17, 1543-1554.

3) Corbin, D.R. and Sun, G.Y. (1978) J. Neurochem. 30, 77-82.

4) Gallai-Hatchard, J. et al. (1962) J. Neurochem. 9, 545-554.

5) 伊藤 他 (1980) 脳神経 32, 827-833.

6) 嘉山 他 (1980) 脳虚血と細胞障害 p39-48.

7) Sun, G.Y. et al. (1979) Lipids 14, 226-235.

8) 田中 他 (1978) 脳神経 31, 665-667.

9) Webster, G.R. and Alpern, R.J. (1964) Biochem. J. 90, 35-42.

10) Yoshida, H. et al. (1979) J. Biochem. 85, 379-388.

29 G_{M1}-ガングリオシドーシスの大脳、肝臓及び脾臓における糖脂質及び関連物質の異常

原　　厚・笠間　透・武富　保
（信大・医・順応研・生化）

〔要　約〕

G_{M1}-ガングリオシドーシスと診断された患者の剖検材料から、大脳，肝臓及び脾臓を得て，その脂質分析を行なった。大脳の中性糖脂質画分では，正常組織ではほとんど検出されないグルコセレブロシド，ラクトシルセラミド，アシアロG_{M2}，アシアロG_{M1}が存在し，ガングリオシド画分では，G_{M1}の著しい蓄積がみられ，さらにG_{M3}，G_{M2}の増加も認められた。一方，肝臓及び脾臓では，中性糖脂質及びガングリオシドのパターンに著明な変化は認められなかった。このことは，本疾患は，Ⅱ-型であることを示唆した。一方、肝臓のガングリオシド画分にレゾルシノール試薬及びアンスロン試薬に陽性で，ガングリオシドとは異なる3物質を見い出した。この物質は、コレステロールとグルクロン酸それぞれ一分子から構成されるCholesterol Glucuronideと同定された。この物質は正常肝臓の含量の3倍増加していることが確認された。また、成人型のG_{M1}-ガングリオシドーシスと考えられる患者の肝臓においても、正常肝臓の4.5倍のCholesterol Glucuronideの増加がみられた。

Key words：　GM1-Gangliosidosis, Sphingoglycolipids, Cholesterol Glucuronide

---

〔はじめに〕

G_{M1}-ガングリオシドーシスはⅠ-型，Ⅱ-型及び成人型と発症年令及び臓器におけるG_{M1}の蓄積状態によって分類されている。我々は、G_{M1}-ガングリオシドーシスについて研究し，その一部はすでに報告したが(1)，さらに、大脳，肝臓及び脾臓について詳細な検討を加えた。一般にG_{M1}-ガングリオシドーシスでは，G_{M1}-ガングリオシドが蓄積する他に、尿中に酸性ムコ多糖(2)や中性オリゴ糖(3)が検出されている。今回、我々は、これらの蓄積物質とは異なり，特に肝臓のガングリオシド画分に存在するCholesterol Glucuronideの増量を見たので、糖脂質の異常とともに報告したい。

〔実験方法〕

1. 実験材料

男。5才5ヶ月で死亡。臨床検査で白血球β-ガラクトシダーゼ活性は正常値の2～3%。また、β-グルクロニダーゼは正常値を示した。

2. 方法

大脳は新鮮組織1gを50倍量のクロロフォルム－メタノール(以下C-M)(2:1 v/v)でホモジナイズし，その3液を抽出液とした。肝臓及び脾臓の新鮮組織それぞれ40g及び5gはSuzuki(4)の方法に従い，C-M(2:1, v/v)及び5%の水を含むC-M(1:2, v/v)で順次抽出した。各抽出液は、弱アルカリ処理後、Ledeen等(5)の方法に従い，中性脂質及び酸性脂質の2画分に分けた。中性脂質画分は，アセチル化後，スフィンゴミエリン，コレステロール及び脂肪酸メチルエステルを除去した後，中性糖脂質画分

を得た。各中性糖脂質は，C-M-W（65：25：4, V/V/V）で分離後、薄層プレートから抽出し，分析に用いた。酸性脂質画分は、C-M-0.25% KCl（60：35：8, V/V/V）で薄層を展開後，薄層粉末より抽出し，分析に供した。

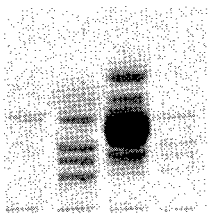
各脂質の分析は、常法により，メタノリシスした後、脂肪酸メチルエステルとメチルグリコシドに分け，ガスクロマトグラフィーで分析した。メチルグリコシドは，N-アセチル化処理ののち，2% OV-1 で 140°C から 220°C まで 2°C/min の昇温で分析した。脂肪酸メチルエステルは 210°C で行なった。コレステロールは 2% OV-1 で，140°C から 280°C まで，または、170°C から 280°C まで，2°C/min の昇温で行なった。

薄層上のバンドの検出は，アンスロン試薬，レゾルシノール試薬及びリン酸炭化試薬を用いた。

赤外線吸収スペクトルは KBr 錠剤を用いて測定した。

[結果]

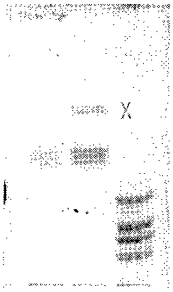
図1に示すように、大脳の酸性脂質画分ではGM1が圧倒的に蓄積しているのがわかる。肝臓の酸性脂質画分では、図2に示すようにGM1の蓄積はみられず、GM3（glc:gal = 1:1.1），少量のGD3（glc:gal= 1:1.1）及びバンドXが見い出された。図3に大脳の中性糖脂質の薄層を示した。セレブロシド（glc:gal=1:2.2）はグルコセレブロシドが31%を占めていた。さらに，CDH（glc:gal=1:1.1），アシアロGM2（glc:gal:galNAc = 1:1.2:0.9）及びアシアロGM1（glc:gal:galNAc= 1:1.7:1.2）が検出された。肝臓の中性糖脂質は、グルコセレブロシド，CDH（glc:gal=1:1.1），CTH（glc:gal = 1:1.7）及びGlob.I（glc:gal:galNAc =1:1.6:1.0）と同定された。これらの糖脂質の組織中の含量を表1にまとめた。



1. GM1（対照）
2. 正常脳
3. 本症例
4. 成人型GM1-ガングリオシドーシス(?)

1 2 3 4

図1 酸性脂質画分（大脳）



1. GM3（対照）
2. 本症例
3. 大脳ガングリオシド（対照）

1 2 3

図2. 肝臓酸性脂質画分



1. 本症例
2. ガングリオシドの蟻酸水解物

CMH
CDH
アシアロGM2
アシアロGM1

1 2

図3. 大脳中性糖脂質画分

表1 大脳及び肝臓における糖脂質含量

	CMH	CDH	CTH	Glob.I	アシアロGM2	アシアロGM1	CSE	GM3	GM2	GM1	GD3	GD1a	GD1b	GT1b
大脳 (μmoles/g湿重量)	6.85	1.78	—	—	1.10	4.27	2.14	0.44	0.25	4.87	—	0.39	0.17	0.08
肝臓 (nmoles/g湿重量)	51.8	57.7	27.8	22.7	—	—	—	210.2	—	—	15.5	—	—	—

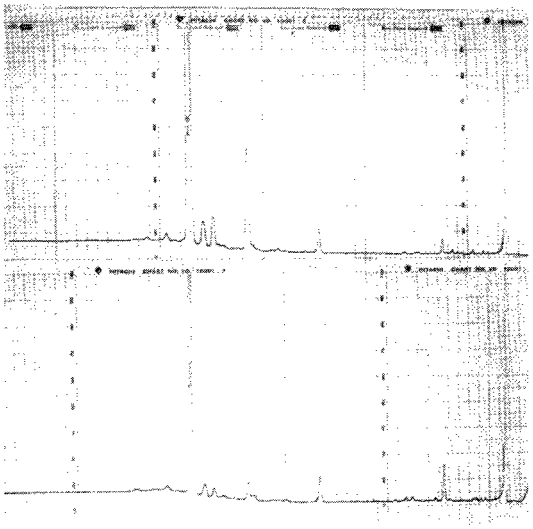


図4　ヘキサン層のガスクロパターン
上：コレステロール（標準物質）
下：バンドXのヘキサン層
2% OV-1
170°C — 2°C/min — 280°C

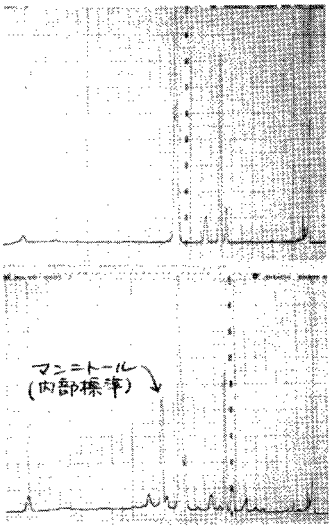


図5　メタノール層のガスクロパターン
上：グルクロン酸（標準物質）
下：バンドXのメタノール層
2% OV-1
140°C — 2°C/min — 220°C

肝臓の酸性脂質画分にはバンドXが見い出された。このバンドはC-M-W(65:25:4,v/v)で薄層を展開するとスフィンゴミエリンのやや上に位置する。このバンドはレゾルシノール試薬及びアンスロン試薬陽性であるので，ガングリオシドと考えられたが，この物質のメタノリシス後のヘキサン抽出液中には，図4に示すように，コレステロールが検出された。一方，ヘキサン抽出後のメタノール層を常法によりTMS化して分析すると，グルクロン酸のピークが得られた（図5）。この物質を調製用薄層で集め，ケイ酸カラムで純化した。得られた物質をメタノリシスし，その分解液を炭酸銀で中和後，TMS化し，直接ガスクロ分析を行なった（図6）。グルクロン酸対コレステロールのモル比が1:1.02であることから，この物

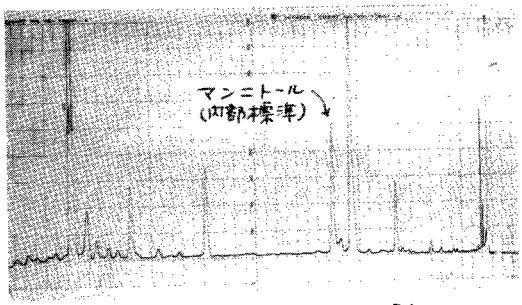


図6　バンドXのメタノリシスによる分解物
2% OV-1
140°C — 2°C/min — 280°C

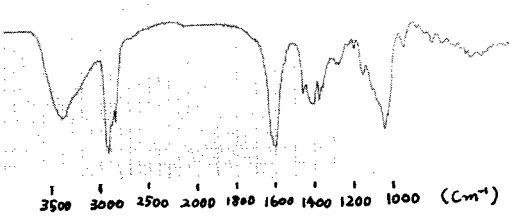


図7. Cholesterol Glucuronideの赤外吸収スペクトル

質はコレステロールのグルクロン酸抱合体(Cholesterol Glucuronide)と同定された。図7に、その赤外線吸収スペクトルを示した。2800~3000cm⁻¹のコレステロールのメチレンの吸収,1600cm⁻¹のカルボン酸塩の吸収,及び1000~1100cm⁻¹の水酸基の吸収を示し,本物質に特有のパターンが得られた。この物質が本疾患に特有のものか否かを検討するため,正常の肝臓,成人型GM1-ガングリオシドーシスと考えられる患者の肝臓と脾臓及び本症例の脾臓及び大脳もかねえ,比較検討を行なった。その結果を表2に示した。大脳及び脾臓にはCholesterol Glucuronideは検出されなかった。本症例の肝臓では,正常の約3倍の増加がみられた。成人型GM1-ガングリオシドーシス(2)の患者の肝臓では,正常値の4.5倍の増加を示した。この患者は白血球β-ガラクトシダーゼ活性が正常の15%と低く,45才で死亡している。その大脳のガングリオシド組成は図1に示してある。GM1の著明な蓄積は認められなかった。同患者の肝臓のガングリオシドのパターンもGM3が主成分で,正常と異なる点はない。現在,この疾患については検討中である。

表2 Cholesterol Glucuronide値(nmol/g湿重)

GM1-ガングリオシドーシス(本症例)			GM1-ガングリオシドーシス(成人型?)		正常
肝臓	大脳	脾臓	肝臓	脾臓	肝臓
89.8	—	—	147.7	—	32.5

[考察]

本疾患では,脳の糖脂質組成は著しい異常を示す一方,肝臓及び脾臓の糖脂質組成は著明な変化を示さなかった。GM1-ガングリオシドーシスのII-型は臓器の脂質組成に影響しないという従来の見解と一致している。しかしながら,Cholesterol Glucuronideが肝臓で見い出され,それが増加しているという事実は,II-型の場合に肝臓は影響を受けないとは言えないのではないだろうか。Cholesterol glucuronideは最初Winter等(6)によって正常人及び高コレステロール血症の患者の尿中に存在することが示され,次いでWade(7)によって血漿中で,酵素学的に確認されている。この物質の生理学的役割は未だ解明されていない。今回、肝臓でこの物質が見い出されたことは、その代謝系路として,肝臓で合成され,血流中を至て,尿中に排出されるものと思われる。Farrell等(1)によると、GM1-ガングリオシドーシスのI-型では尿中の酸性ムコ多糖のウロン酸含量が増加し,II-型では著明な増加はないが,I-型とII-型の中間型では増加がみられるとしている。本症例におけるCholesterol Glucuronideが肝臓で増加していることは,尿中の含量も増加していると考えられるが,本症例では尿の分析は行なわれなかった。今後、GM1-ガングリオシドーシスの患者で尿中のCholesterol Glucuronideの分析を行なうことが重要と思われる。

最後に、本報告で述べたCholesterol Glucuronideは常にガングリオシドと行動を共にし,また,薄層クロマト上でレゾルシノール試薬及びアンスロン試薬に陽性であるので,薄層クロマトを用いてガングリオシドを検索する場合は注意が必要である。

[文献]
1. 笠間透,服部浩,上村敬一,原彦,武富保(1981)脂質生化学研究,23,409-412
2. Farrell, D. F., and Ochs, U.(1981) Ann. Neurol. 9, 225-231
3. Yamashita,K., Ohkura, T., Okada, S., Yabuuchi, H. and Kobata, A.(1981)J. Biol. Chem., 256, 4789-4798
4. Suzuki, K.,(1965)J. Neurochem. 12, 629
5. Ledeen, R. W., Yu, R. K. and Eng, L. F. (1973)J. Neurochem.21, 829-839
6. Winter, J. S. D. and Bongiovanni, A. M.(1968) J. Clin. Endocrinol. Metab., 28, 927-930
7. Wade, A. P.(1970) Clin. Chim. Acta, 27, 109-116

30 レックリングハウゼン病における神経線維腫及び神経線維肉腫のガングリオシド

土田哲也・井上由紀子(東大・医・皮膚)・新村真人(慈恵医大・皮膚)
大塚英昭・橋本康弘・脊山洋右・山川民夫(東大・医・I生化)

〔要　約〕

レックリングハウゼン病患者11例，うち神経線維腫8例(皮膚神経線維腫5例，末梢神経の神経線維腫2例，末梢神経の巨大な神経線維腫1例)，神経線維肉腫3例，及び非レックリングハウゼン病患者の神経鞘腫2例(単発，多発)の腫瘍実質のガングリオシドについて検討した。コントロールとしてヒト坐骨神経，ヒト皮膚・皮下組織をとった。それぞれの腫瘍より得られたガングリオシド分画の薄層クロマトグラフィでは，シュワン細胞及び神経内線維芽細胞由来とされるレックリングハウゼン病の神経線維腫は，いずれのタイプの腫瘍も基本的にはほぼ同様のガングリオシド組成を示し，主成分は GM_3, GD_3, GD_{1a}, GD_{1b}, GT_{1b} であったが，末梢神経のガングリオシド組成とは異なっていた。シュワン細胞由来とされる神経鞘腫は，単発例が GM_3, GM_2, GM_1, GD_{1a}(特に GD_{1a})，多発例が GM_2, GM_1, GD_{1a}(特に GM_1)が主成分で，単発例・多発例の間にやや差がみられたが，末梢神経のガングリオシド組成と類似性を示した。神経線維腫の悪性化した神経線維肉腫では GM_3, GD_3 が主で，特に GD_3 が増加している点が注目され，病理組織学的に困難なことが多い神経線維腫の悪性化を生化学的に診断できる可能性を示唆した。また末梢神経の巨大な神経線維腫より単離した GM_3, GD_3, GT_{1b} についてノイラミニダーゼ処理，ガスクロマトグラフィによる分析をおこない構造を決定した。

Key words：　Ganglioside, Neurofibroma, Recklinghausen

〔はじめに〕

レックリングハウゼン病は皮膚及び末梢神経に多発する神経線維腫，Café au lait spots と呼ばれる特有な色素斑を特徴とするが，それのみならず骨症状・眼症状・中枢神経症状もきたす全身性の遺伝性疾患(常染色体優性)である。一般に生命的予後に関しては良性の経過をとる疾患と考えられているが，時に頭蓋内の神経線維腫の増大あるいは比較的稀ではあるが神経線維腫の悪性化により死の転帰をとるものもある。

レックリングハウゼン病の神経線維腫については，シュワン細胞と神経内線維芽細胞の増殖であることが電子顕微鏡所見より示唆されているが，その由来については未だ確定されていない。一方，ガングリオシドは，神経組織をはじめとして各種臓器においてその組成が判明しているが，神経組織に豊富に存在し，組織特異的組成を示すことがわかっている。そこで，レックリングハウゼン病の神経線維腫のガングリオシド組成を検討し，シュワン細胞由来とされる神経鞘腫(非レックリングハウゼン病患者)及び末梢神経のガングリオシド組成を参考として，腫瘍の由来について考察を加えた。またガングリオシドは細胞膜に局在し，抗原物質としてあるいはホルモン・毒素の受容体としての機能が解明されつつあるが，癌化に伴う糖鎖の変化も以前より注目されている点であった。そこで，神経線維腫が悪性化した神経線維肉腫のガングリオシド組成の変化についても検討してみた。

〔実験材料〕

レックリングハウゼン病患者11例，うち神経線維腫 neurofibroma 8例(皮膚神経線維腫 cutaneous neurofibroma 5例，末梢神経の神経線維腫 plexiform neurofibroma 2例，末梢神経の巨大な神経線維腫 giant plexiform neurofibroma 1例)，神経線維肉腫 neurofibrosarcoma 3例(3例中1例

では肝転移部を含む），非レックリングハウゼン病患者の神経鞘腫 neurilemmoma 2例（単発例，多発例1例ずつ）の腫瘍をいずれも切除手術にて得，電子顕微鏡的検索を含む病理学的検索をおこなうとともにこの実験に用いた。また，悪性黒色腫患者の広範囲切除により得られた健常皮膚・皮下組織と，悪性リンパ腫患者の剖検により得られた健常坐骨神経をコントロールとして用いた。いずれの材料も実験をおこなうまで −70°C で保存した。

〔実験方法〕

凍結した材料を解凍後，腫瘍の結合織被膜を除去し，均質な腫瘍塊を湿重量で2gずつ（一部は2g以下のものもある），皮膚・皮下組織は真皮部分と皮下組織を2gずつ，坐骨神経は結合織被膜を除去した神経線維束を2gとって細断した。脂質分析の常法に従い，まずアセトン抽出をおこない，アセトン不溶分画をさらにクロロホルム（C と略す）メタノール（M と略す）混液（2/1，1/1，1/2，1/4）にて抽出した。得られた CM 可溶分画を Momoi らの方法（3）に従い DEAE セファデックスカラムにかけ酸性分画を得，それを Sep-pak カラムにかけ脱塩してガングリオシド分画を得た。

次いで，シリカゲル薄層板 HPTLC（10×10cm，厚さ 0.25mm，メルク社製）に，それぞれの材料のガングリオシド分画を原材料の湿重量 40mg 相当から得られた量だけのせ，CM 水（55/45/10，0.02% $CaCl_2$-H_2O 含有）を用いて展開後，レゾルシノール試薬を噴霧し，95°C 30分間加熱発色させた。発色後，デンシトメトリーを High speed TLC scanner（CS-920, Shimadzu）を用いておこなった。またそれぞれシアル酸定量をレゾルシノール-HCl 法（Roseman の変法）でおこなった。

また，末梢神経の巨大な神経線維腫 10g を用いて，主成分のガングリオシドを単離し，構造決定をおこなった。結合織被膜を除去後，腫瘍実質を細断し，アセトン抽出，CM 抽出を同様におこなった。得られたアセトン不溶 CM 可溶分画を DEAE セファデックスカラムに酢酸アンモニウムメタノール溶液 0.05～0.45M の酸性勾配をつけて流し，GM，GD，GT 分画を得た。透析にて脱塩後，それぞれの分画を Momoi らの方法（3）に従いシリカゲルカラムにて主成分のガングリオシドを単離した。単離したそれぞれのガングリオシドの構造を決定するために，まず TLC で移動度を既知のガングリオシドと比較し，ついでノイラミニダーゼ処理後 TLC を施行した後，ガスクロマトグラフィによる分析をおこなった。Bahtti の方法（1）に従って，Shimadzu GCMA を用いて，脂肪酸・糖・スフィンゴシンを分析した。

〔実験結果〕

ガングリオシド組成の比較では，図1・表1に示すごとく，坐骨神経では GM_1，GD_{1a}，GD_{1b}，GT_{1b}（特に GM_1，GD_{1a}）が主であったのに対して，皮膚神経線維腫では GM_3，GD_3，GD_{1a}，GD_{1b}，GT_{1b} が主であり，末梢神経の神経線維腫も GD_{1b}，GT_{1b} の比率が皮膚神経線維腫に比べて小さかったものの，基本的にはほぼ同様のパターンを示した。

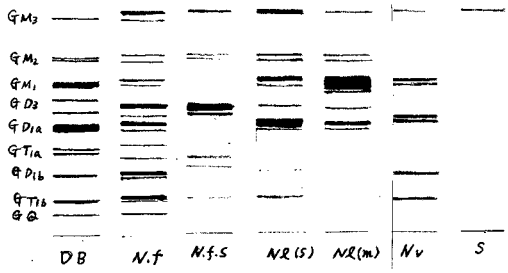


図1：TLC

DB : dog brain
N.f : neurofibroma
N.f.S : neurofibrosarcoma
NR(S) : Single neurilemmoma
NR(m) : multiple neurilemmoma
Nv : sciatic nerve
S : skin

	CN					PN		GPN	NfS	Nl	
	1	2	3	4	5	1	2			(s)	(m)
Sialic acid*	14.7	73.1	46.8	98.1	108.1	7.6	19.1	62.3	47.0	142.5	102.7
GQ		9.1	5.0	7.0	3.9	0.7	1.0	5.2		0.2	
GT1b	3.0	25.3	20.5	26.7	14.2	5.8	7.4	19.2	0.9	2.9	0.5
GD1b	1.2	13.4	10.1	19.4	14.0	4.3	4.8	18.5	4.2	1.6	2.6
	1.0	2.2	2.9	1.5	2.8	1.9	3.2	5.1	12.1	0.7	
GT1a	1.9	2.9	2.7	2.3	2.9	4.0	3.4	3.3		1.9	1.4
GD2		3.2									
GD1a (+GD1)	11.3	15.5	25.7	18.2	20.9	30.0	20.9	9.6		30.8	14.7
GD3	21.2	15.5	16.6	16.5	21.0	14.8	17.4	25.8	65.0 (19.0–66.0)	3.9	1.9
GM1	2.8	4.2 (1.4–2.8)	5.2	2.8	6.9 (1.1–5.8)	10.8	6.2	1.5 (0.8–0.7)		18.4	61.0
GM2	9.9	1.4 (0.7–0.7)	2.0 (0.8–1.2)	0.6	2.1	5.2	4.6		0.8	14.9 (5.1–9.8)	11.5 (5.2–6.3)
GM3	47.6	7.0 (2.3–4.7)	9.2 (2.2–7.0)	7.1 (1.4–5.7)	11.4 (2.7–8.7)	22.4	31.1	11.8 (1.8–9.9)	17.0 (4.5–12.4)	24.8	6.4

* mg/g wet weight
CN : cutaneous neurofibroma
PN : plexiform neurofibroma
GPN : giant plexiform neurofibroma
Nfs : neurofibrosarcoma
Nl : neurilemmoma
(s) single (m) multiple

[表 1] 各腫瘍のシアル酸含量(単位湿重量あたり)とガングリオシド組成(%)

末梢神経の巨大な神経線維腫もGD1aがやや少ない以外はほぼ同様のパターンとみなされた。一方，神経鞘腫では単発例ではGM3，GM2，GM1，GD1a（特にGD1a），多発例ではGM2，GM1，GD1a（特にGM1）が主であった。神経線維肉腫ではGM3，GD3が主で，特にGD3の増加が目立った。（図1，表1）

腫瘍の単位重量あたりシアル酸量では，表1に示すごとく，皮膚神経線維腫はバラツキはあるが1例の14.7 mg/g wet weightを除く他の4例で46.8～108.1と末梢神経の小さな神経線維腫の7.6，19.1に比べて高値を示したが，末梢神経の巨大な神経線維腫は62.3と高値であった。神経鞘腫は単発例142.5，多発例102.7とさらに高値を示し，神経線維肉腫は47.0であった。（表1）

末梢神経の巨大な神経線維腫106gより単離したガン

	NANA	Glc	Gal	GalNac	Sphingosine	Fatty acid (%)		human sciatic nerve*
GM3	1	1	1		18:1	16:0	5.7	6.5
						18:1	3.5	5.7
						18:0	15.9	10.8
						22:0	19.5	10.5
						24:1	22.9	18.8
						24:0	22.9	31.2
						others	9.6	11.7
GD3	2	1	1		18:1	16:0	4.5	
						18:1	7.0	
						18:0	15.2	
						22:0	25.3	
						24:1	22.7	
						24:0	16.4	
						others	8.9	
GT1b	3	1	2	1	18:1	16:0	12.5	
						18:1	8.4	
						18:0	15.9	
						22:0	24.7	
						24:1	20.5	
						24:0	9.9	
						others	8.1	

[表 2] giant plexiform neurofibroma より得られたガングリオシドのガスクロマトグラフィによる合計結果
* 文献2

グリオシド成分はまず下レしによりそれぞれ GM_3, GD_3, GT_{1b} と推定された。イライミンダで処理によりそれぞれ Ceramide dihexoside と free sialic acid, Ceramide dihexoside と free sialic acid, 及び GM_1 と free sialic acid に分解され，それぞれが GM_3, GD_3, GT_{1b} であることを裏付けた。ガスクロマトグラフィーによる分析では，まず脂肪酸組成は表に示すごく，いずれもほぼ同様のパターンを示し，18:0, 22:0, 24:0, 24:1 が主たる脂肪酸であった。糖組成はそれぞれ GM_3, GD_3, GT_{1b} に一致する組成を示し，スフィンゴシンはいずれも 18:1 であった。(表2)

〔考按〕

皮膚神経線維腫と末梢神経の神経線維腫は病理組織学的にはほぼ同様の組織構築をなし，後者が前者に比べて浮腫状で細胞成分が疎である点が異なるだけとされる。しかるに，我々の実験結果として皮膚神経線維腫と末梢神経の神経線維腫ではシアル酸含量に差が認められたがガングリオシド組成は非常に似ていたのは，両者が基本的には同じ細胞成分よりなることを裏付けていると思われる。皮膚神経線維腫でシアル酸含量が少なかった1例は他の皮膚神経線維腫に比べて，組織が浮腫状で組織成分が疎で，末梢神経の神経線維腫の組織に似ており，また末梢神経の小さい神経線維腫に比べてシアル酸量が多かった末梢神経の巨大な神経線維腫では細胞成分が密であり，これらの間にみられたシアル酸の腫瘍単位湿重量あたり含量の違いは，組織の細胞成分の密度の違いによることが推定された。

また神経線維腫のガングリオシド組成は生骨神経のガングリオシド組成及び文献的にみたミエリンのガングリオシド組成(2)とと異なっており，神経線維腫を構成する細胞はシュワン細胞と神経内線維芽細胞であろうとする電顕的見解を裏付けることにはならなかった。一方，シュワン細胞由来とされる神経鞘腫のガングリオシド組成は単発例と多発例でやや差があるものの，末梢神経及び文献的ミエリンのガングリオシド組成と類似しており，この腫瘍がシュワン細胞由来であることの傍証になると考えられた。

神経線維腫が悪性化した神経線維肉腫も特徴的なガングリオシドパターンを示した。GD_3 が著増している一方，長鎖のガングリオシドが消失しており，いわゆる糖鎖不全現象がおこっていると考えられた。神経線維腫が悪性化した場合その悪性化を決定するには病理組織学的にはしばしば困難を伴うが，これらの結果は腫瘍のガングリオシド組成を生化学的に検討することによりその腫瘍の悪性化の診断がつく可能性があることを示唆していると考えられた。

末梢神経の巨大な神経線維腫より単離し，構造決定をおこなった GM_3, GD_3, GT_{1b} については，その脂肪酸組成が文献的に生骨神経のガングリオシドの脂肪酸組成に似ていることはわかったが特殊な脂肪酸・スフィンゴシンの存在は認められなかった。現在神経線維肉腫のガングリオシドを単離中であり，その構造と合わせて検討してみたいと考えている。

〔文献〕

1) Bahtti, T., Chambers, R.E., and Clamp, J.R. (1970) Biochem. Biophys. Acta 222, 339-347

2) Fong, J.W., Ledeen R.W., Kundu S.K. and Brostoff S.W. (1976) J. Neurochem. 26, 157-162

3) Momoi, T., Ando, T. and Nagai, Y. (1976) Biochim. Biophys. Acta 441, 488-497

31 Rat脳での脂肪酸代謝の研究 I

溝渕真人(東大・脳研・神経内科)・森崎信尋・松岡信夫・斉藤　康(千葉大・医・II内)
杉田秀夫(東大・脳研・神経内科)・熊谷　朗(千葉大・医・II内)

〔要　約〕

[1-^{14}C] Palmitic Acid の Rat 大脳皮質への取り込みと代謝を in vitro で検討した。標準反応条件下では，最初の30分間に Triacylglycerol への著明な Radioactivity の増加を認めた。本分画では60分以後に Radioactivity の減少を認めた。Phosphatidyl choline, Phosphatidyl ethanolamine, Phosphatidyl inositol + serine 分画には，反応時間とともに増加する Radioactivity を認めた。N_2 ガス下での反応では，Triacylglycerol への Radioactivity の取り込みが増加し，また Phosphatidyl choline, Phosphatidyl ethanolamine への取り込みが，反応時間を通じて著明に減少した。Triacylglycerol と Phospholipids (特に Phosphatidyl choline) の間に，Free fatty acids に関係した acylation-deacylation cycle が存在する可能性を示唆した。

Key words : Palmitic Acid, Neutral Lipids, Phospholipids.

私達は先に Rat 脳に Triglyceride Lipase 活性の存在することを報告し[1]，更にその調節機序を検討した[2]。今回，中枢神経における Triglyceride 代謝の生理的意義を検討するため [1-^{14}C] Palmitic Acid の Rat 大脳皮質への取り込みと代謝を in vitro で検討した。

〈実験方法〉

雄 Rat (Wistar-King系，250g) の大脳皮質より，血管・髄膜・脈絡叢を除去し，1 mm^3 大に細切し，100 mg の組織を得た。反応液として Krebs-Ringer bicarbonate buffer に 3% albumin，0.75 mM Palmitic Acid，3~7 μCi [1-^{14}C] Palmitic Acid / 試験管を溶解し，各試験管に 1 ml 分注した。同液には sonication を加え，反応開始前に混合ガス (95% O_2 + 5% CO_2) で10秒間発泡した (標準反応条件)。O_2, N_2 ガスの効果を検討する実験では，各ガスで3分間発泡後，NCS を塗布した口紙を壁面に密着させた counting vial に連結し密封した。前述の組織を加え 37°C で反応させた。3M H_2SO_4 を 0.5 ml 加え反応を停止し，5 ml 生食で5回洗浄後，Chl: MeOH (2:1) 混合液を加え，Polytron で組織破壊し，4°C に24時間静置し，脂質抽出を行った。(Folch 法[3]) 抽出液上層の Radioactivity を測定し，上層と中間混濁層を吸引除去後，下層の chloroform を N_2 gas で蒸発させた。400 μl の Chloroform を加え，50 μl を Total Radioactivity 測定に用い，100 μl, 10 μl を各々中性脂質[4]，リン脂質[5]分離用の TLC で展開し，脂質の分離を行った。ヨード蒸気で各脂質を同定し，けずり取って各脂質の Radioactivity を測定した。結果は dpm / 100 mg 脳湿重量で表現した。各実験により最初に加えた Radioactivity 量が異なるため 10^7 dpm / 試験管の Radioactivity を最初加えたと仮定して計算した。各脂質の定量を行った[6],[7],[8]

〈結果〉

標準反応条件下では脂質抽出液下方に，反応時間とともに120分まで増加するRadioactivityを認めた。120分後には最初に加えたRadioactivityの約5%を組織中に認め，その大部分は脂質抽出液下方に存在した。またそのうちの90%以上はF.F.A.分画に存在した。(Table Ⅰ, Ⅱ)

中性脂質では，Triglycerideに多くのRadioactivityを認め，本分画には最初の30分間にRadioactivityが増加し，60分以後に減少した。Diglyceride分画には中等量のRadioactivityを認め，他の分画には少量認めるのみであった。Specific ActivityはCholesterolを除く全分画で高く認めた。(Table Ⅱ)

リン脂質ではPhosphatidyl Choline, Phosphatidyl Ethanolamine, Phosphatidyl inositol + serineの各分画に多くのRadioactivityを認め，これらの分画は反応時間とともにRadioactivityを増した。前記三者の他にLysophosphatidyl compoundsにも高いSpecific activityを認めた。(Table Ⅲ)

N_2ガス，O_2ガス下での反応では，脂質抽出液下方にはFig. 1. に示す様なRadioactivityを認めた。O_2ガス下では30分まで，N_2ガス下では30分以後に標準反応条件下で認めるよりも多くのRadioactivityが脂質抽出液下方に回収された。脂質抽出液下方のRadioactivityはその大部分をF.F.A.分画に認めた。

中性脂質では，いずれの条件下でもTriglycerideに最も多くのRadioactivityを認め，本分画ではN_2ガス下で最も多くのRadioactivityを認めた。標準条件下で認められる60分以後のRadioactivityの減少は，N_2ガス下では認められなかった。(Fig. 2)。またN_2ガス下でCholesterol Ester分画のRadioactivityに軽度の増加を認めた(Fig. 3)。

リン脂質では，Phosphatidyl choline, Phosphatidyl Ethanolamine分画で，O_2ガス下では増加し，N_2ガス下では減少するRadioactivityを認めた。N_2ガス下でのRadioactivityの減少は著明で反応時間を通じて認めた。(Fig. 4, 5)。N_2ガス下でPhosphatidyl inositol + serine分画のRadioactivityに，30分以後に減少を認めた(Fig. 6)。Lysophosphatidyl compounds (Fig. 7), Sphingomyelin (Fig. 8) 分画でもN_2ガス下で30分以後にRadioactivityの軽度の減少を認めた。

O_2ガス反応下では，Fig. 9 に示すように反応時間とともに増加するRadioactivityをcounting vial中に認めたが，N_2ガス反応下では有意のRadioactivityは認めなかった。

<考案>

本実験はin vitroで行なわれたが，本実験の結果は，現在までin vivoで行なわれ報告されている結果に相似している。(9)(10)(11)

Table Ⅱ, Table Ⅲに示すようにin vitroではRadioactivityはまずTriglycerideに取り込まれ，本分画中のRadioactivityの減少とともにPhosphatidyl choline, Phosphatidyl ethanolamine, Phosphatidyl inositol + serine等のPhospholipids中のRadioactivityが増加するように考えられる。この過程でTriglycerideとPhospholipidsの間にF.F.A.に関してacylation-deacylation cycleの存在することが推測される。

N_2ガス下での反応はTriglyceride, Cholesterol ester分画のRadioactivityを増加させ，Phosphatidyl choline, Phosphatidyl ethanolamine, Phosphatidyl inositol + serine等のPhospholipids中のRadioactivityを減少させる。これはAnoxic Stateの中枢神経障害を説明する現象である可能性がある。

脳内での Triglyceride の作用は，Phospholipids に対する Free fatty acids の "reservoir" であり可能性がある。(12) 本題の内容の一部は第12回世界神経学会(京都)で発表予定。

<文献>

(1) Mizobuchi M., et al. (1981) J. Neurochem. 36, 301-303.
(2) Mizobuchi M., et al. (1981) Tohoku J. exp. Med. 133, 417-421.
(3) Folch J., et al. (1957) J. Biol. Chem. 226, 497-509.
(4) Skipski V.P., et al. (1965) Biochim. Biophys. Acta. 106, 386-396.
(5) Skipski V.P., et al. (1964). Biochem. J. 90, 374-378.
(6) Bartlett G.R. (1959) J. Biol. Chem. 234, 466-468.
(7) Tiffany T.O., et al (1974) Clin. Chem. 20, 476-491.
(8) Zak B., (1957) Am. J. clin. Path. 27, 583-588.
(9) Sun G.Y., et al (1971) J. Neurochem. 18, 1963-1969.
(10) Yau T.M., et al (1973) Lipids 8, 410-414
(11) Yau T.M., et al (1974) J. Neurochem., 22, 99-104
(12) Dwyer B., et al (1979) J. Neurochem, 32, 833-838

<図表の説明>

• Table II, III: 脂質名に続くカッコ内数値は脂質含量(μg/100mg脳湿重量)。2つの数値のうち上段は各脂の Radioactivity (dpm/100mg湿重量)で，下段カッコ内数値は Specific Activity (dpm/μg/各脂質)。

• Fig. 1~9: ●—● は Air，△—△ は O_2ガス，▲—▲ は N_2ガス下での反応。単位 dpm/100mg 湿重量。

Table I Radioactivities in Upper and Lower Phases of Lipid Extract

Incubation Time (min)	dpm/100mg(wet weight) of rat cerebral cortex	
	Upper Phase	Lower Phase
15	45 ± 21	415,416 ± 51,895
30	89 ± 10	442,154 ± 72,739
60	88 ± 30	464,856 ± 38,494
120	130 ± 36	520,741 ± 41,251
180	116 ± 39	516,998 ± 56,552

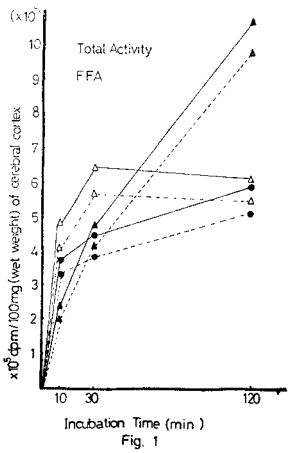


Fig. 1

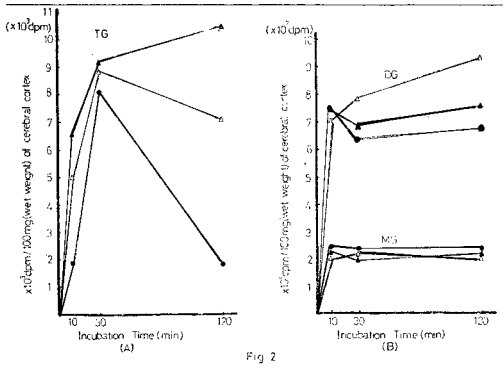


Fig 2

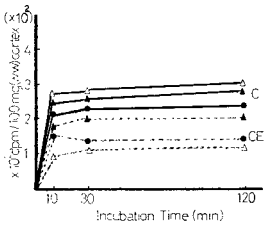


Fig 3

Table II Distribution of Radioactivity in Neutral Lipids

Incubation Time (min)	15	30	60	120	180
FFA	$35\times10^4\pm2\times10^4$	$36\times10^4\pm3\times10^4$	$40\times10^4\pm8\times10^4$	$50\times10^4\pm3\times10^4$	$47\times10^4\pm3\times10^4$
TG (23.7±2.6)	1,772±590 (7.8)	7,652±463 (33.7)	8,031±951 (33.8)	1,692± 95 (7.1)	2,597±102 (10.9.6)
DG (24.7±4.2)	619± 59 (2.5.1)	601± 46 (2.4.3)	709±307 (2.8.7)	745±323 (3.0.1)	1,075± 30 (4.3.5)
MG (13.1±3.2)	331± 8 (2.5.3)	277±141 (2.1.2)	297±128 (2.2.6)	329±132 (2.5.1)	371±156 (2.8.3)
Ch (948 ± 22)	364±147 (0.4)	352±140 (0.4)	352±136 (0.4)	356±137 (0.4)	353±133 (0.4)
CE (26.2±4.6)	347±137 (1.3.3)	328±144 (1.2.5)	219±205 (8.4)	260±200 (9.9)	284±212 (1.0.7)

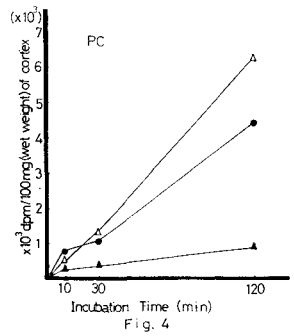


Fig. 4

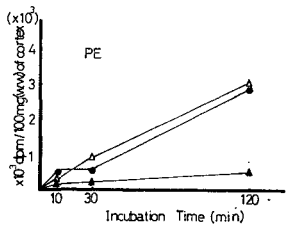


Fig. 5

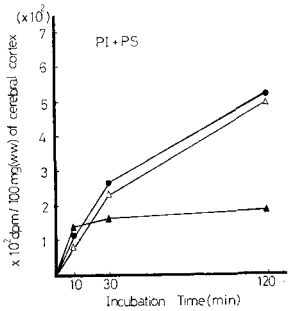


Fig. 6

Table III Distribution of Radioactivity in Phospholipids

Incubation Time (min)		15	30	60	120	180
LPC	(66.0± 13.0)	176±149 (2.7)	60±35 (0.9)	170±37 (2.6)	236±55 (3.6)	69±38 (1.0)
Sph	(222.7± 4.1)	146±114 (0.7)	51±38 (0.2)	64±63 (0.3)	80±51 (0.4)	110± 2 (0.5)
PC	(485.0± 31.0)	902±217 (1.9)	1,248±534 (2.6)	2,757±1,231 (5.7)	5,165±2,468 (10.6)	6,462±3,619 (13.3)
PI+PS	(270.0± 32.0)	180±164 (0.7)	259±142 (1.0)	415±281 (1.5)	539±187 (2.0)	530±198 (2.0)
PE	(1,050.0±150.0)	413±197 (0.4)	714±400 (0.7)	1,438±464 (1.4)	2,968±918 (2.8)	2,643±1,363 (2.5)

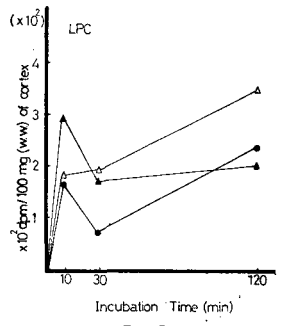


Fig. 7

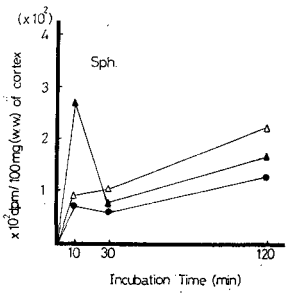


Fig. 8

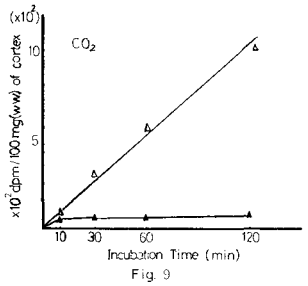


Fig. 9

32 ジャイアント・パンダとヒグマ脳の脂質組成
— キャピラリーカラム-GLCによる直鎖脂肪酸とα-ハイドロキシ脂肪酸の同時分析の応用 —

阿部久美子 ・ 玉井洋一
(北里大・医・生化)

〔要　約〕

ジャイアント・パンダ(GP)脳(2頭)，およびヒグマ脳(1頭)を皮質，白質，小脳に分けそれらの脂質組成を分析し，その結果について両動物間で比較考察した。またスフィンゴ糖脂質の脂肪酸組成をGLCで分析する際にFused Quartz (FQ)キャピラリーカラムを導入した。①GP脳脂質のうちコレステロール，cerebroside(CMH)，sulfatide(CSE)の含有量は哺乳類に一般的な値であった。②脂質/タンパク質比はGPに比しヒグマ脳がやや高かった。③両動物脳にコレステロールエステルが検出された。④FQキャピラリーカラム-GLCを用いて直鎖脂肪酸とハイドロオキシ脂肪酸メチルエステルの同時分析を行うことができた。これによりパックドカラムでは分離できなかったピークが分析可能となり，直鎖酸，ハイドロオキシ酸各メチルエステルの分離操作の省略と分析時間の短縮が可能となった。⑤CMH，CSEの主要脂肪酸は，24:0，24:1，24h:0，24h:1で，両動物間で大きな差は見られなかった。⑥CMH脂肪酸中，ハイドロオキシ酸は皮質，白質ともに約60%，一方CSEでは皮質で30~40%，白質で20~30%と組織による違いが見られた。ハイドロオキシ酸の割合につきGPの文献値に訂正を求めた。⑦ガングリオシドの脂肪酸は両動物ともに18:0が70%以上を占めていた。長鎖塩基はd18:1が60~70%，d20:1が約30%であった。⑧ヒグマ脳のガングリオシド組成についても分析した。

Key words： Brain lipids, Giant panda, Capillary column-GLC.

脊椎動物神経組織の脂質組成については，すでに多くのデータが集積されているが，giant panda (Ailuropoda melanoleuca)については，神経組織の生化学的知見は皆無に等しく，脳脂質の一部についての一例報告があるに過ぎない。[2] 我々は上野動物園で死亡した2頭のgiant panda脳の脂質分析を行う機会があった。また，ヒグマ(Ursus arctos yesoensis)脳についても同時に分析を行ったので，これらの結果を併せて報告する。また，スフィンゴ糖脂質の脂肪酸分析にFused Quartz(FQ)キャピラリーカラム-GLCの応用を試み，直鎖酸(NOH-FA)とα-ハイドロオキシ酸(OH-FA)それぞれのメチルエステルを同時に分析できる条件を検討した。

[実験材料と方法]

<u>実験材料</u>　Giant panda, Lan-Lan (GP_1), Kang-Kang (GP_2)の脳は死後数日間ホルマリン固定したものを平田幸男博士(都神経研)より供与された。ヒグマ脳は分析まで凍結保存されていた。

<u>総脂質の抽出とスフィンゴ脂質の分離精製</u>　$CHCl_3$-CH_3OH (C-M, 1-2, 1-1, 2-1)混液で抽出した総脂質はDEAE-Sepharose, Florisil, およびIatrobeadsカラムクロマトグラフィーの併用により，cerebroside(CMH), ester-CMH, sulfatide(CSE), 総ganglioside画分，およびsphingomyelinを単離精製した。必要に応じて弱アルカリ分解，prepacked Sephadex G-25M (PD-10)による脱塩操作，Resin(Bio Rad, AG 50W-X8, ammonium型)なども併用した。

<u>定量，定性分析</u>　タンパク，総リン脂質，糖脂質の定量は既報[4]の通りである。コレステロールは酵素法[4]とデンシトメトリー(390nm，ジグザグスキャン)，スフィンゴ脂質の長鎖塩基は，その長鎖アルデヒドをGLC分析した。スフィンゴ脂質から調製した脂肪酸メチルエステル(FA-me)は，従来のパックドカラムによるGLC(15% EGS および4% OV-101)とキャピラリーカラムによるGLCの比較分析を行った。キャピラリーカラムはOV-101 coated-FQカラム(島津，0.2mm×25m)を，分析にはsolventless

装置は島津GC-5A型のスプロストグラフを使用し，290℃で定温分析を行った。ピークはクロマトパックC-RIA（島津）で，パターンの記録と面積百分率の計算を行った。NOH-FAとOH-FA-meの分離は，調製用TLC（シリカゲルHプレート，石油エーテル-エーテル 80-30）により行った。glycosphingolipidの構成糖はGLCとアミノ酸分析計により同定した。

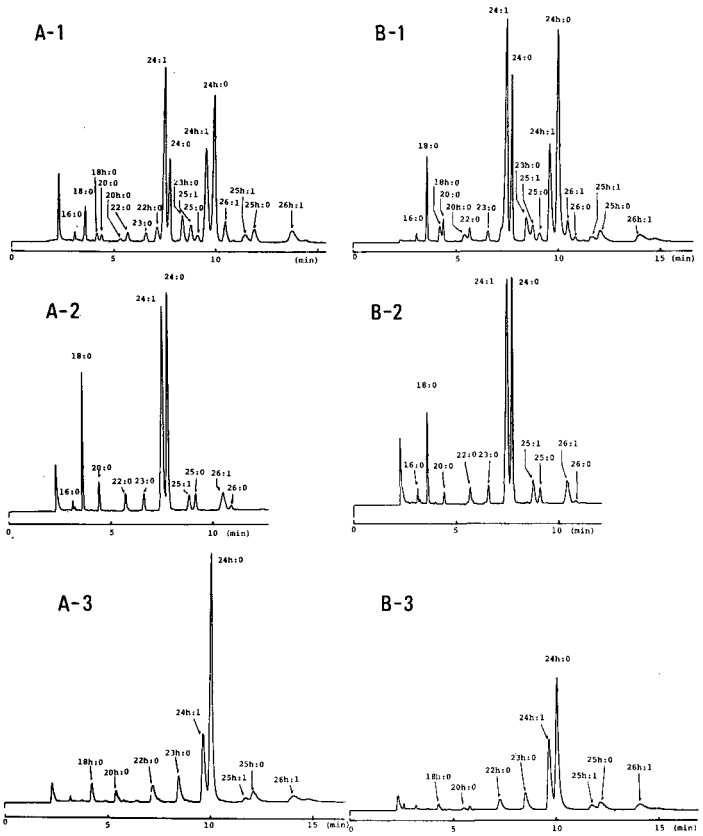
Table 1. Composition of the major lipids from giant panda and bear brain

	Giant panda 1				Giant panda 2			Bear		
	Cortex	White matter	Internal capsule	Corpus callosum	Cortex	White matter	Cerebellum	Cortex	White matter	Cerebellum
Total protein	6.9	6.5	4.8	4.1	5.0	7.0	6.1	11.5	11.5	12.9
Total lipids	5.5	12.3	16.7	14.9	5.4	13.1	6.6	7.7	16.5	9.2
Lipids/protein[a]	0.80	1.89	3.48	3.63	1.08	1.89	1.10	0.68	1.44	0.72
Total cholesterol	1.3 (22.9)	3.4 (27.5)	4.5 (27.1)	4.1 (27.5)	1.2 (22.0)	3.5 (26.6)	1.4 (21.1)	1.3 (16.4)	2.9 (17.4)	1.6 (17.8)
Cholesteryl ester[b]	4.6	0.7	-	0.9	5.0	-	-	4.8	2.0	5.6
Total phospholipids	3.1 (56.4)	5.0 (40.7)	n.d.[c] n.d.	5.9 (39.6)	3.2 (59.4)	6.4 (48.7)	4.0 (59.3)	3.9 (50.6)	8.4 (50.9)	4.9 (53.3)
Cerebroside(CMH)	0.42	2.04	n.d.	2.58	0.44	2.39	0.66	0.98	2.38	0.82
Sulfatide(CSE)	0.14	0.48	n.d.	0.61	0.11	0.47	0.18	0.36	0.88	0.31
Lipid-NANA[d]								51.4	33.2	35.8

Values are expressed as mg/100 mg wet tissue, unless otherwise indicated. Values in parentheses show weight percentages of individual components in total lipids.

a: Weight ratio, b: % of total cholesterol, c: Not determined, d: μg/100 mg wet tissue

Fig. 1. Gas chromatogram of methyl esters of fatty acids from brain white matter cerebroside on OV-101-coated FQ capillary column.
A: Bear B: Giant panda 2
1: Total-FA-me, 2: NOH-FA-me, 3: OH-FA-me



【実験結果と考察】

主要化学組成　表1は，GP脳およびヒグマ脳の主要化学組成を示す。GPの2例はそれぞれ別個に実験を行ったが，互に極めて近似した測定値を示しているので信頼性は高いと考えられる。ホルマリン固定に比較的安定な脂質，例えばコレステロール，CMH，CSEは哺乳動物脳に一般的な含有量である。また，少量のコレステロールエステルを脂質に認めた。ヒグマ脳はGP脳に比しlipids/proteinが低いがこれがGPとヒグマとの本質的な差か，または新鮮脳と固定脳との違いによるものか今後検討の必要がある。CMHとCSEはGP脳に比し，ヒグマ脳ではやや高かった。小脳の脂質組成は，一般的に灰質と白質の中間の値を示していた。

FQキャピラリーカラムGLCによる脂肪酸分析　図1はキャピラリーカラムを用いたCMH FA-meのGLCパターンである。全脂肪酸（図1-1），NOH-FA（図1-2），およびOH-FA（図1-3）各メチルエステルのクロマトグラムを比較すると，① NOH-FAとOH-FAを予め分離しなくても主要脂肪酸が明確に分離されている。② 個々の脂肪酸について全脂肪酸の場合と分離後とを比較すると，一部に割合の変動が見ら

Table 2. Comparative studies on fatty acid composition determined by a capillary column-GLC and a packed column-GLC

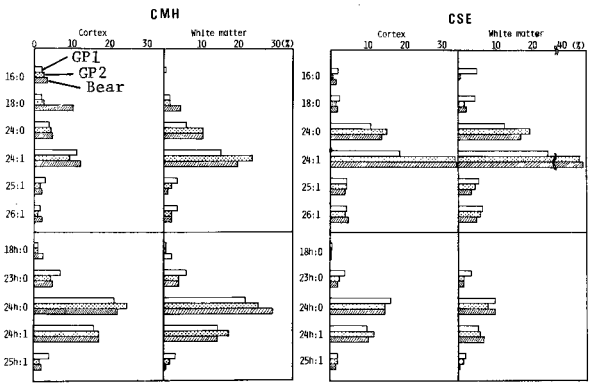
	Giant panda 2		Bear		
	Capillary	Packed	Capillary	Packed	
16:0	1.0	2.0	0.6	1.7	%
18:0	10.2	9.8	20.2	16.2	
18:1	0.2	0.3	-	0.3	
20:0	1.0	3.5	3.7	5.4	
22:0	2.4	3.5	2.5	4.2	
23:0	2.2	5.7	1.8	4.0	
24:0	27.6	28.7	25.6	22.9	
24:1	44.3	31.0	37.0	26.9	
25:0	2.0	3.8	1.8	7.6	
25:1	3.6	6.0	2.2	5.0	
26:0	0.4	0.7	0.6	0.4	
26:1	5.1	4.3	4.0	5.3	
18h:0	1.3	2.7	4.7	5.1	%
20h:0	0.4	1.3	2.1	4.6	
21h:0	0.4	0.2	-	0.3	
22h:0	4.8	6.7	6.0	7.2	
23h:0	7.2	8.7	7.4	8.2	
24h:0	52.7	39.0	54.6	42.6	
24h:1	22.1	20.1	14.9	15.7	
25h:0	4.7	7.9	4.6	6.8	
25h:1	1.8	3.3	1.2	2.1	
26h:0	0.8	1.9	1.4	1.9	
26h:1	4.0	6.9	3.1	4.6	

れる(例えば24:1と24:0)が，再現性は保たれている。③OH-FAはNOH-FAに比しややテーリングの傾向がある。④技術的にはsplit比を大きく，試料量を少なくし，機器の感度を上げる必要がある。従来脳のCMHあるいはCSEのFA-meを無極性パックドカラム(SE30やOV-1)で分析するとCn:0NOHとCn-1:1OH，あるいはCn:1NOHとCn-2:0OHのピークの重複が避けられず，神経組織CMHに有意に存在する24:1と22h:0，25:0と24h:1を定量するためには予め調製用TLCでNOH-FA-meとOH-FA-meを分離する必要があった。極性液相を用いたNOH-FAの異性体の分離条件の検討の報告は多いが(例えば文献(1))，NOH-FAとOH-FAの混合試料をキャピラリーカラムで同時分析した報告は少ない。ここで用いた分析条件は，上に指摘した問題点も含め，必ずしも充分ではないが，現在split比，キャリアーガス量，試料量，分析温度などの条件を検討し，分解能の向上を計っている。

次に表2にGP2脳とヒグマ脳白質のCMH全脂肪酸をキャピラリーカラムとパックドカラムで分析した際の脂肪酸分布の比較を示す。両者とも18:0，24:0，24:1，24h:0，24h:1を主要脂肪酸とする点では変わらないが，主要成分ではキャピラリーカラムの方が，微量成分ではパックドカラムの方がそれぞれ高い値を示した。この差の最も大きな要因は，ピーク面積の算出法にあると考えられる。即ち，パックドカラムの三角形面積計算法では，保持時間の長い微量成分が，実際の割合よりも見かけ上大きく算出される可能性がある。一方，キャピラリー法では全分析時間が15分以内で，各ピークとも極めてシャープな波形を示す上，面積百分率をクロマトパックC-R1Aで算出している。同一計算法でGPとヒグマを比較した場合，ヒグマではGPに比し18:0が多く，24h:1が少ない傾向が見られた。

CMHとCSEの脂肪酸組成　図2にCMHとCSEの主要脂肪酸組成を動物別，部位別に示した。脂肪酸組成は各動物間で非常に類似しており，CMHとCSEともNOH-FAでは24:1，24:0，OH-FAでは24h:0，24h:1が多い。我々の分析値をRamsey[2]の報告と比較すると，後者ではCMH-NOHのうち18:0と16:0の割合が有意に高い。更に同報告[2]ではホッキョクグマ，アライグマにおいても16:0，18:0が主要脂肪酸であることを特徴としてあげている。またツキノワグマ脳の分析結果[3]によればCMH，CSEのOH-FA中，24h:1が50%も含まれている点が我々の分析値とは異っていた。

Fig. 2. Percentage composition of major fatty acids in cerebroside and sulfatide



次にCMH，CSEについて総脂肪酸に占めるオキシ酸の割合を比較する。(表3) NOH-FA/OH-FA比は動物種により

Table 3. Hydroxy fatty acid content expressed as a percentage of total fatty acid in cerebroside and sulfatide

	Giant panda 1			Giant panda 2			Bear		
	Cortex	White matter	Corpus callosum	Cortex	White matter	Cerebellum	Cortex	White matter	Cerebellum
Cerebroside	69.0	64.8	56.9	58.7	56.2	50.8	57.9	58.3	48.3
Sulfatide	41.5	29.0	29.3	37.0	19.8	29.5	34.8	22.0	20.7

多様性があり[5]，神経系の進化との関連性も考えられる。本実験結果によれば，CMHではOH-FAがいずれの部位でも50％以上を占め，一方CSEはNOH-FAの方が多かった。特にCSEは皮質ではNOH-FA/OH-FA比は1.5であるが，白質小脳ではこの比は4.0であった。ところでRamsey[2]はGP脳白質でCMH-OH-FAがわずか13％であることを特徴の一つとして報告しているが，我々の分析結果からは同意できない。

ガングリオシド組成　ガングリオシドの脂肪酸組成と長鎖塩基組成を表4に示す。主要脂肪酸は18:0と20:0で，哺乳動物脳ガングリオシドに共通していたが，GP上脳では，皮質において20:0が20％も含まれていた。また，長鎖塩基としては，GP脳，ヒグマ脳ともにd18:1を約65％，d20:1を約30％含み，しかも皮質，白質ともほぼ同じ組成比であった。ヒグマ小脳ではd18:1が多く，d20:1がやや少ない傾向が見られた。以上の値をツキノワグマの分析値[3]と比較すると，後者でd18:0が10％も含まれること，d18:1が多く(70～80％)d20:1が少ない(12～15％)などの点でかなりの差が認められた。同報告[3]ではCMHにおいてもd18:0を15～20％も検出しており，我々の分析結果(d18:0，0.5％以下，表着脳)と異っていた。GP上脳のガングリオシドの構成糖としてGal，Glc，GalNAc，NeuAcが同定され，GlcNAc，NeuGcは検出されなかった。ヒグマ脳ガングリオシドの分布を表5に示す。ガングリオシド分布は動物種や年令によりかなりの変動があるので一概には言えないが，皮質については哺乳類に一般的であること，白質についてはGM1が少なく皮質と極めて類似していること，小脳はGD1a，GT1bの割合が高いことなどが特徴であった。

Table 4. Fatty acid and long chain base composition in ganglioside

		Giant panda 1	Giant panda 2			Bear		
		Cortex	Cortex	White matter	Cerebellum	Cortex	White matter	Cerebellum
Fatty acid	16:0	1.3	2.1	0.8	2.2	0.7	9.5	1.2
	18:0	77.1	92.3	96.5	94.8	95.8	88.2	92.3
	18:1	1.1	trace	trace	trace	trace	trace	trace
	20:0	20.4	5.6	2.8	3.0	3.5	2.3	5.6
Long chain base	d18:0	2.4				3.1	2.9	1.8
	d18:1	64.4				64.5	64.7	70.3
	d20:1	33.1				32.4	32.5	27.8

Table 5. Ganglioside distribution in bear brain

	Cortex	White matter	Cerebellum
GM_3	2.3	4.1	1.7
GM_2	4.4	3.9	3.5
GM_1	26.9	26.6	14.9
GD_3	2.9	3.4	4.9
GD_{1a}	30.9	27.9	18.7
GD_{1b}	14.9	15.9	26.9
GT_{1b}	14.2	14.0	23.9
GQ_1	3.6	4.2	5.8

以上，ここに示した実験結果は必ずしもgiant pandaが種として他の動物と際立って異なる特徴を示すものではないが，あまりにも情報の少ない本動物の生体を理解する上での一資料として意味があると考える。なお，Ramseyによる分析結果[2]に対しても訂正を求めるデータを示した。

〔謝辞〕

Giant panda脳を提供され，研究の機会を与えられた平田幸男博士(都神経研)ならびに上野動物園に感謝致します。ヒグマ脳は登別くま牧場の加納業穂氏学術主任に御提供いただきました。ここに感謝致します。

〔文献〕

1. 板橋ら，(1980)油化学 29, 855-865.
2. Ramsey, R. B. (1976) Trans. Zool. Soc. Lond. 33, 153-158.
3. Sato. S., et. al., (1979) Japan. J. Exp. Med. 49, 139-146.
4. 玉井ら，(1980)北里医学 10, 335-342.
5. Yamakawa. T., et. al., (1966) Japan. J. Exp. Med. 36, 101-102.

[註] ここに示したGP上脳のデータの一部は北里医学 10，335～342(1980)に発表したものを引用した。

33 ラット脳ミクロソームの電子伝達系と脂肪酸代謝

竹下正純・三木真由美
田村　実・指吸俊次
（大分医大・生化）

〔要　約〕

脳神経系の発達にともなうミクロソームの電子伝達系と脂肪酸代謝の関係を明らかにするために、ラットの胎児から生後の発育期に至る脳ミクロソームのNADH-cytochrome b_5 reductase及びNADPH-cytochrome c reductase活性を測定した。NADH-cytochrome b_5 reductaseはNADH-ferricyanide reductase活性とcytochrome b_5を電子受容体とする活性とについて測定したが、蛋白当りの比活性は両活性共胎児期にはやや高く、生後4～6日頃最低となり、20日から25日頃にかけてピークに達し、以後幾分低下するという特有のパターンを示した。NADPH-cytochrome c reductaseについても、ほぼ同様の活性変動を得た。脳当りの全酵素活性は3活性共に胎児期から上昇を続け、出産直後の活性減少は認められず、20～30日頃にピークがよりはっきりと現れた。脳の部位による酵素の比活性は3活性共大脳半球と延髄が高く、以下中脳、小脳の順に低くなった。更にpalmitoyl-CoAに対する[2-^{14}C]malonyl-CoAの取り込みを脳ミクロソームについて実験した。この活性の、脳の部位による強さのパターンはreductaseの分布に一致した。脂肪酸伸長活性はfactorとしてNADH, NADPH共にほぼ同程度に有効であった。これらの結果は、脳ミクロソームの電子伝達系が脂肪酸不飽和化及び脂肪酸伸長活性の変動に関わっていることを示唆する。

Key words : brain development, microsomal electron transport, fatty acid metabolism

---

長鎖脂肪酸はミエリンを構成するスフィンゴ脂質の主要な構成脂肪酸である。この脂肪酸の生成にあずかるミクロソームの脂肪酸伸長酵素の活性は、脳の生育にともなって上昇し、ラットやマウスでは生後20～30日頃ピークに達することが認められており(5,15)、ミエリン形成との関係が問題となっている。また、脳ミクロソームの脂肪酸不飽和化活性は生後急速に減少することが知られている(18,8)。この不飽和化酵素系はcytochrome b_5を経由するミクロソームの電子伝達系を含んでいることが早くから知られていた(17)が、最近脂肪酸伸長酵素系にも電子伝達系が関与することが報告された(10,11)。ミクロソームの脂肪酸代謝と電子伝達系の関係についての実験は肝臓では十分になされているが、脳神経系については殆ど知られていない。我々は脳内での両者の関係を明らかにするために、発育中のラットについて脳ミクロソームの電子伝達系の酵素活性を測定し、脂肪酸伸長活性との関連性について検討を行なった。

〔実験材料および実験方法〕

(1)実験動物

Wister系ラットを飼育繁殖させ、出産児を日を追って使用した。胎児については受胎日及び胎児の身長からAltman & Dittmer(9)の表を元にして在胎日数を決定した(20)。動物は実験動物用食餌(オリエンタル)を処理直前まで与えた。酵素活性の日変動の可能性を考慮して動物の処理は午前10～11時の間に行なった(1)。

(2)ミクロソームの調整

ラットを断頭し、手早く脳を取り出し氷冷した後6vol.の0.32M sucrose-0.1M K-phosphate buffer, pH 7.0を加えてポッター型ホモジナイザーで6回上下させてhomogenateとした。

これを 17,000 xg 30min 遠心し．その上清を 105,000 xg 1hr 遠心した。Reductase 活性測定の場合は sucrose-buffer に 1mM EDTA を加えた液で一回洗浄して得た pellet を少量の 0.1M K-phosphate buffer, pH 7.5 に suspend した。脂肪酸伸長活性測定の場合は洗液に EDTA は加えず．最後の suspension も同じ sucrose-buffer で行なった。

(3) Reductase 活性の測定

Ferricyanide reductase 活性の測定は Mihara & Sato (14) の方法によった。Cytochrome b_5 reductase 活性の測定は Takesue & Omura (19) を modify した方法によった：反応液 2ml, 終濃度 0.02M K-phosphate buffer, pH 7.5, 0.1mM NADH, 5μM cytochrome b_5, ミクロソーム或いは homogenate．反応は NADH を加えてスタートさせ．25°C で 424nm で測った。Cytochrome c reductase は Omura & Takesue (16) によって assay した。タンパク質は Lowry 法 (12) で牛血清アルブミンを標準にして測定した。Cytochrome b_5 にブタ肝から trypsin 処理による Omura & Takesue (16) に従って調整した。

(4) 脂肪酸伸長活性の測定

Elongation の測定は Murad & Kishimoto (15) を modify した方法を用いた。標準反応組成は 100mM K-phosphate buffer, pH 7.2, 0.5mM NADPH, 0.02mM palmitoyl-CoA, 0.05mM malonyl-CoA (2μCi/μmol) および新鮮なミクロソームを加えて全量 0.5ml として 37°C, 30min incubation を行なった。以後は Keyes et al (10, 11), 及び MacGee & Allen (13) に従い 15% KOH/methanol 0.5ml で反応停止、1M H_3PO_4 0.7ml 添加、ヘキサン 5ml 抽出、TMTFTH[1] 10μl で抽出し、この層 2μl に methyl propionate/methanol (1:2) 1μl を混合して、ガスクロマト装置に注入した。カラムは 10% silar 10 C (silicone) を 100/120 Gaschrom Q (ステンレス 5mm x 2m tube)。Column 温度 200°C 固定、He flow rate 50 cm^3/min で Packard model 894 に送り活性測定を行なった。

〔実験結果および考察〕

Fig. 1 に脳の生育にともなう NADH-ferricyanide reductase, NADH-cytochrome b_5 reductase および NADPH-cytochrome c reductase 活性の変動を示した。NADH-cytochrome b_5 reductase は ferricyanide reductase 活性としても assay したが、両活

[1] TMTFTH, trimethyl (α, α, α-trifluoro-m-tolyl) ammonium hydroxide

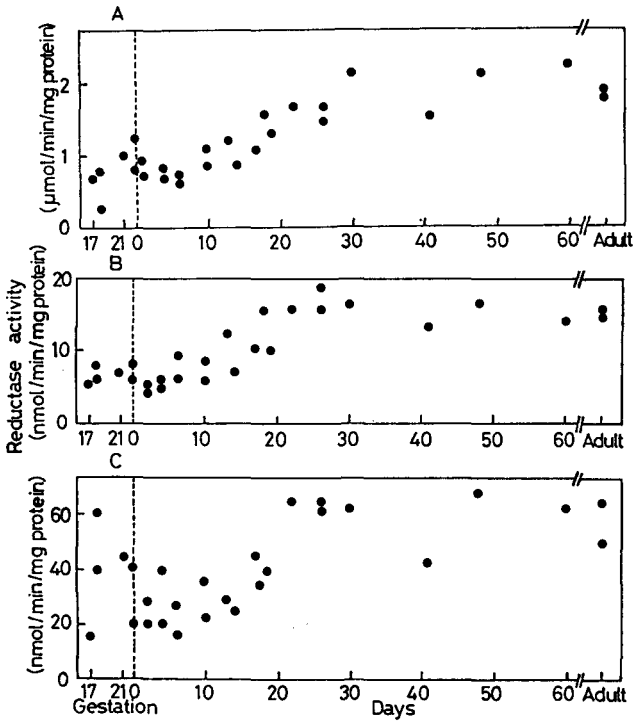
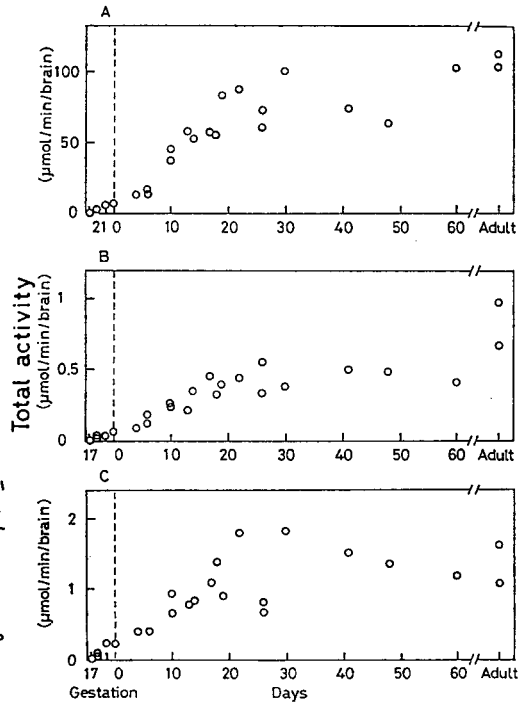


Fig. 1. Rat brain microsomal reductase activities at various stages of gestational and postnatal development. A; NADH-ferricyanide reductase; B, NADH-cytochrome b_5 reductase; C, NADPH-cytochrome c reductase. Adult rats were 130 and 160 days-old.

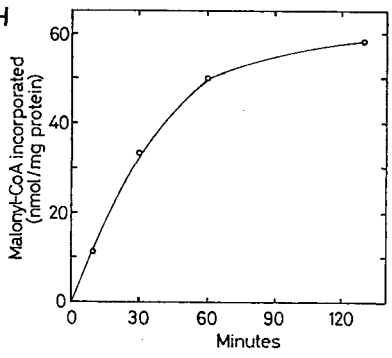
性共胎生期にやや高く、生後4～6日頃最低となり、その後上昇して20日から30日にかけてピークに達し、以後は幾分下がり気味に plateau を示した。NADPH-cytochrome c reductase はかなりバラツキが見られるが前二者とほぼ同じ傾向を示した。脳当りの全活性は胎生期からずっと上昇を続け、20～30日頃のピークがよりはっきりと現れ、また adult でやや上昇する傾向が見られた (Fig. 2)。Pullarkat & Reha (18) はラット脳 desaturase の比活性は生後低下するが、脳当りの全活性は一定であると述べており、出産直後の reductase 全活性が減少しないことと対応しうる。

Fig. 2. Rat brain microsomal reductase activities (total activity per brain) at various stages of gestational and postnatal development. Definitions of A, B and C are the same as in Fig. 1. Brain homogenates were used for the assay of reductase activities.



ミクロソームの電子伝達系が関与する主な代謝系は肝臓での結果から類推して2つ考えられる。その一つ脂肪酸不飽和化酵素の脳内活性は生後10日頃まで急激に低下し、以後も緩かな減少を示すことが知られている (18, 8)。もう一つの脂肪酸伸長酵素活性は逆に生後増加して20～30日頃ピークに達し、以後やや減少することが報告されている (5, 15)。今回は、まず伸長酵素系と電子伝達系の関係について検討を加えた。Fig. 3 に示したが、伸長反応は 30min まで直線的に進行した。ミクロソームの reductase 活性と伸長活性についての脳の部位別分布を対比して Fig. 4 に示した。Reductase 活性は、大脳半球、中脳、小脳の順に大体減少を示し、延髄での活性は高くなっている。これに対して、脂肪酸伸長活性は大脳半球でやや低いことを除いては reductase 活性と似かよったパターンを示した。若し脂肪酸伸長活性が cytochrome b_5 を経由する電子伝達系につながるなら、NADH, NADPH 両方に対し活性を示さなければならない (Fig. 5)。脳の伸長活性に関しては NADPH のみ有効とする報告と、両者共に有効とする報告があって一定しない (2, 4, 6)。この点について実験を行なった。Table 1 に示した様に palmitoyl-CoA の伸長に関しては、NADH, NADPH 共ほぼ同程度に有効であった。

Fig. 3. Effect of incubation time on [2-^{14}C]malonyl-CoA incorporation into palmitoyl-CoA. Brain microsomes from 22 day-old rats were used.



Aeberhard & Menkes (2) は endogenous fatty acid の elongation に pyridine nucleotide 共有効としている。この場合、生成物は 18:0, 22:4, 22:6 である。Bourre らは、behenyl-

CoA (4)のelongationがNADPHのみ有効としている。このことはelongationされる基質によって異った酵素系が存在する可能性を示唆する。Fig. 1の結果は脳ミクロソームの電子伝達系が脂肪酸の不飽和化、伸長などの代謝に密接に関わり合っている可能性を暗示するものであり、これらの脂肪酸代謝はearly myelin(9)やmyelinの形成に(7)重要な役割をもっていることから、結局ミクロソームの電子伝達系がmyelin形成に関与することになる。今後更にcytochrome b_5の抗体などを用いてミクロソームの電子伝達系と脂質代謝の関係を明らかにしていきたいと考えている。

Fig. 4. Regional distribution of microsomal reductases and fatty acid elongation in rat brain. A, B, and C are defined as in Fig. 1; D, palmitoyl-CoA elongation. Brains from rats (20-27 day-old) were carefully dissected (18) and the microsomes from 4-5 rats prepared as described in the text. Duplicate experiments were performed and each value was expressed as short and long bars. Cr, cerebral hemispheres; Mr, midbrain; Cl, cerebellum; Me, medulla oblongata.

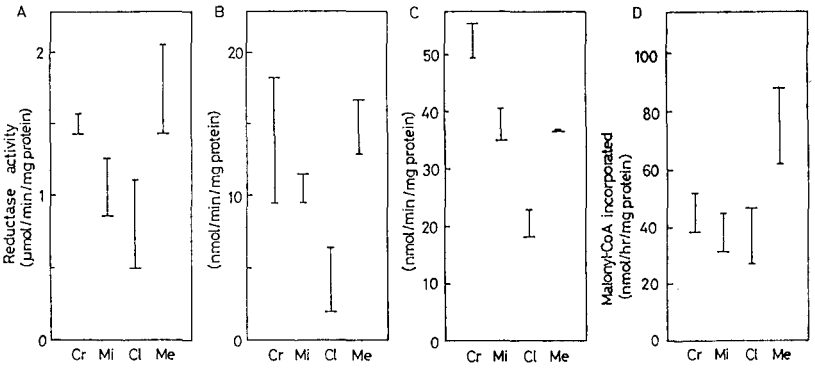
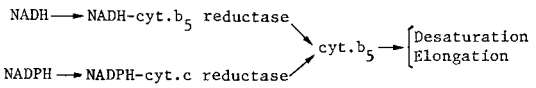


Table 1. Cofactor requirements for incorporation of [2-^{14}C]malonyl-CoA into palmitoyl-CoA by rat brain microsomes.

Additions (final concentration)	Activity (nmol/hr/mg protein)
NADPH (500 μM)	38.3 ± 12.9
NADH (500 μM)	29.8 ± 16.7
NADPH + NADH	36.8 ± 14.5
- Pyridin nucleotides	2.5 ± 1.2

Fig. 5. Schematic representation of the relationship between microsomal electron transport and fatty acid metabolism.



1 Acts-Dato, S.M., Catala, A., and Brenner, R.R.(1973) Lipids 8, 1-6
2 Aeberhard, E., and Menkes, J.H.(1968) J. Biol. Chem. 243, 3834-3840
3 Altman, P.L., and Dittmer, D.S.(1962) Groth, Including Reproduction and Morphological Development. p.350, Fedn Am. Socs. Exp. Biol., Washington.
4 Bourre, J.M., Daudu, O.L., and Baumann, N.A.(1975) Biochem. Biophys. Res. Commun. 63, 1027-1034
5 Bourre, J.M., Pollet, S., Paturuneau-Joas, M., and Baumann, N.(1978) in Enzymes of Lipid Metabolism (Gatt, S., L. Freysz and Mandel, P. eds) p.17-26, Plenum, N.Y.
6 Brophy, P.J., and Vance, D.E.(1975) J.Biochem. 152, 495-501
7 Brophy, P.J., and Vance, D.E.(1976) Biochem. J. 160, 247-251
8 Cook, H.W., and Spence, M.W.(1973) J. Biol. Chem. 248, 1793-1796
9 Cuzner, M.L., and Davison, A.N.(1968) Biochem. J. 106, 29-34
10 Keyes, S.R., Alfano, J.A., Jansson, I. and Cinti, D.L.(1979) J. Biol. Chem. 254, 7778-7784
11 Keyes, S.R., and Cinti, D.L.(1980) J. Biol. Chem. 255, 11357-11364
12 Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L., and Randall, R.J. (1951) J. Biol. Chem. 193, 265-275
13 MacGee, J., and Allen, K.G.(1974) J. Chromatog. 100, 35-42
14 Mihara, K., and Sato. R.(1978) in Methods in Enzymology p.102-108, Academic Press, N.Y.
15 Murad, S., and Kishimoto, Y.(1978) Arch. Biochem. Biophys. 185, 300-306
16 Omura, T., and Takesue, S.(1970) J. Biochem.(Tokyo) 69, 249-257
17 Oshino, N., Imai, Y., and Sato, R.(1971) J. Biochem.(Tokyo) 69, 155-167
18 Pullarkat, R.K., and Reha, H.(1975) J. Neurochem. 25, 607-610
19 Takesue, S., and Omura, T.(1970) J. Biochem.(Tokyo) 67, 259-266
20 Volpe, J.J., and Kishimoto, Y.(1972) J. Neurochem. 19, 737-753

34 イノシトールリン脂質の代謝回転と環状ヌクレオチド

見淵弘三・佐野公彦・松原　司
于　乗治・高井義美
（神戸大・医・II生化）

〔要　約〕

種々の神経伝達物質の作用にはCa^{2+}とイノシトールリン脂質（PI）の代謝回転が密接に関与していることが知られている。私共はCa^{2+}とPIの代謝回転が制御する蛋白質リン酸化酵素（C酵素）を見出し解析を行っているが、今回はC酵素を介する受容伝達機構と環状ヌクレオチドとの相互関係について血小板を用いて解析を行った。血小板をトロンビンで刺激すると、PIが加水分解されジグリセリド（DG）が生成される。このDGがC酵素を活性化して分子量約40,000の蛋白質をリン酸化し、その結果セロトニンが放出されることは昨年報告した。これらの反応はすべてcyclic AMPを上昇させるdibutyryl cyclic AMPやプロスタグランディンE1、およびcyclic GMPを上昇させるニトロプルシド、8 bromocyclic GMPによって抑制された。なお、同一条件下でこれらの物質は分子量約50,000の蛋白質をリン酸化し、この蛋白質のリン酸化反応はDGの生成と逆比例して増加した。したがって、cyclic AMPとcyclic GMPはそれぞれの蛋白質リン酸化酵素を介して、PIの代謝回転を停止させ、C酵素の活性化を抑制すると推定される。なお、リンパ球や多核白血球においてもそれぞれの細胞の活性化とPIの代謝回転は共にcyclic AMPによって抑制された。

Key words : Phosphatidylinositol turnover, Cyclic nucleotides, Protein kinase

---

エピネフリン（α作用）やアセチルコリン（ムスカリン作用）などの神経伝達物質の作用発現にはCa^{2+}が重要であり、その際標的細胞膜のイノシトールリン脂質（PI）が急速な代謝回転を受けることが知られている(1)。一般に、これらの神経伝達物質はcyclic GMPを上昇させることが多く、cyclic AMPを上昇させることはない。私共はCa^{2+}とこのPIの代謝回転を介する受容伝達機構について解析を行っているが、この機構ではPIが加水分解して生成されるジグリセリド（DG）がCa^{2+}と共に細胞内伝達物質として作用し、セリンリン脂質（PS）の存在下にある種の蛋白質リン酸化酵素（C酵素）を活性化する(2)。活性化されたC酵素は種々の蛋白質をリン酸化し、その結果神経伝達物質の作用が発現される。この受容伝達機構は大脳をはじめ種々の組織に存在しているが、血小板をモデルにした解析の結果、実際に細胞外シグナルによって作動していることをほぼ確認している(3)。今回は、この受容伝達機構とcyclic AMPおよびcyclic GMPとの相互関係について解析を行った。

〔実験材料と方法〕

血小板とリンパ球はヒト末梢血から、多核白血球はラット腹腔から調整した。血管平滑筋としてはラット大動脈を用いた。血小板のPIの加水分解およびDGの生成、in vivoのリン酸化、セロトニン放出はそれぞれ(^3H)アラキドン酸、^{32}Pi、(^{14}C)セロトニンで標識した血小板を用いて測定した(3)。血小板以外の組織のPIの代謝回転は^{32}PのPIへの取込みで測定した(1)。リンパ球のDNA合成は(^3H)チミジンの取込みで測定した(4)。多核白血球のリソゾーム酵素としてN-acetylglucosaminidaseの放出を測定した(5)。cyclic AMPとcyclic GMPはラジオイムノアッセイで定量した(6)。

Table 1 Inhibition of platelet activation by PGE1

Addition	PI hydrolysis	DG formation	40K protein phosphorylation	Serotonin release
	(Δcpm)	(cpm)	(ΔO.D. at 430 nm)	(cpm)
None	0	200	0	640
Throm	15,640	2,240	0.30	4,870
Throm + PGE1	4,700	650	0.02	650
PGE1	150	170	0	610

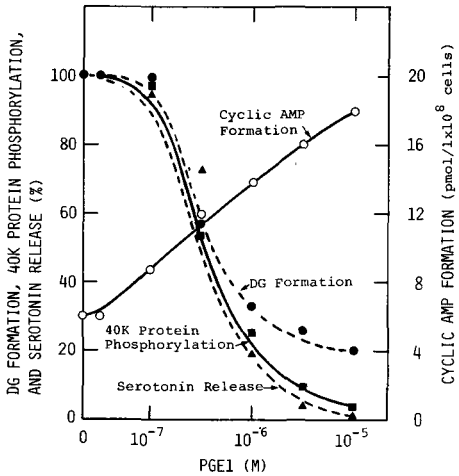


Fig.1.Effect of PGE1 on platelet activation

〔実験結果〕

(I) PIの代謝回転と cyclic AMP

血小板にトロンビンを作用させるとPIが加水分解されてDGが生成され、分子量約40,000(40K)の蛋白質がリン酸化されてセロトニンが放出された(表1)。この40K蛋白質がC酵素によってリン酸化されることは前回報告した(3,7)。これらの反応はすべてプロスタグランディンE1(PGE1)によって抑制された(表1)。DGの生成、40K蛋白質のリン酸化、セロトニン放出の諸反応を阻害するのに必要なPGE1の濃度はすべて同一であった(図1)。このPGE1の作用はdibutyryl cyclic AMP(DbcAMP)によっても同様に認められた。また、同一条件下でPGE1とDbcAMPは分子量約240,000、50,000(50K)、24,000、22,000の少なくとも4種類の蛋白質のリン酸化反応を促進した。50K蛋白質がPIの加水分解の制御に関与している可能性があり、この蛋白質のリン酸化反応とDGの生成とは逆比例して認められた(図2)。

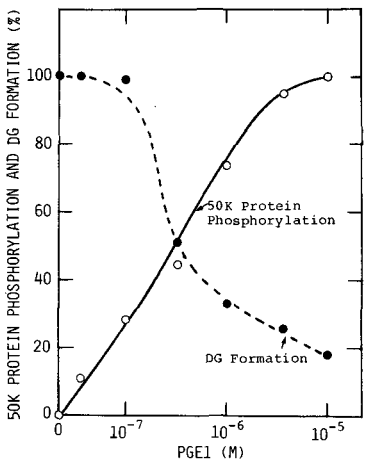


Fig.2.50K protein phosphorylation and inhibition of DG formation

(II) PIの代謝回転と cyclic GMP

細胞内cyclic GMP濃度を上昇させるニトロプルシド(SNP)や8-bromocyclic GMP(8brcGMP)は血小板の活性化反応を阻害することが知られているが(8)、SNPはトロンビンによる血小板のPIの加水分解、DGの生成、40K蛋白質のリン酸化、セロトニン放出の諸反応をすべて抑制した(表2)。しかも、上記の3

Table 2 Inhibition of platelet activation by SNP

Addition	PI hydrolysis	DG formation	40K protein phosphorylation	Serotonin release
	(Δcpm)	(cpm)	(ΔO.D. at 430 nm)	(cpm)
None	0	210	0	700
Throm	18,200	1,160	0.40	6,050
Throm + SNP	11,000	720	0.19	3,600
SNP	100	230	0	650

種類の反応を抑制するのに必要なSNPの濃度はほとんど同一であり、そのKiは1×10^{-4} Mであった。このSNPの作用は8brcGMPによっても同様に認められた。また、同一条件下でSNPと8brcGMPは分子量約50,000の蛋白質を比較的選択的にリン酸化した。この蛋白質はPGE1とDbcAMPによってリン酸化される50K蛋白質と同一であった。

(III)他の組織におけるPIの代謝回転と環状ヌクレオチド

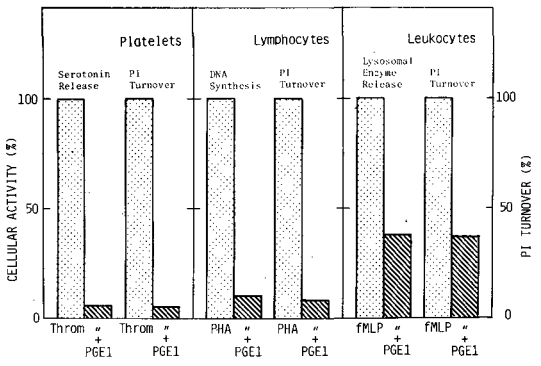


Fig.3. Inhibition of PI turnover by PGE1 in various tissues

植物性凝集素(PHA)をリンパ球に、走化因子(fMLP)を多核白血球に作用させるとPIの代謝回転が促進され、^{32}PがPIへ取込まれた。このPIの代謝回転はPGE1によって抑制された(図3)。同一条件下でPGE1はリンパ球のDNA合成と多核白血球のリソゾーム酵素放出反応を阻害した(図3)。一方、ラット大動脈の血管平滑筋にノルエピネフリンを作用させるとその張力が増大し同時にPIの代謝回転が促進された。そして、この張力の増大とPIの代謝回転は共にSNPや8brcGMPによって抑制された。

〔考察〕

細胞膜に受容体を有する種々の神経伝達物質はその細胞内伝達物質から2つのグループに大別できると思われる。そのひとつはCa^{2+}、PIの加水分解に由来するDGおよびcyclic GMPを細胞内伝達物質とするグループ(グループA)であり、他はcyclic AMPを細胞内伝達物質とするグループ(グループB)である。私共はグループAの神経伝達物質の作用発現にはC酵素が重要な役割を果たしていることを提唱しているが、今回の実験結果から血小板、リンパ球多核白血球、血管平滑筋などのいわゆる"Bidirectional"な受容応答系においては、C酵素の活性化がcyclic

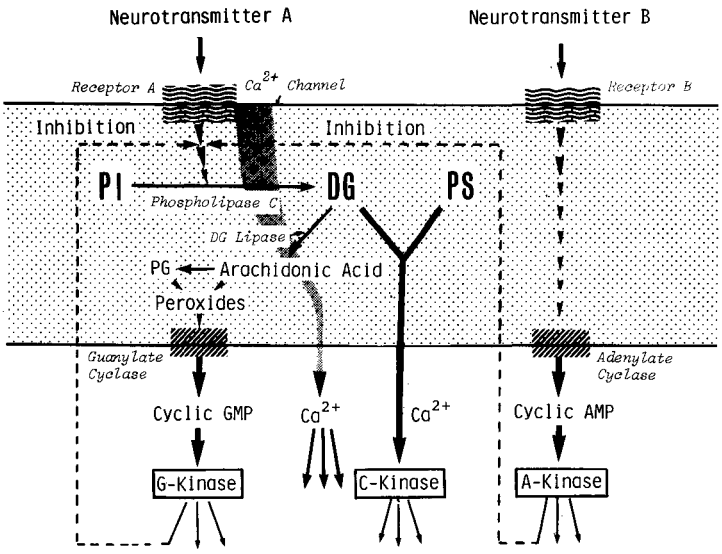


Fig.4. Proposed mechanism of trnsmembrane control in nervous tissues

AMPやcyclic GMPと密接に関連していることが明らかとなった。したがって、これまでの知見を総合すると、この"Bidirectional"な系における神経伝達物質の作用様式は図4に示したようにまとめることができよう。すなわち、グループAの神経伝達物質がその受容体に結合すると、PIが加水分解されてDGが生成される。同時に、細胞外のCa^{2+}が細胞内に流入する。DGはCa^{2+}とPSと共同してC酵素を活性化する。細胞内に流入したCa^{2+}はカルモジュリンやアクチノゲリン、ゲルゾリンなどの種々のCa^{2+}受容体を活性化する。一方、DGやホスファチジン酸から生成されるアラキドン酸やプロスタグランディンの過酸化物がグアニル酸シクラーゼを活性化し、cyclic GMPを生成する。このcyclic GMPはcyclic GMP依存性蛋白質リン酸化酵素（G酵素）を活性化して、PIの加水分解・DGの生成を停止させC酵素の活性化を抑制する。グループBの神経伝達物質はアデニル酸シクラーゼを活性化してcyclic AMPを上昇させる。cyclic AMPはその依存性蛋白質リン酸化酵素（A酵素）を活性化して、PIの加水分解・DGの生成を抑制してC酵素の活性化を阻害するという機構である。このように、種々の神経伝達物質の作用時に"Bidirectional"な受容応答系が作動するが、神経組織は複雑多彩であり、グループAとBが互いに非依存性に作用するいわゆる"Monodirectional"な受容応答系も存在すると考えられる。したがって、神経伝達系においてはDG－C酵素系とcyclic GMP－G酵素系やcyclic AMP－A酵素系が様々な部位、機能に対応してより複雑な相互関係を有しながら作働していると推定される。

〔参考文献〕

(1) Michell, R.H. (1975) Biochim. Biophys. Acta 415, 81-147

(2) Takai, Y., Kishimoto, A., Kikkawa, U., Mori, T., and Nishizuka, Y. (1979) Biochem. Biophys. Res. Commun. 91, 1218-1224

(3) Kawahara, Y., Takai, Y., Minakuchi, R., Sano, K., and Nishizuka, Y. (1980) Biochem. Biophys. Res. Commun. 97, 309-317

(4) Smith, J.W., Sterner, A.L., and Parker, C.W. (1971) J. Clin. Invest. 50, 442-448

(5) Rubin, R.P., Sink, L.E., and Freer, R.J. (1980) Mol. Pharmacol. 19, 31-37

(6) Steiner, A.L., Pagliara, A.S., Chase, L.R., and Kipnis, D.M. (1972) J. Biol. Chem. 247, 1114-1120

(7) 水口龍次、貝淵弘三、佐野公荒、吉川潤、川原康洋、手塚治、高井義美（1980）神経化学 19, 82-85

(8) Haslam, R.J., Salam, S.E., Fox, J.E.B., Lynham, J.A., and Davidson, M.M.L. (1980) Cellular Response Mechanism and their Biological Significance (Eds. Rotman, A., Meyer, F.A., Gilter, C., and Silberberg, A.) pp. 213-231, John Wiley & Sons Ltd.

35 金魚視神経損傷後のオルニチン脱炭酸酵素活性上昇について

高坂新一(慶大・医・生理), A.M.Heacock, B.W. Agranoff (Neurosci. Lab. Univ.of Mich.)

〔要　約〕

金魚を用い、視神経の再生に伴うオルニチン脱炭酸酵素(ODC)活性の変化について検討した。右視神経をCrushし、経日的に右(PC)網膜及び左(N)網膜のODC活性を測定してみると両網膜ともCrush後4~5日にかけて活性上昇がみられた。但しPC網膜の活性はN網膜に比し有意に高い値を示した。又、脳及び腎のODC活性も著明に増加した。Sham-operation及び強度のストレスは、網膜及び脳のODC活性に変化は与えなかった。ODCのinhibitorであるdifluoromethylornithine(DFMO)を投与すると、視神経Crush後のODC活性は著しく抑制された。このDFMO投与群を用いてPC網膜に於けるTubulin蛋白合成の促進及び視力の回復速度について検討してみると、ODC活性の低下は両者に何ら影響を与えなかった。一方、視神経Crush後のODC活性上昇は全身的なものであることから、視神経の再生に於ける何らかのhumoral factorの関与が考えられた。1つの候補として、Nerve Growth Factor(NGF)のODC活性に与える効果を、網膜explant cultureを用いて検討した。0.5及び1.0μgのβ-NGFはPC及びN網膜のODC活性を著明に上昇させた。この際PC網膜のODC活性はN網膜のそれよりも有意に高値を示した。このNGFによるODC活性の上昇は抗NGF抗血清の添加により完全に消失した。

Key words : Optic nerve regeneration, Ornithine decarboxylase, Nerve growth factor

---

ポリアミンは、その強い塩基性カチオンという性格を背景として、DNA. RNA及び蛋白代謝と密接な関連性を有している[8][17]。我々の研究室では以前から金魚を用い、視神経の再生に伴う網膜内での生化学的変化について研究を進めている。金魚の視神経をCrushした場合、網膜内では、RNA代謝[2][3][9]及びTubulin蛋白の合成[7]が促進することは既に報告した。今回は、視神経をCrushした後、ポリアミン合成律速酵素であるornithine decarboxylase (ODC, EC 4.1.1.17)活性の変化について検討を加えた。

〔実験方法〕

動物：金魚(Carassius auratus)を用い、既報の方法[7]に従って右視神経をCrushした。Sham-operationを行った金魚、又はA.C.3.5Vの電気ショックを120回与えることにより強度のストレスを加えた金魚も作製した。

ODC活性の測定：網膜、脳、腎、培養網膜組織を、1mM dithiothreitol, 100μM pyridoxal phosphateを含む50mM Tris buffer (pH 7.6)でホモゲナイズし、30,000g. 20分遠心後の上清を、酵素標品とした。ODC活性の測定はL-[1-^{14}C]-ornithine (40-60 mCi/mmol, NEN)を基質として(10^{-4}M, 0.5μCi), Oka and Perry[15]の方法に従った。

α-Difluoromethylornithine (DFMO)投与実験：視神経をCrushした後のODC活性を抑制する目的で、Crush当日、2日後、4日後に計3回1.5mgのDFMOを腹腔内注射した。Control群には生食を注射した。DFMOは、Dr. Peter P. McCann (Merrell Laboratory, Cincinnati, OH)から提供して頂いた。

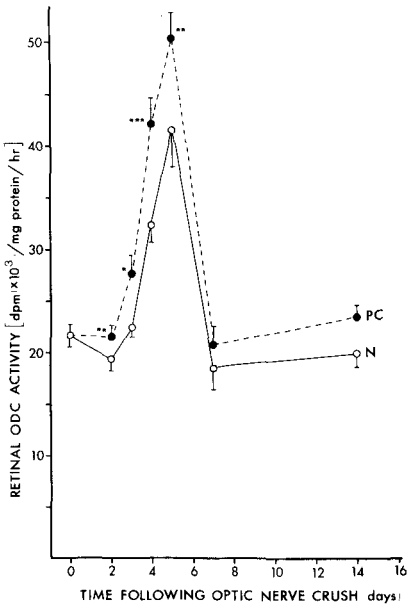
Tubulin labeling実験：Dunlop's medium[4]中で、右(PC)網膜はL-[^{35}S]-methionine (91 Ci/mmol, Amersham)(10μCi/retina), 左(N)網膜はL-[methyl ^{3}H]-methionine (91 Ci/mmol, Amersham)

(10μCi/retina) と 25°C. 1時間 incubate した後、両網膜をまぜ、62.5mM Tris buffer (pH 6.8), 1mM EDTA, 1mM phenylmethylsulfonylfluoride でホモゲナイズした。100,000g. 60分遠心の上清に SDS (final 1.0%) 及び Urea (final 8M) を加え、5%ポリアクリルアミドゲル電気泳動に供した。泳動後ゲルを 1mm 間隔のスライスにし、各々を 30% H_2O_2 で可溶化した後、^{35}S 及び ^{3}H 各々の radioactivity を測定した。

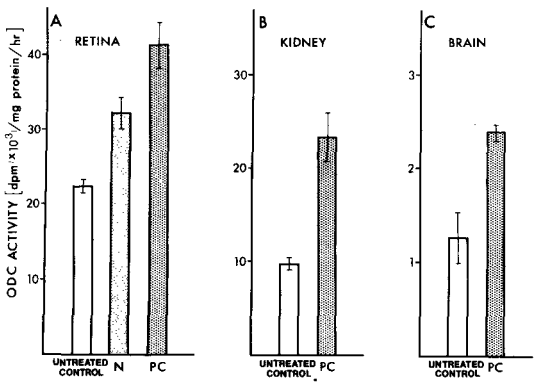
視力回復測定実験：左眼球を摘出し、右視神経を Crush した金魚を用い、視神経が再生し視力が回復する時期を behavioral に検討した。左眼球摘出後 Shuttle box 中で既報の方法⑯に従い逃避学習訓練を行った。過剰訓練した後、右視神経を Crush し、以降週2回、10 trials から成る逃避学習実験を行った。光刺激 (CS) 呈示時の逃避回数から、CS 呈示していない時の逃避回数を差し引いた値が連続2回、4以上となることを視力回復の Criterion とした。

網膜 explant culture：10~14日以前に右視神経を Crush した金魚の PC 及び N 網膜を用い、既報の方法⑪に従い explant culture を行った。但し、Nerve Growth Factor (NGF) の効果を明らかにする為、L-15 medium 中に Fetal Calf Serum は添加しなかった。β-NGF は Dr. Eric M. Shooter (Dept of Neurobiol. Stanford Univ. Sch. Med.) から提供して頂いた。Anti NGF anti-serum は Collaborative Research から購入した。

〔Fig. 1〕



〔Fig. 2〕

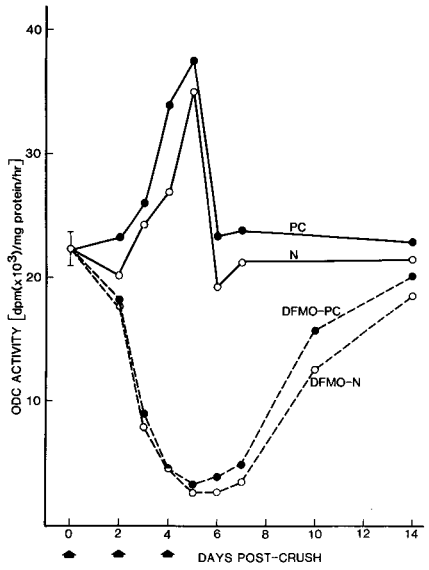


〔結果及び考察〕

視神経 Crush 後の ODC 活性

右視神経を Crush した後、経日的に右(PC)網膜及び左(N)網膜の ODC 活性を測定した。Fig. 1 に示した如く PC 及び N 網膜いずれの ODC 活性も Crush 後4~5日にかけて著明に増加した。但し、PC 網膜の値は N 網膜に比し有意に高い値を示した。次に Crush 後4日目の金魚を用い、脳及び腎の ODC 活性を測定してみると、両組織に於いても Control 群に比し顕著な活性上昇がみられた (Fig. 2)。一方、Sham-operation を行った金魚、又は電気ショックによるストレスを与えた金魚で、網膜、脳の ODC 活性を4日後に測定してみると、Control 群との間に差は認められなかった。これらのことから視神経 Crush 後の ODC 活性の上昇はストレスによるものではなく、視神経の損傷自体に由来すること、又、ODC 活性の上昇には何らかの humoral factor

〔Fig.3〕



が関与していることが示唆された。即ち、視神経Crush後の神経線維変性物質が血流を介し直接ODC活性を上昇させるのか、又は、これが何らかのhumoral factorの分泌を促進させる等のことが考えられる。

次に以下2つの問題点について検討を加えた。①視神経Crush後にみられるODC活性の上昇はその後網膜内で観察されるRNA代謝の亢進、Tubulin蛋白合成の促進、更には神経線維の再生に必要か否か。②何らかのhumoral factorがODC活性の上昇に関与しているとすれば、それはいかなるfactorか、又そのfactorは神経の再生と関連性を持っているか否か。

DFMOはODCのactive siteをアルキル化することにより非可逆的に活性を抑制するinhibitorであり[14]、毒性が弱いことから in vitro, in vivo両者で用いることができる[5][12]。そこで視神経をCrushした後DFMOを3回投与した金魚を用いて、網膜のTubulin蛋白合成及び視力の回復について検討した。Fig3に示した如く、DFMOを3回腹腔投与した群ではPC及びN網膜いずれのODC活性も2~10日にかけて著しく低下した。このDFMO投与群を用い、Crush後10日目に網膜Tubulin蛋白の合成について検討した。Table 1に示した如く、DFMO投与群に於いてもPC網膜では32~105%、Tubulin蛋白の合成が促進されていた。このことからODC活性が低下した状態でもTubulin蛋白合成促進は起こりえるものと考えられた。次にDFMO投与の視神経再生に与える影響を、視力の回復実験により検討を加えた。Control群(生食投与)では視神経Crush後14日目から視力回復のCriterionに達するものが現われ始め、31日目までには実験に用いた28ヒキの金魚のうち約80%が視力を回復した。DFMO投与はこの視力回復速度に対しても全く影響を与えなかった。以上のことから視神経Crush後のODC活性上昇そのものと、視神経の再生とは直接の関連性はないものと結論された。

〔Table 1〕
TUBULIN LABELING WITH METHIONINE

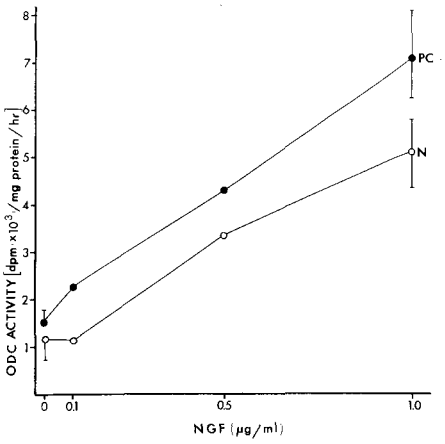
	NORMALIZED PC/N ($^{35}S/^{3}H$) RATIO
EXPERIMENT 1	
CONTROL	1.34
DFMO	1.84
EXPERIMENT 2	
CONTROL	1.34
DFMO	1.32
EXPERIMENT 3	
CONTROL	1.62
DFMO	2.05

EACH VALUE IS THE AVERAGE OF DUPLICATE DETERMINATIONS.

次にその問題点につきPreliminaryな実験を行った。NGFはマウスsalivary glandに高濃度存在する蛋白で、PC-12 cellやDorsal root ganglion cellのsurvival及びdifferentiationに必須なものであることが知られている[6]。最近Benowitzらは金魚脳内にもNGF様物質が高濃度存在していることを報告した[1]。又Turnerらは金魚の視神経をCrushした後NGFを眼球内に注射した場合、Ganglion細胞の形態学的変化が増強

されることを報告した[18]。又、NGFはラットのSuperior cervical ganglionのODC活性を上昇させることも知られている[13]。そこで我々は網膜のexplant cultureを用いβ-NGFのODC活性に与える効果を検討した。Culture mediumにβ-NGF(0.5μg)を添加し継時的にODC活性を測定してみると、NGF添加後6時間をピークに活性上昇がみられた。6時間の培養時間を用い、β-NGFのdose responseをみてみると、0.5μg, 1.0μgで活性上昇はみられるが、0.1μgでは変化を示さなかった(Fig.4)。又1.0μgのNGFを使った実験では、10-14日以前に視神経をCrushしてあるPC網膜のODC活性は、N網膜に比し有意に高い値を示した。又、0.5μgのNGFと抗NGF抗血清を同時に添加した場合にはODC活性の上昇はみられなかった。これらのことから視神経Crush後ODC活性を上昇させるhumoral factorとしてNGFもその候補の1つと考えられた。ODCはここに示したNGF以外にも数多くのホルモン例えば成長ホルモン、性ホルモン、Thyrotropin等によってもinduceされることが知られており[2]、NGFを含めたこれらのホルモンと視神経の再生との関連性を追求することは、今後の興味ある問題であろう。

〔Fig.4〕



（本研究の一部は既にDevelopmental Brain Res.に発表した[10]。）

〔文献〕

1. Benowitz, L.I. and Greene, L.A. (1979) Brain Res. 162, 164-168.
2. Burrell, H.R., Dokas, L.A. and Agranoff, B.W. (1978) J. Neurochem. 31, 289-298.
3. Dokas, L.A., Kohsaka, S., Burrell, H.R. and Agranoff, B.W. (1981) J. Neurochem. 36, 1160-1165.
4. Dunlop, D.S., Van Elden, W. and Lajtha, A. (1974) J. Neurochem. 22, 821-830.
5. Fozard, J.R., Part, M.-L., Prakash, N.J., Grove, J., Schechter, P.J., Sjoerdsma, A. and Koch-Wester, J. (1980) Science 208, 505-508.
6. Greene, L.A. and Shooter, E.M. (1980) Ann. Rev. Neurosci. 3, 353-402.
7. Heacock, A.M. and Agranoff, B.W. (1976) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 73, 828-832.
8. Jänne, J., Pösö, H. and Raina, A. (1978) Biochem. Biophys. Acta 473, 241-293.
9. Kohsaka, S., Dokas, L.A. and Agranoff, B.W. (1981) J. Neurochem. 36, 1166-1174.
10. Kohsaka, S., Schwartz, M. and Agranoff, B.W. (1981) Dev. Brain Res. 1, 391-402.
11. Landreth, G.E. and Agranoff, B.W. (1979) Brain Res. 161, 39-53.
12. Luk, G.D., Goodwin, G., Marton, L.J. and Baylin, S.B. (1981) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 78, 2355-2358.
13. MacDonnell, P.C., Nagaiah, K., Lakshmanan, J. and Guroff, G. (1977) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 74, 4681-4684.
14. Metcalf, B.W., Bey, P., Danzin, C., Jung, M.J., Casara, P. and Vevert, J.P. (1978) J. Amer. Chem. Soc. 100, 2551-2553.
15. Oka, T. and Perry, J.W. (1976) J. Biol. Chem. 251, 1738-1744.
16. Springer, A.D., Schoel, W.M., Klinger, P.D. and Agranoff, B.W. (1975) Behav. Biol. 13, 467-481.
17. Tabor, C.W. and Tabor, H. (1976) Ann. Rev. Biochem. 45, 285-306.
18. Turner, J.E., Delaney, R.K. and Johnson, J.E. (1980) Brain Res. 197, 319-330.

36 発達期のラット脳における蛋白合成及びmRNAレベルの変化—二次元電気泳動法による分析

荒木一明・崎村建司・吉田　豊
高橋康夫
（新大・脳研・神経薬理）

〔要　約〕

二次元電気泳動－フローログラフィー法は、脳における複雑な蛋白の合成パターンを追求する上で有用な方法である。我々はこの方法を発達期のラット脳切片による蛋白合成の変化及び網状赤血球無細胞系に発達期のラット脳から抽出したRNAを添加することにより合成される蛋白の変化の研究に応用し、次の様な結果を得た。

大脳皮質切片を^{35}Sメチオニンと反応させると、胎仔、新生仔では約300のラベルした可溶性蛋白のスポットが認められ、tubulin, アクチンなどは非常に大きい。しかし10日及び成熟ラットではスポット数が激減した。小脳の切片では大脳とは異なり、10日ラットで非常に多くのスポットが見出された。次にmRNAによる翻訳実験では、全脳細胞質RNAの添加による全蛋白の合成は10日及び成熟ラットの脳RNAで低下しており、フローログラフィーでもスポットの減少が認められた。脳細胞質poly(A)RNAの添加では、全蛋白合成は発達につれて余り減少しなかったが、二次元電気泳動－フローログラフィー法で分析の結果、切片などとは異なり、成熟ラット脳poly(A)RNAでもtubulin, アクチンを始め、多数のラベルしたスポットが認められた。各スポットにより、その変化は特徴的で発達と共に次第に大きくなるもの、或いは小さくなるものなど色々であった。

Key words：brain development, mRNA, 2-dimensional gel electrophoresis

---

発達期の脳において、その可溶性蛋白の組織が複雑な変化を示すことを我々(5)は昨年O'Farrellの二次元電気泳動法を使って観察した。しかし、その実験は色素染色によるものであり、あくまでも静的なものであり、蛋白の合成などの動的な変化を追求することはできなかった。そこで本研究では^{35}Sメチオニンを前駆体として使用し、発達期のラット脳切片で可溶性蛋白を合成させ、それを二次元電気泳動－フローログラフィー法で分析し、蛋白の代謝パターンを追求しようと試みた。更に発達期の脳から細胞質RNA、或いはpoly(A)RNAを抽出し、これを網状赤血球無細胞系に添加することによって蛋白合成を行せ、その合成蛋白を二次元電気泳動－フローログラフィー法で分析することにより、翻訳可能なRNAのレベルの発達期の脳における変化を検討しようと試みた。

〔実　験　方　法〕

(1) 切片実験法　研究所の動物センターで飼育されたWistar系のラットを使用し、その胎仔、新生仔、幼若(10日)、成熟ラットから大脳、小脳をとり出し、大脳皮質及び小脳皮質の切片を作成し、その50mgづつを^{35}Sメチオニン(R.C.C.製品, sp Act. 1000Ci/mM) 20μCi入りKrebs Ringer phosphate (glucose入り) pH 7.4の1ml中に入れ、通常37°C, 2時間インキュベートした。反応後、切片を1回洗滌した後、0.32M蔗糖でホモジナイズし、10万G, 90分遠心して可溶性蛋白を得た。この可溶性分画の一定量にTCAを終濃度10%になる様に加え蛋白を沈澱させ、Whatman GF/Cフィルター上に集めTCAで洗滌してからバイアルに移し、トルエンシンチレーターを加えてカウントした。また、上述の様にして得られた可溶性蛋白の40μg, 或いは70μgを既に発表の方法とほぼ同様のO'Farrellの方法(3)の改変法を使用して二次元電気泳動を行い、クマシーブルーで染色し、蛋白の染色パターンを観察した後、Bonner, Laskeyの方法に

従ってフローログラフィーを行った。

(2) RNA翻訳実験法　(1)と同様の発達段階のラットの全脳から細胞質RNA及びpoly(A)RNAを別報に記述した様に分離した(1)。網状赤血球lysate及びそれを使用した無細胞蛋白合成系については既報に大体従って使用した(4)。反応後、その一部をメンブランフィルター上に移し、TCAで洗滌した後シンチレーションカウンターで測定して、全蛋白へのとりこみを計算した。また、その一部を直接前述したO'Farrellの二次元電気泳動にかけ、更にそのフローログラフィーを行った。また、特定のスポットについては切りとってからバイアルに移し、シンチレーションカウンターで測定した。

〔実験成績〕

(1) 切片での実験成績　ラット新生仔の大脳皮質切片による[35]Sメチオニンの可溶性蛋白へのとりこみは、大体2時間は直線的に進行する。ラット胎仔大脳切片での蛋白合成活性は新生ラットと同じ位で高い。しかし、成熟ラットの大脳切片による活性は胎仔の約1/6位であった。幼若ラットでは成熟ラットより若干高い活性が認められた。一方、胎仔、新生仔ラットの小脳切片では、大脳より僅かに低い位の蛋白合成活性を示すが、幼若ラットでは非常に高い活性を示した。

Fig. 1. a は胎仔大脳切片での蛋白合成後に行った二次元電気泳動－フローログラフィーのパターンである。我々の条件下では(40 μg蛋白, 7日間露出)蛋白のスポットは約300であり染色によるスポット数100(蛋白160 μg)よりはるかに多い。またフローログラフィーのパターンを検討すると、以前に報告した染色パターン(5)とかなりの相応が認められた。例えば、スポット20,21即ちtubulinのα-, β- subunit, スポット25即ちアクチンは大きく認められた。スポット2に相当すると思われるスポットとその近くのpI 5.5-6.0分子量7-8万の一群のスポットが認められた。また染色スポット30,31などに相当するスポットも明らかに認められる(番号については文献5,及びFig. 2. e参照)。その他にpI 6.5-7.0位で分子量4-6万位のスポットの一群が非常に多く認められるが、これらは染色パターンでは大程明らかでないものである。Fig. 1. b は新生ラット大脳のものであるが殆んど変りはない。Fig. 1. C は幼若ラットの大脳切片のものであるが、a, b に比べてスポット数が少なく、アクチンは、はっきり認められるがtubulinのスポットは小さくなっている。Fig. 1. d は成熟ラットのもので

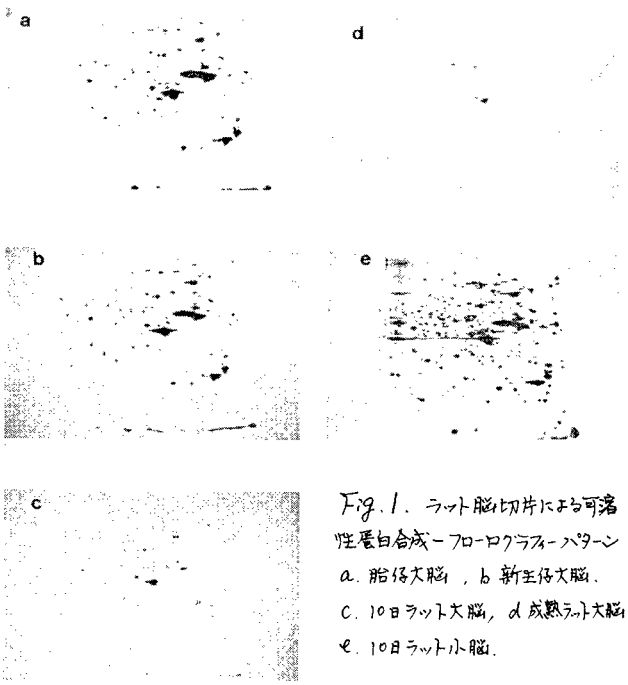


Fig. 1. ラット脳切片による可溶性蛋白合成－フローログラフィーパターン
a. 胎仔大脳, b 新生仔大脳、
c. 10日ラット大脳, d 成熟ラット大脳、
e. 10日ラット小脳.

更にスポット数が少なくなっている。小脳切片による合成可溶性蛋白のフローログラフィーパターンは、幼若ラットの場合をFig.2eに示すが、蛋白合成活性が高い為に多数のスポットが認められた。しかし、基本的なスポットは殆んど変りはない。小脳の胎仔、新生仔、成熟ラットでの成績は紙数の都合で省略する。

(2) mRNA指令による蛋白合成実験成績　以上の切片での実験成績がmRNAレベルの変化によるものかどうかを更に検討する為に網状赤血球無細胞系に胎仔、新生仔、幼若、成熟のラット全脳より抽出した細胞質RNA或いはpoly(A) RNAを添加して合成した場合の蛋白の変化を検討した。細胞質RNA一定量あたりの蛋白へのとりこみは発達につれて低下してゆくが、これは細胞質RNA中のpoly(A)RNA含量の低下とmessenger活性の低下によるものと思われる。この合成された全蛋白の一定カウントを二次元電気泳動－フローログラフィーにかけて比較検討した。先ず胎仔脳RNAによる蛋白のフローログラフィーと前述した胎仔脳切片での合成蛋白のパターンと比較してみると、tubulin, アクチン或いは30,31に相当するスポット、スポット2, pI6.5-7.0位で分子量4-6万位の一群のスポットなど殆んど同様であった。しかし非常に異なることはスポット2付近のpI5.0-6.0位で分子量7万以上の蛋白スポットが殆んど認められないことである。夫々の発達期の脳細胞質RNAによるパターンを比較してみると切片での変化と非常に似た傾向を示していた(図は省略)。

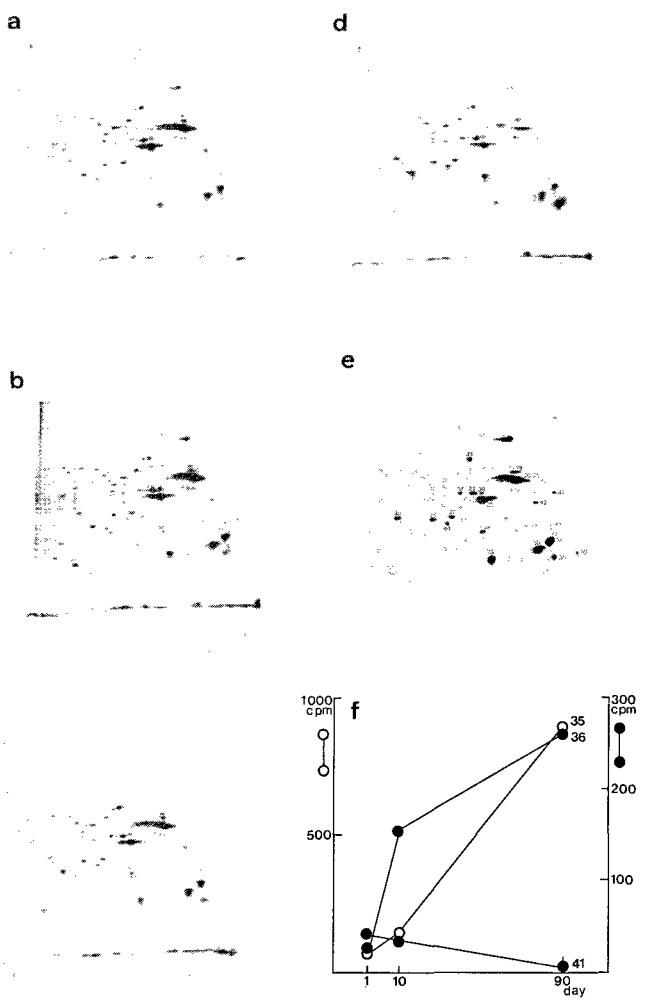


Fig.2. 網状赤血球無細胞系による合成蛋白のフローログラフィー
a, b, c, dは夫々胎仔、新生仔、10日令及び成熟ラットのpoly(A)RNAによる合成蛋白
eは模式図、fはスポット35, 36, 41へのとりこみの発達による変化

次にpoly(A)RNAの添加による全蛋白へのとりこみを見ると、発達段階につれて認められる低下は、夫程著明ではなかった。合成された全蛋白の一定量及び一定カウントを二次元電気泳動－フローログラフィーにかけて分析したが一定のカウントでのパターンがFig.2で

あり、Fig.2. a は胎仔, b は新生仔, c は幼若(10日), d は成熟ラットの脳 poly(A)RNA により合成された蛋白を示している。また、これらのスポット中注目すべきスポットに既報の染色パターンのスポット番号をつけ、更に36以上の約10ケに番号をつけ加えた模式図が Fig.2.e である。これを上述の切片及び細胞質 RNA の場合のパターンと比較すると、使用したカウントが多いので(9万cpm, 10日間露出)、スポット数は多いが細胞質 RNA の場合と同様に pI 5.0-6.5, 分子量7万以上のスポットが認められなかったことは切片の場合と異なっていた。また分子量3-6万位の pI 6.0-7.0 位の小スポットが多数認められた。
tubulin, アクチンなどのスポットは、成熟ラットの場合でも大きいことは興味がある。これは或いは poly(A)RNA として分離されているので、その messenger 活性が強く表現されるからであるかも知れない。番号をつけたスポットについてフローログラフィーの後で切りとってカウントしたが、その中35は既報の小脳特異蛋白であり、その合成カーブは Fig.2.f の如くで成熟ラットの脳 poly(A) RNA で非常に上昇していた。36も同様であった。またスポット41などは成長と共に低下していた。tubulin, アクチンについても同様測定したが、スポットが大きく、まとまりの関係もあり結論にはなお実験が必要であるが、成熟ラット poly(A) RNA で低下していることは確実である。

〔考　察〕

上述した様な合成蛋白の二次元電気泳動ーフローログラフィーによる分析のパターンの変化は細胞の発生分化、特にニューロンの成熟、デンドライト・軸索の成長、シナプス形成、グリアの増殖、ミエリン形成などと密接な関係があると思われる。切片の場合と網状赤血球無細胞系での mRNA の翻訳とでは若干の相違点も認められるが、高分子蛋白の合成が後者で欠けていたことが最も大きな差異であった。これは高分子蛋白の合成を指令する mRNA が in vitro の系では部分的にこわれてしまう結果であるかも知れない。細胞質 RNA の方が poly(A) RNA より切片に近い発達期の変化を示したが、これは細胞質 RNA 中における poly(A) RNA の含量が変化していることと関連があるかも知れない。
tubulin, アクチンに就いては切片でも細胞質 RNA, poly(A) RNA の添加実験でも成熟ラットの場合は減少するが、スポット35の様な成熟小脳に特異的な蛋白が成熟ラット脳の poly (A) RNA で活発に合成されることは興味がある。これは別に報告する S-100 蛋白, 或いは 14-3-2 蛋白などの場合の変化とも考え合せて興味がある。(1, 6)　しかし、小脳の RNA を使用して検討する必要がある。最近この実験の進行中, Morrison らは小脳の mRNA レベルの変化を小麦胚芽系を使用して研究し報告した。(2)

〔文　献〕

(1) 増田達, 崎村建司, 吉田豊, 高橋康夫, 磯辺俊明, 奥山典生; 神経化学会に投稿中
(2) M. R. Morrison, S. Pardue, W. S. T. Griffin; J. Biol. chem. 256, 3550 (1981)
(3) P. H. O'Farrell, ; J. Biol. chem. 250, 4007 (1975)
(4) 崎村建司, 高橋康夫; 神経化学 19, 274 (1980)
(5) Y. Yoshida, Y. Takahashi; Neurochem. Res. 5, 81 (1980)
(6) 吉田豊, 崎村建司, 増田達, 榊谷悦子, 高橋康夫; 生化学 53, 963 (1981)

37　発達期のラット脳におけるS－100蛋白mRNAレベルの変化

増田　達・崎村建司・古田　豊
櫛谷悦子・高橋康夫(新大・脳研・神経薬理)
礒辺俊明・奥山典生(都立大・理・化学)

〔要　約〕

S-100蛋白は、脳特異蛋白でありアストログリアに局在していると考えられている。我々は、このS-100蛋白をコードするmRNAのレベルを測定することにより、脳におけるアストログリアの発生分化についての情報を得ることができるのではないかと考え、次の様な実験を行った。　成熟ラット脳のポリゾームから抽出したpoly(A)含有RNAを、網状赤血球無細胞系に添加すると、S-100蛋白を合成するが、無添加或は肝ポリゾームpoly(A)含有RNAの添加では、S-100蛋白を合成することができなかった。　発達期脳のRNAとしては、細胞質RNA及び細胞質RNAから分画したpoly(A)含有RNAを使用した。胎仔,新生仔,4日,10日,20日,30日,成熟ラット脳から抽出した細胞質RNAを網状赤血球無細胞系で合成されるS-100蛋白は、生後発達に比例して次第に増加して成熟ラットで最高に達した。　また、poly(A)含有RNAの添加では、胎仔,新生仔,10日,30日,成熟ラット脳で検討した。　その結果、やはり成熟ラットで最高の翻訳活性がみられた。

これらの結果は、S-100蛋白mRNAの活性がアストログリアの分化成熟にほぼ比例して上昇することを示している。

Key words：　S-100, mRNA, brain development.

S-100蛋白は脳特異蛋白であり,(9)現在ではアストログリアに局在すると考えられている。(1)　我々は、脳の遺伝る発現機構の研究の一部としてS-100蛋白をコードするmRNAレベルを発達期の脳で測定することにより、脳におけるアストログリアの発生分化についての情報を得ることができるのではないかと考えた。　本研究では、網状赤血球無細胞系での翻訳活性を測定することにより、mRNAレベルを胎仔から成熟ラットまでの脳について検討したのでその成績を報告する。

〔実　験　方　法〕

Ⅰ. S-100蛋白と抗S-100血清の調製　　S-100蛋白は、牛脳よりIsobe & Okuyamaの方法(3)により調製した。　また抗血清は、300μgのS-100蛋白と700μgのメチル化アルブミンを1mlのPBS(phasphate buffered saline)に溶解し、同量のFreundのアジュバンドと混合し、家兎に毎週1回、5週間注射して得た。

Ⅱ. RNAの分画　　各種の日令のラットの全脳のミトコンドリア上清から、フェノール,クロロホルム,イソアミルアルコール(25：24：1)でRNAを抽出した。(6)　また、成熟ラット全脳，肝よりポリゾームを調製し、これより同様な抽出法でRNAを得た。poly(A)含有RNAは、oligo(dT)celluloseクロマトグラフィーを2回以上くり返して得た。

Ⅲ. 家兎網状赤血球無細胞系の調製　　家兎網状赤血球無細胞系の調製は、Schimukeの方法によった。　また、mRNA依存性の蛋白合成系は、Preham & Jacksonの方法を一部変更して行った。　詳細は昨年の報告による。(7)

Ⅳ. S-100蛋白の翻訳活性の測定　　詳細は昨年本学会に報告した14-3-2蛋白mRNAの定量法に述べてある。(7)　即ち、家兎網状赤血球無細胞系の反応終了液をPBSで稀釈し、

その可溶性画分に1% DOC, 1%トライトンX-100, 0.4%メチオニン存在下で、S-100蛋白と抗体を添加し免疫沈降を行わせた。 この沈降物を、Laemmliの15% SDS-PAGEにかけS-100蛋白のバンドを切り出し、S-100蛋白への取り込みを測定し翻訳活性とした。

Ⅴ. ホルムアミド-ショ糖密度勾配遠心　ホルムアミド-ショ糖密度勾配遠心は、50%ホルムアミド, 0.2% SDS, 5mM EDTA, 0.1M NaCl, 10mM Tris-HCl (pH 7.5)を含む5-20%のショ糖の直線勾配で、77,500g, 40時間, 4℃ (Hitachi, RPS 25-3 rotor)で遠心した。

〔結　果〕

Ⅰ. 兎網状赤血球無細胞系でのS-100蛋白の合成

我々の使用した網状赤血球無細胞系では、内在的な蛋白合成は極めて低くpoly(A)含有RNA添加により、20ヘ30倍の蛋白合成の上昇が認められた。この系で方法の項で述べたようにして免疫沈降させた蛋白をLaemmliのSDS-PAGE(15%)で泳動し、フルオログラフィーを行った成績はFig.1に示した。脳のpolysomal poly(A)含有RNAを添加して合成させたものⅡでは、S-100蛋白の移動度に一致する場所に明らかにバンドが認められる。 その他に非特異的な吸着によると思われるバンドがいくつか存在する。 内在性の合成蛋白沈降物には、S-100蛋白のバンドの位置には何も存在しない。 また、肝のpolysomal poly(A)含有RNA添加による合成蛋白の沈降物でも非特異的バンドは存在するが、S-100蛋白のバンドの位置にはラベルは認められない。同様の結果は、細胞質RNA, 細胞質poly(A)含有RNA添加による蛋白合成産物の分析からも得られた。最近、Isobe & Okuyama ら(4)はS-100蛋白が、Swankらの方法で、2つのサブユニットに分離されることを示しているが、現在この方法を蛋白合成産物の免疫沈降物の分離に適用しているが、まだ成功していない。

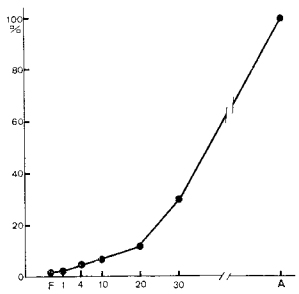
Fig.1　Ⅰ　Ⅱ　Ⅲ

← S-100

無細胞蛋白合成系での生成産物の抗S-100血清による免疫沈降物のフルオログラフィー。 Ⅰ: 内在性RNA, Ⅱ: 脳poly(A)含有RNA添加, Ⅲ: 肝poly(A)含有RNA添加.

Ⅱ. 添加RNA量とS-100蛋白合成の関係　発達期の脳でのS-100蛋白mRNAの活性を検討する際、無細胞系に添加するRNAの量と合成されるS-100蛋白の量が、直線的関係を保っていることが必要である。この点を、細胞質RNA及び細胞質poly(A)含有RNAで検討した。 前者では、40-160μg/ml, 後者では5-20μg/mlの範囲で全体の合成量は直線的であり、また免疫沈降したS-100蛋白の量も全体に対する割合で一定であった。 そこで、上記の範囲のRNA量の使用により、S-100蛋白の合成活性が測定可能

Fig.2



S-100蛋白mRNAレベルの発達による変化。細胞質RNAによる。S-100蛋白mRNAレベルは、S-100 incorp./total incorp.で算出。図は成熟ラットのmRNA活性を100%とした。

であると判断した。

Ⅲ. 発達期の脳の細胞質 RNA による S-100蛋白の合成　20日目胎仔, 新生仔, 4日, 10日, 20日, 30日, 成熟の日令ラットから調製した全脳細胞質 RNA により、指令される S-100蛋白合成活性を Fig 2 に示す。胎仔期新生仔期 RNA では、殆んど S-100蛋白は合成されないが、生後脳の発達に従い増加していき、成熟ラットで最高に達する。

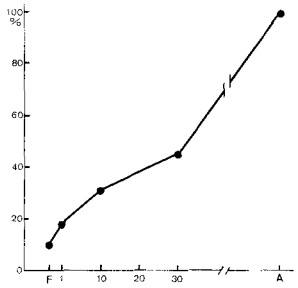
Ⅳ. 発達期の脳の poly (A) 含有 RNA による S-100蛋白の合成　細胞質 RNA の結果を確認するために、細胞質の poly (A) 含有 RNA を、胎仔, 新生仔, 10日, 30日, 成熟ラット全脳の細胞質より抽出し、S-100蛋白の合成活性を検討したのが Fig 3 である。細胞質 RNA での結果と同様、胎仔, 新生仔では活性は低く、発達に従い増加し成熟ラットで最高になった。

Ⅴ. S-100蛋白 mRNA のショ糖密度勾配遠心　S-100蛋白をコードする mRNA を精製する第一段階として、サイズによる分画を試みた。Ⅲ, Ⅳの結果より S-100蛋白 m-RNA が成熟ラットで最も活性が高いことから、成熟ラットの poly (A) 含有 RNA をホルムアミド含有ショ糖密度勾配遠心法で分画した。各々の画分の RNA を無細胞系に添加し、合成産物中の S-100蛋白の量を測定した。その結果を Fig 4 に示す。S-100蛋白の合成活性は2つのピークに分かれた。このピークは、各々 6-8S, 12-16S であり、6-8S のピークの活性が 12-16S のピークの活性より高い。しかし、この分画によって、S-100蛋白の mRNA は3倍程にしか濃縮されなかった。

〔考　察〕

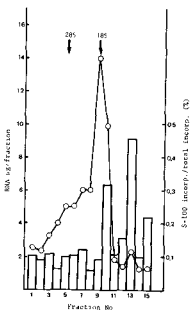
S-100蛋白の mRNA 依存性の homologas な系での合成は、Zomzely - Neurath(8)により、また heterologas な系での合成は Mahony らによって小麦胚芽系について報告された。(5)　我々は、網状赤血球無細胞系が有用であることを、Laemmli の SDS-PAGE, フルオログラフィー法で明らかにした。しかし、Isobe & Okuyama による Swank らの系での合成 S-100蛋白の2つのサブユニットへの分離には成功していないので、現在検討中である。S-100蛋白の含量は免疫沈降法やラジオイムノアッセーでの測定によると、ヒト, ラット, マウス, などの動物で生後次第に増加し、成熟動物で最高になることが知られている(2)　一方、S-100蛋白の細胞局在については多くの研究が

Fig.3



S-100蛋白 mRNA レベルの発達による変化。細胞質 poly (A) 含有 RNA による。
S-100蛋白 mRNA レベルは、S-100 incorp. /total incorp. で算出。
図は、成熟ラットの mRNA 活性を100%とした。

Fig.4



ホルムアミド－ショ糖密度勾配遠心による RNA の分画と、S-100蛋白 mRNA 活性。
折線で各画分の RNA 量とヒストグラムで、mRNA 活性を示す。

なされ、相反する所見が報告されている。しかし、最近の注意深い免疫組織化学研究によると、S-100蛋白は、アストログリアのみ局在しているという(1)。これ故、S-100蛋白mRNAの発達期の脳での測定は、アストログリアの発生分化の解析に役立つに違いない。現在までの処、アストログリアの発生分化については、まだ一致した見解に達していないが、Sturrukの研究によると、アカヌスの胎仔16日でグリオブラストからアストロブラストとオリゴデンドロブラストに分化し、それが次第にアストロサイトとオリゴデンドロサイトになっていくという。我々のS-100蛋白mRNAの実験成績は、細胞質RNAでもpoly(A)含有RNAでも、いずれも胎仔より次第に活性が増加し、成熟ラットで最高に達する。この成績は、S-100蛋白含量の変化とよく一致しており、また、S-100蛋白mRNAの出現は、グリオブラスト→アストロブラストの発現に一致しアストロサイトの成熟とよく一致していると考えられる。

ホルムアミドーショ糖密度勾配遠心の結果により、S-100蛋白mRNA活性は、6-8S及び12-18S程度のサイズの所にピークがあることから、S-100蛋白mRNAは、比較的少ないことが考えられる。ピークが二つに分れたことについては、分離が悪いのか、それとも、分子種が二種類あるのか現在検討中である。この分画法では、S-100蛋白mRNAの活性は、3倍程度にしか上昇せず、さらに濃縮の方法を検討している。

〔文　献〕

(1) M.S. Ghamdour, O.K. Langley, G, Labourdette, G, Vincendon, G, Gombos; Dev. Neurosci. 4, 66 (1981)
(2) M.S Ghamdour, G, Labourdette, G, Vincendon, G, Gombos, Den Neursci. 4, 98 (1981)
(3) T. Isobe, T, Nakazima, T. Okuyama. Biochim Biophys. Acta 494, 22 (1977)
(4) T. Isobe, N. Ishioka, T. Okuyama. Eur. J. Biochem; 115, 469 (1981)
(5) J. Mahony, I. Brown. G, Labourdette, A, Marks; Eur, J. Biochem. 67, 303 (1976)
(6) R. D. palmiter; Biochem. 13, 3606 (1974)
(7) 嶋村建司, 高橋泰夫; 神経化学 19, 274 (1980)
(8) C. Zomzely-Neurath, C. York, B. W. Moore; Proc. Nat. Acad. Sci. 69, 2326 (1972)
(9) C. Zomzely-Neurath, W, Walker; Proteins of the Nervous system, 2nd Edit, p.1; Raven Press (1980)

38 培養毛様体神経節ニューロンに働く神経突起伸展因子の精製と性質について

林 要喜知 ・ 郭 哲輝 ・ 東田陽博 ・ 三木直正
（金大・がん研・薬理）

〔要 約〕

培養ニワトリ胚毛様体神経節(CG)ニューロンの神経突起を著明に伸展させる神経栄養因子を，ニワトリ筋胃組織より部分精製した。リン酸緩衝化食塩水で調整した筋胃粗抽出液を，35%飽和硫安により分画し，トリス緩衝化食塩水にて溶解させた。この硫安分画は，CGニューロンの神経突起伸展のみならず，ニューロンの生存維持に対しても著しい促進効果を示した。続いて，DEAE-セルロースカラムクロマトグラフィーを行ったところ，突起伸展と生存維持の両因子は分離した。このとき前者の活性効果は著しく低下していた。しかし，生存維持因子の添加により，再び突起伸展活性が完全に回復した。ニワトリ胚眼球組織中の生存因子[1]をこの突起伸展活性分画に添加した場合でも，同様な回復現象が観察された。以上のことより，CGニューロンの突起伸展には，少なくともニつの因子，即ち，生存維持因子(生存因子)と突起伸展因子が関与すると推察された。突起伸展因子の精製は，さらにDEAE-セファロースCL-6Bカラムクロマトグラフィー，およびセファクリルS-200によるゲル過法を用いて行った。これらの精製過程で，突起伸展因子の分子量は14～18万ダルトンと推定され，精製度は約700倍であった。また、約0.4μg/mlの蛋白濃度で有効な伸展効果が認められた。

Key words： Parasympathetic neurons, Neurotrophic factor, Neurite outgrowth

---

脊椎動物の知覚神経および交感神経系の発生過程に神経成長因子(NGF)が重要な役割を演じていることは良く知られている[5]。現在，運動神経や副交感神経系に作用する同様な神経栄養因子の検索がなされている[2)3)4)8)9)11)12)]。

私達は，先に，ニワトリ筋胃組織中には，培養副交感神経節の分離ニューロンに働き，(1)ニューロンの生存維持[7]，(2)神経突起の伸展[6]，さらには(3)ラット骨格筋細胞との神経筋シナプスの形成[10]などを促進する蛋白性高分子物質が存在することを報告した。

今回，これらの促進効果が同一の因子によるものか否かを明らかにする目的で，まず，突起伸展因子の精製を試みた。その結果，副交感神経節ニューロンの生存維持と突起伸展は，それぞれ別の因子の働きによることが明らかとなった。

<実験方法>

毛様体神経節分離ニューロンの培養： 神経節分離ニューロンは、8,9日齢のニワトリ胚より調整し，ポリオルニチン塗布プラスチック培養皿(well当り,培養液を0.6ml加えた。)に，うえて培養した。培養には，37℃，10%CO_2，90%空気の条件下，10%牛胎児血清(FCS, GIBCO社)を含むDMEM(Dulbecco's modified Eagle's medium)を用いた。神経突起の伸展活性は，筋胃因子あるいは生存因子の添加後，培養16時間目に，全生存ニューロンに対する突起伸展ニューロンの比率で表示した。生存維持活性は，培養開始時のニューロン数に対する生存ニューロンの割合を経時的に調べることにより測定した。

神経突起伸展因子の調整： 約2ヵ月以上の成体ニワトリ筋胃組織を5倍量のPBS(-)(Dulbecco's phosphate-buffered saline without Ca^{++} and Mg^{++})でホモジナイズし，8万×g，1時間の上清分画を，筋胃粗抽出液として以下の精製操作に使用した。なお，組織抽出液を

CGニューロンの培養系に加える場合，充分量のPBS(-)で透析し，その上清(1万×g，30分間)を活性測定に用いた。

眼球抽出液の調整：　孵卵16～20日齢の鶏卵より眼球をとり出し，6倍量の蒸留水でホモジナイズし，10万×g，1時間の遠心により上清を得た。CGニューロンの培養系に添加する場合，口過滅菌(0.45μm)した後，希釈率が20倍になるように加えた。

<結果>

神経突起伸展因子の部分精製：　PBS(-)で調整した筋胃粗抽出液を35%飽和硫安にて塩析し，得られた沈殿物を，粗抽出液の1/5量のトリス緩衝化食塩水(140mM NaCl，10mM Tris-HCl pH 7.5)に溶解させた。同トリス溶液で充分な透析を行った後，DEAE-セルロースに吸着させた。非吸着性蛋白質を溶出した後，250mM NaClを含むトリス緩衝液で一部の蛋白質を溶出させた。突起伸展活性をもつ因子は，1.5 M NaClを含むトリス緩衝液で溶出した(図1)。しかし，この分画中の突起伸展活性は著しく低下していた。次に，この分画を250mM NaClを含むトリス緩衝液で再度透析した後，DEAE-セファロースCL-6Bに吸着させた。同トリス溶液で非吸着性蛋白質を溶出させた後，NaClの濃度勾配(0.25M－1.0M)により，蛋白質の溶出を行った。突起伸展因子は，0.45M－0.65MのNaCl濃度に回収された(図2)。さらに，この分画を濃縮後，リン酸緩衝化食塩水で透析し，セファクリルS-200にてゲル口過クロマトグラフィーを行った。活性因子は，限界排除容積に続く位置に溶出され，見かけの分子量は，14－18万ダルトンと推定された(図3)。

図1

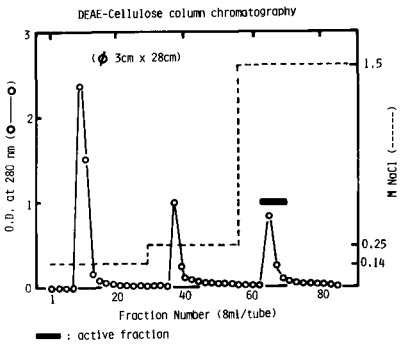


図2

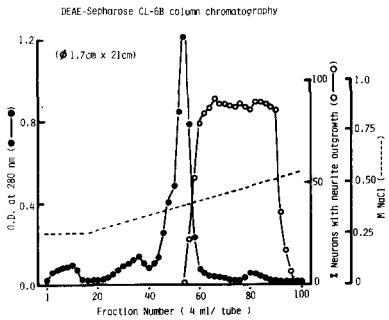
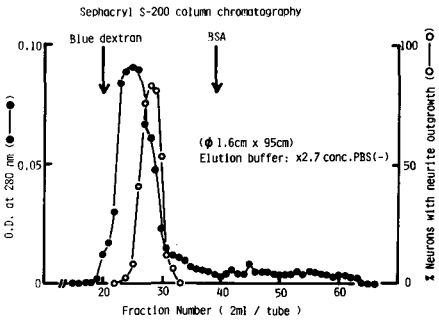
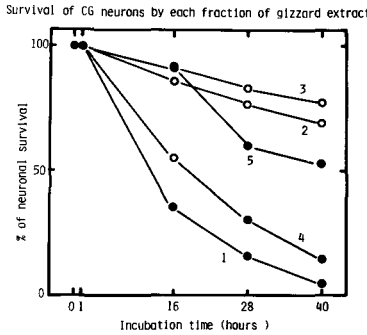


図3



突起伸展因子と生存因子の分離：　筋胃粗抽出液，硫安分画およびDEAE-セルロース分画(1.5 M NaCl溶出分画)を充分量のPBS(-)で透析した後，培養液(10% FCS + 90% DMEM)に等量添加して，CGニューロンを培養した。培養液のみで培養したCGニューロンの生存率は極めて悪く，培養28時間目でほぼ80%以上のニューロンが死滅した(図4)。この間，神経突起の伸展もほとんど観察されなかった。培養液中に粗抽出液あるいは硫安分画を添加した場合，65%以上のニューロンが40時間以上生存し，しかも，培養開始後3時間目頃より突起伸展が認められ，16時間目以降では，神経突起に

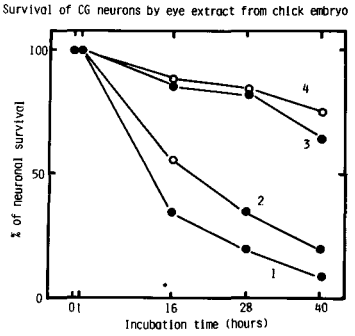
図4-A



1: No addition
2: Supernatant(470 μg/well)
3: Ammonium sulfate(300 μg/well)
4: DEAE-Cellulose 1.5M fraction (110 μg/well)
5: DEAE-Cellulose 0.14M fraction (400 μg/well)

○—○ :Neurite outgrowth was observed.
●—● :No neurite outgrowth was observed.

図4-B



1: No addition
2: DEAE-Cellulose 1.5M fraction (42 μg/well)
3: Eye extract(30 μg/well)
4: DEAE-Cellulose + Eye extract

よるネットワークが形成された。しかし，DEAEセルロース分画(1.5M NaCl溶出分画)を加えた場合，急激な生存率の低下が認められ，しかも神経突起の伸展もわずかに認められるにすぎなかった。

一方，DEAE-セルロースカラムの非吸着蛋白分画(140mM NaCl溶出分画)をPBS(-)にて透析後，培養系に加えると，突起伸展は全く認められなかったものの，ニューロンの生存率は極めて良好であった(図4-A)。そこで，この生存維持活性をもつ分画と，DEAE-セルロースカラムの1.5M NaCl溶出分画(突起伸展活性分画)を共存させたところ，再び著明な突起伸展と，それに続くネットワーク形成が回復した。また，Adler ら[5]は，ニワトリ胚眼球組織中に，毛様体神経節ニューロンの生存因子が存在することを既に報告しているが，この生存因子をDEAE-セルロースの突起伸展活性分画と共存させた場合も，同様な突起伸展回復が確認された(図4-B)。この生存因子(あるいはDEAE-セルロースの生存活性分画)は，CGニューロンの体積増加，ニューロン間での吸着融合，あるいは，伸展開始時の神経突起のbundle化などの変化をひきおこした。

表1　Comparision of Neurite outgrowth factor and Survival factors

	Neurite outgrowth factor from gizzard extract	Survival factor from eye extract	Survival factor from gizzard extract
Neuronal survival	−	+	+
Neurite outgrowth	+	−	−
Molecular weight	14-18 x 10^4	3.5-4.0 x 10^4	3 x 10^4
Stability at 4°C	stable	labile	labile
Fractionation with :			
0-35% $(NH_4)_2SO_4$	++	+	+
35-65% $(NH_4)_2SO_4$	−	+	+
Elution from DEAE-Cellulose column	0.45-0.5 M NaCl	<0.14 M NaCl	<0.14 M NaCl

図5　Dose response curves of each purification step

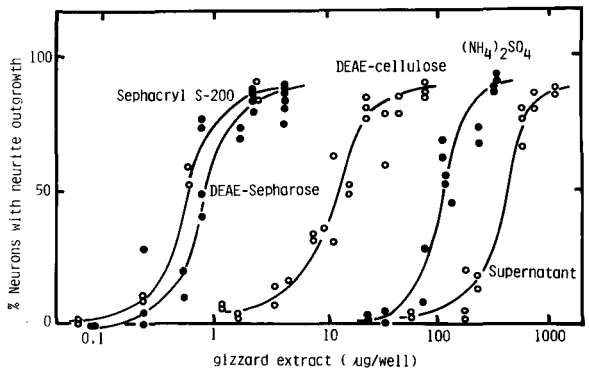


表1に，筋胃粗抽出液中の突起伸展活性因子と生存維持因子，

表2

Summary of partial purification

Fractions	Half maximal neurite outgrowth (μg protein/ well)	Purification fold
Supernatant	400	1
$(NH_4)_2SO_4$	110	3.6
DEAE-Cellulose	11	36
DEAE-Sepharose	0.8	500
Sephacryl S-200	0.55	727

および眼球組織中の生存因子の性質を比較した。

突起伸展因子活性の測定：

生存因子として20倍希釈のニワトリ胚眼球抽出液を添加することで，筋胃抽出液よりの部分精製過程で得られた各分画中の突起伸展活性を測定した(図5)。各分画での最大突起伸展活性値は，ほぼ90％を示した。その半値(45％)の突起伸展活性を示す蛋白量の逆数をとり，比活性として表示した(表2)。その結果，これらの操作で得られた突起伸展因子の精製度は，727倍であり，45％突起伸展活性は，0.55 μg 蛋白質／well (0.6 ml) で認められた。また，回収率は約11％であった。

〈考察〉

筋胃抽出液中の生存維持因子は、眼球抽出液中の生存因子ときわめて類似の分子と考えられる。生存因子は比較的不安定な分子であるため，私達は，短時間で調整可能な後者の因子を用いた。この生存因子存在下で，筋胃由来の神経突起伸展因子の活性を測定すると，約700倍，精製することができた。しかし，ポリアクリルアミドゲル電気泳動法による解析では，主バンドが3本以上認められた。現時点では，副交感神経節ニューロンの神経突起伸展反応に，どれくらいの因子が必要なのかは明らかではないが、本実験より，少なくとも生存維持因子と突起伸展因子の2因子の関与が考えられる。最近，小幡らは，ニワトリ胚脊髄由来の分離ニューロンには，すくなくとも3つの因子が関与して，神経突起の著明な伸展が誘導されると報告している[13]。これらのことは，NGFという単一分子が、交感神経節細胞の成熟・分化に作用しうるという事実と対照的である。

神経突起伸展因子や生存維持因子の作用機作，あるいは，これらの因子の相互作用については，今後さらに各因子の精製および諸性質の検討を進める必要がある。

〈文献〉

1) Adler, R., Landa, K.B., Manthorpe, M. and Varon, S. (1979) Science 204, 1434-1436.
2) Barde, Y.A., Edgar, D. and Thoenen, H. (1980) Proc. Natl. Acad. Sci. 77, 1199-1203.
3) Collins, F. (1978) Proc. Natl. Acad. Sci. 75, 5210-5213.
4) Coughlin, M.D., Bloom, E.M. and Black, I.B. (1981) Develop. Biol. 82, 56-68.
5) Harper, G.P. and THoenen, H. (1980) J. Neurochem. 34, 5-16.
6) 林 要喜知，東田陽博，三木直正 (1980) 神経化学 19, 334-337.
7) 林 要喜知，東田陽博，郭 哲輝，三木直正 (1981) 第59回日本薬理学会近畿部会口演要旨 pp 9.
8) Helfand, S.L., Riopelle, R.J. and Wessells, N.K. (1978) Exp. Cell Res. 113,39-45.
9) Mclennan, I.S., and Hendry, I.A. (1978) Neurosci. Lett. 10, 269-273.
10) Miki, N., Hayashi, Y. and Higashida, H. (1981) J. Neurochem. 37, 627-633.
11) Nishi, R. and Berg, D.K. (1979) Nature 277, 232-234.
12) Obata, K. and Tanaka, H. (1980) Neurosci. Lett. 16, 27-33.
13) Tanaka, H. and Obata, K. (1981) Eighth International Congress of Pharmacology, Abstract pp 811.

39 ラット睾丸の発育における自律神経の役割

村野俊一・永井克也・中川八郎(阪大・蛋白研・代謝)
奥田拓道(愛媛大・医・生化)・絹谷政江(同・解剖)
熊谷　朗(千葉大・医・II内)

〔要　約〕

睾丸の発育における自律神経の役割を検討する為，生後13～26日目のラットの片側睾丸への神経の外科的切断及び片側睾丸被膜下への各種神経遮断剤の局所注入を行なった。生後13日目に行なった神経切断及び6-hydroxydopamineの局所注入は6～10週令のラットの睾丸重量を有意に減少させた。これらの効果はその処置を行なう時期(年令)が遅くなれば少なくなった。組織学的に検討したところ睾丸重量の両処置による減少は精細管の発育障害により，Leydig細胞を含む間質は良く維持されていて，この場合神経の作用は主に精細管の発育に関与する事を示唆した。この除処置側睾丸のtestosteroneの相対含量は増加していた。生後13日目にpropranolol又はatropine処置を受けた21日令のラットの処置側睾丸重量は減少していたが，phenoxybenzamine処置ラットのそれは増加していた。この事実は睾丸の成長に関して交感神経のβ作用と副交感神経が促進的に，交感神経のα-作用が抑制的に作用する事を示唆している。またこれらの神経の作用機序を検討する為，性ステロイド代謝酵素活性を調べたところ，上記の薬剤で睾丸の5α-水素添加酵素活性の減少が起こるが，神経切断の場合にはこの活性減少は認められず，この現象で一元的に睾丸に対する神経の作用を説明出来なかった。

Key words : TESTICULAR GROWTH, AUTONOMIC NERVOUS SYSTEM, TESTOSTERONE METABOLISM.

従来より睾丸の成長と機能に関する視床下部－下垂体－性腺系の重要な役割について数多くの報告があるが，自律神経の役割についての報告は極めてわずかである。Kuntz(7)やTakahashi(10)はそれぞれイヌとモルモットを用いて睾丸へ分布する交感神経を除去すると精細胞の変性と減少を伴なう睾丸の萎縮が起こる事を報告している。更に同様の知見がネコ(5)，ラット(4)で報告されており，ヒトの睾丸でも神経切断による精子形成の減少が報告されている(1,9,11)。しかし乍ら，これらの報告は全て成熟動物についての知見である。そこで私共は外科的神経切断と各種神経遮断剤を用いてラット睾丸の発育における自律神経の役割について検討した。

<実験方法>　生後13から26日目迄のウィスター系雄性ラットをエーテル麻酔下で開腹し，右側の上及び中精神経(N. spermaticus superior et medius)を睾丸へ入る5mm手前で2mm程切除するか，8μlの6-hydroxydopamine(6-OHDA, 4～80mg/kg), propranolol(32mg/kg), phenoxybenzamine(32mg/kg), atropine(32mg/kg)を0.01%アスコルビン酸，ゴマ油，ゴマ油，エタノール，ゴマ油混液(1：3)，にそれぞれ溶かし右側睾丸被膜下に投与した。対照としては左側睾丸を機械的に刺激したものおよび左側睾丸被膜下にそれぞれ8μlの溶媒を投与したものを用いた。一部の動物は生後21日目に屠殺したが，残りは21日目に離乳した後生後6～10週目に屠殺した。屠殺後睾丸及び副生殖器の重量を測定した。組織学的検索は摘出した睾丸をBouin液で固定し，パラフィンを埋後得られた切片をhematoxylin-eosine染色したものについて行なった。testosterone，蛋白及びDNA含量は睾丸を水でホモジェネートしたものを用いて，Testosterone/Dihydrotestosterone kit(RCC, Amersham, Backinghamshire, England)，を用いるradioimmunoassay，Biuret(8)及び螢光法(6)に

てそれぞれ測定した。睾丸の性ステロイド代謝酵素として17β-水酸基脱水素酵素，5α-水素添加酵素，および3α(β)-水酸基脱水素酵素活性をInanoらの方法(2,3)にて測定した。

<結果> 生後13日目より19日目迄の間の睾丸への上位および精神経の外科的切断は6～10週令迄の処置睾丸重量を対照側と比べ有意に減少させた(表1,A)。また生後21日目に手術を行なった群でも減少傾向は認められた。屠殺時期(年令)は異なるが，処置側睾丸重量が対照側のそれの80～50%の重量より低い頻度は手術を行なう時期(年令)が遅くなるにつれて100%から0乃至40%に減少した(表1,A)。更にこれらの変化が神経因子の欠損によるものか否か確かめる為，交感神経終末を破壊する6-OHDA(16mg/kg)を睾丸被膜下に局所注入したところ，この処置もまた睾丸の成長を抑制した(表1,B)。6-OHDAの場合もその処置時期(年令)が遅くなるに従がって睾丸重量の減少および減少頻度が小さくなっている。これらの事実は神経因子が睾丸の成長のある時期に強く作用する事を示唆している。またこれらの処置動物の対照側の睾丸重量は少なくとも6週令迄は同年令の正常動物のそれと差が認められず，代償性肥大は起っていない様である(表1)。生後13日目の上記6-OHDA処置の睾丸成長抑制効果は処置後2日目(生後15日目)に既に認められた。またこの生後13日目の6-OHDAの効果はその投与量に依存して変化することも認められた(図1)。生後13日目に外科的神経切断又は6-OHDA処置を受けた生後6週目のラットの睾丸を組織学的に検討したところ，両者共類似していて，精細胞が変性し，その数が減少し，一部の精細管は破壊吸収されて線維組織に置き代わっており，対照側では活発な精子形成が認められるのに対して，どの精細管にも精子が認められなかった。しかしながら，Leydig細胞を含む間質は対照側と差がなく良く維持されている様である

表1. ラット睾丸重量に対する神経切断および6-hydroxydopamine局所注入の影響

群	動物数	屠殺時期 / 手術時期	体重(g)	睾丸重量(g) 右側	睾丸重量(g) 左側	#右睾丸重量が左睾丸重量より低い頻度 (左睾丸の80%以下)		(左睾丸の75%以下)		(左睾丸の50%以下)	
A. 外科的神経切断											
(1)	3	13D / 9W	279 ± 6	1.69 ± 0.01	0.12 ± 0.02***	3/3	(100%)	3/3	(100%)	3/3	(100%)
(2)	10	13D / 10W	355 ± 7	1.74 ± 0.06	0.25 ± 0.13***	10/10	(100%)	10/10	(100%)	8/10	(80%)
(3)	6	19D / 6W	177 ± 1	0.78 ± 0.05	0.38 ± 0.16*	4/6	(67%)	4/6	(67%)	4/6	(67%)
(4)	7	21D / 9W	297 ± 20	1.49 ± 0.05	1.23 ± 0.09	3/7	(43%)	3/7	(43%)	0/7	(0%)
B. 6-Hydroxydopamine 局所注入											
(1)	8	13D / 6W	205 ± 6	0.98 ± 0.02	0.35 ± 0.06**	8/8	(100%)	8/8	(100%)	7/8	(88%)
(2)	3	13D / 6W	203 ± 7	0.98 ± 0.05	0.47 ± 0.07**	3/3	(100%)	3/3	(100%)	2/3	(67%)
(3)	6	13D / 6W	167 ± 4	0.84 ± 0.02	0.54 ± 0.04***	6/6	(100%)	6/6	(100%)	1/6	(17%)
(4)	8	17D / 6W	180 ± 5	0.97 ± 0.02	0.77 ± 0.02***	3/8	(38%)	1/8	(13%)	0/8	(0%)
(5)	3	21D / 6W	173 ± 13	0.90 ± 0.09	0.81 ± 0.08	0/3	(0%)	0/3	(0%)	0/3	(0%)
(6)	5	26D / 8W	278 ± 7	1.44 ± 0.03	1.26 ± 0.08	1/5	(20%)	0/5	(0%)	0/5	(0%)
C. 正常動物											
(1)	6	- / 13D	21.5±0.8	0.026±0.001	0.025±0.001	0/6	(0%)	0/6	(0%)	0/6	(0%)
(2)	9	- / 6W	180 ± 3	0.73 ± 0.03	0.75 ± 0.04	0/9	(0%)	0/9	(0%)	0/9	(0%)
(3)	4	- / 6W	200 ± 1	1.01 ± 0.05	1.03 ± 0.04	0/4	(0%)	0/4	(0%)	0/4	(0%)

#:同一個体の左睾丸重量を右睾丸重量と個々に比較し，左睾丸重量の80%，75%又は50%より右睾丸重量の低い頻度を分数で示した。括弧内はパーセントの表示。データは平均±標準誤差で示し，統計処理はt-testで行なった。D：日令，W：週令，*：$p<0.05$，**：$p<0.01$，***：$p<0.001$.

った。表2には副生殖器重量及び睾丸の testosterone，蛋白及びDNA含量を示す。副生殖器では外科的神経切断時にのみ副睾丸及び精管の重量減少が認められ，これらの臓器に分布する神経の切断を反映しているのかも知れない。睾丸の testosterone 含量は生後13日目に神経切断又は6-OHDA処置を行なった睾丸では対照側のそれに比べ，絶対含量は少なかったが，相対含量(蛋白当り)ではむしろ増加していた。蛋白及びDNA含量も処置睾丸で減少していた。これらの事実は組織学的所見と一致して処置側睾丸の萎縮，特にLeydig細胞の成長が良く維持されている事を示唆している。次に各種自律神経遮断剤の局所投与の影響を調べてみた。図2は生後13日目に手術又は薬剤を投与したラットの生後21日目の処置睾丸重量と対照側の睾丸重量との比を示しているが，神経切断並びに6-OHDAのほか，β-blocker であるpropranolol又はatropine の投与でも睾丸重量が減少し，α-blocker であるphenoxybenzamine投与では逆に増加する事が観察された。最後に成長に伴なう性ステロイド代謝の各酵素活性は生後13日目から21日目の間に増加するので，生後13日目に上記各処置をした動物の21日令での睾丸の17β-水酸基脱水素酵素，5α-水素添加酵素及び3α(β)-水酸基脱水素酵素等の活性を測定してみた。表3はその結果を示す。睾丸重量及び各酵素活性(mg蛋白当り)は対照側を1とした比として表わした。神経切断比べの各種薬剤の

図1. 睾丸の成長に対する6-OHDA局所投与の影響(生後6週令時)

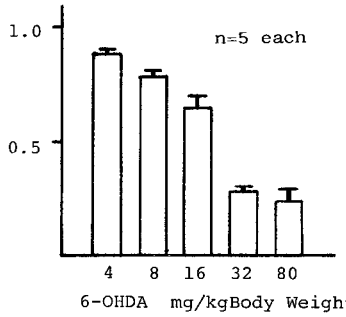


表2. 副睾丸，精管及び精嚢の重量並びに睾丸のテストステロン，蛋白及びDNA含量に対する神経切断及び6-hydroxydopamine局所注入の影響

群	動物数	手術時期	屠殺時期	睾丸の位置	副睾丸重量 (mg)	精管重量 (mg)	精嚢重量 (mg)	睾丸のテストステロン含量 (ng)	睾丸の蛋白含量 (mg)	睾丸のDNA含量 (γMg)
A. 外科的神経切断										
(2)	10	13D	10W	left	430 ± 10	104 ± 7	284 ± 15	13.53±2.38 #(72±12)	180±15	321± 7
				right	190 ± 30***	70 ± 4***	267 ± 18	4.00±1.83** (150±67)	57±28**	122±44**
(3)	6	19D	6W	left	UD	UD	UD	3.48±0.25 (49±11)	100±13	1468± 51
				right	UD	UD	UD	3.88±1.89 (37± 5)	75±21	670±258
B. 6-Hydroxydopamine 局所注入										
(1)	8	13D	6W	left	156 ± 9	37 ± 3	107 ± 5	15.48±1.70 (119±11)	130± 6	556± 24
				right	120 ± 6	33 ± 2	87 ± 5	6.57±1.19* (176±38)*	41±11**	249±91*
C. 正常動物										
(1)	6	-	13D	left	8.8 ±0.9	UD	2.8 ±0.3	1.72±0.30 (635±104)	2.56±0.12	17.7±1.0
				right	8.1 ±0.5	UD	2.7 ±0.5	1.90±0.36 (661±125)	2.75±0.17	18.2±1.3
(3)	4	-	6W	left	162 ± 3	44 ± 3	90 ± 20	3.93±0.36 (35± 3)	112± 8	528± 23
				right	164 ± 5	42 ± 2	93 ± 12	3.84±0.43 (33± 2)	116±11	494± 14

睾丸のテストステロン，蛋白及びDNA含量の測定にはA(2)，A(3)，B(1)，C(1)とC(3)のうちで，それぞれ6，5，3，6，6匹を使用した。残りの睾丸は組織学的検索に使用した。UD：測定せず。#：睾丸のテストステロンの相対含量(pg/mg protein)。

局所投与では5α-水素添加酵素活性の減少及び減少傾向が認められたが，このうちphenoxybenzamine処置では17β-水酸基脱水素酵素活性の増加が認められた。

<考察> 以上の結果は神経因子が睾丸の成長に重要な役割を果している事を示唆している。交感神経(特にβ作用)及び副交感神経は成長に促進的に、また交感神経のα作用は逆に抑制的に作用している様である。交感神経は特に睾丸の精細管の発育に重要であり、その作用は成長のある時期に特に強いことも示唆している。次にこれらの神経因子の成長における役割が果して睾丸における性ホルモンの合成を介しているか否かを検討するため、性ステロイドの代謝酵素活性を測定したところ、神経切断

図2. ラット睾丸の発育に対する諸処置の影響(生後21日目)

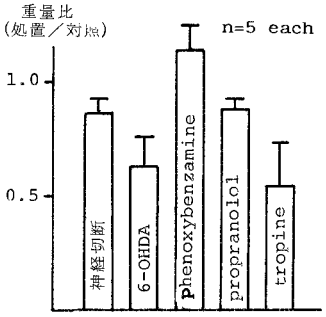


表3. 各種処置ラットの生後21日目の睾丸重量と性ステロイド代謝酵素活性(処置/対照) n=5 each

	睾丸重量比	17β-脱水素酵素	5α-水素添加酵素	3α(β)-脱水素酵素
神経切断	0.85 ± 0.08	1.43 ± 0.22	1.32 ± 0.45	0.96 ± 0.43
6-OHDA	0.63 ± 0.13	0.98 ± 0.18	0.60 ± 0.08	0.85 ± 0.13
phenoxybenzamine	1.14 ± 6.11	1.31 ± 0.59	0.71 ± 0.10	0.81 ± 0.10
propranolol	0.88 ± 0.05	1.00 ± 0.57	0.81 ± 0.29	1.03 ± 0.13
atropine	0.55 ± 0.19	1.12 ± 0.70	0.83 ± 0.33	0.81 ± 0.44

MEAN ± S.D.

を除いて5α-水素添加酵素活性の減少が認められた。これらの事実は6-OHDA, atropine, propranolol 投与による睾丸成長抑制には生物活性の強いdihydrotestosterone合成の減少が関与している事を示唆している。またphenoxybenzamine 投与は5α-水素添加酵素活性を減少させる一方、17β水酸基脱水素酵素活性を増加させ、testosterone合成を増加させるので蓄積を抑制しないのかも知れない。しかし乍ら、神経切断では5α-水素添加酵素活性の減少が認められないことから自律神経因子の成長における役割を一元的にdihydrotestosterone合成促進で説明することは出来ない。その他、神経因子の直接作用、血流調節作用、その他を介している可能性もあり、今後更に検討したいと考えている。

<参考文献>

1. Bandmann, F. (1919) Chirurg. 20, 132-136 2. Inano, H., Hori, Y. and Tamaoki, B. (1967) Ciba Found. Colloq. Endocrinol. 16, 105 3. Inano, H., Tamaoki, B., Hamada, K. and Nakagawa, H. (1980) J. Steroid Biochem. 13, 287-295 4. Khodorovski, G.I. (1965) Sechenov Physiol. J. USSR 51, 1123-1127 5. King, A.B. and Langworthy, O.R. (1940) J. Urol. 44, 74-82 6. Kissane, J.M. and Robins, E. (1958) J. Biol. Chem. 236, 184-188 7. Kuntz, A. (1919) Anat. Rec. 17, 221-234 8. Lane, E.(1957)Methods in Enzymol. 3, 450-451 9. Marconi, P. (1923) Comp. Rend. Soc. Biol. 88, 237-242 11. Vague, J., Bernard, P., Pache, R., Lieutaud, R. and Mattei, A. (1965) Europ. Rev. Endocrin. 1, 309-348

40　ラットグリオーマ細胞中の細胞増殖促進因子

山川洋右(保健衛生大・医・外)・加藤泰治
田中　亮(名市大・医・生化Ⅰ)

〔要　約〕

各種のグリア性細胞(正常グリア芽細胞、C6、LRM-55、354A、G26-20)を用い、その細胞抽出液中に存在する細胞増殖促進因子(GSF)を正常グリア芽細胞のDNA合成促進作用を指標にしてスクリーニングした。全てのグリア性細胞抽出液中にGSF活性が存在し、特にC6及びLRM55に強い活性が認められた。またC6培養液中にもGSF活性が存在した。

C6細胞抽出液中のGSFは20μg/mlの投与で正常グリア芽細胞のDNA合成を3倍に、細胞数を1.5倍に増加せしめ、ひきつづきグリア突起の伸長、ネットワーク形成といった形態的分化を惹起した。さらに、産生細胞であるC6自身の増殖も有意に増加せしめた。この因子の分子量は4万～5万で、等電点5.3の酸性タンパク質である。トリプシン、キモトリプシン、パパイン処理により活性を失い、70℃、5分間の加熱でほとんどの活性を失った。エステラーゼ活性は保持せず、細胞下分画ではミクロソーム分画と可溶性分画に90%以上の活性が存在していた。以上の事実はC6細胞の産生するタンパク質性因子は正常グリア芽細胞の増殖・分化に関与するだけでなく、グリア性腫瘍の自律増殖機構にも何らかの関連を持っていることが推察される。

Key words：
Growth factor, Glioblasts, C6 cell

表1

GROWTH-PROMOTING ACTIVITY IN VARIOUS CELLS

Cell Extracts	Mitogenic Act.	Morphological Trans.
C6	282 ± 46	3+
LRM55	236 ± 36	2+
Glioblasts	163 ± 21	+
G26-20	148 ± 12	-
354A	134 ± 9	-
3T3	160 ± 12	±
3T6	130 ± 16	-
Cond.Med. of C6	137 ± 15	-
Tris-saline	100	-

表2

PROLIFERATIVE RESPONSES TO C6 EXTRACTS

Cell Lines	Proliferative Response (% Increase in DNA synthsis)	Morphological Trans.
Glioblasts	282 ± 46	3+
354A	204 ± 14	3+
C6	160 ± 10	-
LRM55	126 ± 21	-
G26-20	85 ± 7	-
3T3	152 ± 11	2+
3T6	94 ± 3	-
Neuro2a	45 ± 3	-

〈序文〉

一般に成長因子は細胞分化・増殖を促すタンパク質性因子と定義され、従来から神経細胞成長因子(NGF)[2]、表皮細胞成長因子(EGF)[3]、線維芽細胞成長因子(FGF)[5]などが知られている。この他にも血清、胚、肝細胞などのいろいろな生体材料から多数の成長因子類の活性が発見されている。ところで最近、ウイルスでトランスホームした細胞や腫瘍細胞からも成長因子様の物質が産生されている事がわかってきた[8][10]。これらの因子は3T3などの正常細胞の増殖を促進するだけでなく、腫瘍である自分自身の細胞にも作用する事がわかってきた。

そこで演者らは種々のグリア性細胞(正常グリア芽細胞およびグリア性腫瘍細胞)の増殖促進因子産生能の有無について検討し、得られた細胞増殖促進因子(growth stimulating factor, GSF)の生物活性および物理化学的性質を明らかにした。

〈実験材料と方法〉

培養グリア芽細胞の調整：在胎17日目の胎児ラット脳より髄膜を完全に除去し、トリプシン処理後20%FCS含有F-10培地で一次培養を行う。2日後に一度培地交換しひきつづき7日後にプラスティックプレートを用い二次培養を行った。二次培養後2日目に再び培地交換し、実験には一次培養後14日目の細胞を正常グリア芽細胞として使用した。

各種グリア性細胞の培養：次の様なクローン化細胞を全て10%FCS含有F-10培地で培養して実験に用いた。C6はrat astrocytoma, G26-20はmouse oligodendroglioma, LRM55は、rat mixed glioma, 354Aはrat peripheral glioma である。

細胞増殖因子(GSF)の調整法：培養細胞10^8個をTris緩衝液中で2×10^6個/mlに調整、これをPotter homogenizerにてホモゲナイズした後、10,000g, 60分間の遠心上清を、沪過滅菌して粗抽出液とした。タンパク濃度は200μg/mlであった。

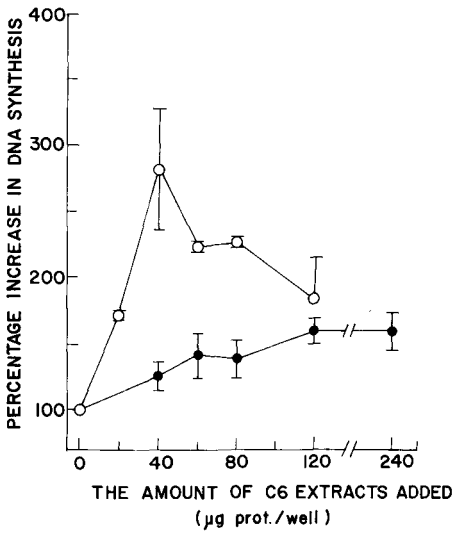
Bioassay：GSF活性は、正常グリア芽細胞および各種グリア性細胞の分裂、増殖能（[^{3}H]-チミジンのDNA内へのとりこみ量の増加、細胞数増加）と細胞自体の形態的変化（グリア突起の伸長）の二つの方法で測定した。

等電点測定法：平板電気泳動装置に10% sucrose および5% Pharmalyte含有SephadexG75のゲルベッドを作成し試料添加後4℃にて16時間一定電力（10W）で電気泳動を行った。泳動後ゲルベッドを5mm巾に切断して分画し各々Bioassayを行った。

〈結果および考察〉

1．各種培養細胞中の細胞増殖促進因子：表1は正常グリア芽細胞をassay細胞とした各種培養細胞抽出液およびC6培養液に含まれるGSF活性を示している。全てのグリオーマ細胞抽出液中にGSF活性が存在し、特にC6およびLRM55に強い活性が認められた。その他の抽出液およびC6培養液にも有意のGSF

図1



(-○-；グリア芽細胞，-●-；C6)

図2

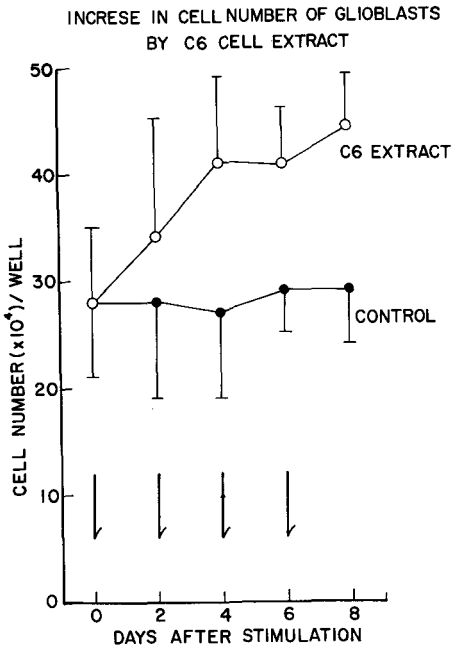
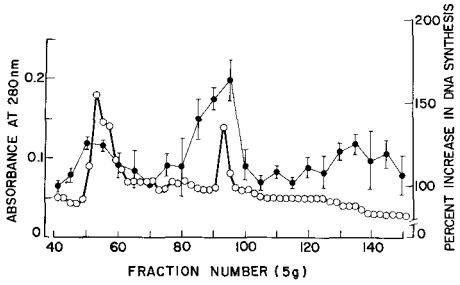
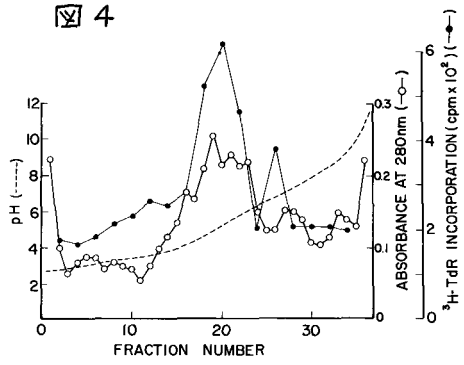


図3



(-○-; 紫外吸光, -●-; DNA合成)

図4



活性が認められた。なかでも、C6培養液中にもGSF活性が認められたことは、C6細胞内で産生されたGSFが積極的に細胞外へ放出されることを意味している。

2. C6由来細胞増殖促進因子に対する各種培養細胞の反応性：表2は前項の実験で最も強いGSF活性を示したC6由来のGSF抽出液に対する各種培養細胞の反応性を示している。G26-20および3T6以外の全ての細胞種はGSF抽出液に対して反応しDNA合成が増加した。特に前項の実験で低いGSF産生能を示し、共に接触阻害性を有する正常グリア芽細胞および354Aが高い反応性を示し、GSF産生能の高いC6およびLRM55がかえって低い反応性を示したことは、膜表面レセプターを含めたGSFの作用機構を理解する上で興味深い。

3. dose response（図1）：グリア芽細胞のDNA合成能はGSF抽出液40μgタンパク/well投与で最大値282%をとり、GSF増量につれて漸減していった。C6細胞は自己が産生するGSFに反応し120μgタンパク/well投与で最大値160%と有意の反応性を示した。またGSFで刺激されたグリア芽細胞の細胞数は刺激後4日で50%増加した。しかしGSF抽出液をさらに連続的に投与してもこれ以上の増加はみられなかった(図2)。

4. 分子量（図3）：Bio-Gel P200によるゲル沪過では、GSF活性はvoid volumeに一致する#55分画(200,000Mr以上)と#93分画付近(40,000～50,000Mr)の2つに分離し、GSF自身の凝集あるいは他のタンパクなどと結合による分子多様性が示唆された。しかし、活性の70%以上が低分子側に観察されることからGSFの推定分子量は40,000～50,000とした。

5. 等電点（図4）：85%以上のGSF活性はpH5.3付近に認められ、等電点はウシ、ブタ脳より得られるグリア細胞成長因子（glia maturation factor、GMF、pI4.73[7]、5.04[6]）と類似しているが、FGF(pI9.5)[5]、血小板由来成長因子(plateletderived growth factor、

PDGF、pI9.5~10.3[9]とは異なっている。なおより中性に近い分画(pI6.0)にも小さな活性が認められるが、この意義については不明である。

6. タンパク分解酵素感受性：表3はGSFの各種タンパク分解酵素に対する感受性を示している。GSF抽出液はtrypsin、chymotrypsin、papain、subtilisin全ての処理によって活性が70~80%低下した。この結果からGSFはタンパク質であり、4種のタンパク分解酵素に対する感受性の差異はないことがわかった。

7. 細胞内局在(表4)：GSF比活性は可溶分画およびマイクロソーム分画で有意に高値を示し、さらに全活性の80%以上が可溶分画に存在していた。各分画の精製度は可溶分画の標識酵素であるlactate dehydrogenase[4]とライソソーム分画の標識酵素であるβ-glucosidase[1]の2酵素で検定した。ライソソーム分画にはGSF活性が少なく、また可溶分画にもライソソーム酵素のβ-glucosidase活性が少ない(全体の4%以下)ことからGSF活性がある種のタンパク分解酵素活性に関係があるのではないかという可能性は否定できた。

以上の結果は、単にグリオーマ細胞(C6)中に増殖促進因子が存在するというだけでなく腫瘍細胞自身がGSFを産生し自己の増殖をさらに加速していることを意味している。

表3

SUSCEPTIBILITY TO PROTEASES

Proteases	DNA Synthesis (cpm)	Remaining Mitogenic Activity
Trypsin	261 ± 9	37 %
Chymotrypsin	231 ± 4	27
Papain	238 ± 5	29
Subtilisin	231 ± 9	27
Gel + C6 extracts	448 ± 32	100
Gel + Tris saline	150 ± 5	0

表4

SUBCELLULAR LOCALIZATION OF GMF-LIKE ACTIVITY

Fraction	Specific Mit. Act. (cpm/60 ug prot.)	Distribution of Act. (%)
Nucleus	255 ± 23	2.1
Mitochondria	286 ± 19	5.8
Lysosome	223 ± 28	1.3
Microsome	353 ± 30	14.1
Supernatant	517 ± 55	76.7
Control	160 ± 25	—

〈文献〉

1. Beck, C., & Tappel, A. L. (1968) Biochim. Biophys. Acta 151, 159-164
2. Cohen, S., Levi-Montalcini, R., & Hamberger, V. (1954) Proc. Nat. Acad. Sci. USA 40, 1014-1018
3. Cohen, S. (1962) J. Biol. Chem. 237, 1555-1562
4. Euler, H., Albers, H., & Schlenk, F. (1936) Hoppe-Seylers Z. Physiol. Chem. 240, 113-126
5. Gospodarowicz, D. (1975) J. Biol. Chem. 250, 2515-2520
6. Kato, T., Chiu, T.-C., Lim, R., Troy, S. S., & Turriff, D. E. (1979) Biochim. Biophys. Acta, 579, 216-227
7. Kato, T., Fukui, Y., Turriff, D. E., Nakagawa, S., Lim, R., Arnason, B. G. W., & Tanaka, R. (1981) Brain Res. 212, 393-401
8. Shields, R. (1978) Nature 272, 670-671
9. Taylor, J. M., Mitchell, W. M., & Cohen, S. (1974) J. Biol. Chem. 249, 2188-2194
10. Todaro, G. J., & De Lacro, J. E. (1978) Cancer Res. 38, 4147-4154

41 ラットグリア芽細胞由来の神経芽腫増殖抑制因子(NGIF)の同定

城崎 由紀夫(名市大・医・外II)・加藤 泰治(同・生化)・角岡 秀彦
正岡 昭(同・外II)・田中 亮(同・生化)

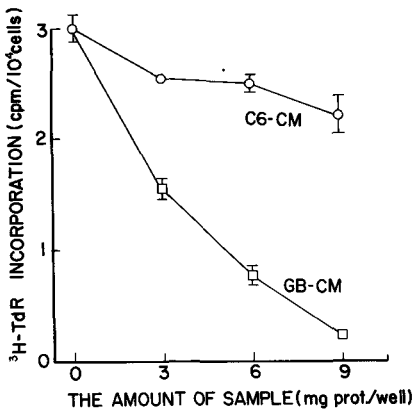
〔要 約〕

グリア芽細胞由来の神経芽腫細胞増殖抑制因子(NGIF)は、マウスC-1300由来の神経芽腫細胞(Neuro2a, NS-20Y, NIE-115)に形態的分化を惹起し、DNA合成及び細胞数増加を抑制する。これらの作用は細胞毒性を伴わない。また、ラットグリオーマ細胞(C6及び354A)や線維芽細胞(3T3)の増殖には何らの変化をもたらさず、その作用が神経系細胞に特異的かつ生理的である事が示唆された。

細胞内c-AMP, c-GMP値には、有意の変化が認められなかったが、神経伝達物質に関連した酵素(Cholineacetyl transferase : CAT, Dopamine-β-hydroxylase : DBH)の活性変動では、CAT値の上昇がNS-20Yに、DBH値の上昇がNIE-115にそれぞれ有意に認められた。高濃度血清(25%以上)は、NGIFのもつDNA合成阻害作用を消去し、血清中のNGIFに対する阻害因子の存在が示唆された。In vivo実験では3種クローン細胞共、延命効果にのみ有意な延長が認められた。Bio Gel P-200を用いたゲル濾過法によるNGIFの推定分子量は、10万、等電点は5.8である。また、NGIFのプロテアーゼに対する感受性は、パパイン処理にて、その活性が最も強く消去されるが、トリプシン, キモトリプシン, サブチリシンでは抵抗性を示した。熱処理(80°C, 20min)で50%以上の活性を失った。

Key words : Neuroblastoma, Glioblasts, Growth inhibition

図1.



〈序 文〉

"神経芽腫細胞内の低c-AMP状態が無制限の腫瘍性増殖をひき起こす大きな原因の一つである"[3]という概念に立って、私共はこれ迄、神経芽細胞腫の分化誘導療法に関し、in vivo, in vitroにわたり幾多の研究を進めてきた[1)4)8)]。しかし、これまで使用してきた分化誘導剤(PGE$_1$, BL 191, Paparerine等)は非特異的で副作用が強い事、或いは性質を異にする多数の細胞クローンよりなる神経芽細胞腫が分化誘導剤に対して均一な反応性を示さない事[2)7)]等の問題点より、分化誘導療法の臨床的応用には今までとは異った側面からのアプローチが必要となってきた。

今回、私共は一連の「グリア細胞の増殖と分化」の研究を進める中で、偶然正常グリア芽細胞がconditioned mediumに、神経芽腫細胞の増殖を著明に抑制する物質を分泌する事を見い出した(図1)。この物質はMonardらのglial factor[6)]とは異り、形態的分化だけでなく強い細胞増殖抑制作用をもつこと[5)9)]から、これを神経芽腫細胞増

殖抑制因子(Neuroblastoma growth inhibitory factor: NGIF)と命名し、以下この因子の部分精製及び物理化学的同定を行った。

〈実験材料と方法〉

培養グリア芽細胞の調整：在胎17日目の胎児ラット脳より髄膜を完全に除去し、トリプシン処理後20%FCS含有F-10培地で一次培養を行う。2日後に一度培養液交換しひきつづき7日後にプラスチックトレイを用いて二次培養を行った。そして二次培養後2日目に再び培養液交換した。

神経芽腫細胞及びC6,354A,3T3細胞の培養：マウス神経芽腫C-1300よりクローン化された Neuro2a, NS-20Y, NIE-115の各クローンの継代培養は10%FCS含有Dulbecco's MEM培地にてフラスコ内で行い、培養条件は37°C, 5% CO_2 下である。実験使用の際は、0.1%トリプシンにて剥離採集し、グリア芽細胞の二次培養と同じトレイに移して行った。C6, 354A, 3T3細胞の培養は、10%FCS含有F-10培地を用いる他は神経芽細胞腫と全く同様にした。

Bioassay：本因子の活性は、神経芽腫細胞の分裂・増殖能(^{3}H]チミジンのDNA内への取り込み量、細胞数増加の変動)と、細胞自体の形態的変化(プラスチック面に付着した神経芽腫細胞が多極性の神経突起を形成)で測定した。

NGIFの調整：前記グリア芽細胞の一次及び二次培養液について行う。集められた培養液を蒸留水にて24hr透析後、10000g 60min.遠心し、低分子浮遊片を除く。得られた遠心上清は限外沪過にて20倍濃縮後、沪過滅菌し実験に使用した。なおタンパク濃度(Folin Lowry's method)は60mg/mlに調整し実験に使用した。

In vivo実験：(A)培養後2日目と3日目の神経芽腫細胞に培養液交換と共に本因子投与(1.0ml/75cm²シャーレ)し、4日目に剥離採集し、直ちにA/Jマウス背面皮下へ2×10^6個(生細胞)移植、観察した。(B)培養後2日目と3日目に培養液交換のみ行い、4日目に剥離採集後、(A)と同様にマウスへ移植し、その後24hr目より本因子

図2.

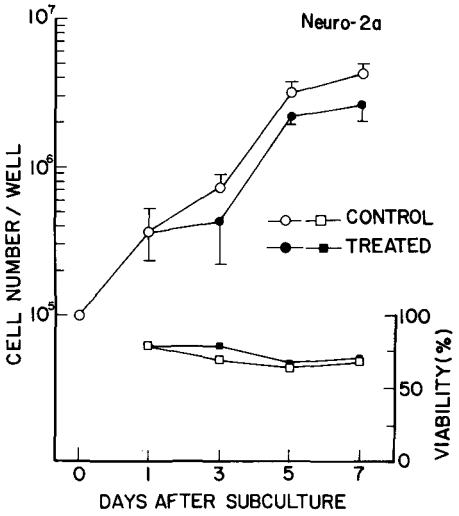


図3.

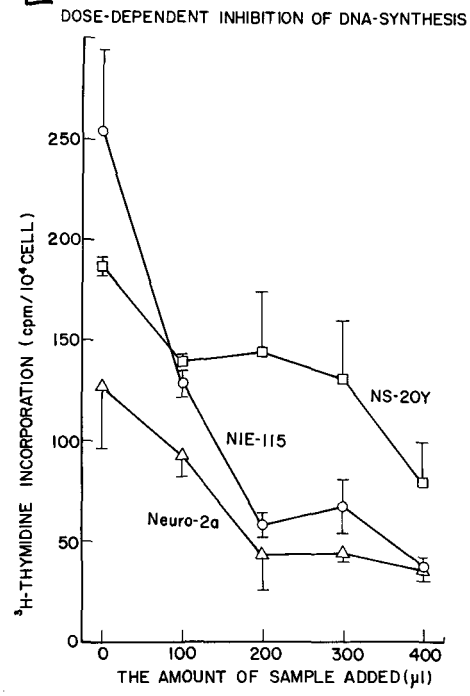


表1.

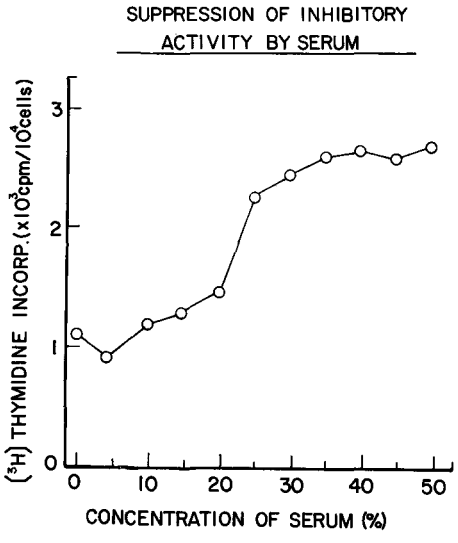
INTRACELLULAR LEVEL OF cAMP & cGMP

CELL LINES	cAMP* CONTROL	cAMP* TREATED**
Neuro2a	24.3	26.5
NS-20Y	23.1	33.1
NIE-115	42.4	25.6

CELL LINES	cGMP* CONTROL	cGMP* TREATED**
Neuro2a	18.6	25.0
NS-20Y	27.2	13.4
NIE-115	15.0	8.2

* pmol/mg protein.
** Treated with conditioned medium of glioblasts.

図4.



を背面皮下へ 100μl/回. 2回/日注射し、死亡まで観察した。

〈 結果及び考察 〉

1. 形態的変化：3種クローン細胞共、対照群に比して処置群ではいずれも、細胞の胞体、核共に大きく紡錘形、多極構造となり、いわゆる形態的分化が惹起された。

2. 細胞数増加の抑制：3種クローン細胞共、処置群では有意に細胞数増加が抑えられる。また、viabilityには有意差は認めなかった(図2.)。

3. DNA合成の抑制：3種クローン細胞共、処置群では有意にDNA合成抑制が認められた。しかし、1.~3.の変化はグリア系細胞(C6.354A), 3T3には認められず、NGIFは神経系腫瘍細胞にのみ特異的にその効果を発現し、他の正常細胞及びグリア系細胞に影響を与える事なく腫瘍性増殖を抑制する事が推測された(図3.)。

4. 細胞内C-AMP, C-GMP量：3種クローン細胞共、処置群の細胞内C-AMP, C-GMP量には有意の変動は認めなかった。この事はNGIFによる増殖抑制誘導機構が、両ヌクレオチドにはindependentな系を介している事を示唆している(表1.)。

5. CAT, DBHの変動：CAT値の有意な上昇はNS-20Yに、DBH値の有意な上昇はNIE-115にそれぞれ認められた。

6. 血清によるNGIF活性の阻害：培養後2日目のNeuro2aを用い、その培養液中の血清(FCS)濃度を0~50%と漸増させ、同時に一定量のNGIF(100μl/well)を投与し、DNA合成の阻害を測定すると、25%以上の高濃度血清は、NGIFのDNA合成阻害作用を消去する事がわかった。この事より、血清中にはNGIFに対する何らかの阻害因子が存在する(図4.)。

7. Bio Gel P-200 column：本因子の活性はフラクション#55の溶出画分を中心に認められ、予め得た標準試料による検量線に照合し分子量約10万を求めた(図5.)。

8. 平板等電点分画法：広pH域(3.5~10)のAmpholineを用い、5%pharmalyte含有Sephadex G-75

(Pharmacia) のゲルベッドを作成し、試料添加後 4°C にて 16 hr. 一定電力 (10 W) で電気泳動を行った。本因子活性は pI 5.8 を中心に認められ他には全く認めなかった。

9. プロテアーゼへの感受性：固定化パパイン処理にて、その活性が最も強く消去され、トリプシン、キモトリプシン、サブチリシンでは抵抗性を示した。

10. 熱安定性：NGIF は熱に対しては不安定性で、80°C, 20 min で 50% 以上の活性を失った。

11. In vivo 実験：3種クローン細胞移植マウスの (A)(B) 両処置群に、有意な延命効果が得られた。特に、in vitro 処置群よりもマウスへの直接投与による in vivo 処置群の方がその効果は高い (表2.)。

以上、NGIF の生物学的活性と物理化学的性質を検討し、この物質が神経芽腫細胞の増殖を阻害する新しいタンパク性因子である事を明らかにした。現在さらに、DEAE Sephacel, ゲル ろ過法等を用いて本因子の完全精製を試みている。

図5.

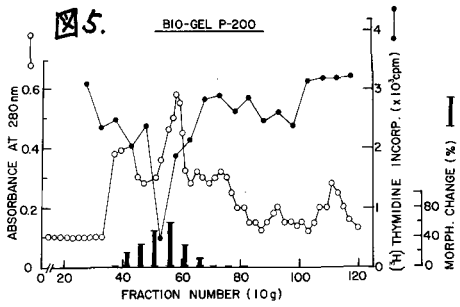


表2.

MEAN SURVIVAL TIME OF MICE INOCULATED

	CONTROL	TREATED A	TREATED B
Neuro-2a	23.4 ± 0.9	24.6 ± 0.6 (P<0.01)	25.3 ± 0.7 (P<0.001)
NS20Y	21.0 ± 1.6	23.0 ± 1.1 (P<0.01)	23.9 ± 1.0 (P<0.001)
NIE-115	26.7 ± 1.2	27.1 ± 0.4 (N.S.)	28.3 ± 0.2 (P<0.001)

A: 2×10^6 cells treated with factor were injected s.c. into A/J mouse.
B: Mice inoculated with 2×10^6 control cells had an injection of factor twice a day.

< 文　献 >

1. 舟曳純一, 角岡秀彦, 佐々木信義他：神経芽細胞腫-分化誘導療法の基礎と臨床的考察. 小児外科, 11：1261-1269, 1979.
2. Helson,L.,Helson,C.,Lai,K.B. et al. (1974) Proc.Am.Assoc.Cancer 15,172
3. 今宿晋作, 東道伸二郎：腫瘍の分化誘導療法. 小児内科, 11：1223-1231, 1979.
4. 加藤 治, 角岡秀彦, 舟曳純一他：神経芽細胞腫の分化誘導療法の基礎的研究－PGE1, DBcAMP, BL191 による in vitro 実験, 日小外誌, 17：493 (抄), 1981.
5. Kato,T.,Yamakawa,Y.,Sakazaki.,Ito,J.,Kato,H.,Tsunooka,H.,Masaoka,A.,and Tanaka,R. Brain Res. (in press)
6. Monard,D.,Solomon,F.,Rentsh,M.,and Gysin,R.(1973) Proc.Natl.Acad.Sci.USA 70,1894-1897
7. Prasad,K.and Hsie,A.W.(1971) Nature New Biol. 233, 141-142
8. 角岡秀彦, 舟曳純一, 加藤 治他：神経芽細胞腫の分化誘導療法の基礎的研究, 日小外誌, 16：393 (抄), 1980.
9. Yamakawa,Y.,Kato,T.,Kato,H.,Naganawa,N.,Funabiki,J.,Tsunooka,H.,Masaoka,A.,and Tanaka,R. 日本癌学会誌 (第39回), 609 (抄), 1980.

42 ラット脳ミエリンの5'-nucleotidase活性

小嶋久子・玉井洋一(北里大・医・生化)

〔要　約〕

ラット脳のミエリンが5'-nucleotidase活性を持ち、ミエリン形成と本酵素活性の変動が相関する事が明らかとなったが、本酵素のミエリンにおける存在意義を検討するために、ラットを使って以下の実験を行った。(1)脳ではミエリン形成期より5'-nucleotidase活性が増加し始め、その活性はミトコンドリア画分ミエリンに高い。一方坐骨神経では活性を認める事が出来なかった。(2)実験的アレルギー性脳脊髄炎の脳のミエリンは組織学的には崩壊を示さなかったが、ミトコンドリア画分のミエリンにおける5'-nucleotidase活性の上昇が顕著であった。(3)トリエチル錫による脳浮腫からの分離ミエリンについて検討すると、5'-nucleotidaseの活性が上昇し、ミトコンドリア画分のミエリン量が増加した。(4)核画分とミトコンドリア画分の精製ミエリンについて、Agrawalらの方法に従ってミエリン細分画を試みたが、5'-nucleotidaseの局在膜を分けることは出来なかった。(5)以上の結果より、5'-nucleotidaseはミエリン膜内で偏在している可能性が強く、更にラット脳のミトコンドリア画分に回収されるミエリンは、ミエリン形成時やミエリン損傷後の修復機転の際に増加し、それに伴って5'-nucleotidase活性が上昇するのではないかと考えられた。

Key words :
5'-Nucleotidase, Central Nerve Myelin, Peripheral Nerve Myelin

5'-Nucleotidaseが脳の精製ミエリンに存在することが生化学的[3]、組織化学的[7]研究により報告され、本酵素のミエリン局在はほぼ明らかとなって来た。我々もミエリンの精製に伴って比活性が上昇する事を昨年度の本学会で報告した[6]。ところでEichbergらの方法で調製されるミエリンは組織をホモジナイズした時の膜の大きさの違いによって遠心によりP_1(核画分)とP_2(ミトコンドリア画分)に分別される。P_1とP_2よりそれぞれ蔗糖密度勾配遠心、低張ショックを組み合わせて精製したミエリンは形態学的にも、またタンパク組成、脂質組成も変わらない。しかし核画分からのミエリンとミトコンドリア画分からのミエリンでは5'-nucleotidaseの比活性に相異がある事もわかった[6]。ミエリンを蔗糖密度勾配遠心にかけると軽い成分から重い成分まで比重にかなりの差があり、このミエリン分離法の違いによる構成成分の多様性は充分に考えられる事である。今回我々は核画分とミトコンドリア画分ミエリンの5'-nucleotidase活性についての詳しい検索、又中枢ミエリンと末梢ミエリンとの活性の比較、ならびにミエリン障害時の本酵素活性の変動についての検討を進め、5'-nucleotidase局在の点からミエリンの不均一性について考察をしたのでここに報告する。

—実験材料と方法—

<u>実験に使用した組織</u>　Wistar系ラットを心臓より生理食塩水で灌流した後、断頭して脳を採取、大脳部を実験に使用した。同時に断頭後のラットより坐骨神経を取り出した。実験的アレルギー性脳脊髄炎(EAE)はHartley系モルモットの白質ホモジネートをFreundの完全adjuvantと共にLewisラットに接種して発症させた。同様にして生食灌流後、脳と

脊髄を取り出し、各々一部をホルマリン固定して組織学検査に供した。Triethyltin-induced edemaはTriethyltin chlorideを1mg/ml/kg体重の割合でWistar系ラットに腹腔内注射をし、24時間目に5mg/ml/kg体重を追加し、48時間目に生食灌流して断頭、大脳を採取した。

ミエリンの分離　ミエリンの分離はEichberg ら[4]の方法とNorton ら[12]の方法を組み合わせて行なった。組織をDounce型テフロンホモジナイザーを用い、0.32M蔗糖でホモジナイズする。ホモジネートを1000×g, 10分遠心して粗核画分(P_1)、その上清を13,500×g, 15分遠心して粗ミトコンドリア画分(P_2)を得る。P_1とP_2を各々0.32M蔗糖でホモジナイズし、2.85M蔗糖上に重層して75,000×g, 30分遠心し0.32M/0.85Mの界面より粗ミエリンを得る。低張ショック2回行った後、もう一度0.32M/0.85M不連続蔗糖密度勾配遠心を75,000×g, 30分行なって精製ミエリンを得た。坐骨神経のミエリン分離は、組織を鋏で細切し、ガラスホモジナイザーを使って0.32M蔗糖ホモジネートを作り、P_1とP_2に分けずにNortonらの方法[12]で調製した。

タンパク質と酵素活性の測定　タンパク質の定量はLowry ら[10]の方法によって行なった。ミエリンの遠心図型はISCO-density gradient fractionatorを使い280nmの吸収を測定した。5'-Nucleotidase活性はほぼMichell ら[11]の方法に従ったが、遊離した燐はFiske-SubbaRow法[5]にて定量した。

病理組織学的検索　EAEラットの病理学的組織像の検索は、10%ホルマリンで固定した組織をヘマトキシリンエオジンで染色し、検鏡した。

—実験結果と考察—

(1)中枢と末梢神経組織における5'-nucleotidase　Schwann cellのplasma membraneに起源を持つ末梢神経ミエリンの5'-nucleotidaseの存在を確認した。ミエリン形成期とadultのラットについて坐骨神経よりミエリンを分離し、5'-Nucleotidase活性を測定したところ、表1に示すように活性を認める事が出来なかった。一方脳ではミトコンドリア画分からのP_2(M)ミエリンではミエリン形成期よりadultになるまでほぼ一定の比活性値を示した。これはoligodendroglia細胞膜画分の5'-nucleotidase比活性値[7]とほぼ同じかやや高い値であった。核画分からのP_1(N)ミエリンではミエリン形成期には活性値が低いが、漸時増加してadultではP_2(M)ミエリンの1/2～2/3の比活性値を示した。

表1　5'-Nucleotidase activities in rat brain and sciatic nerve myelin.(μmol/h/mg prot.)

Age(days)	16	21	27	100	300
Sciatic nerve	0	0	0	0	0.9
Brain P_1(N)	n.d.	0.5	0.5		2.3
P_2(M)	2.3	4.5	4.7		4.6

n.d., not determined.

(2)ミエリン障害時の5'-nucleotidase活性　5'-Nucleotidaseのミエリン局在とその存在意義を明らかにするためには、ミエリン障害時の本酵素活性の変動を調べることも重要な情報を提供すると考えられる。そこでミエリンに障害を起こさせる試みの一つとして実験的アレルギー性脳脊髄炎(EAE)とトリエチル錫(TET)による脳浮腫をラットに惹起させた。細胞性自己免疫疾患のモデルとして注目されているEAEは近年その抗原の誘起機構がかなり明らかとなってきている。ミエリン塩基性タンパクやペプチドを抗原とした場合と全脳やミエリンを抗原とした場合とでは発症機構が異なり、脱髄抗体の抗原はミエリン膜のgalactocerebrosideである。galactocerebrosideを多量に含むモルモットの白質を

Freundの完全adjuvantと共にEAE感受性のLewisラットに皮内接種してEAE発症実験を行なった。接種後14日頃より15匹のうち11匹に著しい体重減少が起こり、内2匹は後肢に麻痺が現われた。4匹は20日目頃より回復に向った。症状の一番ひどかった3匹をA群、中等度の症状を示した4匹をB群、回復に向かった4匹をC群とした。脳の組織学的検索では視床の小静脈周辺に細胞浸潤が見られ、一部はロバン腔を越えて脳実質に浸潤していた。但しこのような炎症所見は灰白質に限局し、白質の病変は無く、ミエリンの崩壊は見られなかった。脊髄についての組織検査は進行中である。表2にA, B, C群についてのP(N)とP2(M)ミエリンの5'-nucleotidaseの比活性値を示す。表より明らかなように、症状の程度に関係なくミエリンにおける比活性が上昇し、特にP2(M)ミエリンにおいてその上昇が顕著であった。

表2 5'-Nucleotidase activities of EAE rat brain myelin. (μmol/hour/mg protein)

	EAE-A (3)	EAE-B (4)	EAE-C (4)	Control (2)
Age(days)	98	130	137	102
Homogenate	1.7	1.3	1.1	1.2
P_1(N)myelin	3.3	2.6	n.d.	2.7
P_2(M)myelin	6.1	7.9	6.2	3.6

The numbers of samples analysed are shown in parentheses.
n.d., not determined.

次にミエリンのタンパク量と5'-nucleotidaseのtotal活性のホモジネートに対する回収率を表3と表4に示す。表3の(2)に示すようにEAEラットではP1(N)ミエリンのタンパク量がcontrolに比べて減少しており、それが表4(2)のEAEのP1(N)ミエリンのtotal活性の減少となっている。表には示さなかったが、EAEラットの脊髄からもP1(N)ミエリンとP2(M)ミエリンを分離し5'-nucleotidase活性を測定した。ミエリンは大部分がP1(N)に回収され、その酵素活性は脳に比較的近い値であった。EAEの実験では、組織学的にはミエリンは侵されていないが、ミエリン画分の5'-Nucleotidase活性が上昇し、特にP2(M)ミエリンにおいて顕著であるという生化学的変化が起っていることが示唆された。

表3 Distribution of protein content in rat brain. Values are expressed as % of the protein content in myelin fraction, recovered from brain homogenate.

(1) Wistar rat

	Control			TET
Age(days)	21	27	300	120
Homogenate	100	100	100	100
P_1(N)myelin(%)	0.3	1.4	7.8	6.7
P_2(M)myelin(%)	0.4	1.0	1.9	6.0

TET, Triethyltin-induced edema

(2) Lewis rat

	Control		EAE		
			A	B	C
Age(days)	102	390	98	130	137
Homogenate	100	100	100	100	100
P_1(N)myelin(%)	6.2	8.7	4.5	5.6	3.6
P_2(M)myelin(%)	3.6	3.6	4.6	3.6	3.0

ミエリン障害のもう一つの実験としてTET中毒法を用いて脳浮腫を作成した。TETは中枢神経系のミエリン膜のsplitを引き起こし、形態的に白質変性疾患のモデルと考えられる。[13] 我々はTorack ら[14]、駒井ら[15]の方法を参考にしてTETの腹腔内投与による急性中毒実験のみを行った。臨床的には著明な四肢麻痺を呈した。分離ミエリンのタンパク量と5'-nucleotidaseのtotal活性のホモジネートに対する回収率を示したのが表3の(1)と表4の(1)である。EAEと同様にP2(M)ミエリン量が増加し、5'-nucleotidase全活性は増大したがcontrol実験として本酵素自体に対するTETの影響を見ていないので、現時点での結論は避けたい。

(3) ミエリンの細分画　5'-Nucleotidase活性のミエリン内局在を更に明確にするために、

表4　Distribution of 5'-Nucleotidase activity in rat brain. Values are expressed as % of the total activity in myelin fraction, recovered from brain homogenate.

(1) Wistar rat

	Control		TET	
Age(days)	21	27	300	120
Homogenate	100	100	100	100
P_1(N)myelin(%)	0.4	1.2	14.6	26.2
P_2(M)myelin(%)	0.9	8.5	7.3	14.6

TET, Triethyltin-induced edema

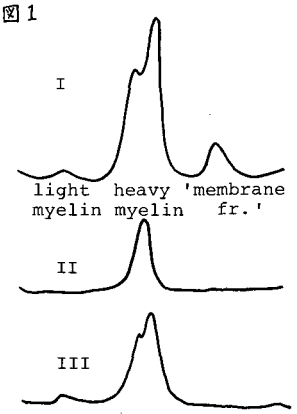
(2) Lewis rat

	Control		EAE		
			A	B	C
Age(days)	102	390	98	130	137
Homogenate	100	100	100	100	100
P_1(N)myelin(%)	14.6	16.1	8.7	11.7	n.d.
P_2(M)myelin(%)	11.0	12.5	16.3	22.6	16.5

P_1(N)ミエリンとP_2(M)ミエリンの細分画を試みた。精製したP_1(N)とP_2(M)各ミエリンをAgrawal ら[2]の方法に従って0.88M, 0.85M, 0.75M, 0.55M, 0.32M蔗糖の不連続密度勾配遠心を行ったのが図1の遠心図型である。Iはtotalミエリンを Agrawal らの方法に従って再分画したもの。'membrance fr.'はいわゆるミエリン様分画である。IIのP_1(N)ミエリンはheavy myelinに相当するバンドのみで、IIIのP_2(M)ミエリンはlight myelinに相当するバンドが濃厚に検出され、'membrane fr.'は薄い。この細分画ミエリンの5'-nucleotidase活性を測定すると、heavy myelinにのみ活性が認められた。つまり5'-nucleotidaseはミエリン膜に固く結合しており、この遠心分画法では酵素の内在膜を分けることは出来なかった。

ところでTETやEAEラットで観察されたP_2(M)ミエリン画分のタンパク回収の増加などのように解決できるであろうか。P_2(M)ミエリンが"活性ミエリン"を含んでいて、それが組織をホモジナイズする時に、より壊れ易く小さな分子となり易いのではないだろうか。また表3からP_2(M)/P_1(N)の比を見ると、P_2(M)ミエリンのミエリンタンパクとしての割合がミエリン形成時には高いが、日令がすすむと共に減少することや、ミエリン損傷時には、これが増加していることより、P_2(M)ミエリンはミエリン形成およびミエリンの修復機転に伴って増加することが考えられる。更にこのようなタンパク合成に関連して5'-nucleotidase活性が上昇するのではないだろうか。何部ら[11]もミエリンのちぢみ現象に関連して、5'-nucleotidase, CNPase, Na^+, K^+-ATPaseが核分画よりもミトコンドリア分画ミエリンに少し高い活性を示す事を報告している。ミエリン形成や再ミエリン形成における5'-nucleotidaseの役割りを明らかにするために、ミエリン障害動物を用いた研究を進めている。

図1



Centrifugal profiles of myelin subfractions.
I. Total myelin, II. P_1(N) myelin, III. P_2(M)myelin

(謝辞) EAEラットの組織学的検索は、石原好弘博士(都神経研)の御好意を得ました。TETは、佐武明教授(新大脳研)から提供されました。

文献

[1.] Abe, T., et al (1976)神経化学 15,180-183 [2.] Agrawal, H.C.,et al(1974) Biochem. J. 140,99-109
[3.] Cammer, W.,et al (1980) J.Neurochem. 35,367-373 [4.] Eichberg, J., et al(1964) Biochem. J. 92,91-100
[5.] Fiske,C.H. and SubbaRow,Y.(1925) J.Biol.Chem. 66,375-400 [6.] Kojima,H. and Tamai,Y.(1980)神経化学 19,310-313 [7.] Kojima,H. et al(1980) J.Biochem. 88,1615-1622 [8.] Komai,Y. et al (1971)脳と神経 23,251-258
[9.] Kreutzberg,G.W. et al(1978) Brain res. 158,247-257 [10.] Lowry,O.H. et al(1951) J.Biol.Chem. 193,265-275
[11.] Michell,R.H. et al(1965) Biochem.Biophys.Res.Commun. 21,333-338 [12.] Norton,W.T.and Poduslo,S.E.(1973) J.Neuro.Chem. 21,749-757 [13.] Norton,W.T.(1977) Myelin(Plenum Press,New York) 383-413 [14.] Torack,R. et al (1970) Int.Rev.Neurobiol. 12,45-86

43 両生類神経組織における糖脂質とミリエン蛋白の多様性

斉藤 信太郎(山梨県立中央病院・精神)
小嶋 久子 ・ 玉井 洋一(北里大・医・生化)

〔要 約〕

両生類5種の神経組織についてミエリンの主要構成成分であるCerebrosideとSulfatideの組成，ミエリン蛋白の種類，CNPase活性を分析し，得られた結果を系統発生と対応して考察した。1) CMH, CSEの長鎖塩基(LCB)組成に他の脊椎動物と異る著しい特徴が観察された。即ち分枝鎖LCBの存在，飽和LCBに富み，奇数鎖LCBの存在などは両生類に共通していた。2) CMH, CSEの直鎖脂肪酸は24:1が最主要成分で24:0は微量であった。ハイドロオキシ酸も24h:1が主成分であった。3) 有尾類はハイドロオキシ酸を含むCMHが微量か，又は欠くことが特徴で，この点で無尾類と大きく異っていた。4) ミエリン蛋白組成はproteolipid protensとDM-20に近い蛋白，Wolfgram蛋白よりやや高分子の蛋白の三つが主要成分で，哺乳類にみられるミエリン塩基性蛋白に相当するバンドは極めて微量であった。又蛋白組成は両生類間でも大きな差が見られた。5) CNPase活性は種による違いが顕著であった。

以上の結果からミエリンの主要構成成分が両生類間でも，極めて多様性に富んでいることがわかった。

Key words : Glycolipids, Myelin proteins, Amphibian nervous system

---

脊椎動物神経組織の主要な構成成分の一つである糖脂質は，その化学構造や分布が動物の種類や発育段階，神経組織の部位などにより，きわめて多様性に富んでいる。神経組織における糖脂質の機能的意義を探るために，神経組織の系統発生との関連を解析する方法が考えられる。我々は先に，ウシガエルの神経系糖脂質に，分枝鎖長鎖塩基が存在すること[3]，ある一群の硬骨魚類にハイドロオキシ酸を有する糖脂質が欠けていること[4][5][6]を報告した。系統発生上両生類は重要な位置を占めることに注目し，糖脂質(ここで扱う糖脂質はガングリオシドを含まない)の構成成分の多様性を無尾，有尾両生類について分析した。更にミエリンの主要成分である膜タンパクおよび2',3'-cyclic nucleotide 3'-phosphodiesterase (CNPase)活性についても測定した。

〔実験材料と方法〕

材料　ウシガエル(Rana Catesbeiana)，ヒキガエル(Bufo bufo japonicus)，アフリカツメガエル(Xenopus laevis)，イモリ(Cynops pyrrhogaster pyrrhogaster)，ネクチュルス(Necturus maculosus)のいずれも新鮮神経組織を使用した。

糖脂質の単離　$CHCl_3$-CH_3OH混液で抽出した粗脂質画分を0.1N NaOHでアルカリ処理し，中和後得られたalkali-stable画分をIatrobeads column chromatographyにより，Cerebroside (CMH)とSulfatide (CSE)に分離した。ある場合には，アルカリ処理を行なわず，総脂質のFolch分配を行なって，Folch下層画分について，Iatrobeads column chromatographyを行なう方法を併用した。必要に応じて，再クロマトを行ないTLC上単一のスポットを示すまでに精製した。

糖脂質の定量・定性分析　糖脂質の定量はanthrone硫酸試薬による比色法と二波長

クロマトスキャナーによるデンシトメトリーを併用した。（anthrone試薬噴霧，180℃，3分加熱 525/600nm 透過光ジグザグスキャン法）。長鎖塩基（LCB）組成の分析は既報の通りである[3]。尚本実験では脂肪酸メチルエステル（FA-me）の分析に，OV-101 coated FQ キャピラリーカラム（0.2mm×25m）[solventless装置付島津GC-5A]を用い，290℃で定温分析を行なった。分析条件については本予稿集の別報（阿部玉井）に詳報の予定である。直鎖脂肪酸（NOHFA）とα-ハイドロオキシ脂肪酸（OHFA）メチルエステルの分離は調製用TLCにより行なった。

CNPase 活性　栗原ら[2]の分光学的方法にて測定した。

蛋白質の電気泳動　ミエリンの調製とミエリン蛋白のSDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動は既法[4]の通りに行なった。

〔実験結果と考察〕

糖脂質量　脳のCMH量はRanaで24mg/g湿重量，XenopusとNecturusは1.5mg/g湿重量の範囲内にあり，両生類の中でもかなりの幅があった。CMH/CSE比はRana，Xenopusで5~6であるが，Necturusでは1.2とCSEが高いのが特徴であった。

CMHのTLC上の特徴　図1に両生類脳から単離されたCMHのTLCを示す。三種の無尾類はいずれも明瞭な二本のバンドを示すが，有尾類は二種ともフレシン相当バンドが微量ないしは欠如していた。

Fig.1, TLC of Amphibian Brain CMH
Silica gel HPTLC, C-M-W(65-25-4)

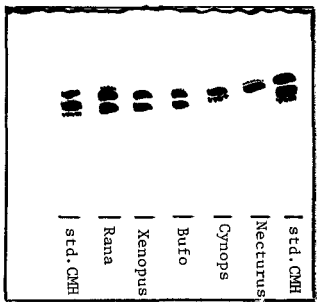
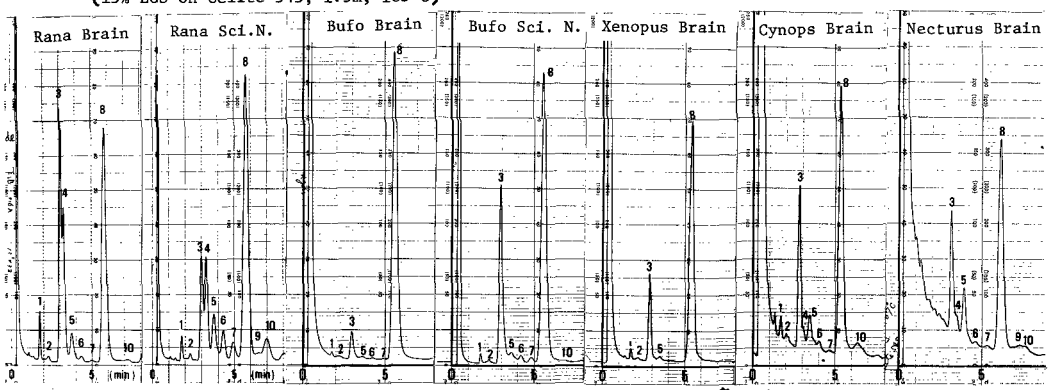


Fig. 2 GLC of Long Chain Aldehydes derived from Long Chain Bases of Amphibian Nerve CMH
(15% EGS on Celite 545, 1.5m, 185°C)



CMHとCSEのLCB

第2図は5種の両生類の脳・坐骨神経のCMHのLCBから調製した長鎖アルデヒドのGLC profilesである。程度の差はあるが，いずれの動物においても，LCB組成は多彩であることがわかる。表に各ピークの組成を示す。各ピー

（表1）
Composition of long chain bases of cerebroside from amphibian nerve tissues

Peak no.	LCB	Rana Brain	Rana Sci.N	Bufo Brain	Bufo Sci.N	Xenopus Brain	Cynops Brain	Necturus Brain
1	d16:0	3.5	1.1	0.2	0.6	0.7	2.7	tr.
2	d17:0	0.8	0.5	0.1	0.2	0.4	0.5	0.2
3	d18:0	28.9	13.8	3.3	26.9	14.8	19.3	21.7
4	d16:1	16.6	9.6	tr.	0.6	0.9	1.6	2.0
5	isod17:1	4.2	5.3	0.2	1.5	1.4	5.2	9.2
6	d17:1	0.8	4.4	0.1	1.2	0.5	0.9	0.9
7	isod18:1	0.3	2.6	0.1	1.2	tr.	0.6	0.9
8	d18:1	44.3	58.2	96.0	66.5	79.8	63.4	62.7
9	isod19:1	tr.	0.5	-	0.7	0.5	1.0	1.1
10	anteiso d19:1	0.5	4.0	-	0.5	1.1	4.7	1.1

Values are expressed as weight percentage of total bases.

（表2）
Composition of long chain bases of sulfatide

LCB	Rana Brain	Rana Sci.N	Xenopus Brain	Cynops Brain	Necturus Brain
d16:0	2.0	1.7	2.8	2.7	0.4
d17:0	0.2	0.9	1.2	1.0	0.5
d18:0	43.3	15.4	30.5	38.3	29.4
d16:1	9.3	8.7	0.9	1.8	4.1
isod17:1	4.0	8.1	2.0	8.2	21.2
d17:1	0.9	3.2	1.1	1.8	1.3
isod18:1	0.6	2.7	0.3	0.4	1.3
d18:1	38.0	55.2	60.3	43.4	38.0
isod19:1	1.1	tr.	0.7	0.5	1.9
anteisod19:1	0.7	4.1	0.3	2.0	1.9

クは既述[3]の如く，GC-MSで同定されている。すでに我々は，Rana神経組織に，分枝鎖LCBが存在することを報告[3]したが①本実験により無尾類・有尾類を問わず，両生類に広く存在することがわかった（ピーク5.7.9）。②更に飽和LCBも豊富に含まれていたが，Bufoに限って33%であった。③その他，炭素数16のLCBや奇数鎖LCBも検出された。CSEのLCB組成を表2に示す。各動物ともCMHにくらべて，d18:0が多いのが目立つ。以上の結果から，分枝鎖LCBの存在と飽和LCBが豊富に存在することは，魚類やその他の脊椎動物には見られない両生類神経組織に共通した特徴であることがわかった。

(表3)
Hydroxy fatty acid compolstion of cerebroside

	Rana		Bufo	Xenopus
	Brain	Sci.N	Brain	Brain
18h:0	4	11	2	3
20h:0	4	8	2	15
22h:1	3	1	1	24
22h:0	-	13	3	-
23h:1	1	1	-	4
23h:0	-	2	-	4
24h:1	84	41	80	44
24h:0	1	18	8	1
25h:1	-	2	6	3
25h:0	-	-	-	1
26h:0	-	-	-	1

(表4)
Non-hydroxy fatty acid composition of cerebroside

	Rana		Bufo	Xenopus	Cynops	Necturus
	Brain	Sci.N	Brain	Brain	Brain	Brain
16:0	5	4	3	2	4	-
18:0	12	24	4	9	5	1
18:1	2	1	1	-	1	-
20:0	3	9	2	2	5	6
20:1	1	-	-	19	1	-
22:0	2	12	2	1	9	5
22:1	7	2	1	22	2	2
23:0	-	3	1	-	-	-
23:1	2	1	-	4	1	-
24:0	-	11	2	1	1	2
24:1	61	27	78	38	68	83
25:0	-	1	3	1	1	-
25:1	2	-	2	1	3	-
26:0	1	-	2	-	-	-

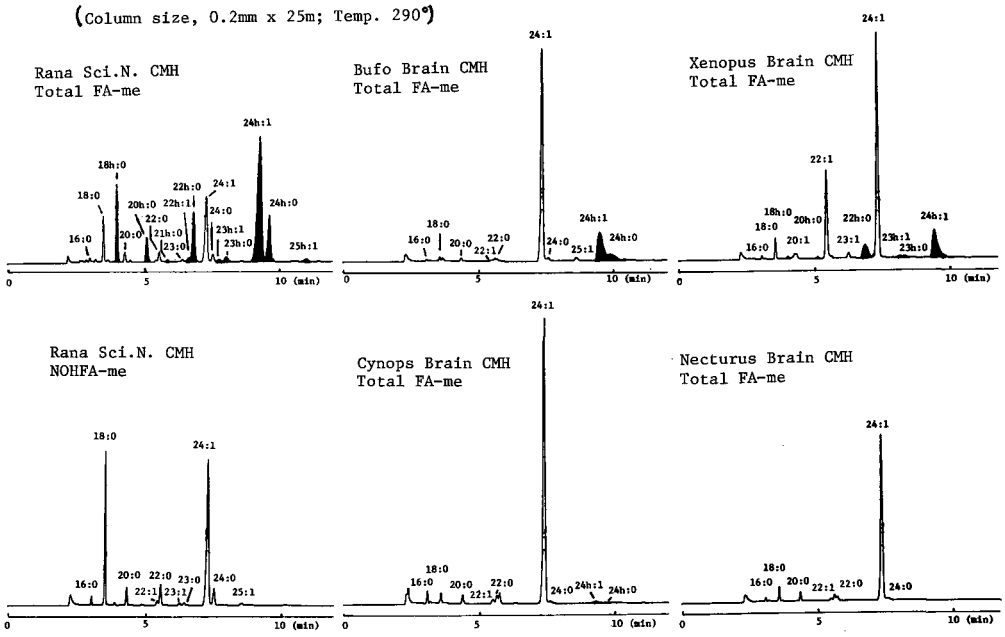
Values are expressed as weight percentage of the total nonhydroxy fatty acids.
Dash(-) means absence or negligible amount.

(表5)
Non-hydroxy fatty acid composition of sulfatide

	Rana		Bufo	Xenopus	Cynopus	Necturus
	Brain	Sci.N	Brain	Brain	Brain	Brain
16:0	2	3	15	7	5	4
18:0	8	20	6	19	4	10
18:1	1	1	5	8	1	1
20:0	2	5	1	1	3	7
22:0	1	7	2	1	7	9
22:1	5	3	-	18	2	2
23:1	1	2	3	3	2	-
24:0	1	6	1	1	1	1
24:1	78	45	58	38	72	66
25:0	-	5	2	1	1	-
Others	1	1	8	3	2	1

<u>CMHとCSEの脂肪酸組成</u>　各両生類のCMHとCSEのNOHFAとOHFAの組成を表3,4,5に示す。①全ての両生類に共通して24:1は最主要成分である。②Ranaの坐骨神経以外は24:0は微量成分である。③Xenopusでは20:1，22:1が他の両生類にくらべて有意に多く含まれる。④OHFA組成についても24h:1は最主要成分である。⑤NOHFA同様，Ranaの坐骨神経では24h:0，Xenopusでは22h:1も多く含まれていた。図3にCMH

Fig.3, GLC profiles of fatty acid methyl esters from amphibian brain CMH on OV-101 coated capillary column
(Column size, 0.2mm x 25m; Temp. 290°)



のNOHFA-meとOHFA-meをFIDキャピラリーガスを用いたGLCで分析した結果を示す。一般にpacked column（例えばOV-101やSE-30など）でCMHのFAs-meを分析すると，N-OHFA-meとOHFA-meが重なるピークがあり，全脂肪酸同時分析は不可能である。本実験の条件では全脂肪酸のメチルエステルは全て分離されるので NOHFA-meとOHFA-meをあらかじめ分離調製する必要がない。ネコ目は3種の無尾両生類はOHFAを主要成分として含んでいるが，2種の有尾類ではOHFAが微量成分あるいは痕跡程度としか存在していないことを示している。第6表は全脂肪酸中のOHFA（表6）の割合を示したものである。この値はOHFAとNOHFAを分離せず，packed columnで分析した結果であるが，ネコ目から算出するとイモリの値は5%以下となる。

Hydroxy fatty acid content exoressed as a percentage of total fatty acids in cerebroside

Rana		Bufo	Xenopus	Cynops	Necturus
Brain	Sci.N	Brain	Brain	Brain	Brain
27	71	51	50	11	1~±

ところで，CMHの $\frac{NOH}{OH}$ 比は動物進化の系統樹を上行するに伴って，低下するという報告がある（岸本安生博士私信）。我々はすでに，硬骨魚類に，OHFAを全く欠く一群があることを報告しているが[4][5][6]，系統樹におけるOHFAの有無が神経系の系統発生を考える場合，一つの情報を提供するのではないだろうか。

ミエリンのCNPase活性　イモリでは1.36 μmol/mg prot./min，Xenopusでは26.8 μmol/mg/minであり，両生類の中でも種による違いが顕著である。

ミエリン蛋白の電気泳動　Necturus，Xenopusはproteolipid proteinsとDM-20に近い蛋白，および Wolfgram proteinsよりやや高分子の蛋白の3つが主要成分で，いわゆる哺乳類のmyelin basic proteinに相当するバンドは極めて，微量が殆んど検出されなかった。これは Xenopus myelinについての他の研究室の報告[7]にほぼ一致する。イモリでは高分子蛋白部分はXenopusと一致するが，低分子蛋白成分が少ない点で，Xenopus，Necturusと異なっており，全体のprofileはむしろ，硬骨魚類のそれに近い。

以上，我々はミエリンの主要構成成分であるCMH．CSE．ミエリン蛋白およびCNPase活性に注目し，その組成の多様性を両生類の種の違いと対比させ考察した。脂肪酸の中ではOHFAは無尾類と有尾類で画然とした違いがあるようであるが，現在Salamander種について分析中である。ミエリン蛋白は高等脊椎動物とは明瞭に異なる組成を示したが，両生類でも多様性があり，更に解析を重ねている。

（謝辞）Necturusは遠藤仁先生（東大医学部薬理）より供与された。

〔文献〕

1. 小嶋，玉井，神経化学（1980）19，310-313
2. Kurihara, T. et al., Biochem. J.(1977) 165, 135-140
3. 斉藤，堀地，玉井，大橋，脂質生化学研究（1979）21，258-261
4. 玉井，堀地，原尻，小嶋，斉藤，脂質生化学研究（1979）21，254-257
5. 玉井，堀地，斉藤，神経化学（1979）18，228-231
6. 玉井，小嶋，堀地，阿部，斉藤，脂質生化学研究（1981）23，262-265
7. Trapp, B. et al., J. Neurochem., (1980) 34, 1241-1246

44 P2蛋白およびその構成ペプチドの脱髄活性について

植村慶一・北村邦男・堀江賀与子
鈴木　勝
（埼玉医大・I生理）

〔要　約〕

1)ウシP2蛋白のモルモット，ウサギ，SD系およびLewis系ラットに対する実験的アレルギー性神経炎(EAN)活性を比較検討し，Lewis系ラットにのみ強い活性を認めた。ヒト末梢神経ミエリンの主要構成分であるP2，P0蛋白，セレブロシド，ガングリオシドのうちではP2蛋白のみにLewis系ラットにEAN活性を認めた。ウシとヒトのP2蛋白のアミノ酸残基の置き換わりはEAN活性に本質的な影響は及ぼさないと考えられた。

2)ウシP2蛋白のブロムシアン分解ペプチドについてLewis系ラットに対するEAN活性を検討すると，15 nmolesでCB2（21～113,93残基）ペプチドにのみ活性を認めた。更にCB2ペプチドをシトラコニル化後トリプシン分解したペプチドについてEAN活性を検討した結果，CiT4（53～78，26残基）ペプチドにのみ，7匹中6匹の末梢神経系に細胞浸潤又は脱髄の病変を認めた。以上の結果ウシP2蛋白のLewis系ラットに対するEAN活性はP2蛋白のほぼ中央に位する53－78位の部位に存在することが明らかとなった。このペプチドはPhe 3個とLys-Asn，Asn-Arg各1を含んでおり，これらとEAN活性との関係を検討中である。

Key words：　Myelin, Peptide, Neuritis.

末梢神経系の脱髄疾患のモデルとして実験的アレルギー性神経炎(EAN)が考えられ，その抗原性物質について検討が進められて来ている。[12][13][14]末梢神経ミエリンの構成蛋白は酸可溶性の塩基性蛋白と酸不溶性の蛋白に大別される。[6][7][14]塩基性蛋白のうちP2蛋白はEANの抗原性蛋白の最も有力な候補であるが，その EAN抗原性に対する評価は一定していなかった。最近ウシP2蛋白がLewis系ラットに対しEANの抗原性を示すことが報告され[5]我々もこれを追認した。[12]一方ウサギP2蛋白はそれのみではLewis系ラットにEAN抗原性を示さないことも報告されている。[7][8]このように抗原蛋白の由来する動物種と抗原注射をうける動物種の組合せが，EAN発症に重要な因子となっていることが予測されたので，この点について今回検討を加えた。次にウシP2蛋白－Lewis系ラットの組合せを用いて，ウシP2蛋白の分解ペプチドによる抗原性の検索より，Lewis系ラットに対するEAN発症のための有効な最小アミノ酸配列部位の決定を試みているので，それらの結果を報告する。

〔実験方法〕

1)実験動物；ウサギ(日本白色種)，モルモット(Hartley系)は市販のもの，SDおよびLewis系ラットはチャールスリバー社より入手し，自家繁殖したものを用いた。

2)ミエリン構成成分の分離；P2蛋白はウシ又はヒトの馬尾神経より調製したミエリン画分より，酸抽出，Sephadex G75カラムによる既報の方法[6]によって精製した。P0蛋白はミエリン画分の酸抽出残渣よりSDSゲル電気法[11]によって精製した。[12]セレブロシド，ガングリオシド画分はミエリン画分の有機溶媒抽出液より調製した。

3) P2蛋白のブロムシアン分解ペプチドの分離：P2蛋白はブロムシアン添加後、70%ギ酸中で24時間分解し、凍結乾燥後、Biogel P6で分画した。[8][9]
4) CB2ペプチドの分解：CB2ペプチドはシトラコニル化しリジン残基を修飾した後、トリプシン分解を行い、SP Sephadexで分画した。[8][9]
5) EAN抗原性の検索：各種動物に抗原物質一定量をFreund完全アジュバントの混合物を一回注射し、注射後約30日目に試料(脳・脊髄・神経節・馬尾神経・坐骨神経)を剥出し、パラフィン切片を作製、LFBとHE染色によって、病変の有無を検討した。病変の検索には神経研・中川恵弘博士の協力を得た。

〔実験結果と考察〕

1) ウシP2蛋白の種々の動物に対するEAN抗原性：第1表に示した様に500μgのウシP2蛋白はモルモット、ウサギおよびSD系ラットに対して無効であった。併しLewis系ラットに対してのみ200μgで10例中5例に脱髄活性、1例に細胞浸潤を惹起させた。また中枢神経系にはいづれの場合も全く病変を認めなかった。従ってウシP2蛋白はLewis系ラットにEAN活性をもつと結論出来る。ウシP2蛋白のモルモット、ウサギに対するEAN抗原性について、我々は既に否定的な結果を報告し[2][4][6]、Brostoffらも蛋白それ自体には活性はないが、そのN末端ブロムシアンペプチドはモルモットにEAEを起すと報告[2]しており、この点は更に検討が必要であろう。ウシP2蛋白のLewis系ラット以外の動物に対するEAN活性は全く無いか、或は何かの原因でmaskされているか、今の所不明であるが、Nagaiらはウシ P2蛋白にガングリオシドを添加することによってウサギに対するEAN活性が回復すると報告[10]している。併しLewis系ラットに対してはウシP2蛋白のEAN活性に対するガングリオシドの添加効果は見られなかった。[8]
2) ヒト末梢神経ミエリン構成成分によるLewis系ラットに対するEAN活性：ヒトP2、P0蛋白、セレブロシド、ガングリオシドの各画分のLewis系ラットに対するEAN活性を検討した。(第1表) ヒトP2蛋白はウシP2蛋白よりやや弱いがほぼ同程度のEAN活性をもつことが明らかとなった。末梢ミエリンの主要糖蛋白であるP0蛋白、主要脂質であるセレブロシドは共に無効であり、微量成分のガングリオシ

TABLE 1. EAN ACTIVITY OF MYELIN COMPONENTS IN VARIOUS HOST ANIMALS

Antigens	Dose (μg)	Host Animal	Number of Animals Tested	Number with Histological Lesions in PNS (-)	(+)	(++)
Bovine P2	500	Guinea Pig	7	7	0	0
Bovine P2	500	Rabbit	5	5	0	0
Bovine P2	200	SD Rat	4	4	0	0
Bovine P2	200	Lewis Rat	10	4	1	5
Human P2	500	Lewis Rat	8	4	3	1
Human P0	500	Lewis Rat	3	3	0	0
Cerebroside	1,000	Lewis Rat	2	2	0	0
Ganglioside	30	Lewis Rat	7	7	0	0

(-) No Lesion ; (+) Cell Infiltration ; (++) Demyelination.

ドも無効であった。この結果は末梢神経ミエリン構成成分のうちではP2蛋白のみが有効であることを強く示唆する。ヒトP2蛋白はウシP2蛋白と比較して131残基のうち8残基の置き換りのあることが明らかにされている[1)(5)(6)]が、これらのおき換りはEAN活性にはそれほど重要な影響を及ぼさないと考えられる。またリサギP2蛋白はそれ自身ではLewis系ラットにEANを起さないが、酸性脂質等と混合することによってEAN活性が回復すると報告されている。[1)(4)]このようにP2蛋白のEAN抗原性について種々異った成績があるが、現在の所一般に用いる抗原蛋白の由来する動物種と抗原注射をうける動物種との組合せがEAN発病の重要な因子となっていると考えると予値なく理解出来る。ウシP2蛋白がLewis系ラットにEAN抗原性をますことについては少くとも3ヶ所の異った研究室で確認されている[2)(5)(12)]ので、この系を用いてEAN抗原性の追求を行った。

3)ウシP2蛋白の構成ペプチドのLewis系ラットに対するEAN抗原性：131残基よりなるウシP2蛋白はブロムシアン分解によって、4個のペプチド；CB1(1～20)、CB2(21～113)、CB3(114～119)、CB4(120～131)に切断される。[8)(9)]CB1、CB2、CB3＋CB4の3画分それぞれ15 nmoleのLewis系ラットに対するEAN活性を検討した(表2表)。この中で93残基を含むCB2にのみ活性が認められ、他のCB1、CB3＋CB4ペプチドは無効であった。そこでCB2ペプチドの細分画を試みた。CB2ペプチドはArg 6位、Lys 13位を含むので、適当な長さのペプチドを得るために、シトラコニル化してLys残基を修飾した上で、トリプシン分解を行い、7個のペプチドをSP-Sephadexで分離した。[8)(9)]得られたペプチドのうち、CiT1(21～30)、CiT2(31～39)、CiT3(40～52)、CiT4(53～78)、CiT6(89～96)について EAN活性を検索した結果、CiT4のみに活性が認められ、他のペプチドはすべて無効であった。これらのペプチドのアミノ酸配列を第3表に示した。CiT4は26残基のアミノ酸よりなり、その中に $Phe^{57}-Lys-Asn^{59}$ および $Phe^{70}\cdots\cdots-Asn^{77}-Arg^{78}$ の配列を含んでおり、これらの部位とEAN活性との関連について興味が持たれる。現在更にCiT4ペプチドを細分画したペプチドおよび各種合成ペプチドによるEAN

TABLE 2. EAN ACTIVITY OF BOVINE P2 PROTEIN PEPTIDES IN LEWIS RATS

Peptides (Position) (15 nmols each)		Number of Animals Tested	Number with Histological Lesions in PNS (-)	(+)	(++)
CB Peptides					
CB 1	(1- 20)	4	4	0	0
CB 2	(21-113)	4	2	0	2
(CB 3 / CB 4)	(114-119) / (120-131)	4	4	0	0
CiT Peptides					
CiT 1	(21-30)	4	4	0	0
CiT 2	(31-39)	5	5	0	0
CiT 3	(40-52)	5	5	0	0
CiT 4	(53-78)	7	1	5	1
CiT 6	(89-96)	9	9	0	0

(-) No Lesion ; (+) Cell Infiltration ; (++) Demyelination.

TABLE 3. Amino acid sequence of tryptic peptides of citraconylated CB2

Peptide	Position	Sequence
CiT1	21 - 30	Lys-Ala-Leu-Gly-Val-Gly-Leu-Ala-Thr-Arg
CiT2	31 - 39	Lys-Leu-Gly-Asn-Leu-Ala-Lys-Pro-Arg
CiT3	40 - 52	Val-Ile-Ile-Ser-Lys-Lys-Gly-Asp-Ile-Ile-Thr-Ile-Arg
CiT4	53 - 78	Thr-Glu-Ser-Pro-Phe-Lys-Asn-Thr-Glu-Ile-Ser-Phe-Lys-Leu-Gly-Gln-Glu-Phe-Glu-Glu-Thr-Thr-Ala-Asp-Asn-Arg
CiT5	79 - 88	Lys-Thr-Lys-Ser-Thr-Val-Thr-Leu-Ala-Arg
CiT6	89 - 106	Gly-Ser-Leu-Asn-Gln-Val-Gln-Lys-Trp-Asn-Gly-Asn-Glu-Thr-Thr-Ile-Lys-Arg
CiT7	107 - 113	Lys-Leu-Val-Asp-Gly-Lys-Hse

The sequences were proved by manual Edman degradation (→), by carboxypeptidase digestion (←), and by hydrazinolysis (—). Dotted underline portions (---) were determined by analysis of tryptic peptides of CiT4 or V8 protease peptides.

活性については追求中である。また Gln^{95}-Lys^{96}-Trp^{97} を含むCiT6ペプチドには無あであったが，次の Asn^{98}-Gly^{99} 結合がβ結合に変化しているために活性の失われている可能性も考えられこの点についても検討を重ねている。

文献

1) Curtis,B.M.,Forno,L.S. & Smith,M.E.(1979) Brain Res. 175, 387-391
2) Hoffman,P.M.,Powers,J.M.,Weise,M.J. & Brostoff,W.(1980) Brain Res. 195, 355-362
3) Hsieh,D.L.,Weise,M.J.,Levit,S.,Powers,J.M. & Brostoff,S.W.(1981) J.Neurochem. 36,913-916
4) Ishaque,A.,Hofmann,T. & Eylar,E.H.(1979) Fed.Proc. 38, 514 (abstract)
5) Kadlubowsky,M. & Hughes,R.A.C. (1979) Nature (lond.) 277, 140-141
6) Kitamura,K.,Yamanaka,T. & Uyemura,K.(1975) Biochim.Biophys.Acta 379, 582-591
7) Kitamura,K.,Suzuki,M. & Uyemura,K.(1976) Biochim.Biophys.Acta 445, 806-816
8) Kitamura,K.,Suzuki,M.,Suzuki,A. & Uyemura,K.(1980) FEBS Lett. 115 27-30
9) Kitamura,K.,Suzuki,M. & Uyemura,K.(1981) Biomed.Res. 2 (4) in press.
10) Nagai,Y.,Uchida,T.,Takada,S. & Ikuta,F.(1978) Neurosci.Lett. 8, 247-254
11) 鈴木勝．北村邦男．野村恭一．坂本安．植村慶(1980) 神経化学 19,266-269
12) Suzuki,M.,Kitamura,K.,Uyemura.,Ogawa,Y.,Ishihara,Y. & Matsuyama,H.(1980) Neurosci.Lett.19,353-358
13) Uyemura,K.,Tobari,C.,Hirano,S. & Tsukada,Y.(1972) J.Neurochem. 19,2607-2614
14) Uyemura,K.,Suzuki,M. & Kitamura,K.(1978) Adv.Exp.Med.Biol. 100,95-115
15) Uyemura,K.,Kitamura,K.,Suzuki,M. & Horie,K.(1981) Abstracts,8th INS Meeting,Nottingham,in press
16) Uyemura,K.,Kitamura,K.,Ogawa,Y. & Matsuyama,H.(1976) The Aetiology and Pathogenesis of the Demyelinating Disease,pp.181-192. Japan Science Press

45 Myelin proteolipids 由来の 5-hydroxytryptamine 結合物質の本体について

宮川明久・石谷良一
(城西大・薬・薬理)

〔要　約〕

ラット脳幹部 myelin butanol extracts (T.E.), すなわち proteolipids, 由来の 5-HT 結合物質の本体について acidic lipids の再構成系実験より検討した。

T.E. および3種類の acidic lipids (CS, PS および PI) より成る再構成系, すなわち, A; CS + PS + PI, B; CS + PS, C; CS + PI について ^{3}H-5-HT (5×10^{-7}M) に対する結合能, 種々の刺激伝達物質 (5-HT, Tryptamine, DA, ACh, NA) に対する特異性および chloroform-methanol 4:1, での溶出パターンを, Sephadex LH$_{20}$ による gel-filtration 法により検討した。その結果, A の (CS + PS + PI) 再構成系は, T.E. が有する 5-HT 特異的結合能を完全に再現し得る事が判明した。更らに 5-HT 結合について動力学的検討を行った結果, 本再構成系には非飽和性結合部が認められず, その2重逆数プロットは直線性を示さず少くとも3種類の結合部位 (Kd: 2×10^{-7}M, 4×10^{-7}M および 4×10^{-6}M) から構成されている事が明らかとなった。

以上の結果より, ラット脳幹部 myelin fragments 由来の 5-HT 結合物質は CS, PS および PI の3種類の acidic lipids より構築されていると考えられる。

Key words : myelin, 5-hydroxytryptamine, acidic lipids

ラット脳幹部 butanol extracts (proteolipids) に対する 5-hydroxytryptamine (5-HT) の結合実験から, Fisher & De Robertis[1] および Godwin & Sneddon[2] らは, 5-HT 結合物質の本体は特種な proteolipids でありそのものは receptor protein としての可能性を有すると報告した。他方著者らは[4,5] 彼らが用いた proteolipids は synaptic membranes ではなく myelin fragments 由来である事, および receptor としての proteolipids の可能性に疑問点を提唱した。

近年, opiate[9] および cholinergic receptor[15] としての acidic lipids の関与が注目されている。Johnson ら[8] は上記 proteolipids 5-HT receptor の本体は, protein でなく sulphatides (CS) と phosphatidyl inositol (PI) である事を報告した。しかし前報[6] にて著者らは, myelin proteolipids 由来の 5-HT 結合物質には, Johnson ら[8] が指摘した2種の acidic lipids より成る再構成系では ^{3}H-5-HT について結合能を有するがその性質は非特異的である事から, その他の物質の関与を示唆した。

本実験目的は myelin proteolipids 由来の 5-HT 結合物質の本体を明らかにすることである。

〔実験材料および方法〕

(1) Butanol extracts の調整: Wistar 系雄ラット (150 ~ 200g) を断頭後, 脳幹部を摘出し, 0.32M sucrose にて 5% homogenate とし Norton & Poduslo[13] らの方法にて myelin fragments を得た。このものを 50% sucrose (2ml/g brain stem) に懸濁後, 10倍量の水一飽和ブタノールにて室温下2時間抽出した。得られた有機相を N_2 気流下 38℃ にて 1/4 に濃縮し butanol extracts (T.E.) とした。

(2) Acidic lipids の調製: CS, PI および phosphatidyl serine (PS) は Marinetti[10] と Hanahan[3]

の方法にてラット脳幹部より調製した。脳幹部より chloroform-methanol (CM 2:1) によって "Folch-washed extracts" を得た。PS はケイ酸および DEAE cellulose (acetate form) column chromatography にて分離した。CS および PI は，さらに連続的ケイ酸 column chromatography にて精製した。これら3種 lipids の純度は TLC にて 96% 以上であった。

(3) ^{14}C-5-HT との結合実験: Myelin butanol extracts は，不溶性物質を可溶化するため 14.53 % の water にて処理した。再構成系は 14.53 % の butanol-water 混液にて可溶化した。各試料 (0.25 ml) を ^{14}C-5-HT とともに室温下 20 min インキュベート後，Sephadex LH_{20} column (0.6 × 15 cm) による gel-filtration 法にて結合 5-HT 量および溶出パターンを計測した。溶出には chloroform 8.4 ml，chloroform-methanol (CM) 15:1，10:1，6:1，各 4.2 ml および CM 4:1 20 ml による stepwise 法を用いた。

(4) lipids の定量: 試料中の lipids は2次元 TLC 法にて分離定量を行った。使用した展開溶媒は① chloroform-methanol-ammonium hydroxide (14:6:1) と② chloroform-acetone-methanol-acetic acid-water (5:2:1:1:0.5) である。

〔結果〕

ラット脳幹部より得られた T.E. の lipids 組成を TLC 法により計測し Table 1 に示す結果を得た。T.E. 中の各々の lipid について，cholesterol に対するモル比にてすでに報告[12]されている myelin 値と比較した。結果は，sphingomyelin のみが myelin fragments の約 1/2 量比を示したが，他の lipids に関しては両者間で何んらの差異も認められなかった。T.E. における lipid phosphorus 含量は 2.5 μ moles/ml extracts であることが判明したので，この値にて種々の再構成系における各 acidic lipids 含量を算出した。

Table 1. Lipid composition of myelin butanol extracts

Component	μg/μmol lipid phosphorus
Cholesterol	539.0 ± 35.1
Minor galactolipids	23.0 ± 0.9
Cerebrosides	337.4 ± 8.4
sulphatides	86.9 ± 1.9
Ethanolamine phosphatides	333.4 ± 3.3
Choline phosphatides	211.5 ± 5.2
Sphingomyelin	42.4 ± 4.2
Phosphatidylserine	83.7 ± 4.2
Phosphatidylinositol	9.5 ± 0.3

Values are expressed as mean ± S.E.M. of 4 determinations.

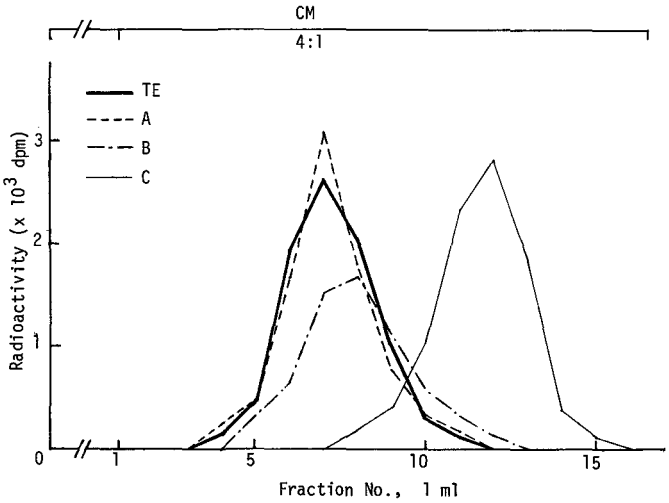


Fig. 1. Sephadex LH_{20} chromatograms of the several recombinate fractions. Samples were incubated with 5 x 10^{-7} M of ^{14}C-5-HT. TE; myelin butanol extracts, A; CS+PS+PI, B; CS+PS and C; CS+PI.

Acidic lipids による種々の再構成系 (A系; CS+PS+PI, B系; CS+PS, C系; CS+PI) に対する ^{14}C-5-HT 結合実験を Sephadex LH_{20} column chromatography にて検討した。結果を Fig. 1 に示した。A系および C系の結合 5-HT の溶出ピークは，T.E. と A系では共に同一の位置 (fraction No., 7) であるのに対し C系は No., 12 とかな

Table 2. Inhibition of ^{14}C·5-HT binding by several neurotransmitters

Compound	% Inhibition	
	Recombinate	Myelin extracts
5-Hydroxytryptamine	100	100
Tryptamine	100	100
Dopamine	100	67.6 ± 6.2
Acetylcholine	83.2 ± 4.4	54.0 ± 12.3
Noradrenaline	None	None

The recombinate of CS,PS and PI was preincubated with several compounds (all; 5 x 10^{-4} M) for 30 min and then 5 x 10^{-7} M of ^{14}C·5-HT was added. (mean ± S.E.M. of 4 experiments)

リpolarityが異なっていた。他方，T.E.とB系を比較した場合，溶出ピークに関してはほぼ同一であったが，^{14}C·5-HT結合能がA系およびC系に比較して劣っていた。T.E.が示す5-HT結合能に対する種々の再構成系のそれはA系；95.5%，B系；71.2%，C系；96.7%であった。又，1000倍量の非放射性5-HTによるdisplacement実験の結果，AおよびB系は100%の飽和性を示した。これらの結果からCS，PSおよびPIの3種のacidic lipidsがmyelin proteolipids由来の5-HT結合物質の本体である可能性が示唆された。上記可能性をより明白にすべく，3種acidic lipidsの再構成系に対する各種刺激伝達物質の特異性をdisplacement実験にて検討した。その結果をTable 2に示した。CS+PS+PIの再構成系はT.E.が有する特異性を完全に再現する事が明らかとなった。

著者らは前報[5,6]にて，5-HT結合物質は飽和性と非飽和性より構成されていること，およびKdは約3x10^{-7}Mであることを報告した。Displacement実験から3種のacidic lipidsより成る再構成系は，飽和性部位のみから構成されていると考えられるが，本再構成系と^{14}C·5-HTとの結合様式について動力学的検討を行った(Fig. 2)。得られた結合曲線はdisplacement実験の結果とよく一致し非飽和性部位は認められなかった。更らに2重逆数プロットを試みた結果，本再構成系は^{14}C·5-HTに対して少くとも3種の結合部位(または結合物質)を有し，それぞれ2x10^{-7}，4x10^{-7}および4x10^{-6}MのKdを示した。

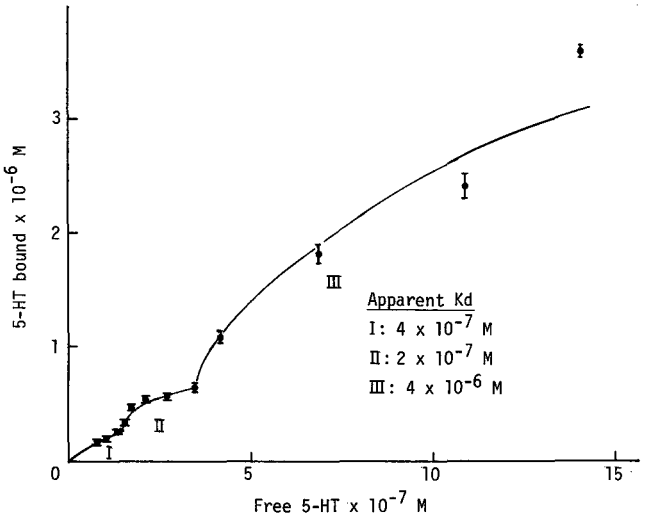


Fig. 2. Binding curve of ^{14}C·5-HT to the recombinate fraction with CS,PS and PI. The points are the mean ± S.E.M. of 3 experiments.

〔考察〕

近年，opiate[9]およびcholinergic receptor[15]としてのacidic lipids(CS & T PI)の可能性が指摘されている。ラット脳幹部由来のproteolipids 5-HT receptorについても，Johnsonら[8]はその本体としてCSとPIの2種のacidic lipidsの関与を報告している。しかしすでに述べた如く[6]，CSとPIの再構成系ではmyelin proteolipidsが示す特異的5-HT結合能を再現出来

ない事が判明した。他方，myelin butanol extractsをMokrasch[11]の方法にて4倍量のcold-ether処理して得たlipid mixturesは5-HT結合能を示さないが，このものにCS，PSおよびPIを添加すると結合能が回復する事，およびOchoaら[14]が報告している5-HT結合物質としてのgangliosidesは，少くともmyelin fragments由来の5-HT結合物質には不適切である事が明らかとなった[7]。以上の事実から，本実験ではCS，PSおよびPIの3種acidic lipidsによる種々の再構成系実験を立案した。

得られた結果を総括すると，CS単独でも5-HT結合能を有するがCS-5-HT complexはT.E.-5-HT complexとpolarityが異なり従って特異性も低い。CS+PS系の5-HT binding peakがmyelin proteolipidsのそれと近似である事から，PSは5-HT結合の特異性に関与していると考えられる。事実，CS+PS系はほぼ100%の飽和性および他の刺激伝達物質に対する特異性を示した。しかしながら，CS+PS系ではmyelin proteolipidsが示す5-HT結合能の71.2%しか発現されず，PIの存在下にて初めて完全な結合能の回復が認められた。すなわち，PIは特異性よりも結合能により関与していると考えられる。

最終的に，Sephadex LH_{20}での結合5-HTの溶出パターンおよび種々の刺激伝達物質によるdisplacement実験の結果より，myelin proteolipids由来の5-HT結合物質はCS，PSおよびPIの3種acidic lipidsより構築されている可能性が強く示唆された。さらに，本再構成系と^{14}C-5-HTとの結合様式について動力学的検討を行った結果，この再構成系は5-HTに対して特異的結合性のみを示し，少くとも3種の結合部位(または結合物質)より構成されており，結合様式に関しては3者間での相互作用は無いと考えられる。それぞれのKd値は2×10^{-7}M，4×10^{-7}Mおよび4×10^{-6}Mであった。

なお，本実験結果の一部は第8回国際薬理学会(1981年7月，東京)にて発表した。

〔文献〕

1) Fiszer, S. and De Robertis, E. (1969) J. Neurochem. 16, 1201
2) Godwin, S.F.R. and Sneddon, J.M. (1975) J. Neurochem. 25, 283
3) Hanahan, D.J., Dittmer, J.C. and Warashina, E. (1957) J. biol. Chem. 228, 685
4) Ishitani, R., Miyakawa, A., Saito, R. and Iwamoto, T. (1977) Experientia 33, 932
5) Ishitani, R., Miyakawa, A. and Iwamoto, T. (1978) Japan. J. Pharmacol. 28, 899
6) Ishitani, R., Karasawa, A. and Miyakawa, A. (1980) Life Sci. 27, 291
7) Ishitani, R., Takemoto, T. and the late Iwamoto, T. (1981) Japan. J. Pharmacol. 31, 295
8) Johnson, D.A., Cho, T.M. and Loh, H.H. (1977) J. Neurochem. 29, 1105
9) Johnson, D.A., Cooke, R. and Loh, H.H. (1977) Mol. Pharmacol. 16, 154
10) Marinetti, G.V. (1967) Lipid Chromatographic Analysis, 1, p.99, Marcel Dekker Inc., New York
11) Mokrasch, L.C. (1967) Life Sci. 6, 1905
12) Norton, W.T. and Autilio, L.A. (1966) J. Neurochem. 13, 213
13) Norton, W.T. and Poduslo, S.E. (1973) J. Neurochem. 21, 749
14) Ochoa, E.L.M. and Bangham, A.D. (1976) J. Neurochem. 26, 1193
15) Wu, Y.C., Cho, T.M. and Loh, H.H. (1977) J. Neurochem. 29, 589

46 培養小脳組織によるミエリン形成細胞の分裂と分化の神経化学的研究

長池一博・塚田裕三
(慶大・医・生理)

〔要　約〕

ミエリン形成機構を探るため、ラットまたはマウスの小脳の組織培養を行ない　ミエリン形成細胞の分裂時期と2',3'cyclic nucleotide 3'phosphohydrolase (CNPase) 活性とミエリン塩基性タンパク(MBP)の発育変化について検索した。培養小脳のDNA合成は胎生16日，出生時，生後9日にpeakがみられた。胎生16~20日にDNA合成阻害剤を添加した培養ではミエリン形成は完全に抑制された。胎生16~18日にDNA合成を阻害した場合　正常な時期のミエリン形成は認められず遅延したミエリン形成が観察され、このミエリン形成を担う細胞は詳細な検討の結果、胎生18~20日に分裂、その後、生後5~8日に分裂した細胞であることが明らかとなった。CNPase活性はミエリン形成の増加と伴に上昇し、ミエリン形成が観察されるExplant部分で高値をミエリンのないoutgrowth部分で低値を示した。また各種抗血清を用いた実験的ミエリン形成抑制培養や脱髄を生じさせた培養中では低値を示した。MBPを牛，マウス脳より精製し抗体を作製　MBPの定量を行なった所，ミエリン形成に一致してその含量は増加して行った。また抗MBP血清はEAE，セレブロシド抗血清と異なり、形成したミエリンを破壊しなかったが、培養初期からの添加でタンパク合成の抑制を伴ったミエリン形成の抑制をもたらした。MBP合成能はMBP含量，ミエリン形成に先行して上昇していった。

Key words : Myelination, Tissue culture, Cerebellum,

我々は一昨年の本学会において　小脳培養組織を用い　ミエリン形成細胞は胎生18日以前に分裂し終っていること、ミエリン形成に伴ってタンパク、糖タンパク、リピッド合成等が盛になっていくことを報告した[1]。今回はミエリン形成細胞の分裂時期をさらに詳細に検討し、再生的なミエリン形成細胞の分裂について　またミエリンの生化学的指標とされているMBPとCNPase活性の培養下での変化について報告する。

(実験方法)

1) 組織培養法；Wistar系ラット，ddYマウスの小脳を材料として既法に従って培養した[2]。2) CNPaseの測定；堀田らの方法を用いた[3]。3) MBPの精製；牛，ddYマウスの脳よりChouらの方法によって精製した[4]。4) MBP抗体の作製；Chouらの方法によって精製したMBPのpeak 5，6を抗原とした。抗原20mgを1.0mlのGey's BSSと1.0mlのFreund complete adjuvantに懸濁、ニュージーランドラビットに、初回は皮下に1ml、その後3日，5日，7日，以後7日毎に0.5mlずつ皮下に注射して作製した。5) MBPの定量；のホモジェネートに19倍量のクロロホルム：メタノール(2:1)を加え、その沈殿をアセトン洗浄し、乾燥、0.01NHClで酸抽出、この酸抽出液を測定試料とした。①酸抽出液を0.01NHClで希釈、その0.1mlに0.1mlの100mM Na-acetate buffer pH4.0を加え、さらに直径5mmのCM-cellulose paper(東洋口紙)を加え6時間振盪吸着させた。③ CM cellulose paper discを0.1%脱塩アルブミンを含む100mMリン酸buffer(W-buffer)で1ml，10min，2回洗浄、希釈抗MBP血清を0.1ml加え　6時間振盪、Ⓗ W-bufferにて1ml，20min，3回洗浄後、0.1mlの希釈市販HRP conjugate anti rabbit IgG goat IgGを加え一夜、⑤ W-bufferで3回洗浄後、HRP活性を酵素法により測定した。6) MBP合成能の測定；培養小脳組織を100μCi/mlの^{3}H-

amino acid mixture を含む Gey's BSS で無菌的に 6 時間 incubation. この組織を前述 5) の方法を用いて CM-cellulose paper disc に吸着させ 6M Urea を含む 81 mM glycine-NaOH buffer pH 10.4 にて洗浄. paper disc に残存した放射能を測定しあめた。7) その他、タンパク、DNA 含量、合成量等は本学会ですでに報告した方法によった。なお生化学的検索は Explant 部分を試料とした。

(結果と考察)

1) ミエリン形成細胞の分裂時期; 胎生期から小脳を培養し、その DNA 合成を検索した所、図 1 A に示したように 3 つの peak A, B, C が認められた。peak B, C に相当する時期での細胞分裂はすでに報告したように[4]ミエリン形成には無関係であり、autoradiography による観察でもミエリンに連なる細胞の核には grain が見い出せられなかった。ミエリン形成細胞の核に grain の認められるのは peak A すなわち、胎生 16 日前後のみであった。図 1B に示すように DNA 合成阻害剤 Methylazoxymethanol (MAM) を胎生 14 日からの培養に 2 日間に限り添加した所、胎生 16-17 日に相当する添加(□)で最も強いミエリンの形成抑制が見られた。また、胎生 16-17 日, 胎生 14-15 日の両日に MAM を添加した培養では正常な培養組織ではすでにミエリン形成の終了した時期にミエリンが出現した。そこで、この遅延したミエリンの形成を担う細胞の分裂がいかなる時期に生ずるかを検索した(図 1 C)。胎生 16-17 日と 18〜20 日に MAM を添加した培養ではミエリンがまったく観察されず、また胎生 16-17 日と生後 5〜8 日に DNA 合成を抑制した場合にもミエリンの形成は認められなかった。

以上のことからネズミの小脳のミエリン形成細胞の正常な分裂時期は胎生 16-17 日であり、この時期に損傷を受けた場合、胎生 18〜20 日に分裂する細胞が生後 5〜8 日にさ

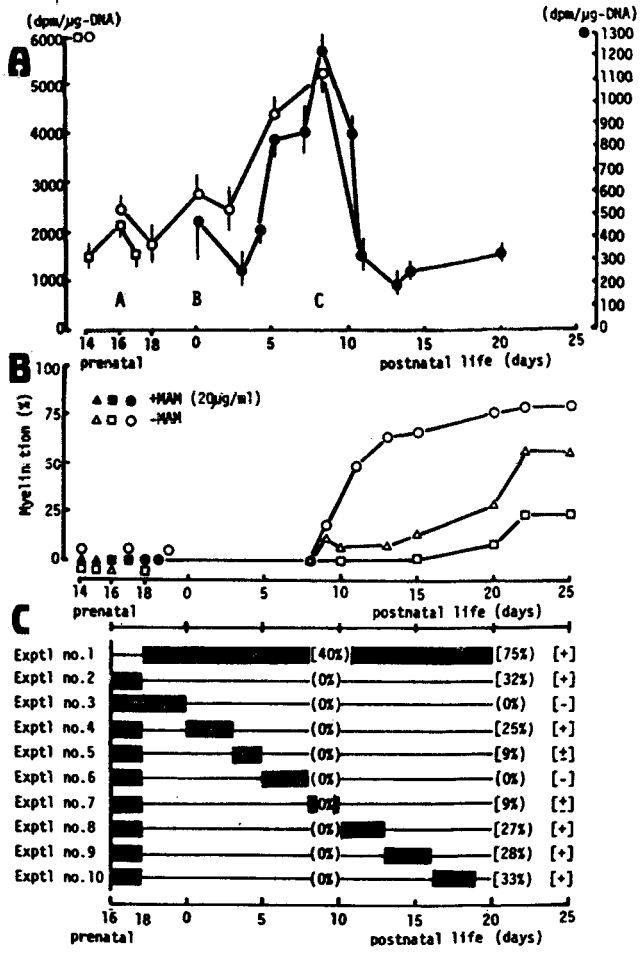


図 1 A) 培養小脳組織の DNA 合成. ^{3}H-thymidine の DNA 分画への取込み.
B) 胎生 14 日からの培養に MAM を 14-15 日(▲), 16-17 日(■), 18-19 日(●), の時期に添加した場合のミエリン形成
C) 胎生 16 日からの培養における MAM のミエリン形成に対する効果. 黒帯は MAM を添加した時期を示し、( )内はその時期でのミエリン形成率. 横軸は培養組織の生体での時期を示している。

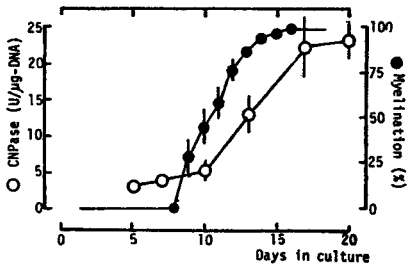


図2 出生直後のマウスの小脳を培養した時のCNPase活性の変化

らに分裂し、再生的にミエリンを形成するものと考えられた。

2. 培養小脳組織中のCNPase活性；CNPase活性の増加は図2に示すようにミエリン形成の増加と伴に上昇した。そして、この酵素活性はミエリンの観察される Explants 部分に高く、ミエリンのない outgrowth 部分では 1.7～3.0 U/μg-DNA と低値を示していた。そして、EAE血清(抗白質血清)やセレブは抗血清を添加し、脱髄やミエリン形成の抑制を起した培養中では低下しており(図3)、CNPase は培養中のミエリンの存在にまったく一致した変動を示した。これらの結果から、培養小脳組織においてもCNPaseはミエリン形成細胞の細胞膜、ミエリンにのみに局在していると考えられた。

3. 抗MBP血清のミエリン形成に対する効果；MBPを牛またはddYマウスの脳を材料としてChouらの方法で精製した所、6つのpeakをもつMBPのうちマウスのMBPはpeak 4が著明に多く回収された。また精製マウスMBPにはLarge, Small 両MBPが回収された。抗MBP抗体を得るためにはMBPの複回の注射を必要とした。注射間隔をおいた場合、牛、マウスMBPとも2週間目に多くのウサギ(6羽中4羽)にEAE症状が現われた。抗牛MBP血清は高濃度(60%)で添加しても形成されたミエリンを破壊することなくCNPase活性もControlとまったく差が認められなかった(図3)。そしてこの現象は血清を得たウサギのEAE症状の有無にも関係がなかった。しかし、出生直後のマウスの小脳を10%の抗牛MBP血清を添加した培養液で培養した場合、ミエリンの形成は抑制されCNPaseも低値であった(図3)。このミエリン形成が抑制された培養のタンパク合成と糖タンパク合成をみると表1に示すようにタンパク合成のみが抑制されていた。EAE(抗白質)血清のタンパク合成と糖タンパク合成

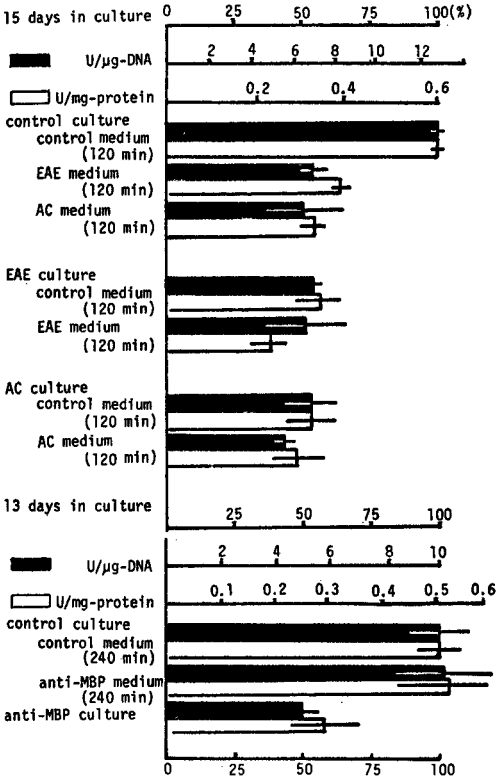


図3 各種培養条件下でのCNPase活性, EAE cultureとは2% EAE, AC cultureは2% AC, anti-MBP cultureは10%抗MBP血清を添加し続けた培養、血清の処理はEAE, ACが25%, 抗MBPが60%の濃度

Culture condition	Protein synthesis cpm/μg-DNA	Glycoprotein synthesis cpm/μg-DNA	Myelination (%)
Control	1380±57 (13)	1800±180 (13)	86
EAE (2%)	824±68 (6)***	998±158 (6)**	0
AC (2%)	1380±131 (13)	1320±100 (13)*	0
Anti-MBP (10%)	1145±92 (5)*	1684±125 (5)	4

表1 抗MBP血清を添加し続けた培養組織でのProtein, Glycoprotein合成(EAEは抗白質, ACは抗セレブロシド血清を示す.)

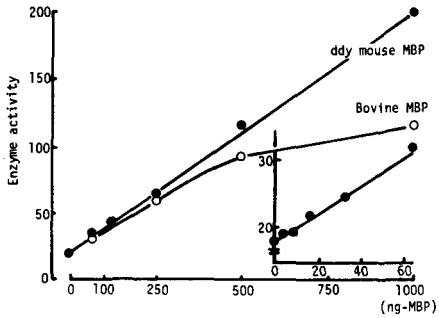


図4　MBP測定用の標準曲線

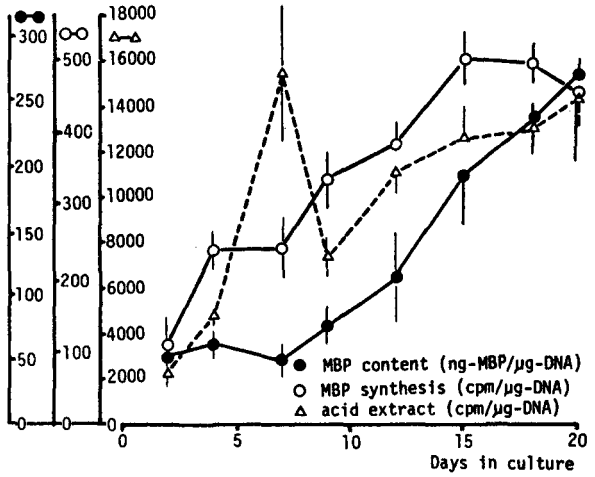


図5　出生直後のマウスを培養した時のMBP量と合成能の変化

両者の抑制は抗ヒプロシド(AC)血清の糖タンパク合成の抑制とこの抗MBP血清両者の総合した作用であると考えられた。

4. MBPの含量と合成能の発育変化

MBPの定量法は本学会においても四宮らによって報告[4]されたが、マウスのMBPを四宮らの方法[4]によってHRPと結合させる試みはNaIO4処理に依存した不溶性の沈殿を生じ測定不能であった。そこで、MBPが非常にアルカリ側に等電点を有することを利用し、IgG, またはHRP conjugate IgGが吸着しない条件でMBPをCM cellulose paperに吸着させておき抗原抗体反応を起しMBPの定量を行なった。標準曲線の一例を図4に示したが、本法によって微量な試料しか得られない培養小脳組織を用いても充分にMBP量を測定することができた。(本法を用いたrat大脳のMBP量はすでに報告されている[4]量にほぼ一致した。) また、MBPの合成能を同様にCM cellulose paper discに吸着させ6M-Ureaを含む80mM Glycine-NaOH buffer pH10.4で洗浄しその吸着部分の放射能を測定することによって定量した。(この条件の洗浄によってMBP以外のタンパクはほとんど除去されていた。) MBPの含量はミエリン形成にほぼ一致して増加していった(図5)。しかし、培養2日(生体の新生児でも2日に相等)においても充分に測定できるMBPが存在していた。MBPはミエリン形成細胞の膜の内側に存在することが考えられている[1]が、抗MBP血清を培養初期から添加した場合には前述のようにミエリンの形成の抑制が認められることから発育初期においてはMBPは外側に分子鎖を出している時期がある可能性が考えられる。MBP合成能はMBP含量より若干早く増加し、MBP含量とまったく平行した変化であった。このことはMBP合成能の測定が特異的なものであることを示すものと考えられる。

(文献)

1) Braun,P.E.(1977),in Myelin, Morell,P.,Ed.,N.Y.Plenum Press,p.689

2) Chou,F.C-H.,Chou,J.C-H.,Shapira,R. and Kibler,R.F.(1976),J.Biol.Chem. 251,2671.

3) Cohen,S.R.,McKhan,G.M. and Guarnieri,M.(1975),J.Neurochem. 25,371

4) 長池, 塚田,(1979)神経化学18,196

5) 四宮, 加藤, 今澤, 宮本(1979), 神経化学18,176

6) 塚田, 渋谷, 小川(1972) 神経化学11,60

47 トリプトファン欠乏餌飼育ラットの脳ミエリンたん白及び学習行動の変動

野村正彦・大辻正高・岡村邦博・永田　豊
（保健衛生大・医・生理）

〔要　約〕

食餌中のトリプトファン(TRY)を制限することによって(CORN餌飼育)、ラット脳内のセロトニン(5HT)量が減少し、オペラント型学習能力も低下し、また中枢ミエリンの形成不全がおこることが知られている。

このTRY欠乏時の脳内ミエリン蛋白合成能の変動を調べるために、^{14}C-Leucineをラット脳室内に注入して、ミエリン分画への放射能の取り込みを測定した。TRY欠乏群ラット脳より分画したミエリンは、正常群に比べて明らかに^{14}C-放射能の取り込みの減少が認められ、また、SDS-polyacrylamido-gel electrophoresis で分画した蛋白像では、軽および重塩基性蛋白間に見出される intermediate protein量の減少がみられた。さらに定率反応学習課題で Fixed Ratio 50 の条件下で強化学習をおこなうと、TRY欠乏群ラットでは正常群に比してレバー押し反応数の増加と各強化間の短縮が観察された。

このような成績はミエリン蛋白合成能の低下と脳内セロトニン作動系ニューロン活動の変動が、動物の学習行動様式に密接な影響をおよぼす可能性を示唆している。

Key words :　Tryptophan, Myelin protein & Learning behavior.

セロトニンは神経伝達物質の1つとして精神神経疾患、特に抑うつ状態の病因と関連性の強いことが考えられ、種々の神経活動に密接な働きがある[2,6]。このセロトニンの代謝基質であるトリプトファンは食餌中に含まれ、欠乏した条件下で飼育生育させた動物は、脳内セロトニンが低値を示すだけでなくミエリン形成不全及び学習行動の異常を示した。[9]

本年はトリプトファン欠乏条件下で飼育した動物の脳内ミエリン形成不全の原因究明の1つとして、ミエリンたん白質の変化を検討し、更に行動変化発現との関連性を調べた。

〔方法〕

実験動物：Wister-Imamichi系雄ラットを自家繁殖させ、出生直後の新生仔を次の条件下で飼育成育した。対照群飼料のほぼ8%程度の含有量しかTRYを含まないトウモロコシ(CORN)を基本にして調整した飼料で飼育したCORN飼育群、CORN飼料に0.1%TRYを添加した飼料で飼育したCORN+TRY飼育群、CORNと同じ粗たん白質含有量を含む6% CASEIN基質の餌飼育群の4種類を実験群として、対照飼料で飼育した対照群と比較した。[4,9]

^{14}C-Leucineのミエリン分画への取り込み：ネンブタール麻酔下にラット頭蓋骨を開け、脳室内に放射能ラベルのLeucineを注入し、1時間後に断頭脳を剔出してミエリン分画を分離し、各々の分画への放射能の取り込みを調べた。また分画の一部は20%TCAで除たん白後、クロロホルム、エーテルで洗って後沈査を1N NaOH で可溶化し、たん白分画に取り込まれた放射能を Packard liquid scintillation counter で測定した。[7]

たん白含有量はLOWRY et al法[8]によった。

ミエリン分画の調整法：AGRAWAL et alの方法[1]に準じて行った。脳組織の10倍量の0.88 M Sucroseでテフロンガラスホモゲナイザーでホモゲナイズ後、上層に0.32 M Sucroseを重層して75,000g×1h遠心後、中間層の粗ミエリン分画を取り出し、9倍量の水ショックを行った後更に75,000g×15 minの遠心を2回くり返した。沈査を0.32 M Sucroseでホモゲナイズ後、0.88 M・0.75 M・0.55 M上に重層して、75,000g×1h遠心分離し、Light Myelin、Heavy Myelin及びMembrane分画を得た。

SDS－ポリアクリルアミドゲル電気泳動：試料は各々の実験群脳由来のミエリン分画を使用した。5%SDS、0.1% Mercaptoethanolを添加後60℃30分反応させて、4%濃縮ゲル及び11%分離ゲルを使って電気泳動を行った[12]。染色はCBB-G250で行い、7%酢酸で脱色後、GELMANデンシトメーターで泳動パターンを記録した。

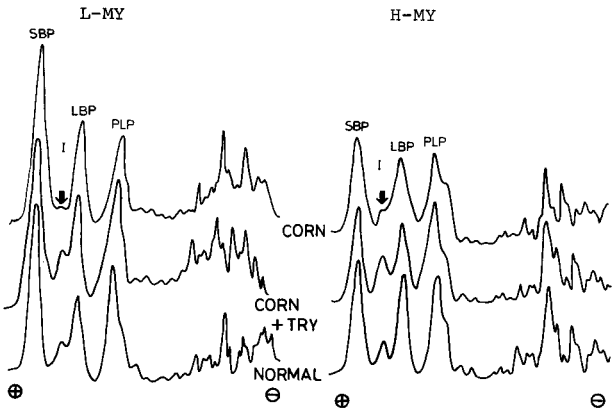
定率反応学習課程：Skinner箱内のlever-press反応を50回行うと1個の餌が強化されるスケジュール下で(FR-50)毎回20回を1試行として、1日1試行づつ15日間行った。成績は一定時間内の反応率と強化間隔時間(Interreinforcement Interval)及び強化後の休止(post-reinforcement pause)期間をそれぞれ比較した[5,10]。

表1 Incorpomation of ^{14}C-Leucine into myelin protein of NORMAL CORN, CORN+TRY, and 6 % CASEIN fed rats

	NORMAL	CORN	CORN+TRY	6% CASEIN
Homogenate	8264	8338	7538	8630
Crude Myelin	5834	3438	4034	5488
Light Myelin	5579	4325	5168	4801
Heavy Myelin	4805	3098	4010	4845
Membrane	3590	2032	2365	2757

L-^{14}C(U) Leucine 328mCi/mmol, was injected into ventricles of each 4 rats of each group.
Values are the mean specific radioactivity(cpm/mg protein)

図1 SDS-polyacrylamide gel electrophoretic profiles of light myelin and heavy myelin protein



[結果及び考察]

1. ミエリン分画への ^{14}C-Leucine の取り込み：

表1の如くCORN群はミエリン分画への放射能の取り込みは低くCORN+TRY群及び6%CASEIN群は対照群との中間的な値を示した。また、ミエリンたん白分画への取り込みはCORN群のみミエリン分画ホモジェネートの50%以下であったが、CORN+

CUMMULATIVE RESPONSE ON FIXED-RATIO 50 SCHEDULE OF CORN, CORN + TRY AND NORMAL FED RATS

図 2

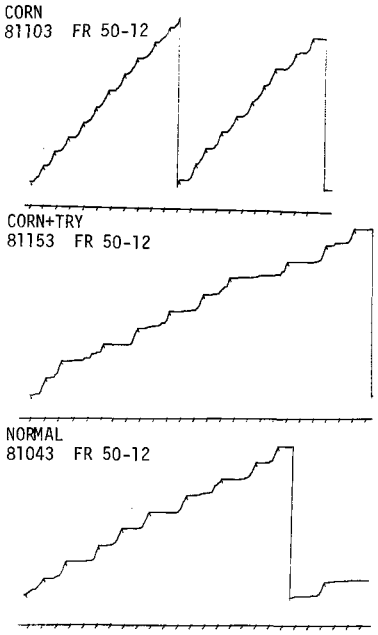
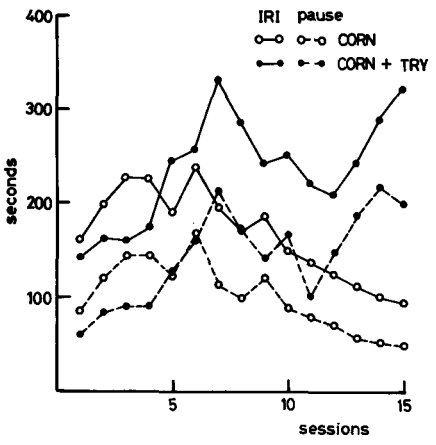


図 3

Interreinforcement interval (IRI) and the post reinforcement (pause) on Fixed-Ratio 50 schedule of CORN and CORN+TRY fed rats



TRY及び6%CASEIN群は55%以上であり、対照群の示した60%値に近い値を示した。

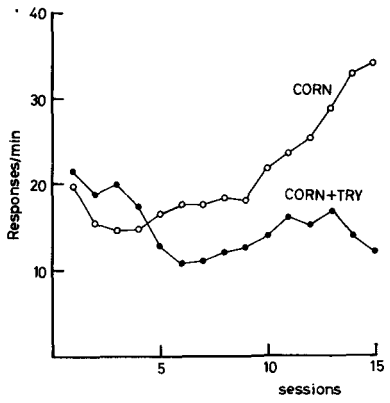
2. ミエリン分画の電気泳動：

ミエリン分画のうちLight Myelin及びHeavy Myelin分画を電気泳動分析後、デンシトメーターでそれぞれのバンドをスキャンした。図1の如くLight及びHeavy MyelinではSmall basic protein (SBP)及びLarge basic protein (LBP)の間にあるIntermediate proteinのピークがCORN群でのみ減少を示し、TRY添加群でこれが対照群に近いピークを示していることから、TRY欠乏による変化ではないかと考えられる。

3. 学習成績：

CORN群及びCORN+TRY群が示した明度弁別学習成績の差を更に詳細に検討すべく、FR50条件下で学習を行った。図2はFR50第12試行目の累積図を示したものである。CORN群の81103番ラットはほぼ100秒に1回強化を受ける反応を示したのに対し、CORN+TRY群の81153ラットは250秒以上かかってFR50の強化を受ける反応を呈した。これは対照群ラットである81043番ラットの累積図とほぼ同じパターンであった。図3では各群10匹の平均反応時間を15試行目にわたって示した。即ちFR50各強化間に要した時間(IRI)はCORN群では強化開始時150秒であったのが、第15試行目には100秒と短縮が見られた。そして強化後のpauseも同様の傾向を認めた。これに対してCORN+TRY群は試行開始時150秒であったIRIが徐々に延長して、300秒にまで延長し、pauseも同様試行数の進行に伴い増加を示した。図4は両群の単位時間当りの反応数を示した。即ちCORN群は第10試行目以降急激に反応数の増加を認め、第15試行目では30回(Responses/min)まで達した。これに対し、CORN+TRY群は全試行過程を通じてほぼ10回から15回の間にあり、対照群が常時一定して10回前後の反応を示し、これらと全く同一のパターンを示した。即ちTRY欠乏であるCORN群のみが活動性が

図4 **Responses rate on Fixed-Ratio 50 schedule of CORN and CORN+TRY fed rats**



過多であるという異常行動型を示し、明度弁別学習で認めた学習異常行動を更に裏付ける結果を得た。[3,10]

TRY欠乏群ラットが示したミエリンたん白への放射能の取り込みの変化は、TRY添加でほぼ正常群に近づく事、及び電気泳動で認められたIntermediate proteinのpeakの減少がTRY添加で回復を示した事から、TRYがミエリンたん白構成及びミエリンの機能に直接関与している可能性が考えられた。一方、学習行動変化もTRY欠乏群ラットが示した異常行動がTRY添加でほぼ正常群の学習行動型に近づくことから、脳内セロトニン作動性神経系の持つ1つの重要な機能が、TRYの摂取量を変えることで容易に調節できることが分った。

References

1. Agrawal,H.C.,Trotter,J.L.,Burton,R.M. & Mitchell,R.F.(1974)Biochem.J.140.99.
2. Clemens,J.A.(1978) Ann.New York Acad.305.399.
3. Fernstrom,J.D. & Lytle,J.D.(1976) Nutritional Reviews 34.257.
4. Fernstrom,J.D. & Wurtman,R.J.(1971) Nature 234.62.
5. Gott,C.T.& Weiss,B.(1972) J.Experimental Analysis of Behavior 18.481.
6. Jouvet,M.(1969) Science 163.32.
7. Konat,G.,Offner,H. & Clausen,J.(1979) J.Neurochem.32.187.
8. Lowry,O.H.,Rosenberg,N.J.,Farr,A.L. & Randale,R.J.(1951)J.biol.Chem.193.265.
9. 野村正彦，大辻正嗣，永田豊(1980) 神経化学 19．210
10. 野村正彦(1980) 動物心理学年報 30．54
11. Tsukada,Y.,Nomura,M.,Nagai,k.,Kohsaka,S.,Ito,M. & Matsutani,T. Behavioral Neurochemistry (1977) 63 EdsDelgado,J.M.R. & De Feudis. New York, Spectrum Pub.
12. Weber,K.& Oshorn,M.(1969) J.biol.Chem.244.4406.

48 網膜2', 3'-cyclic nucleotide 3'-phosphodiesterase の免疫組織化学

西沢芳子・栗原正・高橋康夫
(新潟大・脳研・神経薬理)

〔要　約〕

最近，網膜のミエリン画分や網膜の photoreceptor - interneuron の部位に，高活性の 2',3'-cyclic nucleotide 3'-phosphodiesterase (CNP) が存在するとの報告されている。そこで，私達は脳 CNP の免疫組織化学的染色法を網膜に適用して，CNP の局在を検索し，次のような結果を得た。

1) 網膜10層のうち，photoreceptor の Outer segment layer, inner segment layer および nerve fiber layer が，CNP 抗体で染まることが判明した。

2) 特に photoreceptor cell inner segment 内の ellipsoid に相当する部分が，塊状に強く染められた。

3) 網膜の種々の細胞を Sarthy & Lam に従って dissociate させ，組織切片と同様に CNP 抗体で処理したところ，やはり photoreceptor の ellipsoid に相当する部分が強く染められた。ganglion cell, horizontal cell, amacrine cell や Müller cell などは，CNP 抗体に反応しなかった。

Key words : 2',3'-cyclic nucleotide 3'-phosphodiesterase — immunohistochemical localization — retina

2',3'-cyclic nucleotide 3'-phosphodiesterase (CNP) は，中枢神経系のミエリンおよびミエリン形成細胞（オリゴデンドログリア）に高い活性が認められる。このことは，免疫組織化学的な方法で確められた[1]。最近，Kohsaka ら[2]は網膜のミエリン画分に，又，Giulian ら[3,4]は網膜の photoreceptor - interneuron の部位に高い CNP 活性を検出し，CNP が網膜のどの細胞に存在するか興味の的となった。

ここでは，私達がラットの中枢神経系で行った免疫組織化学的方法[1]を，ウシの網膜に適用させて検索した結果を報告する。

（実験材料と方法）

(1). 網膜のパラフィン包埋切片

Prophet[5] の方法に従って，10%ホルマリン－0.1M リン酸緩衝液(pH 7.4) で固定を行った。完全に固定液を除去してから，脱水・包埋した。包埋したブロックは，6 μm の厚さの切片に切って，後に述べる PAP 法で染めた。

(2). 網膜細胞の dissociation および固定

ウシの眼を乗二つに切り開き，反転させて Retina を剥離した。Sarthy & Lam[6] の方法に従って，dissociation suspension を調製した。細胞は，すぐに 2% グルタールアルデヒド・1%ホルマリン－0.2M Tris-Hcl 緩衝液(pH 7.4) で固定を行った。固定液を完全に除去して，上と同様に，PAP 法に従って染めた。

(3). 抗 CNP 血清の調製

すでに報告した方法[1,7]で抗血清を調製した。抗血清はラットの脳に用いたと同じ100

倍から200倍の希釈抗血清を用いた。

(4). 免疫組織化学的染色（PAP法）

6 μmの厚さの組織切片を1 % H_2O_2・0.2M Tris-HCl緩衝液(pH 7.4)で30分処理し，0.25% Triton X-100・0.2M Tris-HCl緩衝液(pH 7.4)で、30分 incubation した。次に3 %の正常ブタ血清に5分反応させてから，抗CNP血清(×100 or 200倍希釈）で4℃ overnightで，反応させた。次にブタの抗ウサギIgG(×50）で1時間反応させてから，PAP(×100)で1時間反応後，0.01 % H_2O_2・0.05% 3,3'-diamino-benzidine tetrahydrochloride で発色させた。

固定されたdissociated cellsは，1 % H_2O_2・0.2M Tris-HCl緩衝液(pH 7.4)で4℃ 1時間処理した。PAP法は組織切片の場合と同様に行った。ただし抗CNP血清との反応は37℃ 1時間 incubationした後4℃でovernightした。

（実験結果）

組織切片(6 μm)では，ウシ網膜の10層のうち，outer segment layer，inner segment layerおよびnerve fiber layerがPAP法でCNP抗体に染まった。nerve fiber layerは線維状に染まり，ミエリンが存在する部位にCNPが存在することを示した。しかしミエリンが存在する部分以外にも，photoreceptor cellの一部であるouter segment layerとinner segment layerが，CNP抗体で特異的に染め出された。とりわけ，photoreceptor cellのinner segmentが濃く染まるように見えた。この部分の染まり具合をはっきりさせるために，顕微鏡下でouter segment layerを削り取り，なるべくinner segment layerを露出させてからPAP法で染めてみた。こうして染色するとphotoreceptor cellのinner segmentのうち，小くらみをもった頭部すなわちellipsoidに相当する部分が塊状に染め出された。だが，external limiting membraneに近いinner segmentの部分(myoid)は，染まっていなかった。

dissociated cell suspensionの場合，形態がなるべくintactなものを選んで，細胞の種類を同定し染め出された細胞を観察した。photoreceptor cellはouter segmentが離脱していたが，inner segmentおよび核部がよく保たれたものがあった。photoreceptor cellは組織切片と同様に，inner segmentのellipsoidに相当する部分がCNP抗体で強く染め出された。この細胞のmyoidに相当する部分，核，核部の細胞質，それに終足と思われる部分は染まっていなかった。ganglion cell，horizontal cell，amacrine cell，Müller cellなどは，形態が損われてはいたが，CNP抗体に反応しなかった。

（考察）

Kohsaka ら[2]は，網膜のミエリン画分に高いCNP活性を検出し，網膜CNPがnerve fiber layerのミエリンに結合していると考えた。一方，Giulian ら[3,4]は網膜のmicrodissectionを行い，ミエリン化されたoptic nerve fibersよりもむしろphotoreceptor-interneuronの部位に高いCNP活性があることを報告した。私達は，免疫組織化学的にouter segment layer，inner segment layerおよ

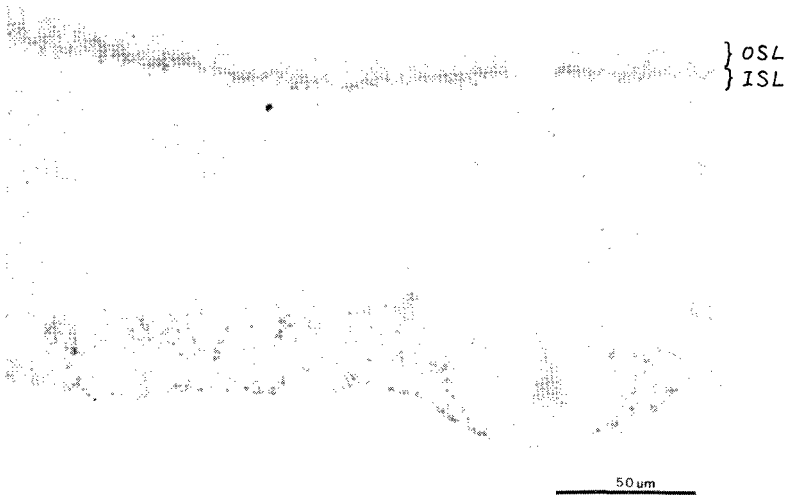


図1. 抗CNP血清(PAP法)で染めた網膜切片
OSL, outer segment layer; ISL, inner segment layer

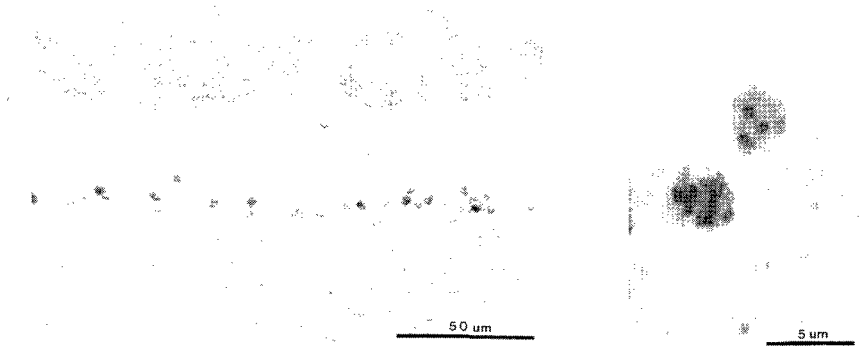


図2. outer segment layerを剥り取った後抗CNP血清(PAP法)で染めた網膜切片

び nerve fiber layer に CNP が存在することを明らかにした。特に photoreceptor cell inner segment の ellipsoid に相当する部分が強く染まるのが注目された。carbonic anhydrase C は、脳ではオリゴデンドログリアーミエリンに特異的とされるが、Kumpulainen[8] は網膜 inner segment layer に強い carbonic anhydrase C 活性が検出されることを見い出している。網膜 photoreceptor cell の inner segment はオリゴデンドログリアーミエリンと何か共通要素を備えているように思える。又、網膜にはかなりの量のセレブロシド，スルファチドが含まれているが[9]これも nerve fiber のミエリンばかりでなく photoreceptor cell からも由来している可能性がある。網膜 photoreceptor cell は，機能的にはニューロンに似ているとされるが、代謝的にはオリゴデンドログリアーミエリンに発達した系をもっているのではないかと思われる。

1. Nishizawa, Y., Kurihara, T., and Takahashi, Y. (1981) Brain Res. 212, 219-222
2. Kohsaka, S., Takamatsu, K., Nishimura, Y., Mikoshiba, K., and Tsukada, Y. (1980) J. Neurochem. 34, 662-668
3. Giulian, D. (1980) Brain Res. 189, 135-155
4. Giulian, D., and Moore, S. (1981) J. Biol. Chem. 255, 5993-5995
5. Prophet, E. (1977) Histologic 5, 73-74 日本語版
6. Sarthy, P.V., and Lam, D.M.K. (1979) Brain Res. 176, 208-212
7. Kurihara, T., Nishizawa, Y., Takahashi, Y., and Odani, S. (1981) Biochem. J. 195, 153-157
8. Kumpulainen, T. (1980) Acta Ophthalmol. 58, 397-405
9. Dreyfus, H., Pieringer, J.A., Farooqui, A.A., Harth, S., Rebel, G., and Sarlieve, L.L. (1978) J. Neurochem. 30, 167-174

49 Snell下垂体性dwarfマウスのミエリン形成不全について

野口鉄也・杉崎哲朗・塚田裕三
(慶大・医・生理)

〔要　約〕

すでにわれわれは成長ホルモン分泌不全動物を用いて，脳の発育，とくにミエリン形成に成長ホルモンが必須であることを報告した。今回はSnell下垂体性dwarfマウスの神経系のミエリン形成とグリア細胞の増殖過程をみるために2',3'-cyclic nucleotide 3'-phosphohydrolase (CNPase)，DNA含量を発育期を通じて測定し，以下の結果を得た。

(1) CNPase活性はSnell下垂体性dwarfマウス(dw/dw)では，大脳，脳幹で低値を示し，小脳，脊髄，視神経，坐骨神経で+/?と全く差を認められなかった。

(2) 脳部位当りのDNA含量は大脳，小脳ともにdw/dwで著しく低値で，とくに大脳では10日令以後の増加は全くみられなかった。

(3) dw/dwマウス大脳より精製したミエリン分画のCNPase活性(蛋白当り)は+/?のそれと等しい値を示し，dw/dwマウスのミエリン分画の回収率(蛋白量として)は+/?のそれより著しく低くかった。

以上の結果より，dw/dwマウスのミエリン形成不全はグリア細胞の増殖の減少によって惹起されていることが示唆された。

Key words：

Snell pituitary dwarf mice, CNPase, Dysmyelination

すでにわれわれはSnell下垂体性dwarfマウス(dw)(1)の大脳にミエリン形成不全のあることを示し，この形成不全が下垂体成長ホルモンを投与することにより回復することを報告した(2)。また生下時ハイドロコーチゾン中毒ラットを用いた実験からも，成長ホルモンがラット大脳のグリア細胞の分裂を促進し，ミエリン形成に必須であることを報告した(3)。そこで今回は，dwarfマウスの発育期神経系の部位別2',3'-cyclic nucleotide 3'-phosphohydrolase(CNPase)活性の変動と同時に，DNA含量を測定し，dwarfマウス大脳でみられるミエリン形成不全もまたグリア細胞の増殖の減少によることが示唆されたので報告する。

実験材料と方法

動物：The Jackson Laboratoryより購入し，自家繁殖したSnell下垂体性dwarfマウスを用いた。尚+/?(+/+及び+/dw)とdw/dwの判定には抗ウシ成長ホルモン抗体を用いて免疫組織学的方法を行った。

DNA含量の測定：DNAの抽出はSchmidt and Thannhauserの方法(4)に従い，定量はBurtonの方法(5)により行った。

CNPase活性の測定：Tsukadaらの方法(6)によった。

ミエリン分画：組織を0.32M庶糖液中でホモジェナイズし，遠沈により核分画を得，この核分画を0.8M庶糖液に重ね，105,000g，60min遠沈，界面のミエリン分画を再度0.8M庶糖液にのせ，再遠沈し，精製ミエリン分画を得た。

実験結果

脳各部位の湿重量の発育に伴う変化

Fig. 1.に示すごとく，dw/dw は発育期を通じて脳各部位で低い湿重量を示し，40日令でも +/? の約70-80% であった。とくに注目すべきことは大脳で11日令以後ほとんど湿重量が増加しないことであった。

脳各部位のDNA 含量の発育に伴う変化

Fig. 2.に示すごとく，dw/dwの大脳では(A)，10日令以後 DNA含量の増加は全く認められず，+/? では25日令までほぼ直線的に増加した。このことは dw/dw ではこの時期に増加するグリア細胞の分裂が10日以後ほとんど停止していることを示していた。一方，小脳では(B)，外顆粒層細胞の分裂増殖の時期に一致して +/? ，dw/dw いずれでも DNA含量は増加したが，dw/dw では25日令で +/? の約 70% にとどまった。

したがって，dw/dw大脳ではグリア細胞の分裂が，小脳では外顆粒層細胞の分裂が極度に減少していることが示唆された。

神経系各部位でのCNPase 活性の発育に伴う変動

ミエリン形成にともなう脳各部位でのCNPase 活性の増加の様子を Fig. 3.に示した。+/? 大脳では(A)，ミエリン形成期（10日令～25日令）に一致してCNPase 活性が急増するが，dw/dwではその増加が強く抑制されていた。小脳では(B)，+/? と dw/dw の間に全く差は認められなかった。脳幹では(C)ミエリン形成期を通じて +/? に比してdw/dwでは低値にとどまり，ミエリン完成期の40日令でも依然として低値であった。しかし，その他の部位，すなわち，脊髄(D)，視神経(E)，坐骨神経(F)では小脳と同様に +/? と dw/dw の

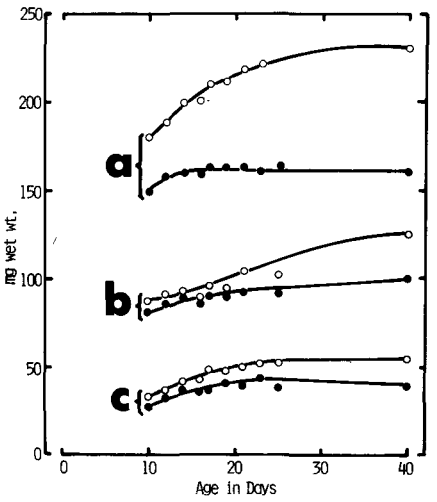


Fig. 1. Changes of tissue-weight during development: A; Cerebrum, B; Brain stem, C; Cerebellum. Each value represents the mean value of 6 animals. (○): +/?, (●); dw/dw

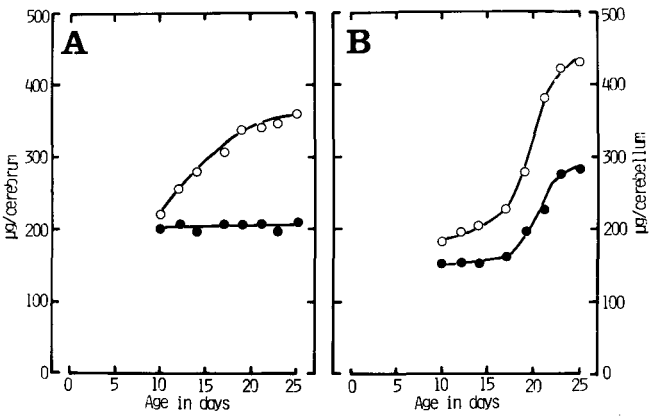


Fig. 2. Changes of DNA contents in cerebrum (A) and in cerebellum (B) during development: The values were expressed as μg DNA per part. Each point represents the mean value of 6 animals. (○): +/?, (●): dw/dw

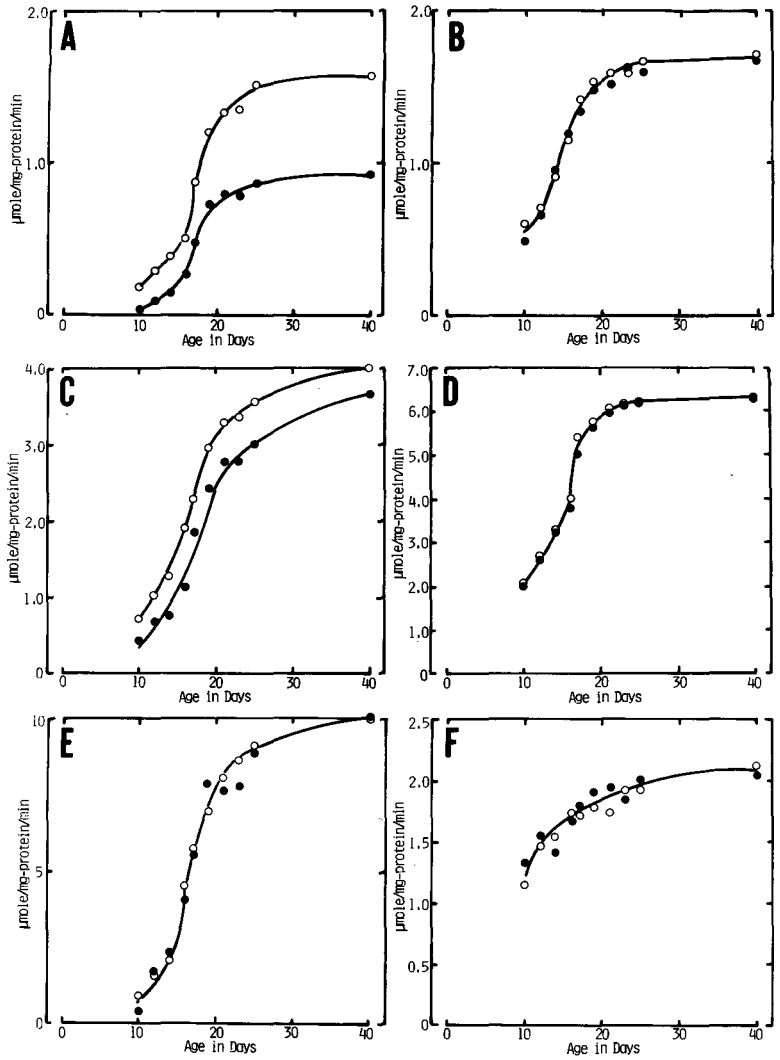


Fig. 3. Changes of CNPase activity in different part of brain during development: The values were expressed as μmole/mg-protein/min. Each point represents the mean value of 6 animals. A; Cerebrum, B: Cerebellum, C; Brain stem, D; Spinal cord, E; Optic nerve, F; Sciatic nerve. (○); +/?, (●); dw/dw.

間に全く差を認められなかった。

十/? と dw/dw の大脳ミエリン分画での CNPase 活性

40日令の大脳ホモジェネートの CNPase 活性は dw/dw で 十/? の約 54% であったが，ミエリン分画を精製することによって，その活性は 十/? と dw/dw で全く一致していた。また全活性は 十/? の40% であった。一方 dw/dw のミエリン分画に回収される蛋白量は

CNPase activity in purified myelin fractions of the cerebra from normal control and dwarf mice at 40 days of age.

		CNPase			Protein	
		Specific Activity (μmole/mg-protein/min)	Total Activity (μmole/min)	Recovery (%)	Total Protein (mg)	Recovery (%)
Normal Control	Homogenate	1.65±0.09* (5)	51.56	100	31.25	100
	Purified Myelin	7.59±0.14 (5)	23.36	45.3	3.08	9.86
Dwarf	Homogenate	0.89±0.05 (5)	18.04	100	20.20	100
	Purified Myelin	7.54±0.28 (5)	8.67	48.1	1.15	5.69

Tab. 1. The values of CNPase specific activity were expressed as mean ± SD with number of animals shown in parenthesis.

*: $p<0.01$ by Student's t test.

十/? の 60% にとどまった。

組織学的知見

PAP 法(7)を用いて，抗ラミミエリン塩基性蛋白(MBP)抗血清で40日令の十/?, dw/dw の中枢神経を免疫組織学的に検索した。その結果 dw/dw の Corpus Callosum は十/? のそれに比較して低形成であることが著明な変化であった。さらにこの部位を電顕で観察すると但々のミエリン鞘のラメラ構造は良く保たれていた。

考察

マウス，ラットのグリア細胞の分裂は大脳で生後に(8)，小脳(9,10)及び脊髄(11)で胎生期に行なわれることが知られている。したがって dw/dw マウスの大脳及び小脳でみられる脳部位当りの DNA 含量の発育に伴う増加の停止は，前者ではグリア細胞が後者では内顆粒層細胞が減少していることが示唆される。これをうらがきするように，発育期を通じて，CNPase 活性は大脳，脳幹で低値を示し，小脳，脊髄では全くその差が認められない。さらに精製ミエリン分画の CNPase 活性値および組織学的知見をあわせ考えると，dw/dw のミエリン形成不全は有髄線維の数の減少によることが示唆される。したがって dw/dw マウスでも生後の大脳と脳幹のグリア細胞の分裂が低下し，ミエリン形成不全が惹起されるものと考えられ，成長ホルモンの不足はグリア細胞の分裂を低下させ，ミエリン形成不全を起すという，われわれの報告(2,3)を支持するものである。加えて，dw/dw の大脳，脳幹で S-100 含量が減少し，小脳で不変であるという結果(12)もこれを支持している。しかし，視神経のグリア細胞の分裂は生後5日に起る(13)という報告があり，dw/dw マウスの視神経のミエリン形成については明確な説明は得られず，視神経のミエリン形成過程そのものについて目下検討中である。

文献

(1) Snell,G.D. (1929) Proc. Nat'l. Acad. Sci. USA 15, 733-734 (2) Noguchi,T. et al. (1981) J. Neurochem., Accepted for publication (3) Noguchi, T. et al. (1981) J. Neurochem. Accepted for publication (4) Schmidt, G. and Thannhauser,S.J. (1945) J.biol. Chem. 161, 83-89. (5) Burton,K. (1956) Biochem.J. 62, 315-323. (6) Tsukada,Y. et al. (1980) J. Neurochem. 34, 1019-1022. (7) Sternberger,L.A.(1970) J. Neurochem. 18, 315-333. (8) Bery,M. and Rogers, A.W. (1965) J. Anat. 99, 691-709. (9) Fujita,S. (1967) J. Cell Biol. 32, 277-288. (10) Fujita,S. et al. (1966) J. comp. Neurol. 128, 191-208. (11) 藤田晋也(1972)神経進歩 16, 388-395. (12) 野口鉄也ら (1979) 神経化学 18, 204-207 (13) Skoff,R.P. et al. (1976) J. comp. Neurol. 169, 291-312.

50 S-100タンパクの高感度エンザイムイムノアッセイ(EIA)法
— 人脳脊髄液(CSF)中のS-100タンパクと Neuron-specific enolase(NSE)の測定 —

加藤兼房(愛知県コロニー・生化)・中島　孝(国立がんセンター・病理)
松谷天星丸(保健衛生大・医・総医研・発達生理)

〔要　約〕

1) β-D-Galactosidase (Gal)を標識酵素として使った，S-100タンパクの高感度サンドイッチEIA系を作製した。抗(S-100)血清のIgG画分をpepsinで処理して，Fc部分を除き，抗原との結合部位を保持している$F(ab')_2$フラグメントを使って酵素標識抗体および抗体結合固相を調製した。抗体フラグメントとGalは二価反応試薬 N,N'-o-Phenylenedimaleimide を用いて結合した。抗体結合固相は，抗体フラグメントをシリコンゴム片に物理的吸着させた。抗体結合固相と酵素標識抗体を用いてサンドイッチ法にてS-100タンパクを測定すると，3 pg/試験管の微量が測定可能であった。この測定系を使うと，CSF中のS-100タンパク濃度が測定でき，60 pg/ml CSF以上のS-100は正確に測定できた(within-assay, between-assay ともにCV値は10%以下)。

2) 加療中の患者のCSF中S-100タンパク濃度は，0.1～2 ng/mlの値が測定された。進行中の水頭症では高値を示した。

3) 同時に測定したCSF中のNSE濃度は1.5～15 ng/mlの値を示し，各検体中のS-100とNSEの濃度間にはよい相関関係($r=0.73$)が認められ，CSF中のS-100タンパクはNSEとともに神経組織損傷のマーカー物質として，臨床医学分野での有用性が示唆された。

Key words：　S-100 protein,　Enzyme immunoassay,　Cerebrospinal fluid

---

神経組織特異タンパクとして注目されてきたS-100タンパクは，分子量約2万の酸性タンパクで大脳では白質に多く，細胞レベルでの分布では主としてグリア細胞の細胞質に存在するとされている。Isobeら[2]はいわゆるS-100タンパク分画には，20%アクリルアミドゲル電気泳動で分離されるS-100aとS-100bが存在することを見つけている。S-100タンパクの生理的役割を明らかにするために，種々の条件下での組織内濃度の測定が行われている[10]。S-100の微量測定法としてComplement fixation (CF)法とRadioimmunoassay (RIA)法が用いられているが，CF法はbioassay法のため，RIA法は^{125}Iの半減期が短いために，安定した測定系を維持することが困難である。近年微量測定法として，RIA法のradioactive isotopeの代りに酵素を標識として使うEIA法が開発され，その中で大腸菌由来のGalを標識酵素として用いる系はRIA法に優るとも劣らない安定した微量測定系である[1]。神経組織特異タンパク，14-3-2(またはNSE)はこのEIA系を応用することにより単一神経細胞レベルでの解析が可能になっている[3]。

今回われわれはS-100タンパクの微量測定のために上記EIA法を適用したところ，数pgの微量のS-100タンパクが測定でき，従来報告されているCF法[8]，RIA法[7](最小測定量はともに0.1 ng)にくらべ安定で，しかも数十倍の高感度測定ができることがわかった。本EIA法はS-100最近の神経分野で広く利用可能と考え，測定法の詳細を報告すると同時に，人CSF中に存在する微量のS-100タンパク濃度の測定結果を，NSE(14-3-2タンパク)濃度と対比しながら紹介する。

〈実験材料および方法〉

S-100タンパクの精製および抗血清の作製

牛S-100タンパクをUyemuraらの方法[9]により精製した。精製標品は7.5%アクリルアミドゲル電気泳動(pH8.9)でbuffer frontに単一バンドを示し，15%アクリルアミドゲル中では二本のバンド(S-100aとS-100b)を示した。精製したS-100タンパクとメチル化牛血清アルブミンの混合物[1](1mg毎/動物)をウサギで免疫して抗血清を作製した。

抗血清のIgG画分，およびF(ab')$_2$フラグメントの調製[4]

抗血清6mlより硫安分画をくり返し(50, 40, 33%飽和)約40mgのIgG画分を得た。このIgG画分(40mg/2ml, pH4.5)に1.6mgのペプシン(ブタ腸粘膜，シグマ社)を加え，37°Cで16時間反応後，1N NaOHを加えて中和(pH8.0)し，Sephadex G-150カラム(pH8.0)にかけて，F(ab')$_2$画分を分離した。(約20mg) F(ab')$_2$画分の一部(10mg)をAmicon Centriflo, CF-25で濃縮(約2ml)し，透析(0.1M酢酸ソーダ，pH5.0)して酵素標識のために使った。残りのF(ab')$_2$は0.1Mリン酸ソーダ，pH7.0，含0.1% NaN_3に透析して抗体結合固相調製のために用いた。

抗体Fab'-Gal複合体[4]

抗体F(ab')$_2$フラグメントを2-メルカプトエチルアミンで還元しFab'(SH)フラグメントとしてから，過剰のN,N'-o-phenylenedimaleimide (Aldrich社)溶液中に加えて反応させ，マレイミド-Fab'を得，これとGal(ベーリンガー社)とを反応結合させた。Fab'-Gal複合体量はGal活性で表わした。1 unit活性 = 1μmole生成物/min. 10mgのF(ab')$_2$画分から調製された酵素標識抗体は約15000検体分の測定に使える量であった。

抗体結合固相の調製[5]

シリコンゴム片(中3mmのひも，サンコープラスチック社，を長さ4mmに切った円柱)に抗体F(ab')$_2$フラグメントを物理的吸着させた。すなわち適当に希釈した上記F(ab')$_2$溶液(pH7.0, A_{280}≒0.5)中に，シリコンゴム片を浸し4°Cで一夜放置し，抗体溶液を回収した後固相を上記リン酸緩衝液，次いでA液(0.01Mリン酸ソーダ，pH7.0含0.1M NaCl, 1mM $MgCl_2$, 0.1%牛血清アルブミン(BSA), 0.1% NaN_3)でよく洗って，A液中4°Cで2日間以上保存後測定に用いた。抗体F(ab')$_2$溶液は反復使用が可能で，抗体結合固相は少くとも1ヵ月は安定であった。

測定法の原理

図1に示すように，サンドイッチ法にて行った。まず測定すべきS-100タンパクを固相に不溶化した抗体に結合させて，つぎに抗体を介して固相上にトラップされたS-100に酵素標識抗体を結合させて，固相に結合した酵素(Gal)活性を測定してS-100タンパク量を定量した。

測定操作

検体または標準S-100タンパクを含むG液(0.01Mリン酸ソーダ，pH7.0，含0.3M NaCl, 1mM $MgCl_2$, 1mM Ca^{2+}, 0.1% BSA, 0.1% NaN_3) 0.5mlに抗体結合固相を一個づつ入れ，30°Cで振とうした。5時間後に反応液を吸引除去して，試験管内で固相を洗った(A液1ml×2回)。A液+1mM Ca^{2+}の溶液で希釈した酵素標識抗体(3munit/0.2mg)中に固相を移し，4°Cで一夜静置した。翌日反応液を吸引除去し，A液で固相を洗ってから，固相上に結合したGal活性を測った。Gal活性は，4-methylumbelliferyl-β-D-galactosideを基質とし，生成した4-methylumbelliferoneを螢光光度計で測定する方法[4]を用いた。

図1. 測定法の原理を示す模式図

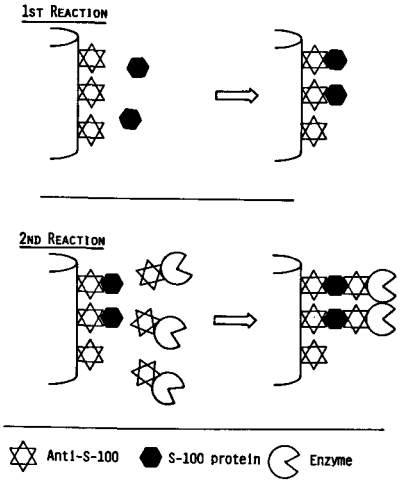
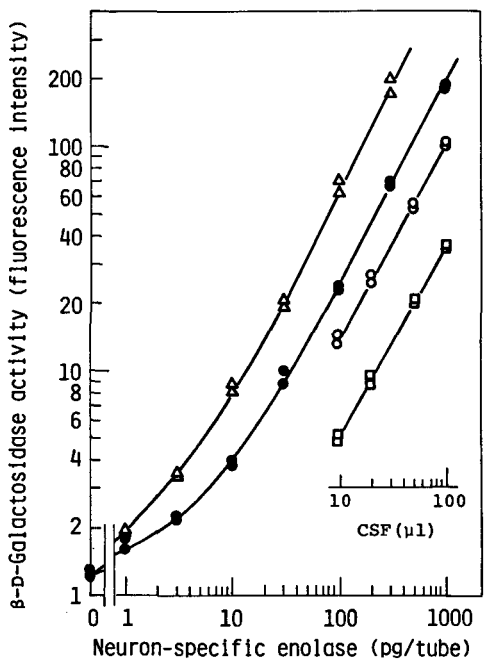


図2. S-100タンパク測定系の標準曲線

●, 標準牛S-100タンパク.

○, □, ■, 人CSF検体.



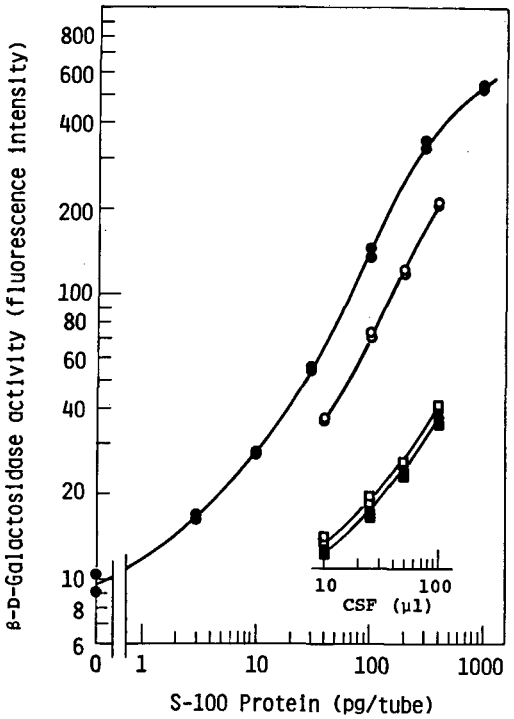


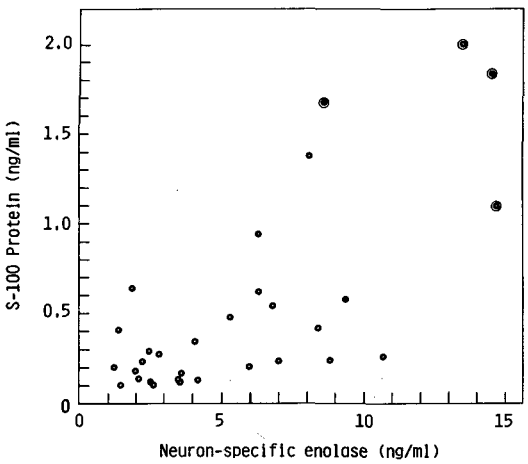
図3. NSE測定系の標準曲線

●, 標準人NSE. △, 標準ラットNSE.

○, □, 人CSF検体.

図4. 人CSF中のS-100タンパクとNSE濃度

◉は水頭症のCSF



NSE の測定

ラットNSEと人NSEが共通抗原性を有することを利用して，すでに報告している[3]ラットNSE測定系を用いて測定した。なお標準NSEは人脳より精製したものを用いた。測定操作は上記S-100の場合と同様に行った。但し Ca^{2+} を含まない反応液を用いた。

CSF 検体

神経系疾患等で入院加療中の患者のCSFを使った。

<結果>

図2にS-100タンパクの検量線を示した。Milesら[7]はS-100とその抗体との反応が Ca^{2+} によって促進される事を報告している。われわれの測定系でも Ca^{2+} を添加すると，測定系の抗体抗原反応が促進されることが確認されたので，測定系反応液中に1mMの Ca^{2+} を加えた。固相に結合するGal活性はS-100タンパク量に応じて増加し，3pgから1ngまでのS-100が測定できた。この測定系にCSF検体を種々の容量加えてみると，固相に結合するGal活性は加えた容量に比例して増加し，少くとも100μl添加までは検量線と平行な曲線が，各検体ごとに得られた。すなわち，100μl以下のCSF検体を用いれば測定系は干渉されることなく，正確にCSF中のS-100量が測定できることがわかった。測定系の正確度を知るために，CSF検体50μlを使った時のwithin-assay (n=10) とbetween-assay (n=5) のCV（変動係数）は10%以下であった。すなわちCSF中のS-100が60pg/mlの微量まで測定できることがわかった。これはMichettiら[6]が最近報告しているCF法による測定感度6ng/mlにくらべると100倍の高感度測定法である。

図3はすでに報告している[1]NSEの測定系を用いて人CSF中のNSE濃度を測定したときの検量線である。ラットNSEとくらべると約30%の最終交叉率で人NSEが測定できることがわかった。またCSF量100μlまでは測定系に加えても干渉作用はなく，正確な測定ができた。(within-assay, n=10; between-assay, n=6 ともにCV値は7%以下) 測定感度はS-100測定系と同様3pg/試験管または60pg/mlCSFであった。

種々の患者のCSF中のS-100とNSEを測定した結果を図4に示した。CSF採取時の患者の病状等が一定でないため，疾患種別の比較をするには例数が少ないが，図中で高値を示すものは新鮮な神経組織損傷のある可能性の強い症例であった。また図からわかるように，S-100濃度とNSE濃度は密接な相関を有し（Y=0.73），CSF中の両物質は，神経組織損傷のマーカー物質として利用でき，早期診断，経過，治療効果判定等に有力な情報を与えてくれるのではないかと考えている。

<考察>

抗牛S-100抗体を使ったS-100タンパクの測定系を作製し，人CSF中のS-100濃度測定について記述したが，CSFの測定値は，正確には，牛S-100等価の値である。人と牛のS-100は100%同一構造ではないため，本測定系への人S-100の交叉率は100%以下と考えられる。より正確な測定は，同種S-100を標準物質として使うべきであろう。

REFERENCES: (1) Ishikawa, E. & Kato, K.(1978) Scand. J. Immunol. 8, Suppl. 7, 43-55. (2) Isobe, T., Nakajima, T. & Okuyama, T.(1977) Biochim. Biophys. Acta 494, 222-232. (3) 加藤幸房，石井木富士子，福田由美子，仙波憲治 (1980) 神経化学 19, 394-397. (4) Kato, K., Fukui, H., Hamaguchi, Y. & Ishikawa, E. (1976) J. Immunol. 116, 1554-1560. (5) Kato, K., Hamaguchi, Y., Okawa, S., Ishikawa, E., Kobayashi, K. & Katunuma, N.(1977) J. Biochem. 81, 1557-1566. (6) Michetti, F., Massaro, A., Russo, G. & Rigon, G.(1980) J. Neurol. Sci. 44, 259-263. (7) Miles, L.E.M., Lee, Y.L. & Eng, L.F.(1977) J. Neurochem. 28, 1201-1205. (8) Moore, B.W., Perez, V.J. & Gehring, M.(1968) J. Neurochem. 15, 267-272. (9) Uyemura, K., Vincendon, G., Gombos, G. & Mandel, P. (1971) J. Neurochem. 18, 429-438. (10) Zomzely-Neurath, C. & Walker, W.(1980) in Protein of The Nervous System. (eds. Bradshaw, R.A. & Schneider, D.) Raven Press, New York, pp. 1-57.

51 Enzyme Immunoassayによる膜結合性S-100蛋白質の測定

吉田知久・大西林吉・原田泰弘
田渕和雄・西本　詮
（岡山・医・脳外）

〔要　約〕

Enzyme immunoassay(EIA)を用い、従来我々の行なってきたmicro-complement fixation assay(CFA)では測定の困難であった膜結合性S-100蛋白質の定量を行なった。膜結合性S-100蛋白質はHaglid[1]らの方法に従ってn-pentanolにより抽出した。またEIAはShinkai[8]らの方法に従っていわゆるサンドウィッチ法で行なった。本法による測定可能範囲は1～100ng/mlで、我々の行なってきたCFAの約50倍の感度であった。以上の方法を用い、ラット正常脳およびヒト脳腫瘍5例(glioblastoma 2例，astrocytoma 1例，neurinoma 2例)において、水溶性および膜結合性S-100蛋白質を測定した。その結果ラット正常脳の水溶性S-100蛋白質量は0.35±0.13ug/mg soluble protein(n=4)でCFAによる測定値0.43±0.11ug/mg soluble protein(n=5)と比較的よく一致した。また膜結合性S-100蛋白質は水溶性S-100蛋白質の20.1±8.4%(n=4)であった。ヒト脳腫瘍では全般に膜結合性S-100蛋白質量は少なく水溶性S-100蛋白質の0%～0.34%程度であったが、neurinomaでは両者ともに多く、glioblastomaでは両者ともに少ない傾向があった。また水溶性S-100蛋白質に対する膜結合性S-100蛋白質量の比率が組織学的悪性度が増すにつれて低下する傾向をみとめた。

Key words：enzyme immunoassay　membrane-bound S-100 protein

S-100蛋白質は、1965年Moore[3]によりはじめて分離・精製された神経組織特異蛋白質のひとつで、主としてグリア細胞内に水溶性の形で存在しているが、一部は膜に結合した形で存在していることが知られている。我々はヒト正常脳およびヒト脳腫瘍[4]ヒトおよびラット培養脳腫瘍細胞、ラット実験的梗塞脳等[5]において水溶性S-100蛋白質の定量的検索をmicro-complement fixation assay (CFA)を用いて行なってきたが、膜結合性S-100蛋白質の定量は、CFAの感度が比較的低く多くの試料を必要とする等の理由から困難であった。このため、より高感度を得る目的で、理論上radioimmunoassay(RIA)に匹敵する感度を有し、しかも操作・設備ともに簡便なenzyme immunoassay (EIA)の応用を試みたところCFAの約50倍の高感度を得たので、本法を用いて膜結合性S-100蛋白質の検索を行なった。

<材料および方法>

(1)膜結合性S-100蛋白質の抽出：Sprague－Dawley ラット2匹(雄・体重300g)を断頭により殺し、4個の大脳半球および2個の小脳を摘出後ただちに－80℃にて凍結保存した。また手術時得られた脳腫瘍標本(glioblastoma 2例，astrocytoma 1例，neurinoma 2例)を可及的すみやかに－80℃で凍結保存した。これらの検体(湿重量150～700mg)を用いてHaglid[1]の方法に準じて膜結合性分画を抽出した。すなわち、まず2.5mMのEDTAおよび0.1mMの2－mercaptoethanolを含む再蒸留水(WEM，pH7.1)を検体に5倍量加えてTeflon-glass homogenizerにてホモジュナイズし、20,000×g，1時間遠沈して得られた上清を水溶性分画とした。一方、沈渣を最初の½量のWEMにてホモジュナイズし、これに最終濃度が5%となるようn-pentanolを加えて4℃で一晩

抽出、20.000 xg，1時間遠沈した上清を蒸留水に対して72時間透析して n-pentanol を除去し、再び 20.000xg，1時間遠沈して得られた上清を膜結合性分画としてEIAによる検索に用いた。(2) EIA：Zuckerman[11]の方法により、牛脳より分離・精製したS-100蛋白質を用いて、Plesia ら[6]の方法に準じて New Zealand 産白色家兎を免疫し、これによって得た抗血清から硫安塩析法により IgG 粗分画を分離した。この IgG 10mg に NaKane[10]らの方法により horseradish peroxidase (HRPO, Sigma Type Ⅲ) 10mgを結合させ IgG－HRPO conjugate を作製した。Fig. 1 にこの conjugate の Sephadex G-100 カラムクロマトグラフィーによる溶出曲線を示す。黒丸は O.D. 280nm で測定した蛋白質濃度を、白丸は O.D. 403nm で測定した HRPO 濃度を表わす。この両者の一致する fraction No 51へ60を IgG－HRPO conjugate として使用した。この蛋白質濃度は 0.54mg/ml であった。一方、Voller[9]らの方法に準じて、直径10mm、厚さ6.5mm のプラスチックビーズ（以下ビーズと略す）に IgG を固相化した。すなわち、燐酸緩衝液（0.076M, PH6.4）により 10ug/ml の IgG 溶液を作製し、これにビーズを56℃、30分間 incubate することにより IgG を結合させた。以上の材料を用い、Shinkai[8]らの方法に従っていわゆるサンドウィッチ法により EIA を実施した。まず第一反応として S-100 蛋白質標準溶液（0, 1, 5, 10, 25, 50, 100ng/ml）もしくは検体 0.2ml を、非特異的結合を防ぐために30％の正常家兎血清および0.1％の牛血清アルブミンを加えた燐酸緩衝液0.3mlで稀釈し、これとビーズを室温で3時間反応させ、ビーズ上の固相化 IgG に抗原を結合させた。ビーズを十分洗浄して遊離の抗原を除去した後、第二反応として20倍に稀釈した IgG－HRPO conjugate 0.5ml を加え、4℃、一晩反応させることによりビーズ上に固相化 IgG－抗原－IgG－HRPO の結合を作製した。このビーズを再び十分洗浄して遊離の conjugate を除去し、結合した HRPO の酵素活性を 5－aminosalicylic acid を基質として発色させ 500nm の吸光度で測定した。すなわち、ビーズに 2ml の酵素基質溶液（0.06％の 5-aminosalicylic acid および 0.003％の H_2O_2 を含む燐酸緩衝液）を加えて 4℃、一晩 incubate して発色させた後、約25ul の 2% NaN_2 溶液を加えて反応を止め、吸光度を Hitachi 100-60型ダブルビーム分光光度計により測定した。なお各測定はすべて duplicate で行なった。(3)水溶性総蛋白質量は O.D. 280 nm の吸光度により測定した。

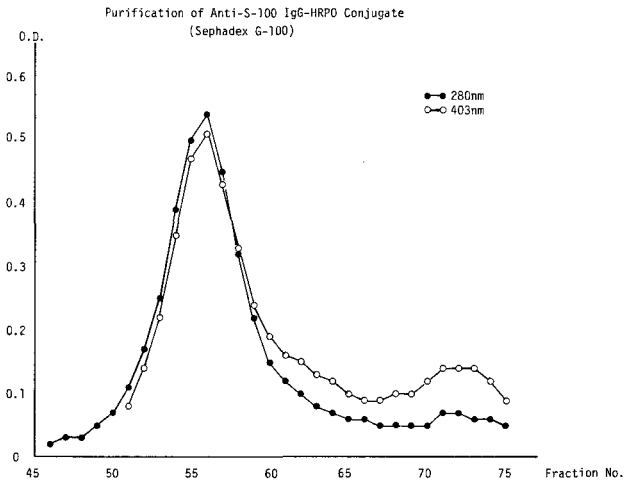


Fig. 1

＜結果＞

EIA を実施するにあたり、予備的に anjugete の濃度および固相化の際の IgG 濃度につき検討した。conjugate の稀釈は10, 20, 50, 100, 200倍を検討したが50倍以上では標準曲線の傾きが極端に低く不適であった。また10倍と20倍稀釈では発色の程度に差

はあるものの傾きはほとんど変わらなかったため20倍稀釈を使用した。一方、IgG濃度については5, 10, 20ug/mlを検討したが5および20ug/mlでは標準試料の高濃度の部分が低下する傾向がみとめられたのに対し、10ug/mlでは標準試料濃度によく比例した吸光度が得られたためこの濃度を使用した。以上の条件で作製した標準曲線をFig 2に示す。縦軸は500nmの吸光度を、横軸はS-100蛋白質濃度を表わし、各点は2検体の平均値である。この変動係数は5%以内であった。この標準曲線より本法の測定可能範囲は1へ100ng/mlと考えられる。Table. 1はラット正常脳における水溶性および膜結合性S-100蛋白質の定量結果である。大脳半球における水溶性S-100蛋白質量は0.35±0.13ug/mg soluble proteinでCFAによる測定値0.43±0.11ug/mg soluble proteinと比較的よく一致したがやや低値を示す傾向があった。また小脳には、水溶性・膜結合性S-100蛋白質とも大脳より多く含まれていたが、水溶性S-100蛋白質に対する膜給合性S-100蛋白質の比率はほぼ等しく約20%であった。Table 2にはヒト脳腫瘍標本における定量結果を示す。ラット正常脳に比べ、膜結合性S-100蛋白質はその絶対値、水溶性S-100蛋白質に対する比率ともに著しく少なくそれぞれ0へ125ng/g wet weight、0へ0.34%であった。腫瘍相互間ではneurinomaで水溶性・膜結合性S-100蛋白質とも高値を示し、glioblastomaでは両者とも低値を示した。とくにglioblastomaの一例では、本法では膜結合性S-100蛋白質は検出し得なかった。また水溶性S-100蛋白質に対する膜結合性S-100蛋白質の割合はneurinoma, astrocytomaに比べglioblastomaで低値を示した。

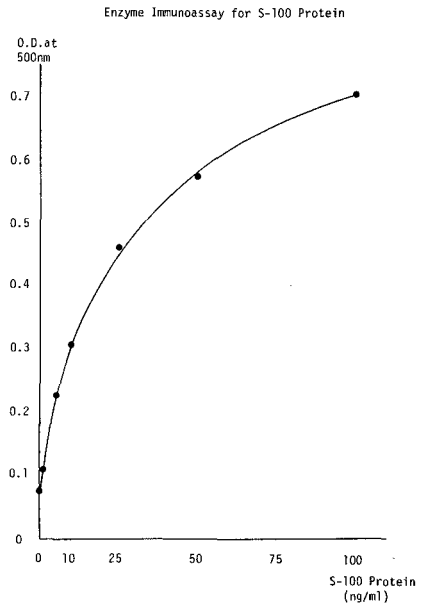


Fig. 2

Table 1

S-100 protein in rat cerebral hemisphere and cerebellum

	water-soluble S-100		membrane-bound S-100
	μg/mg soluble protein	μg/g wet weight	% of water-soluble S-100
cerebral hemisphere (4)	0.35±0.13	31.4±7.9	20.1±8.4
cerebellum (2)	0.69±0.03	35.7±1.5	22.4±5.7

Table 2

S-100 protein in human brain tumors

	water-soluble S-100		membrane-bound S-100	
	μg/mg sol. prot.	μg/g wet wt.	ng/g wet wt.	% of water-soluble S-100
glioblastoma	0.01	1.8	2.2	0.12
glioblastoma	0.09	10.6	0	0
astrocytoma	0.11	5.1	14.3	0.28
neurinoma	0.31	37.1	125.0	0.34
neurinoma	0.49	45.5	111.6	0.25

<考察>

S-100蛋白質は、生化学的にはその一次構造がすでに決定されるに至っている[2]が、その生物学的機能については未だ解明されるに至っていない。1972年Ruscaら[7]および1973年Haglidらは水溶性に存在するS-100蛋白質以外に膜に結合して存在するものがあることを報告した。我々は、実験的ラット梗塞脳における水溶性S-100蛋白質の経時的変動の検索の結果から[5]この膜結合性S-100蛋白質が生物学的に重要な機能を有している可能性があるのではないかと考え、その定量を試みてきたが、従来行なっ

てきたCFAは比較的感度が低く（抗血清の力価によって異なるが，50～70ng S-100蛋白質/ml）十分な検索ができなかった。このため、より感度の高い定量法を検討してきたが、RIAは設備・放射性廃棄物の処理等に難点があり、これと同程度の感度を有しながら特別な設備を必要とせず操作も簡便なEIAを採用し、CFAの約50倍の感度を得た。本法によるラット正常脳におけるS-100蛋白質の定量結果ではCFAによるそれに比べやや低値を示した。これは使用した緩衝液や試料の稀釈法の相違等による影響ではないかと思われるが、この程度の差は実用上問題とはならないと考えている。ヒト脳腫瘍における定量では、ラット正常脳に比べ膜結合性S-100蛋白質量が著しく少ないこと、腫瘍相互間で比較すると、neurinomaでは水溶性・膜結合性S-100蛋白質ともに多く、glioblastomaではとくに膜結合性S-100蛋白質が著明に少ないこと、水溶性S-100蛋白質に対する膜結合性S-100蛋白質が良性のneurinoma，astrocytomaに比べglioblastomaで低い傾向があること等の特徴がみとめられる。これらのことは、膜結合性S-100蛋白質が、正常グリアに比べグリオーマで低下し、とくにその組織学的悪性度が増すにつれて低下する可能性を示しているが、これを明らかにするには今後の症例数の増加、ヒト正常脳での検索、予後との関連の検索が必要であると考えている。このような膜結合性S-100蛋白質の定量を含め、今後のS-100蛋白質の検索に際し、EIAは有力な手段となりうると思われる。

（本研究の一部は文部省科学研究費補助金および厚生省がん研究助金による。）

Refference

1. Haglid, K.G. and Stavrou, D. (1973) J Neurochem., 20, 1523
2. Isobe, T. and Okuyama, T. (1978) Eur.J.Neurochem., 89, 379
3. Moore, B.W. (1965) Biochem.Biophys.Res.Commun., 19, 739
4. 守屋芳夫，古田知久，坪井雅弘，田渕和雄，西本 詮（1978）神経化学，17，265
5. 守屋芳夫，古田知久，原田泰弘，岸川秀実，田渕和雄，西本 詮（1979）神経化学，18，216
6. Plesia, O.J., Braun, W. and Palczuk, N.C. (1964) Proc.Nat.Acad.Sci., 52, 279
7. Rusca, G., Calissano, P. and Alema, S. (1972) Brain Res., 49, 223
8. Shinkai, H., Sohma, M., Takahashi, Y., Kojima, R., Hashimoto, M. and Ogawa,N. (1980) Molecular Immunol. 17, 377
9. Voller, A., Bidwell, D.E. and Bartlet, A. (1976) Protides of the Biological Fluids (Edited by Peeters, H.), Pergamon Press, Oxford, pp751
10. Wilson, M.B. and Nakane, P.K. (1978) Immunofluorescence and Rerated Staining Techniques (Edited by Knapp, W., Houlbar, K. and Wick, G.), Elsevier, North Holland, pp215
11. Zuckerman, J.E., Herschman, H.R. and Levine, L. (1970) J Neurochem., 17, 247

52 神経特異エノラーゼ(NSE)の大量調製と免疫組織化学への応用

石岡憲昭・礒辺俊明
奥山典生(都立大・理・化)
中島　孝(国立ガンセンター・II病理)

〔要　約〕

(1)ウシ脳抽出液中より、神経特異エノラーゼ(NSE)、S100タンパク質、カルモジュリン、GluP等を含む酸性タンパク質を大量調製用に製作したDEAE-セファデックスA-50 short fat カラムを用いた1回のクロマトグラフィーで系統的かつ大量に分離し粗分画した。

(2)NSE粗分画画分よりNSEをDEAE-セファデックスA-50カラムクロマトグラフィーにより最終的に精製した。得られたNSE標品は、最終硫安濃度1.6M(36%飽和) pH6.39の条件下で結晶化された。ウシ脳20kgから約0.9gの結晶NSEを得た。結晶NSEは、SDSゲル電気泳動法および変性剤を用いない2次元電気泳動法により分子量48,000-51,000、等電点4.5であった。アミノ酸組成は、ウシ脳14-3-2タンパク質やラット脳NSEとよい一致を示した。

(3)NSE結晶標品を不溶化したセファロース4Bを用いたアフィニティークロマトグラフィーによりNSE抗体を精製した。精製NSE抗体を用いて組織染色を行った結果、NSEは正常脳組織では神経細胞胞体ならびに神経突起に分布していた。さらに神経芽腫、カルチノイド腫瘍、肺の小細胞未分化癌等のAPUD系腫瘍もNSE陽性所見が見られた。

Key words : neuron-specific enolase, large scale crystallization, immunohistochemical study

脳可溶性酸性タンパク質を簡単に迅速にかつ大量に、しかも系統的に分離精製する方法により、S100タンパク質、カルモジュリンが精製され[5]、その一次構造決定を通じて両者の分子進化上の類縁関係が明らかにされている[6]。今回は、この系統的分離法を用いて神経特異エノラーゼ(NSE)を精製、結晶化し、さらに結晶化NSEを用いたアフィニティークロマトグラフィーで精製したNSE抗体を免疫組織化学へ応用して有用な知見を得たのでその結果を報告する。

〔実験材料および方法〕

(1)脳抽出液の調製と可溶性タンパク質の分画

調製と分画は、S100タンパク質の分離精製に関する既報の方法[5]に従って行った。すなわち、ウシ脳(20kg)を30%飽和硫安で抽出した抽出液(71ℓ)を硫安分画(85%飽和、pH4.7)した。得られた可溶性タンパク質画分(5.63ℓ)をDEAE-セファデックスA-50カラム(φ8.5×23cm)に添加した。イオン交換クロマトグラフィーは、大量調製を行うため、図1に示したようなアクリル管(φ8.5×25cm)と4枚のアクリル板(12×12×1cm)から成るshort fat カラムを使用した。カラムに吸着したタンパク質は、1mM EDTAを含む0.1M リン酸カリウム緩衝液(pH7.1)中の食塩濃度を0.10M、0.17M、0.22M、0.30M、0.45Mと段階的に上昇させる方法で溶離した。溶離されたタンパク質は、7.5%ポリアクリルアミドゲルディスク電気泳動により同定した。

(2)分析方法

7.5%ポリアクリルアミドゲルディスク電気泳動は、OrnsteinとDavisの方法[11][12]により、SDSゲル電気泳動は、1%SDSを含む5%ポリアクリルアミドゲルを用い、Dunkerと

Fig. 1. A short fat column



a: End piece (top)
b: Supporter rings for end pieces
c: End piece (bottom)
d: Tubing
e: Screw rod
f: Sheet (glass filter paper)
g: Raber cork
h: Outlet conectors
i: O-rings for packing

Column: DEAE-Sephadex A-50 (Ø 8.5 x 23 cm)
Elution buffer:
0.1M potassium phosphate, pH 7.1, containing 1mM EDTA
0.10M, 0.17M, 0.22M, 0.30M and 0.45M NaCl
Flow rate: 200ml/h

Fig. 2. A large scale systematic preparation of bovine brain extract

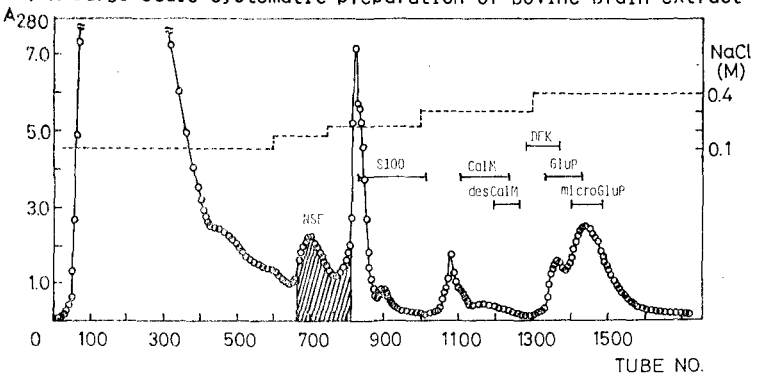
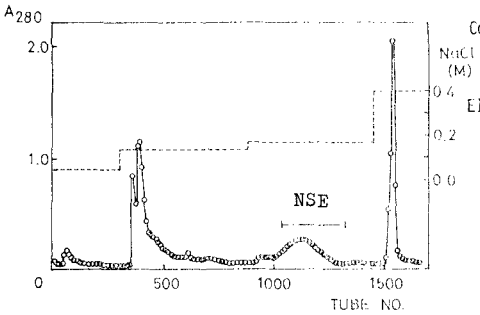


Fig. 3. Final purification of neuron specific enolase (NSE)



Column: DEAE-Sephadex A-50 (Ø 8.5 x 20 cm)
Elution buffer:
0.1M potassium phosphate, pH 7.1, containing 1mM EDTA
0.10M, 0.14M, 0.17M and 0.40M NaCl
Flow rate: 200ml/h

Fig. 5. 7.5% gel electrophoresis (a) and SDS gel electrophoresis (b)

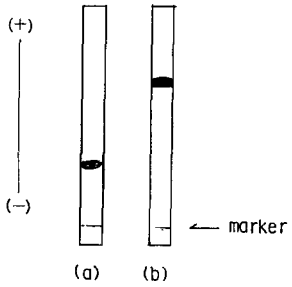
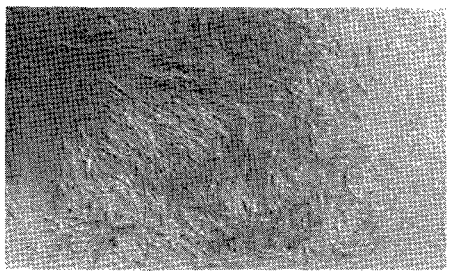


Fig. 4. Photographs of NSE crystals



(magnification x620)

Rückert の方法[3]により行った。エノラーゼ活性の測定は、Sodium-2-phospho-D-glycerate を基質として、Baranowski らの方法[1]により行った。

(3)酵素抗体法(PAP法)による免疫組織化学への応用

国立ガンセンターに於て、剖検または手術時に採取された正常脳組織ならびに各種腫瘍組織におけるNSEの分布をPAP(Peroxidase Anti-peroxidase)法で検討した。使用した腫瘍の内訳は、神経芽細胞腫：5例、カルチノイド腫瘍：22例、肺の小細胞性未分化癌：23例である。15%フォルマリン固定、パラフィン包埋されたこれらの組織より3μ切片を作製し、免疫組織化学に用いた。まずこれらの切片を脱パラフィンした後、0.3% H_2O_2加メタノールで内因性ペルオキシダーゼ反応を阻止した。次に非特異染色を少なくするために、10%正常ブタ血清を室温で30分間反応させた。1次抗体として、4 μg/ml の濃度の Monospecific 抗ウシNSEウサギIgGを用い、4℃で1晩、室温で1時間反応させた。さらにDAKO社の抗ウサギIgGブタ血清(20倍希釈)で、室温30分間反応させた。最後にDAKO社のPAPを50倍希釈して、室温で30分反応させた後、DAB反応を行い、発色させた。DAB反応液は、0.05Mアンモニウムアセテート-クエン酸緩衝液に0.005%の H_2O_2ならびに20mg/100mlの3,3'-diamino-benzidine tetrahydrochloride を加えたものを用い、室温で3～5分反応させた。後染色として、Giemsa染色を軽く行った。

〔結果および考察〕

(1)ウシ脳酸性タンパク質の系統的大量調製

ウシ脳抽出液(5.63l、175gタンパク質)を図1に示したDEAE-セファデックスA-50カラム(φ8.5x23cm)に添加し、0.10M食塩、1mMEDTAを含むリン酸カリウム緩衝液(pH7.1)で洗浄後、段階的溶離法で溶離した。溶離図を図2に示した。食塩濃度0.17MでNSE(図2、斜線部分)が溶離され、0.22MでS100タンパク質[5][6]、0.30Mでカルモジュリン[8](図2、CaIM)およびdes(Ala-Lys)カルモジュリン[7](図2、desCaIM)、0.45Mでは、グルタミン酸約50%有する分子量58,000のタンパク質[4](図2、GluP)、分子量9,000でGluPと同様なアミノ酸組成を有するmicroGluPおよび"DEKタンパク質"が系統的に溶離された。

(2)NSEの精製

図2中斜線部分で得られたNSE画分を硫安法(85%飽和、pH4.7)で濃縮後、DEAE-セファデックスA-50カラム(φ8.5x20cm)に添加して1mMEDTAを含む0.1Mリン酸カリウム緩衝液(pH7.1)中の食塩濃度を0.05M, 0.14M, 0.17M, 0.40Mと上昇させ溶離した。図3に溶離図を示した。NSEは、食塩濃度0.17Mで対称的なピークとして溶離され(図中NSE)、得られたNSE標品は、この段階で完全に精製された。

(3)NSEの結晶化とその生化学的性質

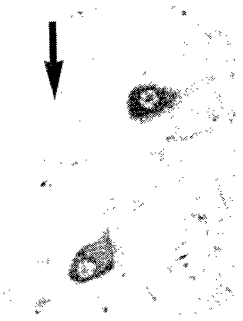
精製NSEの硫安沈澱物(85%飽和、pH4.7)を0.05Mイミダゾール塩酸緩衝液(pH7.8)に溶解し(NSE濃度20mg/ml)、氷上で冷却しながら飽和硫安溶液を36%飽和(1.6M)になるまで滴下、攪拌した(pH6.39)。結晶は、-20℃に凍結したNSE・硫安溶液を室温でゆっくりと融解させることにより生成した。結晶化NSEは、図4に示したように短針状結晶であった。NSE結晶の収量は、0.9g/20kg脳であった。結晶化NSEは、7.5%ポリアクリルアミドゲルディスク電気泳動およびSDSゲル電気泳動で単一バンドを与え(図5)、分子量48,000と計算された。さらに変性剤を用いない2次元電気泳動[9]

の結果、等電点4.5、分子量51,000であった。アミノ酸組成は、酸性アミノ酸が多くウシ脳14-3-2タンパク質[12]やラット脳NSE[10]とよく似ていた。NSEのエノラーゼ活性は、Sodium-2-phospho-D-glycerateを基質として87EU/mgであった。

(4)免疫組織化学への応用

結晶NSEをCNBr法でセファロース4Bに不溶化し、アフィニティークロマトグラフィーによりNSE抗体を精製した。得られた精製NSE抗体を用いて免疫組織化学的研究を行った。正常組織では、NSEの分布は神経細胞胞体と神経突起に認められた。図6にNSE染色による小脳歯状核の神経細胞を示した。脳神経核における神経細胞を見ると、全くNSEを持たない神経細胞よりなる神経核も存在した。例えば、延髄のオリーブ核等は、その例であった。NSEの染色態度は、神経細胞によって種々であった。神経芽腫では、全例がNSE陽性であった。より分化した神経節芽腫になると、NSEは、その胞体ないし突起に強く染色される傾向を有した。カルチノイド腫瘍では、22例中20例が陽性所見を示したが、その染色態度は比較的弱かった。肺の小細胞性未分化癌では、23例中20例がNSE陽性であった。そのうち、多数の細胞突起形成を示す中間細胞型では、突起が良くNSE抗体に反応した。ところが、1つの腫瘍組織内にNSE陰性の細胞群が混在することも、免疫組織化学的に確認された。NSEは、神経細胞ならびにAPUD系細胞に分布することが知られている[13]。脳における神経細胞は、全て一様にNSEを持つものではなく、その程度にかなりの差があることが免疫組織化学的に見られた。またAPUD系腫瘍ならびにParagangliomaとして総括される腫瘍には高頻度にNSEが分布していた。このことは、形態学的に、Neurosecretory granuleの存在や神経方向への分化等で特徴づけられるこれらの腫瘍細胞群が、生化学的にもNSEの存在という共通性を有することになる。従ってNSEはこれらの細胞の指標として有用であろうと思われる。

図6．NSE染色した神経細胞．(←)印の細胞はNSE陰性の神経細胞



(倍率 ×640)

REFERENCES

1. Baranowski, T. and Wolna, E. (1975) Method in Enzymology, XLII, 335-338.
2. Davis, B. J. (1964) Ann. New York Acad. Sci. 121, 404-427.
3. Dunker, A. K. and Rückert, R. R. (1969) J. Biol. Chem. 244, 5074-5080.
4. Ishioka, N., Isobe, T., Okuyama, T., Nomata, Y. and Wada, H. (1980) Biochim. Biophys. Acta, 625, 281-290.
5. Isobe, T., Nakajima, T. and Okuyama, T. (1977) Biochim. Biophys. Acta, 494, 222-232
6. Isobe, T. and Okuyama, T. (1978) Eur. J. Biochem. 89, 379-388.
7. Isobe, T., Ishioka, N. and Okuyama, T. (1981) B. B. R. C. in press
8. Kasai, H., Kato, Y., Isobe, T., Kawasaki, H. and Okuyama, T. (1980) Biomedical Research, 1, 248-264
9. Manabe, T., Tachi, K., Kojima, K. and Okuyama, T. (1979) J. Biochem. 85, 649-659.
10. Marangos, P.J., Zomzely-Neurath, C. and Goodwin, F. K. (1977) J. Neurochem. 28, 1097-1107.
11. Ornstein, L. (1964) Ann. New York Acad. Sci. 69, 1221-1225.
12. Roda, G., Grasso, A., Carretto, S., Moore, B. W. and Hoque-Angeletti, R. A. (1977) Brain Research, 124, 509-522.
13. Schmechel, D., Marangos, P. J. and Brightman, M. (1978) Nature, 276, 834-836.

53 クロマトフォーカシングカラムを使った人脳エノラーゼ(ααとγγ)の精製とそれらの性質

伊藤温子・鈴木富士子・加藤兼房
(愛知県コロニー・生化)

〔要　約〕

A) 精製：　hybrid型αγエノラーゼがクロマトフォーカシングカラム(CFC)を通すと、解離、再会合して、αα およびγγ 型の各 homo-dimerになる現象を利用して、人脳のαα およびγγ 型エノラーゼを精製した。[1]人脳ホモジネートの可溶性画分(17,000×g, 30分)をCM-Sephadexを通し、[2]硫安で分画(40-80% sat.)し、[3]DEAE-cellulose カラムにてαα, αγ, γγ 型に分離した。[4] αγ 粗標品を硫安沈殿で濃縮、透析し、CFC(PBE94カラム, 0.9×20 cm, Polybuffer74)にかけると、蛋白の主ピークはpH 5.8-4.3 のフラクションに溶出したが、エノラーゼ活性はpH7.7とpH4.5のフラクションに別れて溶出した。前者のαα 型酵素はQAE-Sephadexカラムで、後者のγγ 型酵素はDEAE-Sephadexカラムを通すと、SDSゲル電気泳動で単一バンドになった。

B) 性質：　αα, γγ ともに至適pHは6.8。2-phosphoglyceric acidに対するKmは2.0×10^{-5}M (αα), 2.8×10^{-5}M (γγ)とほとんど変わらなかったが、熱に対する安定性ではγγ がαα より安定であり、ともにMg^{2+}によって安定化された。アミノ酸組成もよく似ていたが、Glu, Gly, Lysに差が認められた。プロテアーゼ処理によるペプチドマップによってもααとγγに明らかな差が認められた。

Key words：　Enolases, Human brain, Chromatofocusing column.

哺乳動物の脳には3型のエノラーゼアイソザイム(αα, αγ, γγ)があり、これらは脳抽出液をDEAE-celluloseカラムにかけることによって分離される[3]。γγ(またはγサブユニット)はneuron specific enolase(NSEまたは14-3-2蛋白)[1][10]と呼ばれ、神経組織特異蛋白の一つである。我々は今までにラット脳の3型のエノラーゼを高収率に精製することに成功し、各サブユニット(αとγ)に対する抗血清を作製[11]し、特異抗体を使った3型のエノラーゼの超微量イムノアッセイ系を完成した[7][6]。この測定系を使って、3型のアイソザイムの組織分布[5]、細胞分化に伴う分布変動[4]等を明らかにしてきた。一方、NSEが神経組織に高濃度に存在する[5]ことから、神経組織損傷時には血液中あるいは脳脊髄液中へ漏出し、これら体液中でのNSE濃度が増加することが示唆された。それで我々は臨床医学分野での応用性を確かめるために、人NSEの微量測定系に必要な抗原の精製を試みたところ、最近開発発売されたCFCが本酵素の精製に非常に有効であり、比較的簡単にαα, γγ型の2型のエノラーゼが高収率に精製されたので報告する。

〔実験方法〕

(1) エノラーゼの精製：　人脳(190g)を5mM $MgSO_4$, 0.1mM EDTAを含む4倍容の15mM Tris-acetate buffer, pH6.5でホモジナイズし、17,000×g, 30分遠心した。遠心上清をCM-sephadexカラムに通し、溶出液を硫安分画(40-80% sat.)し、Buffer T(15mM Tris-HCl pH7.9, 5mM $MgSO_4$, 0.1mM EDTA)に溶解、透析した。透析液をDEAE-celluloseカラム(3.1×30 cm)にかけ、Buffer Tつづいて0.1M~0.3M NaCl-Buffer Tでαα, αγ, γγ をそれぞれ溶出し、溶出液を硫安80%飽和にして濃縮した。αγ の硫安画分をBuffer Tに溶解、透析して、DEAE-Sephadexカラム(1.5×25 cm)にかけ、Buffer T中 0~0.2 M NaCl濃度勾配で溶出し、活性の

ある画分を硫安80%飽和にて濃縮(3.25ml)し、Buffer I (25mM imidazol-HCl pH7.4, 5mM $MgSO_4$)に溶解、透析した。これをBuffer Iで平衡化したPBE94カラム(0.9×20cm)にかけ、5mM $MgSO_4$を含む7.5μmole/pH unit/ml Polybuffer 74 pH4.0で溶出した。pH 7.7で溶出された画分(CFC I)とpH 4.5で溶出された画分(CFC II)をそれぞれコロジオンバッグで濃縮し、CFC IはQAE-sephadex A-50カラム(0.9×10cm)を通し、4mM $MgSO_4$を含む10mM Tris-HCl pH 8.5で溶出し、αα型エノラーゼを得た。CFC IIはDEAE-Sephadexカラム(0.9×10cm), Buffer T中、0.1M~0.3M NaCl濃度勾配で溶出し、ββ型エノラーゼを得た。各操作は4℃~0℃で行った。

(2)酵素活性の測定: エノラーゼ活性はcoupled assayによった[11]。

(3)蛋白の定量: Bio-Rad Protein assayを用いbovine serum albuminをstanderdにした。

(4)電気泳動: SDSゲル電気泳動は濃縮ゲルを用い、Laemmliの方法[8]に準じ、Tris-glycineの系で行った。分離ゲルは10%アクリルアミドゲルを用い、3mA/tube, 2時間泳動した後、0.25% Coomassie brilliant blue R (メタノール-酢酸-水, 5:1:5)染色した。サブユニットの分子量はphosphorylase b (MW 94,000)①, bovine serum albumin (MW 67,000)②, ovalbumin (MW 43,000)③, carbonic anhydrase (MW 30,000)④, soybean trypsin inhibitor (MW 21,000)⑤, α-lactoalbumin (MW 14,400)⑥の検量線より決定した。

(5)ペプチドマップ: Clevelandらの方法[2]に準じ、試料(約0.5mg/ml)を0.1M Tris-HCl pH6.8, 0.5% SDS, 10% glycerol中100℃, 2分間加熱した後、Staphylococcus aureus V8 protease 28μg/mlまたは14μg/mlを加え37℃, 1時間インキュベートし、2-mercaptoethanol, SDSをそれぞれ終濃度10%, 2%になるように加え、100℃, 2分間加熱して反応を止めた。この試料を15%アクリルアミドゲルを用いてスラブゲル電気泳動[8]を行った。

(6)アミノ酸分析: 蛋白質を減圧封管中6N HCl中110℃, 20時間および70時間加水分解後、日立835アミノ酸分析機で行った。ThrとSerは20時間加水分解の値から、ValとIleは70時間加水分解の値より求め、他のアミノ酸は70時間と20時間加水分解の平均値から求めた。

〔結果および考察〕

(1)酵素の精製: 人脳190gからのエノラーゼの各精製ステップをTable 1.にまとめた。人脳ホモジネートの可溶性画分をCM-sephadexを通し、硫安分画(40-80% sat.)の後、DEAE-celluloseカラムを通すと、Fig.1に示すように、αα, αγ, ββの3型のエノラーゼが分離された。hybrid型のαγフラクションを硫安濃縮、DEAE-sephadex再クロマトの後、PBE94のCFCでpolybuffer 74 pH 4.0で溶出すると活性はpH7.7とpH 4.5にわかれて溶出された。(Fig.2) pH7.7で溶出されたフラクション(CFC I)をQAE-sephadexカラムに通して、比活性84.0 unit/mgのαα型エノラーゼ3.4mgが得られた。pH 4.5で溶出されたフラクション(CFC II)はDEAE-sephadex

Table. 1 Purification of enolase

Fraction	Total protein (mg)	Total activity (units)	Specific activity (units/mg)	Yield (%)
DEAE-cellulose (αγ)	163	1450	8.9	100
DEAE-sephadex (αγ)	71.9	1030	14.4	71.4
CFC-I (αα)		422		29.1
QAE-sphadex	3.4	287	84.0	19.8
CFC-II (ββ)		238		16.4
DEAE-sephadex	2.6	181	69.6	12.5

カラムで、比活性 69.6unit/mg の γγ 型エノラーゼ 2.6mg を得た。精製した酵素はともに SDS ゲル電気泳動で単一バンドであった。(Fig 3) また、CFCⅡのエノラーゼ蛋白は抗ラット γγ 血清と交叉反応することから γγ エノラーゼであることが確認された。

(2)酵素の性質：

SDS ゲル電気泳動によったサブユニットの分子量は、α,γ ともに 50,000 となり、両者に著しい違いはみられなかった。また coupled assay における至適 pH は αα, γγ ともに pH 6.8, Km値は αα：2.0×10^{-5} M, γγ：2.8×10^{-5} M とよく似ていた。

アミノ酸組成(Table 2)は γγ では αα に比べ、グルタミン酸、グリシンの含量が多く、リジンの含量が少なかった。また各アミノ酸の含量はラット脳の αα および γγ の値[11]とそれぞれ

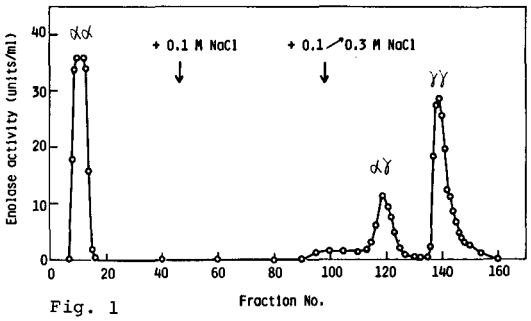


Fig. 1

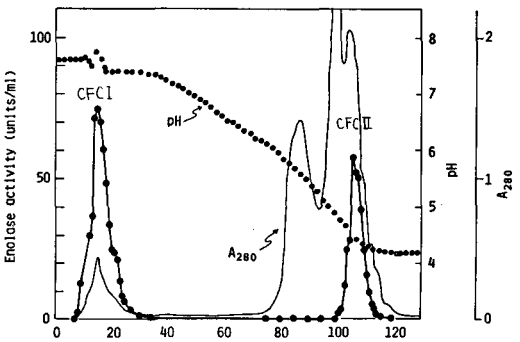


Fig. 2

Table. 2 Amino acid composition

(mol%)

	αα	γγ
Asp	12.07	12.43
The	4.32	3.79
Ser	6.00	5.79
Glu	10.63	11.90
Gly	9.16	9.98
Ala	10.45	11.06
Cys	0.11	0.29
Val	7.17	6.55
Met	1.87	1.77
Ile	5.94	5.32
Leu	8.46	9.15
Tyr	2.46	3.11
Phe	3.97	3.86
Lys	8.30	5.55
His	2.05	2.31
Arg	3.94	4.33
Pro	3.11	2.89

Fig. 3 SDS gel electrophoresis

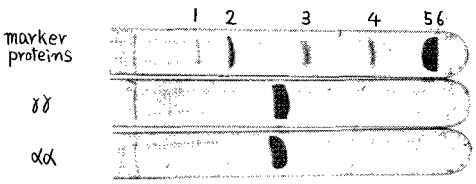
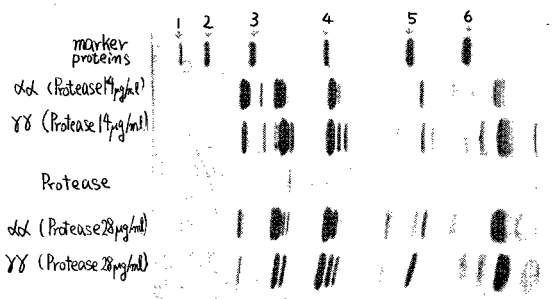


Fig. 4

Peptide mapping by limited proteolysis in SDS and analysis by gel electrophoresis



近い値を示している。

ペプタイドマップ (Fig.4) によって、α, γはそれぞれ異る蛋白であることが認められた。

また、55°Cインキュベーションによる熱安定性 (Fig.5) は、αα は γγ に比べ著しく不安定であった。5mM Mg^{2+} を加えることにより、αα, γγ ともに安定化されたが、γγ の方がより安定であった。

今回、人脳の hibrid型エノラーゼ αγ から、αα, γγ の homodimer 型エノラーゼを精製したが、これらが、もともと αα, γγ の homodimer型で存在するエノラーゼと同一の酵素であるかどうか現在検討中である。

CFCでは人脳の αα, γγ はそれぞれ pH 7.7, pH 4.5 の位置に溶出された。この値はラット脳 αα の等電点 5.9 に比べて高かった。

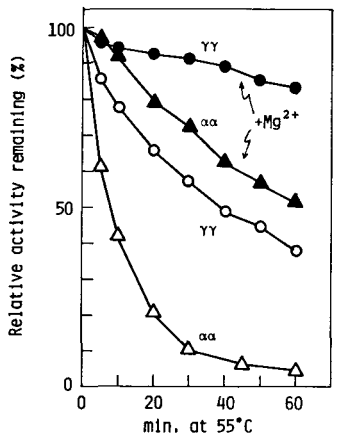


Fig. 5
Thermal stability of enolase at 55°C

hybrid型エノラーゼ αγ が穏やかな条件下で CFCによって簡単に解離、再会合して homodimer を形成することから、神経組織内においても、このような現象が生じ、これが何らかの生理的な役割を担っている可能性も考えられる。

REFERENCES

(1) Bock, E. and Dissing, J. (1975) Scand. J. Immunol., Suppl. 2, 4, 31-36.
(2) Cleveland, D.W., Fischer, S.G., Kirshner, M.W. and Laemmli, U.K. (1977) J. Biol. Chem. 252, 1102-1106.
(3) Fletcher, L., Rider, C.C. and Taylor, C.B. (1976) Biochim. Biophys. Acta 452, 245-252.
(4) Kato, K., Higashida, H., Umeda, Y., Suzuki, F. and Tanaka, T. (1981) Biochim. Biophys. Acta 660, 30-35.
(5) Kato, K., Ishiguro, Y., Suzuki, F., Ito, A. and Semba, R. Brain Res. in press.
(6) Kato, K., Suzuki, F. and Semba, R. (1981) J. Neurochem. 37, 998-1005.
(7) Kato, K., Suzuki, F. and Umeda, Y. (1981) J. Neurochem. 36, 793-797.
(8) Laemmli, U.K. (1970) Nature 227, 680-685.
(9) Marangos, P.J., Zis, A.P., Clark, R.L. and Goodwin, F.K. (1978) Brain Res. 150, 117-133.
(10) Schmechel, D., Marangos, P.J., Zis, A.P., Brightman, M. and Goodwin, F.K. (1978) Science 199, 313-315.
(11) Suzuki, F., Umeda, Y. and Kato, K. (1980) J. Biochem. 87, 1587-1594.

54 ショウジョウバエ神経系に対するモノクローナル抗体

藤田　忍, A.Ferrus, S.L.Shotwell,
*S.Benzer（カルフォルニア工科大・生物）

〔要　約〕

ハイブリドーマ技術により抗原を精製せずに得られるモノクローナル抗体は神経系における細胞間の化学的多様性の解析に革命的展望を切り開いた。[蛋白質・核酸・酵素, 26, 168 (1981), Zipser and McKay, Nature 289, 549-554 (1981)] 遺伝学を適用できるショウジョウバエの神経系に対するモノクローナル抗体が得られれば，脳におけるこの多様性の程度とその化学的実体を探り，さらに突然変異を利用して神経系で働く分子の機能を調べうると考えられる。我々はハエ頭部または脳のホモジネートで感作したマウスとNS-1細胞を使い2回の融合実験において，ハエ頭部の凍結切片に対する間接螢光抗体法によりスクリーニングを行ない，限界希釈法により78系統のハイブリドーマを得た。これらの生産するモノクローナル抗体には，脳または脳と神経にほぼ特異的なもの13例，脳と網膜にほぼ特異的なもの7例，網膜にほぼ特異的なもの1例などが含まれる。また組織特異的ではないが，脳では第一次視神経節だけに結合するもの，後者に特に結合の多いもの，逆に低いもの各1例が得られた。このように興味深い抗原分布を示す抗体をさらに多数収集すれば，神経系の発生，神経系突然変異，および神経細胞の化学的多様性の解析に有用であると考えられる。

Key words：

Drosophila nervous system, Monoclonal antibodies

生物学研究上問題とする分子に対する特異抗体が得られれば，一方で組織学的に生体内での分布とその制御を調べ，他方で高感度の定量（ラジオイムノアッセイ）や抗原分子の精製（アフィニティクロマト）など生化学的研究が可能となる。この種のアプローチは，神経系のように複雑な形態をもつ多様な細胞種が構成しかつその空間的関係が系の機能に本質的な意味をもつ場合には特に効果的であると考えられる。しかし実際には，従来の方法によって抗血清を得るためにはまず抗原分子を多量に精製することが前提となるため，神経系の研究においては免疫学的アプローチの活用には限りがあったと言えよう。

しかし，特異抗血清に含まれる抗体は化学的に異なる抗体分子の複雑な混合物であるのに対し，個々の抗体生産細胞が合成する抗体分子は化学的に均一で従って単一な抗原特異性（monospecificity）をもつことに着目して，Milsteinらはこれらの細胞にミエローマ細胞を融合させることにより増殖能を賦与し，さらにクローン化によって均一な抗体（モノクローナル抗体）を分泌しつつ無限に増殖しつづける培養細胞系統（ハイブリドーマ）を確立する技術を開拓した(1)。この方法では感作マウスの脾臓細胞をミエローマ細胞と融合させた後，望みの抗体を分泌するハイブリドーマ細胞を拾い出す操作（スクリーニング）を行なうので，接種抗原が混合物であってもその成分に対して特異的なモノクローナル抗体を入手しうること，またクローン化されたハイブリドーマの生産する抗体は単一特異的であるので吸収などの免疫学的操作が不要である点が，神経系への応用において特に重要であろう。

このハイブリドーマ技術を用いてBarnstableはラット光受容細胞の特定の部位や，

ミューラー細胞などに特異的な抗体を得(2), Trislerらは鳥類の網膜に濃度勾配をなして存在する糖蛋白質に結合する抗体を得ている(3)。さらにPNSとCNSの細胞にそれぞれ特異的に結合する抗体も報告された(4)。ZipserとMcKayはヒルの神経節に結合する抗体の中に，各神経節を構成する約400個の細胞の限られた数個に特異的なもの約40例を見出したが，その数個は抗体によってそれぞれ異なっていた(5)。これをやや強引に外挿すれば，各半神経節の200個の細胞はそれぞれ化学的個性を有するとも考えられる。

我々は突然変異などの遺伝学的アプローチが可能なショウジョウバエの神経系に対するモノクローナル抗体を多数得たので報告する。

方法

ここに報告するハイブリドーマは2回の融合実験より得られた。

実験1　キイロショウジョウバエ野生型CS系統のハエをアセトン中-20℃で脱水乾燥したもの(6)から脳を摘出採集した。これを0℃で生理食塩水中にホモジナイズし，フロインドのアジュバントに乳化したものをBALB/c♀マウスに接種した。接種量は毎回脳約50個で，0, 3, 5週に腹腔内注，8および18週に静注によった。最後の注射から3日後脾臓を摘出し，その細胞を常法(7)によりNS-1ミエローマ細胞と融合させた。即ち両細胞の混合ペレットを2分間50%ポリエチレングリコール1540 (Baker)にさらした後除々に希釈洗浄した。処理細胞は177個のマイクロタイターウェルに分割して37℃, 7% CO_2 高湿中で培養しHATによって融合細胞の選択を行なった。1週間後にはすべてのウェルに細胞の増殖がみられた。各ウェルの培養液上清を，ハエ頭部の無固定凍結切片(10μm)に対しFITC化したヤギの抗マウス免疫グロブリンG (H+L) (Cappel)を使って間接螢光抗体法によりスクリーニングした。興味ある抗体の検出されたウェルから最初ウェル当り5個の細胞を新たに撒き(ミニクローニング)，それより抗体を生産しつづけるものをさらにウェル当り1個で撒きなおしてクローニングを行なった。得られたハイブリドーマは常法により液体チッソ中に保存し，培養液は-20℃で貯蔵した。ハイブリドーマ番号がアルファベットか2で始まるものはこの実験より得られた。

実験2　接種抗原はハエ頭部のホモジネート（毎回約20個)，接種スケジュールは最後の注射を18でなく29週に行なった。融合後細胞を365個のウェルに分割し，各ウェルには約10^5個のマウス胸腺細胞をフィーダーとして加えた。ミニクローニングは省略し直接クローニングを行なった。以上以外は実験1と同様である。ハイブリドーマ番号が3, 4, 5, 6で始まるものはこの実験から得られた。

間接螢光抗体法　凍結切片をのせたカバースリップは室温高湿箱中で10-15分間細胞培養液とTBS (Tris-buffered saline: 10mM Tris-HCl, pH7.5, 130mM NaCl, 5mM KCl, 5mM NaN_3, 1mM EGTA)の1:1混合液と保温後，5分間TBS中で静置ゆすぎ，FITC-ヤギ抗マウスIg (TBSに50倍希釈）中で10-15分間保温，5分間ゆすぎの後90%グリセロールを含むTBSでマウントし螢光顕微鏡で観察した。コントロールとしてハイブリドーマ培養液の代りにミエローマ培養液を用いた場合には免疫螢光（バックグラウンド）は認められなかった。スクリーニングには野生型ハエを用いた。抗原分布の研究には凍結切片を2%パラホルムアルデヒドを含むリン酸緩衝生理食塩水で室温30分間固定したものを用いたが，野生型のハエではアルデヒド固定によって自己螢光が誘起されるので，変異遺伝子cn,

bwをもつハエを用いた。

結果

両融合実験ともすべてのウェルに細胞増殖がみられたが，実験1では約半数の81，実験2では約25%の95のウェル中に，ハエ頭部の何らかの組織に結合する抗体が検出された。このうち実験1からは29，実験2からは49，計78系統のハイブリドーマを得た。これには筋肉やレンズに特異的な抗体，あるいはほとんどすべての組織に結合する抗体と分泌するものも含まれるが，ここでは主として脳，複眼などの神経系にほぼ特異的なものについて報告する。

抗原分布はcn,bwをもつハエの頭部中央部を通る複数の固定切片について調べたが，ここに報告するもののうち上記固定による螢光染色パタンの変化が認められたものはなかった。観察された螢光の強度は固定により13例で増加し，9例で変化なく，2例で低下した。従ってこれらの抗原のほとんどは上記固定条件下では不活性化されない。

脳に特異的または主として結合する抗体　ショウジョウバエの脳では周縁部に細胞体から成る皮質が存在し，神経線維とシナプティックフィールドから成るニューロピルをとりまいている。得られた脳に結合する抗体は，その結合部位について多様であった。たとえば抗体D10（ハイブリドーマD10の生産するモノクローナル抗体，以下同様）はニューロピル内中央部の限定された部位だけを一様に染めるのに対し，抗体B7と4C6は主としてニューロピル内の多数の線維と神経を染め，さらに皮質や網膜内の少数の細い線維にも結合する。抗体3A4は脳内のより少数の線維と皮質，網膜周縁部，筋肉組織中に主として点状の染色パタンを示す。抗体B10，D6，2A1C，2G4Bは脳と神経に結合するが皮質に比べニューロピルにより密に結合し，しかもその皮質と接する層に最も強い螢光が認められる。抗体5D11と5H3も皮質よりニューロピルを強く染めるが，第一次視神経節においては逆に皮質の方が強く染まる。他方抗体D12Aにあっては，ニューロピル周縁部への結合に加えて特に強い螢光が第一次視神経節に認められる。ニューロピルに比べ皮質の方にはるかによく結合する例は抗体5D6であるが，これの第一次視神経節への結合は非常に少ない。脳神経以外には網膜と食道がこの抗体で染まる。抗体2D8は脳のニューロピル周縁部への結合に加えて，はるかに強い螢光がアンテナ神経などに認められる。

脳と網膜に結合する抗体　抗体2E9は脳，網膜，神経を強く染め，皮質にもニューロピルにも同程度の螢光が認められる。一方抗体3B4は神経，網膜およびニューロピルの粗な線維を染める。抗体2A12と3C2は網膜と脳では主としてニューロピルを染めるが，第一次視神経節においては逆に皮質で螢光が強い。抗体4B6A，6B11，6C5は網膜，神経，および脳の特にニューロピルに結合するが，ニューロピルの部位により結合密度が異なり，前2者ではmushroom bodyのcalyxとそれに接する皮質などが最も螢光が強い。

網膜にほぼ特異的な抗体　抗体3F2は光受容細胞にほぼ特異的であるが，加えて第二次視神経節にまばらな一層の点状の螢光が認められる。

第一次視神経節と脳の他の部位を区別する抗体　上記の例に加え，抗体5B12は皮下組織と食道を強く染めるが，第一次視神経節の特にニューロピルを染める。脳の他の部位にはほとんど螢光が認められない。抗体3F11は網膜周縁部と第一次視神経節およ

び食道下神経節をよく染めるが，脳の他の部位の螢光は弱い。逆に抗体3F10はアンテナ神経と脳の特にニューロピル周縁部をよく染めるが第一次視神経節での螢光は弱い。

考察

ショウジョウバエの神経系に対して多様なモノクローナル抗体を多数とりうることが示された。ショウジョウバエの神経系は10^5個のニューロンを有する複雑さをもちながら，その脳は20枚程度の10μm切片で全体を見通すことが可能であることは，抗原の分布を調べる上で有利な点である。

得られた抗体についてその抗原分子を担っている細胞種，およびその局在する細胞構造をつきとめること，さらにこれら抗原分子の化学的実体を明らかにすることは当面の課題である。またこれら抗原分子の発生にともなう消長を調べれば，これらの抗体は神経系の発生の研究に有用となろう(8)。ショウジョウバエでは神経系の突然変異が多数すでに得られており(9)，特にHeisenbergらは脳に解剖学的異常をもたらす突然変異を多数得て研究中であるので(10)，これらの抗体はこれらの突然変異の解析にも有用となろう。解剖学的あるいは発生学的に興味深い分布を示す抗原分子の機能を探るために，これらの抗体を利用して新たに突然変異を求めてスクリーニングすることも可能であろう。

本研究では脳の特定の部位にのみ結合する抗体は得られなかったが，ある個体の融合実験の予備的な結果では，脳のさらに限定された部位に特異的な抗体が存在することが示唆されている。このような抗体を入手するために何びマウスを感作し，どうスクリーンするかも重要な課題であろう。

文献

1. Köhler, G. and C. Milstein (1975) Nature 256, 495-497.
   Köhler, G. and C. Milstein (1976) Eur. J. Immunol. 6, 511-519.
2. Barnstable, C. J. (1980) Nature 286, 231-235.
3. Trisler, G. D., M. D. Schneider and M. Nirenberg (1981) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 78, 2145-2149.
4. Vulliamy, T., S. Rattray and R. Mirsky (1981) Nature 291, 418-420.
   Cohen, J. and S. Y. Selvendran (1981) Nature 291, 421-423.
5. Zipser, B. and R. McKay (1981) Nature 289, 549-554.
6. 藤田忍，堀田凱樹 (1979) 蛋白質・核酸・酵素 24，1336-1343.
7. Oi, V. T. and L. A. Herzenberg (1980) in Selected Methods in Cellular Immunology, eds. B. B. Mishell and S. M. Shiigi (Freeman) pp 351-372.
8. Jan, Y. N. and L. Y. Jan (1981) CIBA Conference Proceedings, in press.
9. Hall, J. C. and R. J. Greenspan (1979) Ann. Rev. Genet. 13, 127-195.
10. Fischbach, K. F. and M. Heisenberg (1981) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 78, 1105-1109.
    Heisenberg, M. and K. Böhl (1979) Z. Naturforsch. 34, 143-147.

55 アストログリア・フィラメントの蛋白構成
— グリア繊維酸性蛋白とヴィメンチンの共存 —

横山和仁・森　　啓・黒川正則
（東大・医・脳研）

〔要　約〕

(1) 視神経のアストログリアには２種類の10ｎｍフィラメント蛋白がふくまれている。第１にはグリア繊維酸性（GFA)蛋白であり，第２はヴィメンチン（繊維芽細胞10ｎｍフィラメントの蛋白）である。(2) アストログリアのヴィメンチンは分子量（56K)および一次元ペプチドマップの上で培養繊維芽細胞のヴィメンチンとまったく同一であり，またマウス，ラットの間でも違いは認められない。(3) ＧＦＡ蛋白の分子量はマウスでは45K，ラットでは51Kと動物種差があり、両者の一次元ペプチドマップも異なる。しかしともにヒト脊髄由来のＧＦＡ蛋白と共通の抗原性を示す。(4) 脊髄では、発育の初期まずヴィメンチンが出現し、ＧＦＡ蛋白はこれよりおくれて現れる。しかしヴィメンチンは発育とともに減少し、成熟動物ではＧＦＡ蛋白のみが残る。視神経のアストログリアでは、これとは対照的に、成熟後もＧＦＡ蛋白とヴィメンチンが共存している。(5) 以上の知見にもとづいて動物種によるＧＦＡ蛋白の不均一性，10-nmフィラメントから見たアストログリアの分化，細胞種別について考察した。

Key words： Astroglial filaments / GFA protein / Vimentin

ニューロフィラメントとアストログリア・フィラメントは，哺乳動物の神経系における主要な10nmフィラメントである。最近数年来の軸索流の研究[7)13)22)23)]分離フィラメントの分析[12)14)15)17)]ニューロンの変性実験[18)20)21)]を通じて、ニューロフィラメントは分子量200K，160K，68Kのトリプレットから構成されていることが明らかになった。

一方アストログリアフィラメントの研究は、従来もっぱらグリア繊維酸性(GFA）蛋白の視点からなされてきたが、GFA蛋白の分子種については研究者の間になお知見の不一致があり[19)]、決定的ではない。アストログリア・フィラメントを直接に分離して、その蛋白構成をしらべた研究は、これまでにニつしかない。すなわちGoldmanらは人脳のグリア性瘢痕からフィラメントを分離し、これが分子量49Kの単一ポリペプチドから成ることを報告した[6)]。これにたいしてわれわれはマウスの視神経からアストログリア・フィラメントを分離し、55Kと45Kの二種類の蛋白の存在を認めた[21)22)]。

以上、GFA蛋白およびアストログリア・フィラメントをめぐる知見の不統一を整理する重要な手掛りとして、われわれは以下の事実を見出した。

1) 視神経のアストログリア・フィラメントを構成するニつの蛋白のうち、分子量の大きい方はヴィメンチンであり、小さい方はGFA蛋白である。

2) 未熟動物の脊髄（および脳）ではまずヴィメンチンが発現され、GFA蛋白はこれよりおくれて出現する。しかしヴィメンチンは成熟にともなって消失し、成熟動物ではGFA蛋白のみがのこる。これとは対照的に視神経のアストログリアでは、成熟後もヴィメンチンとGFA蛋白が共存する。上に述べたGoldmanらとわれわれの知見のくいちがいは，おそらくこの理由によるものと思われる。

3) GFA蛋白には分子量，一次元ペプチドマップの上で動物種差が認められる。従来の報告に見られる分子量の不一致については，種差の面からの再検討が必要である。

実験方法　神経組織からの10nmフィラメントの分離　ウィスター系及びdd系マウスを用いた。断頭後，視神経と脊髄を取り出し，以下の操作は0-4°Cで行なった。組織を生理的食塩水で洗った後、1% Triton X-100, 130mM NaClを含む20mMリン酸ナトリウム緩衝液（pH6.9）内でホモジェナイズし，100,000gで60分間遠心した。沈澱を回収し，上記の操作をさらに2回繰り返した。最終の沈澱を100mM NaCl, 1mM EDTAを含む10mM PIPES緩衝液（pH6.9）に懸濁し，1.5M蔗糖を含む同じ緩衝液に重層した後，150,000gで90分間遠心し，その沈澱を10nmフィラメント画分とした。

培養繊維芽細胞からの10nmフィラメント蛋白の精製　培養繊維芽細胞株DON-6及びL-P3を用い，5%仔牛血清添加（DON-6），または無添加（L-P3）DMEM培地中で5%CO2 37°Cにて培養した。ほぼ単層に達した後，Osborn & Weberの方法（9）に準じて，1% Txiton X-100, 150mM NaClを含む10mM PIPES緩衝液（pH6.9）で処理し，不溶部分をSDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動後染色し，10nmフィラメント蛋白（ヴィメンチン）に相応するバンドを切り出した。

SDS-ポリアクリルアミド平板ゲル電気泳動　既報に従った。[9)13)23)]

一次元ペプチドマップ　染色後のゲルより目的のバンドを切り出し，既報に従って限定分解を行なった。[3)21)]

SDS-ポリアクリルアミドゲル内での抗体結合によるグリア繊維酸性（GFA）蛋白の検出　10nmフィラメント画分を小型の平板ゲル内で電気泳動後，ゲルをH_2O:メタノール:酢酸(5:5:1)中で固定し，150mM NaCl, 0.1% NaN3を含む50mM Tris-塩酸緩衝液にて置換後，ヒト脊髄由来のGFA蛋白に対するウサギ抗血清[1)4)]で処理し，さらに，ウサギIgGに対するヤギ血清の，FITC抱合IgG画分で処理し[2)]，紫外線ランプ下で螢光を検出した。

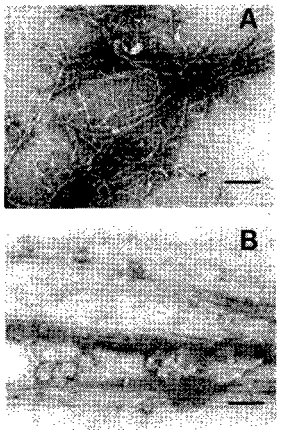


図1 成熟ラット脊髄10nmフィラメント画分のネガティブ染色像

2%フォルマリン，2.5%グルタルアルデヒドを含む0.1Mカコジル酸ナトリウム緩衝液（pH7.3）にて固定後，飽和酢酸ウラン溶液にて染色（スケール0.2μm）

実験結果　視神経及び脊髄の10nmフィラメント画分　図1にこの画分の電顕像を示した。フィラメントは枝分かれせず，表面は平滑で，一部はネットワーク状(図1A)，一部は束状に見える（図1B）。

SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動上，視神経ではニューロフィラメント蛋白以外に，主要な二つの蛋白が存在する。すなわちラットではP56とP51，マウスではP56とP45である（図2A）。これに対して，脊髄ではP56が認められず（図2B），P51或いはP45が，ニューロフィラメント蛋白以外の主な10nmフィラメント蛋白である。

視神経及び脊髄10nmフィラメント画分におけるヴィ

メンチンの同定　ラット，マウスの視神経に共通して存在するP56の同定を行なうために，培養繊維芽細胞の10nmフィラメント蛋白であるヴィメンチンとの比較を行なった。図3に示した様に，ラットとマウスのP56は同一であり，これはさらに2種の培養繊維芽細胞のヴィメンチンと同一であることが明らかとなった。後述のように，脊髄では出生直後の動物にのみP56が存在するが，これもヴィメンチンと同一である（図3-1）。

抗体の結合によるGFA蛋白の同定　P51或いはP45は，脊髄と視神経の間でそれぞれ同一である（図4A）。しかしP51とP45のペプチドマップはたがいに異なっている。しかしながらP51とP45はいずれもヒト脊髄由来のGFA蛋白と共通の抗原性を有しており（図4B），P51或いはP45がそれぞれラットヌはマウスのGFA蛋白であることを示している。

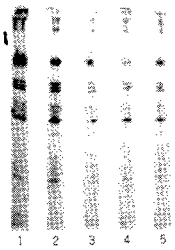


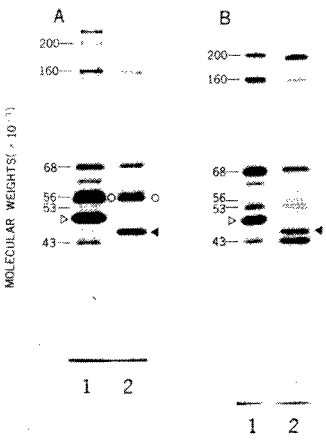
図3　P56とヴィメンチンの一次元ペプチドマップによる比較

1，2，3は各々新生ラット脊髄，成熟ラット視神経，成熟マウス視神経のP56，4はDON-6，5はL-P3のヴィメンチン．限定分解には．Staphylococcus aureus V8 protease を用いた。

成長に伴う10nmフィラメント蛋白の構成変化　図2に示したように，P56は成熟動物の脊髄には認められないが，出生直後のラット脊髄には多量に含まれている（図5-1）。このP56は前述のようにヴィメンチンと同一である（図3-1）。ヴィメンチンとは対照的にGFA蛋白は出生直後にはほんど認められないが，成長に伴って増加し，成熟動物では，GFA蛋白のみが，ニューロフィラメント蛋白以外の10nmフィラメント蛋白となる（図5，1-4）。

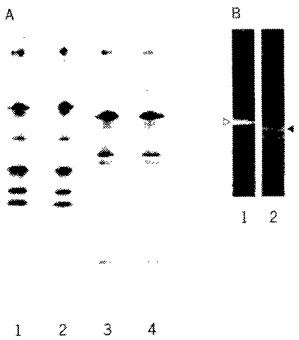
考察　図5に示したごとく脊髄のアストログリアではまずヴィメンチン，次いでGFAが発現するが，ヴィメンチンは成熟にともなって消失に向う。ヴィメンチンの発現がGFA蛋白に先行することは，最近，小脳のアストログリアについても観察された。[19] GFA蛋白とアストログリアの分化との関連については，従来おもに免疫細胞化学の手法にもとづく研究がおこなわれてきたが，今後この方向の研究においてはGFA蛋白のみならず，ヴィメンチンをも同時に考慮しなければならないことは明らかである。

図2　成熟ラットおよびマウス脊髄，視神経の10nmフィラメント蛋白



A：視神経　B：脊髄の10nmフィラメント蛋白の10%SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動像。1はラット，2はマウス，○はP56，▷はP51，◀はP45を示す。

図4　ラットおよびマウスのGFA蛋白の比較



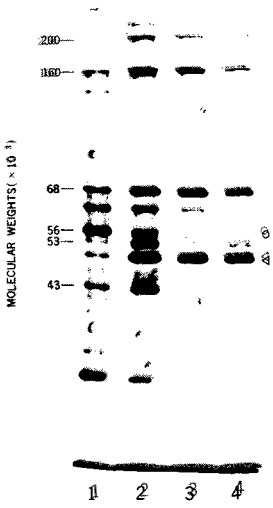
A：二次元ペプチドマップ (1)ラット脊髄，(2)ラット視神経のP51，(3)マウス脊髄，(4)マウス視神経のP45

B：抗ヒトGFA蛋白血清による同定，1，2は各々ラット，マウス脊髄10nmフィラメント画分．▷はP51，◀はP45．

図2および論文[20][21]に示したように，視神経のアストログリアでは，成熟後もヴィメンチンの残存するのが特徴である。さらに系統的に検討すれば，GFA蛋白とヴィメンチンの相対比がアストログリアの型に応じて異なることが見出されるかもしれない。そしてこのことは最近記述されているM1抗原[10]とならんで，アストログリアの細胞種別を生化的に識別する道を開く可能性がある。

ヴィメンチンはもともと繊維芽細胞の10nmフィラメント成分として見出されたが，これが他の種類の10nmフィラメント蛋白，すなわちデスミンやケラチンと共存する例がいくつかの培養細胞で報告されている[8][11]。われわれの今回の観察は，Schachnerらの観察[9]とならんで，ヴィメンチンがin situのアストログリアにおいて，GFA蛋白と共存することを示したものである。ヴィメンチンとGFA蛋白が共重合して同一のフィラメントを構成するのか，それともヴィメンチン・フィラメントとGFAフィラメントが別個に形成された上で共存するのかを明らかにすることは，フィラメント系の発生と分化を考える上に重要な問題である。

図5 成長に伴う10nmフィラメント蛋白構成の変化



左より生後2日，2週，4週及び10週のラット脊髄10nmフィラメント蛋白．○はP56，△はP51を示す。

従来の報告ではGFA蛋白の分子量は54k～47kの範囲内で一定せず，これをめぐって他種の蛋白（ことにチューブリン）の混入，あるいはGFA蛋白の人工的分解などが論議されてきた[1)5)]。図2，図4の結果から，抗原としての共通性にもとづいて定義される「GFA蛋白」の分子量が，比較的近縁の動物種においてもいちじるしく異なることが明らかにされた。したがって文献上に見られる不一致のある部分は，動物種差によって説明できるものと思われる。GFA蛋白に認められる種差は，系統発生の視点からも，蛋白化学の面でも興味深い問題である。

培養細胞株を供与下さり，培養に関して御教示いただいた三菱生命研の井上，丸内両先生，東大薬学部の八木沢先生，抗ヒトGFA蛋白血清を供与いただいたDr A. Bignami, Dr D. Dahl に感謝します。

文献

[1] BIGNAMI A., DAHL D. and RUEGER D.C. (1980) Adv. Cell. Neurobiol. 1, 285-310 [2] BURRIDGE K. (1978) Meth. Enzymol. 50, 54-64 [3] CLEVELAND D.W., FISCHER S.G., KIRSCHNER M.W. and LAEMMLI U.K. (1977) J. Biol. Chem. 252, 1102-1106 [4] DAHL D. and BIGNAMI A. (1976) Brain Res. 116, 150-157 [5] ENG L.F. (1980) In: Proteins of the Nervous System, Second Edition (ed. BRADSHAW R.A. and SCHNEIDER D.M.) Raven Press, New York, pp. 85-117 [6] GOLDMAN J.E., SCHAUMBURG H.H. and NORTON W.T. (1978) J. Cell Biol. 78, 426-440 [7] HOFFMAN P.N. and LASEK R.J. (1975) J. Cell Biol. 66, 351-366 [8] 黒川正則(1981) 生体の科学 32, 19-24 [9] LAEMMLI U.K. (1970) Nature 227, 680-685 [10] LAGENAUR C., SOMMER I. and SCHACHNER M. (1980) Develop. Biol. 79, 367-378 [11] LAZARIDES E. (1980) Nature 283, 249-256 [12] LIEM R.K.H., YEN S.-H., SALOMON G.D. and SHELANSKI M.L. (1978) J. Cell Biol. 79, 637-645 [13] MORI H., KOMIYA Y. and KUROKAWA M. (1979) J. Cell Biol. 82, 174-184 [14] MORI H. and KUROKAWA M. (1979) Cell Struc. Funct. 4, 163-167 [15] MORI H. and KUROKAWA M. (1980) Biomedical Res. 1, 24-31 [16] OSBORN M. and WEBER K. (1977) Exp. Cell Res. 106, 339-349 [17] SCHLAEPFER W.W. and FREEMAN L.A. (1978) J. Cell Biol. 78, 653-662 [18] SCHLAEPFER W.W. and MICKO S. (1978) J. Cell Biol. 78, 369-378 [19] SCHNITZER J., FRANKE W.W. and SCHACHNER M. (1981) J. Cell Biol. (in press) [20] 月田承一郎・石川春律・黒川正則(1980) 神経化学 19, 270-273 [21] TSUKITA S., ISHIKAWA H. and KUROKAWA M. (1981) J. Cell Biol. 88, 245-250 [22] 横山和仁・月田承一郎・石川春律・黒川正則(1980) 神経化学 19, 362-365 [23] YOKOYAMA K., TSUKITA S., ISHIKAWA H. and KUROKAWA M. (1980) Biomedical Res. 1, 537-547

56 小脳プルキンエ細胞膜蛋白(P400蛋白)の代謝的特徴

御子紫 克彦 ・ 塚田 裕三
(慶大・医・生理)

〔要 約〕

P_{400}蛋白は臓器特異性を示し中枢神経系のうちでも小脳にのみみられるプルキンエ細胞膜蛋白である。この蛋白につき検索を加え以下の結果を得た。1)イヌ,マウス,ラット,ニワトリではその含量はほぼ同量であった。コイでは,その含量は非常に少なく,神経系の小脳以外の部位にも痕跡的にみとめられた。小脳の発育の悪いカエルではP_{400}蛋白は検知できなかった。ニワトリの小脳ではラットと同様の発育変化を示した。2)プルキンエ細胞のinputの一つである登上線維を3-Acetylpyridine投与により破壊した結果P_{400}蛋白は減少した。3)[^{14}C]ロイシンの蛋白分画への取り込みを調べたところP_{400}蛋白は強くラベルされ代謝的に活発な蛋白であることが知られた。プルキンエ細胞の欠損を伴うnervous, pcdミュータントやシナプス欠損ミュータントであるstaggererではP_{400}蛋白に相当する部位への取り込みはみられなかった。顆粒細胞欠損を伴うweaverミュータントでは対照よりも強い取り込みを示し小脳の構造変化に伴ってその量の変動がみられた。4)ATPを基質として小脳の全ホモジネート,P_2,P_3分画のリン酸化を調べたところP_{400}蛋白はCa^{++}非依存性のリン酸化をうけた。分離プルキンエ細胞のリン酸化の結果,P_{400}蛋白は最も強くリン酸化をうける蛋白であった。以上の結果よりP_{400}蛋白は小脳の形態変化と密接に関連した代謝活性の高い蛋白であることが推察された。

Key words : P_{400} protein, Purkinje cell, cerebellum

小脳の神経細胞は5種類しかなく,明瞭な層構造を形成している。しかも各々の細胞間の連絡は電気生理学的にも明らかにされており,小脳は中枢神経系の生化学的研究にとって比較的解析しやすい材料であると考えられる。[1,6,7] しかも最近小脳の構成細胞の変性を伴う突然変異マウスが多数みいだされてきており,それら変異マウスと正常マウスの小脳を比較することによりある特定の細胞の特徴を明らかにすることが可能となってきた。[1,5,8] 既に我々はプルキンエ細胞の膜蛋白であるP_{400}蛋白の解析を行ない,P_{400}蛋白は小脳特異性を示し,各種レクチンと良く結合する糖蛋白であることまたプルキンエ細胞の樹状突起の発育時期に一致して増加すること等を明らかにしてきた。[8] 今回我々は小脳内に於けるP_{400}蛋白の代謝的な特徴につき検討を加えたので報告する。

〖実験材料及び方法〗

動物:各種ミュータントマウスは当教室で繁殖したものを使用した。電気泳動:Laemmliの方法[3]に従いSDS-polyacryamide gel (7.5%~20% linear gradient)を用いて泳動を行なった。蛋白量の半定量化はデンシトメータにより行なった。3-acetyl pyridine投与:ラットの腹腔内へ75mg/Kg体重の3-acetylpyridineをClinas's[4]の方法に従って投与した。[^{14}C]ロイシンの蛋白への取り込み:[^{14}C]ロイシンをマウス一匹当り5μCiを脳内へ投与し,90分後に浮血断頭し小脳を取り出し,氷冷した脱イオン水中でホモゲナイズ後105000×g 60分間遠心した。遠心後の上清と沈渣の膜分画を電気泳動により分析しそのゲルを乾燥後,オートラジオグラフィーを行なった。蛋白のリン酸化:50mM Tris-HCl(pH7.4), 10mM $MgCl_2$, 3μM ATP(γ-^{32}P ATP), 0.2mM EGTAを含む反応液中で30℃

3分間反応しSDSを加えて反応を停止させ、電気泳動を行ないオートラジオグラフィーにより解析した。Ca^{++}の効果をみる為に0.5mM $CaCl_2$を添加した。アルキン工細胞の分離：Sellingerの方法[15]を一部改変した方法[14]でラットより分離した。細胞下分画法：マウス小脳を10倍量の0.32M sucroseでホモゲナイズし、既報の方法に従ってP_2, P_3分画を得た。[7]

〔結果及び考察〕

P_{400}蛋白の系統発生と個体発生

P_{400}蛋白はマウス及びラットでは神経系以外の臓器にはみられず、中枢神経系のうちでも小脳にのみみいだされている。[8] まず各動物種の中枢神経系におけるP_{400}蛋白の局在について検索を行なった。イヌ，ウサギ，ニワトリでは小脳にのみみられ、含量もほぼマウスやラットの小脳と同様であった。コイの小脳のP_{400}蛋白は哺乳動物に比べて非常に少なく、小脳に比較的近い部位である後小脳，中脳でも痕跡的ではあるが観察された(ゲルは当日供覧)。一方小脳の発達の非常に悪いカエルでは小脳にP_{400}蛋白は検知できず、中枢の他の部位にもみられなかった。即ち系統発生的に小脳の発達とP_{400}蛋白との関連があることが示された。又鳥類の代表としてニワトリについて発育変化を調べたところ、P_{400}蛋白はラットやマウスにおけると同様に発育とともにその含量は増加した(図1)。

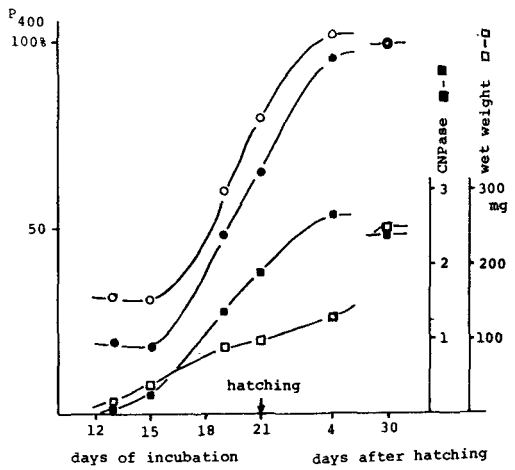


Fig. 1. Developmental change of P_{400} protein in the chick cerebella. The P_{400} peaks were scanned and normalized to the value of the 30 days of hatching. o-o: percentage per protein, ●-●: percentage per wet weight

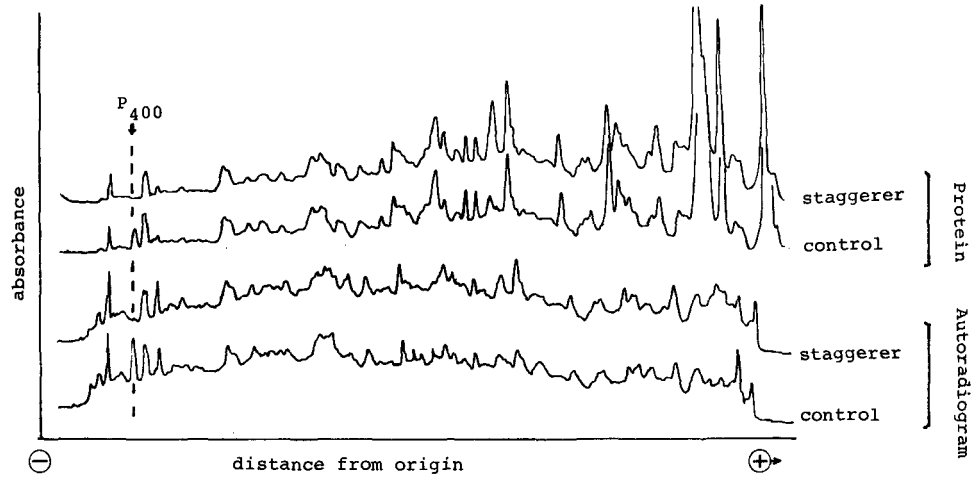


Fig. 2. Incorporation of [^{14}C] leucine into the membrane fraction of the cerebella from the staggerer and the control mice.

3-Acetylpyridine 投与による変化

3-Acetylpyridine をラットへ投与することにより下オリーブ核を特異的に破壊することが知られている。[4] 下オリーブ核には小脳のプルキンエ細胞とシナプス形成する登上線維の起始細胞があるために 3-acetylpyridine で処理した小脳はプルキンエ細胞への input を除去した際の変化を調べる為の良い実験材料と考えられる。3-acetylpyridine 投与ラットの小脳では組織蛋白当りで P_{400} 蛋白の含量は対照の72%に減少していた(表1)。細胞下分画法により得た P_3 分画は P_{400} 蛋白の回収率が高く、より検出感度が高いと考えられるが、この分画でも 3-acetylpyridine 投与ラットでは対照の75%の減少を示した(表1)。登上線維はプルキンエ細胞並びに機能の維持に重要な役割を果していると考えられている。[2] 今回我々が得た P_{400} 蛋白が減少するという結果から、プルキンエ細胞への input 除去により、プルキンエ細胞の形態変化とともに蛋白レベル迄変化をすることが明らかとなった。しかもこの変化は投与後14日では有意な変化を示さなかったことからプルキンエ細胞への影響はかなりゆっくりとしたものと考えられる。

P_{400} 蛋白の代謝的変化とリン酸化

脳内へ[^{14}C]ロイシンを投与し小脳の蛋白への取り込みを調べたところ、正常小脳の膜分画中で P_{400} 蛋白は強くラベルされる蛋白の一つであった(図2)。一方 staggerer ミュータントでは顆粒細胞からの input (平行線維として)をうける棘突起がプルキンエ細胞に形成されない為、顆粒細胞とプルキンエ細胞間のシナプスが欠損しており、[1] P_{400} 蛋白のバンドもほとんど認められない(図2)。[4,5,8] [^{14}C]ロイシンからの staggerer の P_{400} 蛋白に相当するバンドへの取り込みもほとんどみられなかった(図2)。一方 staggerer の可溶性分画においては分子量2~3万ダルトンの領域で Coomassie Brilliant Blue で染色されたバンドには著明な変化がみられ、それに一致して[^{14}C]ロイシンの取り込みパターンも変化していた(当日供覧)。顆粒細胞の変性を伴う weaver ミュータントでは P_{400} 蛋白の含量の増加に伴って非常に強い[^{14}C]ロイシンの取り込みがみられた(図3)。プルキンエ細胞の変性を伴う pcd や nervous ミュータントでは P_{400} 蛋白に相当する位置に[^{14}C]ロイシンの取り込みはみとめられなかった(図3. pcd は当日供覧)。weaver, nervous, pcd ミュータント小脳の水溶性分画には取り込みパターンの変化がみられた。

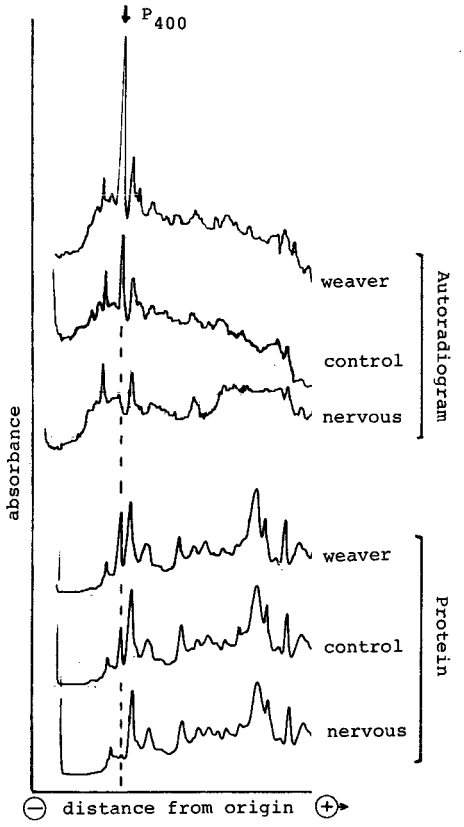
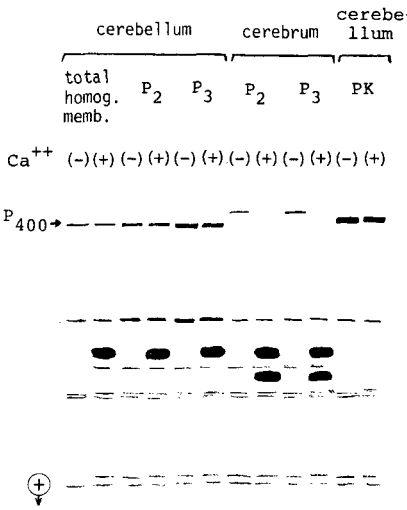


Fig. 3. Incorporation of [^{14}C] leucine into the membrane fractions of the weaver, nervous and the control mice.

Table 1. Effect of 3-acetylpyridine treatment on the content of P_{400} protein in the rat cerebrum. (6 months after injection)

	Total Homogenate	P_3 fraction
3-Acetylpyridine treated rat cerebellum	72 %	75 %
non treated rat cerebellum	100 %	100 %

Fig. 4. Phosphorylation of the separated Purkinje cells and the various membrane fractions of the cerebrum and the cerebellum.



total homog. memb.: membrane fraction of the total homogenate
PK: separated Purkinje cells
sup: supernatant fraction
P_2,P_3: fractions obtained by subcellular fractionation

近年蛋白のリン酸化が生体内での代謝調節の役割を荷っていることが考えられている。まず小脳と大脳よりP_2,P_3分画を得てリン酸化を行なったところ，Ca^{++}の存在とは無関係にリン酸化される数本のバンドが大脳と小脳に共通にみられた。P_{400}蛋白もリン酸化をうけた(図4)。大脳でP_{400}蛋白に相当する位置でリン酸化をうける蛋白はみられなかったが，より高分子側にCa^{++}非存在下でのみリン酸化をうける蛋白がみられた。大脳のP_2,P_3分画でCa^{++}存在下でリン酸化を強くうける分子量数万ダルトンの領域の2本の蛋白がみられ，既報の結果[16]と一致した(図4)。しかしながら小脳ではCa^{++}存在下でリン酸化をうける蛋白のうちより低分子の蛋白はみられず，大脳に特異な現象と考えられた。プルキンエ細胞を分離しリン酸化を調べたところP_{400}蛋白は，プルキンエ細胞のうちで最も強くリン酸化をうけた(図4)。現在P_{400}蛋白のリン酸化がcGMPやcAMPによりどの様な修飾をうけるか検討中である。

以上の様にプルキンエ細胞膜蛋白であるP_{400}蛋白は系統発生，個体発生の上でも小脳の発達と密接な関連があり，プルキンエ細胞へのinputを除くと変動すること，また[^{14}C]ロイシンからの強い蛋白への取り込みをうけリン酸化もうけることが明らかとなった。更にgnaking[9], shiverer[13] rolling mouse Nagoya などのミュータントでは変化はないが，小脳内回路の再編成を伴うミュータント[10-12]でP_{400}蛋白含量が変動することからも小脳の機能と密接な関連を有するものと考えられる。

[文献]
1. Changeux,J.-P. & Mikoshiba,K. (1978) Prog. Brain Res. 48 43-64
2. Hamori,J. (1980) in "Neurobiological Basis of Learning and Memory" p.1-18 John Wiley & Sons
3. Laemmli,U.K. (1980) Nature 227 680-685
4. Llinas,R.,Walton,K.,Hillman,D.E. & Sotelo,C. (1975) Science 190 1230-1231
5. Mallet,J.,Huchet,M.,Pougeois,R. & Changeux,J.-P. (1976) Brain Res. 103 291-312
6. McGeer,P.L.,Eccles,J.C. & McGeer,E.G. (1978) Molecular Neurobiol. of the mammal. Brain. Plenum
7. Mikoshiba,K. & Changeux,J.-P. (1978) Brain Res. 142 487-504
8. Mikoshiba,K.,Huchet,M. & Changeux,J.-P. (1979) Developmental Neuroscience 2 254-275
9. Mikoshiba,K.,Nagaike,K.,Aoki,E. & Tsukada,Y. (1979) Brain Res. 177 287-299
10. Mikoshiba,K.,Nagaike,K.,Kohsaka,S.,Takamatsu,K.,Aoki,E. & Tsukada,Y. (1980) Dev. Biol. 79 64-80
11. Mikoshiba,K.,Kohsaka,S.,Takamatsu,K. & Tsukada,Y. (1980) J. Neurochem. 35 1309-1318
12. Mikoshiba,K.,Kohsaka,S.,Takamatsu,K. & Tsukada,Y. (1981) J. Neurochem. 37 186-191
13. Mikoshiba,K.,Nagaike,K. & Tsukada,Y. J. Neurochem. in press
14. Olsen,W.R. & Mikoshiba,K. (1978) J. Neurochem. 30 1633-1636
15. Sellinger,O.Z.,Legrand,J.,Clos,J. & Ohlsson,W.G. (1974) Nature 271 478-479
16. Schulman,H.& Greengard,P.(1978)

57 コルヒチンによる坐骨神経無髄繊維の選択的変性

小宮義璋(東大・医・脳研・生化)

〔要　約〕

1). ラット第5腰髄(L_5)神経節にコルヒチン(4μg)を注入すると，遅い軸索流を構成する主要成分のうち，チューブリン輸送が選択的に阻害を受ける。この阻害作用はコルヒチン注入後少くとも2日間は持続するが，4日後には殆んど回復する。

2). コルヒチン(4μg)をL_5神経節に注入すると，坐骨神経の無髄知覚繊維が選択的に変性をおこす。有髄繊維への影響はほとんど少なく，ニューロン細胞体も，しばしば色素融解像はみられるものの変性はおこさない。

3). 変性した無髄繊維は3.3±0.3日の潜伏期の後，再生をはじめる。その再生速度は4.7±0.1 mm/日である。

4). 以上観察結果からコルヒチンが，軸索及び軸索内輸送に与える影響について検討をくわえる。

Key words：　Colchicine, Axonal Flow, Axonal Degeneration.

コルヒチンが速い軸索内輸送を阻害することはよく知られている(8)。この阻害作用は長期間持続し，回復には数10日を要するが(10, 14)，可逆的で通常ニューロン細胞体の変性はおこらない(1, 17)。しかしながらニューロン細胞体が傷害を受ける場合もあり(15)，またある種のニューロンが他の種のニューロンより強い傷害を受けるという報告もなされている(7, 16)。

コルヒチンで処理したL_5神経節をL-[^{35}S]-メチオニンで標識し，遅い軸索流を構成している蛋白を電気泳動で分析すると，ニューロフィラメント・トリプレットやアクチンは殆んど影響を受けずに，チューブリンの輸送のみが選択的に阻害される(12)。坐骨神経の知覚繊維は有髄繊維と無髄繊維が混在しているため，コルヒチンの作用が無髄繊維と有髄繊維とに同じように影響を与えるかどうかを知る目的で以下の実験を行なった。

材料と方法

1). 遅い軸索流に対するコルヒチンの効果：ウィスター系ラット(9週令雄，体重約250 g)の第5腰髄(L_5)神経節をエーテル麻酔下に露出し，一側にコルヒチン4μg或は8μg(0.2μl或は0.4μl)を注入した。対側には同量の溶媒を注入し対照とした。コルヒチン注入10分～14日後にL-[^{35}S]-メチオニン200μCi(0.4μl)を注入し，その1週間後に坐骨神経，L_5神経節，L_5後根をとり出し3mmの連続小片に切断した。各小片を200μlの試料緩衝液(2.3% SDS, 10%グリセロール，5mM β-メルカプトエタノール，62.5mM トリス-HCl, pH 6.8)でホモジェナイズし，分析に用いた。試料の一部(50μl)は放射能

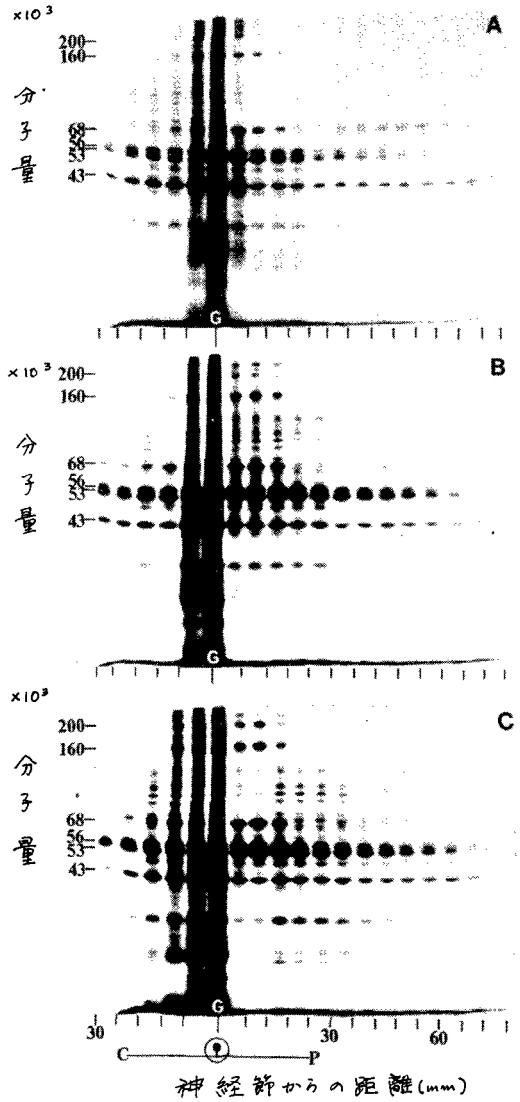


図1．厚い軸索流と対するコルヒチンの効果　A：コルヒチン処理2日後
B：4日後，C：対照

を測定し，他の一部(20μl)は2小片分を合わせた上で電気泳動を行ない，フルオログラフィーによりその泳動像を得た(12)。

2). コルヒチンにより変性した軸索の再生：L5神経節にコルヒチン4μg(0.2μl)を注入し，その10分～21日後にL-[^{14}C]-ロイシン0.4μCi(0.2μl)を注入した。6時間後，坐骨神経及びL5神経節をとり出し，3mmの連続小片に切断した後，各々の放射能を測定した(11)。

3). 電子顕微鏡による観察：コルヒチン4μg(0.2μl)を注入し，1週間後に2%フォルムアルデヒド-2.5%グルタールアルデヒドで灌流固定した。とり出した組織を1% OsO_4で2時間固定し，更に酢酸ウランで染色した後エポン812に包埋，超薄切片を作製し，クエン酸鉛及び酢酸ウランで染色して観察した(12)。

実験結果

1). コルヒチンの毒性：コルヒチン8μgを投与した動物は全て1～2週間以内に死亡し，4μgを投与した動物も約1/3が3週間以内に死亡した。

2). チューブリン輸送に対するコルヒチンの効果：コルヒチンのチューブリン輸送に対する阻害効果は，コルヒチン投与2日後でも明らかに認められるが，4日後には殆んど回復する(図1)。

3). 軸索の再生：コルヒチン投与10分後にL5神経節にロイシンを注入し，6時間後にその速い軸索内輸送パターンを見ると，約35%の阻害を受けている(図2)。コルヒチン処理12日後の速い軸索内輸送パターンは，これと異なり神経節から約30mmの部位に放射能の肩を有している(図2)。この放射能の肩は，コルヒチン処理後の時間が経過するに従って遠位側に移動する。その移動距離をコルヒチン処理の時間に対してプロットすると直線が得られ，傾斜から移動速度は4.7mm±0.1mm/日(N=4)，X軸との交点からinitial delayは3.3±0.3日(N=4)と計算される(図3)。

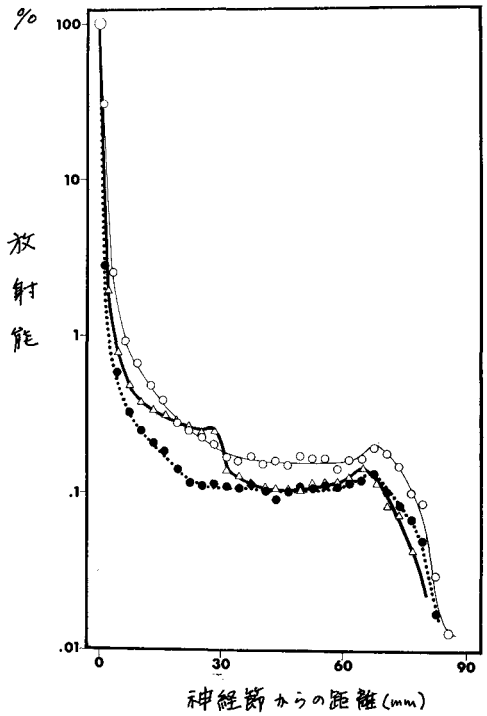


図2. コルヒチン処理神経の速い軸索内輸送パターン ●…●：コルヒチン処理10分後 △—△：12日後 ○—○：対照

4). コルヒチン処理神経の電子顕微鏡による観察：コルヒチン処理により ニューロン細胞体は，色素融解反応を示すものはしばしば認められるが，変性をおこすものはない。有髄繊維は一部に変性像が見られるものの大部分は正常である。これに反して無髄繊維は，正常のものは全く認められず，再生しつつあるもののみ見出された。

検討

コルヒチンのチューブリン輸送に対する抑制効果は少くとも2日間は持続するが，4日後には認められなくなる（図1）。従ってこの間にコルヒチンによる傷害からの回復がおこっているものと考えられる。実際コルヒチン処理7日後の坐骨神経をみると，再生しつつある無髄神経が多数認められることから，無髄繊維の殆んどはコルヒチン処理によって変性をおこすものと思われる。一方有髄繊維の大部分は正常で一部にのみ変性がみられる。再生しつつある軸索の先端の位置を速い軸索内輸送により標識してみると（2,4）図2のようになり，その再生速度は図3から4.7±0.1mm/日と計算される。この値は先に得られた値（11）よりやや速いが，大差はない。図3よりinitial delayは3.3±0.3日となり，凍結傷害後の値よりはかなり大きい（11）。しかし神経を切断後縫合した場合のinitial delayとはほぼ同じである（5）。コルヒチンの効果が処理後2日ではまだ著明であるが，4日後には殆んど認められなくなるという観察結果（図1）はコルヒチン処理により変性した軸索が3.3日の後に再生をはじめることによりよく説明できる。

コルヒチンの速い軸索流に対する抑制は36.6±10.4%（N=22）である。残っている部分は変性をおこさなかった有髄繊維の速い軸索流をあらわしていると考えられる。脊髄腔内にコルヒチンと注入すると無髄繊維と細い有髄繊維とが変性をおこす（9）。また培養神経細胞にコルヒチンを作用させるとニューロン細胞体は変性せず，突起の短縮，伸長抑制が可逆的におこる（3,19）。コルヒチンをin vivoで作用させた時にも同じような反応が期待され，その結果周囲をミエリンにより保護されていない無髄繊維は軸索の断裂変性をおこしやすく，一方有髄繊維は厚いミエリンにとりまかれているために強い抵抗性を示すのではなかろうか。

コルヒチンによるチューブリン輸送の選択的阻害は，無髄繊維の選択的変性の結果であると解釈することも可能である。即ち直径の細い無髄繊維は微小管に富み，径の

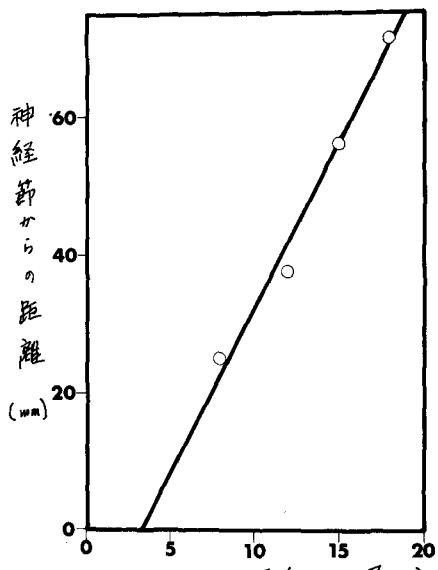


図3. 再生先端部の移動

$y = 4.7x - 14.8$ ($N = 4$, $r = 0.99$)

傾斜：4.7±0.1mm/日, X軸交点：3.3±0.3日

大きい有髄繊維はニューロフィラメントが多いという観察結果(6,18)から，無髄繊維の選択的変性はチューブリンのより大きな減少をもたらし，ニューロフィラメント・トリプレットの減少は比較的少ないと考えられる。この減少の差がフルオログラフィーの特性(13)により更に強調されてチューブリン輸送のみが抑制されているように見える可能性は大きい。

コルヒチンを8μg投与すると動物は全て死亡し，4μg投与しても死亡するものがある。生きのこった動物も無髄繊維の始んどと有髄繊維の一部に変性が見られることから，従来報告されている大量のコルヒチン投与による速い軸索内輸送の阻害現象は再検討が必要であろう。また軸索内輸送の機構に微小管が何らかの役割をはたしているという根拠の一つに用いられているコルヒチンの作用も，コルヒチンが本当に微小管のみに特異的に作用しているのか，或は単に変性をおこしつつある軸索の部分現象を見ているにすぎないのかは，今後慎重に解析を加えるべきではなかろうか。

本研究に用いた電子顕微鏡写真は東京大学医学部解剖学教室月田承一郎先生に撮影して頂きました。記して感謝の意を表します。本研究の一部は文部省科学研究費補助金の援助を受けて行ないました。

参考文献

1) Avrith, D. & Mogenson, G. J. : Brain Res., 153(1978)99-107. 2) Black, M. M. & Lasek, R. J. : Exp. Neurol. 63(1979)108-119. 3) Daniels, M. P. : J. Cell Biol., 53(1972) 164-176. 4) Forman, D. S. & Berenberg, R. A. : Brain Res., 156(1978)213-225. 5) Forman, D. S., Wood, D. K. & DeSilva, S. : J. Neurol. Sci., 44(1979)55-59. 6) Friede, R. L. & Samorajski, T. : Anat. Rec., 167(1970)379-388. 7) Goldschmidt, R. B. & Steward, O. : Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 77(1980)3047-3051. 8) Hanson, M. & Edström, A. : Int. Rev. Cytol., Suppl.7 (1978)373-402. 9) Jacobs, J. M., Cavanagh, J. B. & Chen, F. C.-K. : J. Neurol. Sci., 17(1971)461-480. 10) Karlsson, J.-O., Hansson, H.-A. & Sjöstrand, J. : Z. Zellforsch., 115(1971) 265-283. 11) Komiya, Y. : Exp. Neurol., 73(1981) in press. 12) Komiya, Y. & Kurokawa, M. : Brain Res., 190(1980)505-516. 13) Laskey, R. A. & Mills, A. D. : Europ. J. Biochem., 56(1975)335-341. 14) McGregor, A. M., Komiya, Y., Kidman, A. D. & Austin, L. : J. Neurochem., 21(1973)1059-1066. 15) Morelli, M., Porceddu, M. L. & Di Chiara, G. : Neurosci. Lett., 16(1980)131-135. 16) Parish, D. C. & Pickering, B. T. : J. Endocrinol., 79(1978) 24P-25P. 17) Wiśniewski, H. & Terry, R. D. : Lab. Invest., 17(1969)577-587. 18) Wuerker, R. B. & Kirkpatrick, J. B. : Int. Rev. Cytol., 33(1972)45-75. 19) Yamada, K. M., Spooner, B. S. & Wessells, N. K. : J. Cell Biol., 49 (1971)614-635.

58 カルモデュリン及びカルモデュリン類縁蛋白質の軸索内輸送

田代朋子・黒川正則
(東大・医・脳研)

〔要　約〕

L-[^{35}S]メチオニンを用いて、速い軸索内輸送を構成する蛋白質を標識した後，神経から抽出し、電気泳動とフルオログラフィーで分析した。標識蛋白質の90%以上が膜に結合しており、カルモジュリンに近縁の分子量26,000の酸性蛋白質（蛋白A）も膜蛋白である。Lubrol PXによって、蛋白Aを含む一部の蛋白を可溶化することができた。

カルモジュリンに特異的なフルフェナジン・アフィニティ・カラムに対して、Lubrolで可溶化した蛋白Aは、高塩濃度で解離するような弱い結合を示した。速い輸送の構成蛋白中には、カルモジュリン自体は検出されなかった。

一方、標識された速い輸送の構成蛋白（メチオニン注入7日後の神経より抽出）を同様にフルフェナジン・カラムにかけると、カルモジュリンに相当するEGTA溶出画分に全放射活性の0.9%を回収できた。メチオニン含量の補正を行うと、カルモジュリンは量的には、速い輸送の蛋白の0.3～0.5%に当ると考えられる。

以上のように、カルモジュリンと蛋白Aは、異る輸送コンパートメントに属し、蛋白Aがカルモジュリンの前駆体もしくは輸送型である可能性は低いと思われる。

Key words：　calmodulin / calmodulin-related protein / axoplasmic transport

---

我々は、モルモット迷走神経を用いて、速い軸索内輸送の構成蛋白の解析を行い、その主成分の一つである分子量26,000の酸性蛋白質（蛋白A）が、カルモジュリンに近縁の蛋白であることを、ペプチドマップ法によって同定して、昨年の本学会で報告した。[16,17]

これまでの形態学的[7,18]、生化学的[1,4,6,12,14]研究の結果、速い軸索内輸送は膜構造の流れと考えられるに到っているが、我々の系においても、蛋白Aを含めてその構成蛋白質のほとんどが膜蛋白質である。蛋白Aの機能及び蛋白Aとカルモジュリンの関連を明らかにするために、蛋白Aの可溶化を試みるとともに、カルモジュリン自体の軸索内輸送についても検討を行ったので、以下に報告する。

〈材料と方法〉

動物及び神経組織の処理：　モルモット（体重250～300g）の延髄をペントバルビタール麻酔下に露出し、両側の迷走神経背側運動核に、各々，L-[^{35}S]メチオニン40～50 μCi（0.25μl）を注入した。注入後、所定の時間（約3時間）に、頭蓋から横隔膜に到る迷走神経をとり出し、6mmの連続小片に切断するか、或いはそのままで、−80°Cに保存した。

標識蛋白質の抽出と分画：　神経を液体窒素で凍結し、エアー・ハンマーで破砕して粉末状にした後，0.32M蔗糖−10mM HEPES(pH7.2)−1mM EGTAでホモジェナイズした。ホモジェネートを、1,000g，10分間遠心して沈渣を除いた後、100,000g，1時間遠心して、可溶性画分と顆粒性画分に分けた。顆粒性画分から蛋白を可溶化するには、0.32%

Lubrol PX を用いた。

電気泳動とフルオログラフィー：　SDSゲル電気泳動は、Tris-グリシン系[19]で行い、Coomassie Brilliant Blue R-250で染色後、フルオログラフィーによって泳動像を得た。[2]

フルフェナジン・セファロースを用いたアフィニティ・クロマトグラフィー：　フルフェナジン・マレイン酸塩（吉富製薬より提供をうけた）を、エポキシ活性化セファロース6B（Pharmacia）にカップルさせてアフィニティ担体を作製し[5]、0.2mM $CaCl_2$-10mM HEPES (pH 7.2) で平衡化した後，容量0.5～0.6mlの小カラムにつめた。試料には、最終濃度1mMの$CaCl_2$を加えてカラムに添加し、カラム容量の10倍量の0.2mM $CaCl_2$-10mM HEPES，次いで0.2mM $CaCl_2$-0.5M NaCl-10mM HEPES，最後に2mM EGTA-0.5M NaCl-10mM HEPESで溶出を行った。可溶化した膜蛋白質を試料とする場合には、総ての溶液に0.1% Lubrol PXを加えて用いた。

ウシ脳カルモジュリンは、都立大・笠井先生よりいただいた。

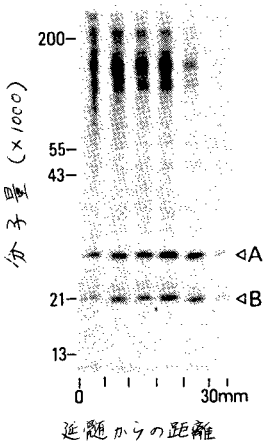


図1　速い軸索内輸送の構成ポリペプチド
放射ラベル3時間後の神経連続切片の標識蛋白を電気泳動で分離し、フルオログラフィーで検出した。15%ゲル

〈結果と考察〉

速い軸索内輸送の構成蛋白質とその可溶化

延髄に[^{35}S]メチオニンを注入してから3時間後に迷走神経内を移動している標識蛋白質のパターンを図1に示す。この時点では、遅い輸送（4mm／日）や、中間速度の輸送（30mm／日）は、まだ現われておらず、速い輸送（240mm／日）の構成蛋白のみを検出することができる。ここに見られるように、速い軸索内輸送の蛋白構成は比較的単純で、分子量26,000の蛋白Aと、21,000の蛋白Bが主成分である。このうち蛋白Aは酸性が強く、蛋白化学的にカルモジュリンに近縁の蛋白である[16,17]。

神経を等張蔗糖液でホモジェナイズした後、遠心分離すると（100,000 g，1時間）、標識蛋白質の90%以上が顆粒画分に回収される。顆粒画分に更に、低張処理（10mM Tris, pH 8.0），EGTA処理（10mM EGTA），超音波処理を行っても、標識蛋白質は可溶化されない。これは、70%以上の標識蛋白が可溶性画分に回収される遅い輸送の場合（放射ラベル注入7日後の神経）と対照的で、速い輸送が膜構造の流れであるという考え

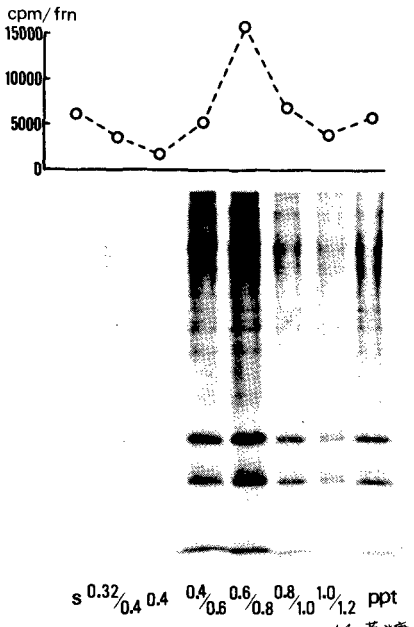


図2　速い軸索内輸送・顆粒性画分の蔗糖密度勾配遠心

を裏づけるものである。[4, 6, 12, 14]

顆粒画分を更に蔗糖密度勾配遠心すると、図2のように、標識蛋白質を含む膜は0.6/0.8M 蔗糖の位置に明瞭なピークを示す。フルオログラフィーからも、密度による蛋白パターンの差はみられず、ほとんどが同一種類の膜に組みこまれていると考えられる。

これらの蛋白、特に蛋白Aの膜からの可溶化を試みたが、図3に示すようにLubrol PXが最も有効であった。尿素や高塩濃度では蛋白Aは可溶化されず、蛋白BはLubrolでも可溶化が困難であった。Lubrol可溶化後、密度勾配遠心、ゲル口過、更に次に述べるようなアフィニティ・クロマトグラフィーによってもある程度の分離がみられており、蛋白Aの単離法の開発も可能と思われる。

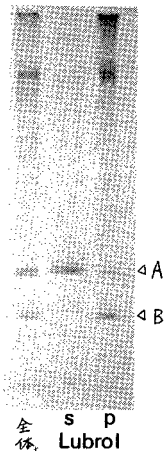


図3 標識蛋白の可溶化
S：上清，P：沈澱

蛋白Aは、放射ラベル20時間後には、腸管壁の神経終末部に検出され、分子量の変化がみられないことから、単なるカルモジュリンの前駆体とは考えにくい。また、フェノールでは抽出されない上に分子量も明らかに異ることから、中村ら[15]の報告しているシナプス形質膜のカルモジュリン様蛋白とも別のものと考えられる。

カルモジュリンの軸索内輸送

カルモジュリンは、シナプス後膜のpostsynaptic density中に高濃度に存在することが報告されているが、[9, 13, 20]シナプス前終末や軸索内での局在については知られていない。カルモジュリンの軸索内輸送に関しては、速い輸送に含まれるという報告[10]と、遅い輸送で運ばれるという対立する報告[3, 8]とが出されている。我々の系では、以下に述べるように、カルモジュリンは速い輸送には検出されず、遅い輸送にのみ検出された。

先ず第一に、速い輸送構成蛋白の電気泳動像で、カルモジュリンに対応する位置に放射活性が認められなかった。また、カルモジュリンはSDS中でもカルシウムの有無によって電気泳動易動度を変えるという特徴があるが、[9]このような性質を示す放射性バンドは検出できなかった。カルモジュリンのもう一つの特徴として、フェノチアジン系の薬物に対してカルシウム存在下に特異的に結合することが知られている。[5]そこで、フルフェナジン・セファロースを用いたアフィニティ・カラムで、標識蛋白質中にカルモジュリンが含まれているかどうかを検討した。図4 a)に示すように、Lubrolの存在下でも、カルモジュリンはカルシウム依存性にこのカラムに結合し、高塩濃度で溶出されないが，EGTAで溶出される。Lubrolで可溶化した速い輸送の

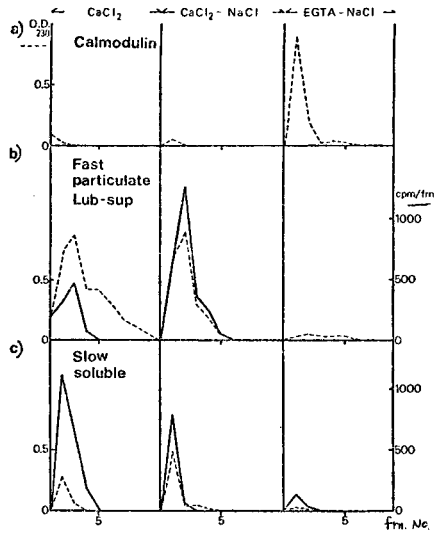


図4 標識蛋白質のフルフェナジン・アフィニティ・クロマトグラフィー
a) カルモジュリン　b) Lubrol可溶化した速い輸送の顆粒性画分　c) 遅い輸送

顆粒性画分では、放射活性の一部が結合したが、高塩濃度で溶出されてしまい、EGTAで溶出されるものは検出できなかった（図4. b)）。速い輸送の可溶性画分を用いた場合にも、EGTAで溶出されるものは検出できなかった。蛋白Aは、結合はするが高塩濃度で溶出される画分にのみ見出された。

同様の実験を遅い輸送の標識蛋白（放射ラベル後、7日の神経より抽出）について行うと、図4. c）にみられるように、EGTA溶出画分に小さい放射活性が検出できた。これは量的には加えた全放射活性の0.9%に相当するが、カルモジュリンは他の遅い輸送成分に比べるとメチオニン含量が高いので（カルモジュリンは6.1%，ニューロフィラメント蛋白やチューブリンは2～3.4%），これを補正すると、遅い輸送蛋白の0.3～0.5%がカルモジュリンということになる。この値は、Erickson ら[8]が他の方法で計算した値とほぼ一致している。

以上のように、カルモジュリンと蛋白Aとは別々の輸送コンパートメントに属しており、また、蛋白Aがそのままの形で神経終末部に検出されることから、蛋白Aがカルモジュリンの前駆体あるいは輸送型である可能性は低い。蛋白Aはむしろ、構造的に類似した酸性カルシウム結合蛋白グループの一員であろうと考えられる[11]。

ウシ脳カルモジュリンを供与下さった都立大・笠井先生及び、アフィニティ・カラム法についてご教示いただいた阪大・垣内先生に感謝します。

<参考文献>

1) Abe,T., Haga,T. & Kurokawa,M. (1973) Biochem. J.,136, 731-740
2) Bonner,W.M. & Laskey,R.A. (1974) Eur. J. Biochem., 46, 83-88
3) Brady,S.T., Tytell,M., Heriot,K. & Lasek,R.J. (1981) J. Cell Biol., in press
4) Cancalon,P. & Beidler, L.M. (1975) Brain Res., 89, 225-244
5) Charbonneau,H. & Cormier,M.J. (1979) Biochem. Biophys. Res. Comm., 90, 1039-1047
6) Di Giamberardino,L., Bennett,G., Koenig,H.L. & Droz,B. (1973) Brain Res.,60, 147-159
7) Droz,B., Rambourg,A. & Koenig,H.L. (1975) Brain Res., 93, 1-13
8) Erickson,P.F., Seamon,K.B., Moore,B.W., Lasher,R.S. & Minier,L.N. (1980) J. Neurochem., 35, 242-248
9) Grab,D.J., Berzins,K., Cohen,R.S. & Siekevitz,P. (1979) J. biol. Chem.,254,8690-8696
10) Iqbal,Z. & Ochs,S. (1978) J. Neurochem., 31, 409-418
11) Kretsinger,R.H. (1976) Annu. Rev. Biochem., 45, 239-266
12) Krygier-Brévart,V., Weiss,D.G., Mehl,E., Schubert,P. & Kreutzberg,G.W. (1974) Brain Res., 77, 97-110
13) Lin,C.-T., Dedman,J.R., Brinkley,B.R. & Means,A.R. (1980) J. Cell Biol.,85,473-480
14) Lorentz,T. & Willard,M. (1978) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 75, 505-509
15) Nakamura,Y., Nakahama,T., Ushiwata,A., Takeda,M. & Nakaya,K. (1980) FEBS Lett., 112, 155-158
16) Tashiro,T., Kasai,H. & Kurokawa,M. (1980) Biomedical Res., 1, 292-299
17) 田代明子・笠井久隆・黒川正則(1980) 神経化学 19, 354～357
18) Tsukita,S. & Ishikawa,H. (1980) J. Cell Biol., 84, 513-530
19) Weber,K. & Osborn,M. (1975) In: The Proteins (Third Edition),Vol. 1, 179-223
20) Wood,J.G., Wallace,R.W., Whitaker,J.N. & Cheung,W.Y. (1980) J. Cell Biol., 84, 66-76

59 calmodulin 阻害剤固定化 Sepharose による S-100 および calmodulin の精製

遠藤登代志・日高弘義
(三重大・医・薬理)

〔要　約〕

Calmodulin 阻害剤である N-(6-aminohexyl)-5-Chloro-1-naphthalensulfonamide (W-7) を固定化した Sepharose を用いて、Ca^{2+} 依存性アフィニティークロマトグラフィーにより、牛脳粗酸性蛋白分画より S-100 および calmodulin を分離・精製した。W-7 を固定化した Epoxy-activated Sepharose 6B (W-7 Epoxy Sepharose) に Ca^{2+} 依存性に吸着し、EGTA 存在下で溶出する蛋白は、Ca^{2+} 依存性 phosphodiesterase を活性化せず、S-100 に近似のアミノ酸組成を示した。この蛋白は電気泳動で S-100a, S-100ab と一致する二つのバンドを示し、S-100 抗体との反応からも S-100a, S-100ab の混合物であることが同定された。Cyanogen bromide activated Sepharose 6B を用いた W-7 CNBr Sepharose では Ca^{2+} 依存性に吸着し、EGTA 存在下で溶出する蛋白は、Ca^{2+} 依存性 phosphodiesterase を活性化した。この蛋白は SDS-PAGA で泳動度が calmodulin に一致する単一バンドを示し、アミノ酸分析でも、1モルの trimethyl lysine を含有することから、Calmoduline と同定された。以上の成績は S-100 の簡易な精製法を提示しているが、同時に神経系に多量に存在する Ca^{2+} 結合蛋白である calmodulin と S-100 の構造研究の手段としても、Sepharose に固定化した W-7 が有益に利用できる可能性を示唆している。

Key words : S-100 protein, calmodulin-antagonist, Ca^{2+}-dependent affinity chromatography

---

Ca^{2+} が細胞内 second messenger として種々の細胞機能の調節に働いていることはよく知られているが、最近この Ca^{2+} の作用に細胞内 Ca^{2+} 受容蛋白が重要な役割をはたしていることが判明してきた(1)。中枢神経系の細胞においても、Ca^{2+} 結合蛋白質 calmodulin, S-100 蛋白の存在が報告され、その機能が注目されている。一方 N-(6-aminohexyl)-5-Chloro-1-naphthalene sulfonamide (W-7) およびその誘導体は、Ca^{2+} 存在下で calmodulin に選択的に結合することによって calmodulin 依存性酵素である Ca^{2+} 依存性 phosphodiesterase (2) (Ca^{2+}-PDE), myosin light chain kinase (3) 等の酵素活性を阻害することが日高らにより報告されている薬物である。今回は、この calmodulin 阻害剤である W-7 を Sepharose に固定化し、Ca^{2+} 依存性アフィニティークロマトグラフィーによって、牛脳より Ca^{2+} 結合蛋白の分離を試みた。

〈実験方法〉

Cyanogen bromide activated Sepharose 4B ならびに Epoxy activated Sepharose 6B を、30% dimethyl formamide に溶解した W-7 と 40°C, pH 9.5 の条件下で 12 時間反応させることにより、W-7 固定化 Sepharose を調製した(4)。一方牛脳を 2.5 倍容の 50 mM Tris·HCl (pH 8.0), 5mM $MgCl_2$, 1mM EGTA, 2-mercaptoethanol で homogenize したのち、100,000 × g 遠心分離により得られた上清を硫安 55% 飽和させ、生じた沈澱を遠心除去し、pH を 4.0 に調整して生じた沈澱を粗酸性蛋白分画とした。これを 20mM Tris·HCl (pH 7.5), 5mM $MgCl_2$, 100μM $CaCl_2$, 150mM NaCl (Buffer A) に対して透析後、W-7 固定化 Sepharose カラムに添加し、4mM EGTA 含有 buffer で溶出した。S-100 および calmodulin はそれぞれ Isobe ら(5), Teo ら(6) の方法によって牛

脳より調製した。またアミノ酸分析は蛋白質を110℃で24時間水解後，KLA 5 日立アミノ酸自動分析器で行なった。なお抗S-100抗体は，東京都立大学，奥山典生先生の恵与を受けた。SDS-polyacrylamide 電気泳動は Laemli の方法(7)で，S-100蛋白の電気泳動は Ornstein(8)，Davis(9) の方法で行なった。Ca^{2+}-PDEの調製ならびに活性測定はいずれも日高らの方法(10)で行なった。

<実験結果>

1) 牛脳16.6g(湿重量)より調製した粗酸性蛋白質分画(5ml)を，Ca^{2+}存在下でW-7 Epoxy Sepharose ならびにW-7 CNBr Sepharose に添加し，4mM EGTA含有bufferで溶出した。図1-a, 1-b に示した蛋白溶出パターンに見られるように，それぞれEGTAによって溶出される蛋白ピークを認め，W-7 Epoxy Sepharose より8.5 mg(W-7 Epoxy protein)，W-7 CNBr Sepharose より3.6 mg (W-7 CNBr protein) が得られた。しかし粗酸性蛋白質分画をEGTA含有bufferと共に両カラムに添加した実験では，これらの蛋白ピークは認められなかった。

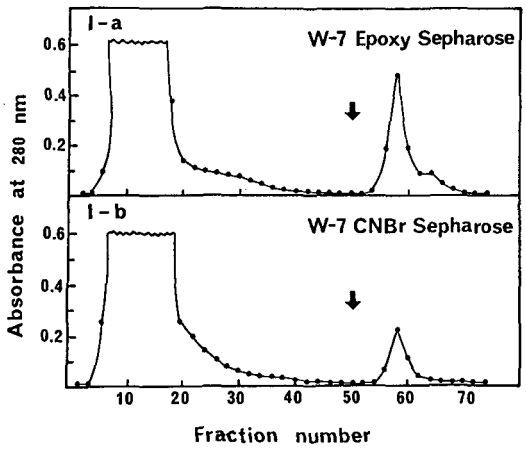


図1 W-7 Epoxy Sepharose ならびに W-7 CNBr Sepharose のアフィニティークロマトグラフィー

2) 図2はW-7 Epoxy protein，W-7 CNBr protein の Ca^{2+}-PDE活性化能を示したものである。W-7 CNBr protein は Ca^{2+}存在下で牛脳精製calmodulinと同程度の活性化を示した。しかしW-7 Epoxy protein は Ca^{2+}存在下でも Ca^{2+}-PDEを活性化せず，calmodulin 以外の Ca^{2+} 結合蛋白質であることが示唆された。

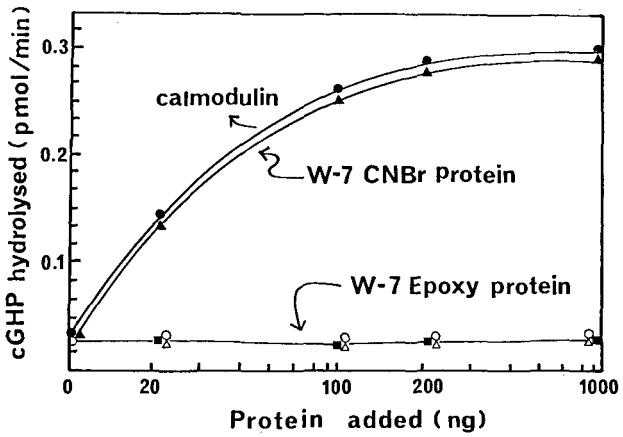


図2 W-7 Epoxy protein ならびに W-7 CNBr protein の Ca^{2+}依存性phosphodiesterase 活性化能

3) W-7 Epoxy protein および W-7 CNBr protein を0.1% SDS-15% polyacrylamide で電気泳動した結果，W-7 CNBr protein では calmodulin と泳動度の一致するほぼ単一のバンドが得られたが，W-7 Epoxy protein では calmodulin より低分子(推定分子量約10,000)の位置に単一バンドを示した。Isobe らの報告によると S-100 蛋白は S-100a および S-100b の2成分より成り(5)，各々が [α,β], [β,β] で示されるサブユニット構造をもつと考えられる(11)。そこで SDS-polyacrylamide 電気泳動で示された W-7 Epoxy protein のバンドが，これら S-100a 又は S-100b のサブユニットではないかと

考え，W-7 Epoxy protein，S-100a，S-100b を Ornstein (5)，Davis(6) の方法により，20% polyacrylamide を使用した電気泳動で比較検討した（図3）。この結果 W-7 Epoxy protein は S-100a，S-100b と泳動度が一致する2つの成分より成ることが示され，S-100a と S-100b が約3:1の割合で混合していることが示唆された。そこで W-7 Epoxy protein，W-7 CNBr protein のアミノ酸分析を行なったところ，W-7 Epoxy protein は S-100 蛋白と著しく類似したアミノ酸組成（表1）であることが判明した。また S-100a および S-100b のアミノ酸組成と比較することにより，W-7 Epoxy protein は両者の混合物と考えられた。一方 W-7 CNBr protein のアミノ酸組成は calmodulin のものとほぼ一致し，かつ calmodulin に特徴的とされる trimethyllysine を1モル含有することより，calmodulin と考えられた。次にこれらの分離蛋白と S-100 抗体との反応性をオクタロニー法によって検討したところ，W-7 Epoxy protein は S-100 抗体と沈降線を形成したが，W-7 CNBr protein では形成が認められなかった（図4；(1) S-100 抗体，(2,5) S-100，(3,4) W-7 Epoxy protein，(6) W-7 CNBr protein，(7) calmodulin）。4) W-5 は W-7

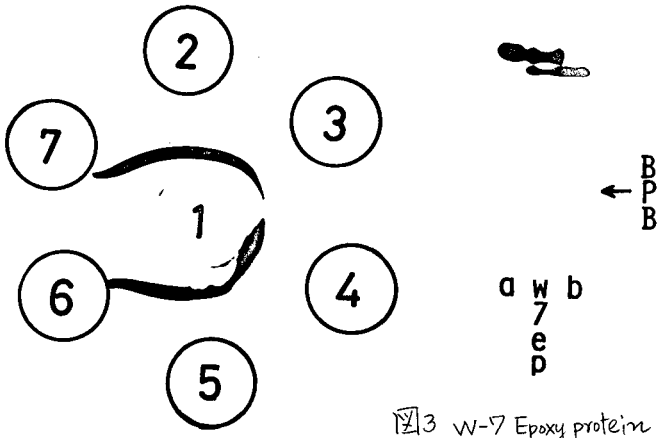


図3 W-7 Epoxy protein のポリアクリルアミド，スラブゲル電気泳動像

図4. 抗S-100抗体と W-7 Epoxy protein，W-7 CNBr protein の反応

表1 分離蛋白質のアミノ酸組成

	W-7 Epoxy protein	W-7 CNBr protein	$PAPI_a$	$PAPI_b$	S-100	calmodulin
Lys	9.7	8.0	8.2	8.0	9.4	7
His	3.5	0.8	3.6	5.7	4.3	1
Arg	1.0	5.9	0.7	1.1	1.0	6
Asp	12.3	23.8	12.4	10.3	11.6	23
Thr	4.3	11.8	3.6	3.4	3.8	12
Ser	5.9	4.0	5.1	5.7	5.8	4
Glu	18.5	27.0	19.0	20.7	19.1	27
Pro	0.0	2.0	0.0	0.0	0.0	2
Gly	6.3	10.8	5.8	4.6	5.1	11
Ala	7.0	10.8	7.3	5.7	6.6	11
Cys/2	1.0	0	1.5	2.3	1.9	0
Val	7.0	6.9	7.3	6.9	7.7	7
Met	0.8	9.0	2.9	3.4	2.7	9
Ile	3.3	8.0	2.9	4.6	3.2	8
Leu	11.1	9.2	10.2	9.2	9.5	9

の脱クロル誘導体	Thy	1.8	2.1	1.5	1.1	1.4	2
でcalmodulin親	Phe	6.6	8.0	6.6	6.9	6.5	8
和性がW-7に比	Trp	0.8	0.0	0.7	0.0	0.6	0
べ著しく低いこと	TML	0.0	1.0	-	-	-	1
が判明している。							

固定化したcalmodulin阻害剤の性質を検討するために、W-5をEpoxy activated Sepharoseに結合させた。図5は牛脳粗酸性蛋白分画をCa^{2+}存在下でW-5 Epoxy Sepharoseに添加しEGTA含有bufferで溶出したものである。この蛋白はcalmodulinと同程度Ca^{2+}-PDEを活性化し、電気泳動像もcalmodulinのものによく似ていた。

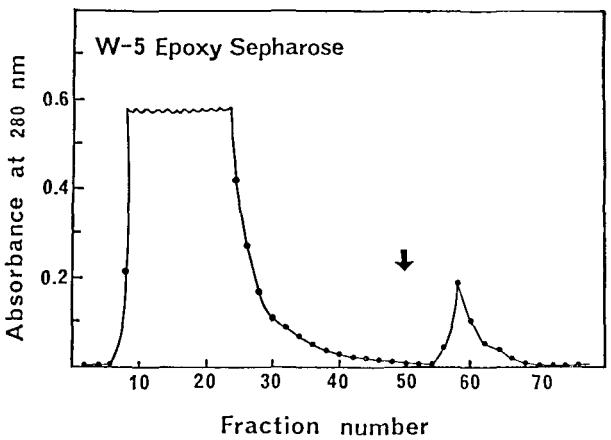


図5 W-5 Epoxy Sepharoseのアフィニティークロマトグラフィー

<考察>

Ca^{2+}-PDE活性化能、電気泳動像、アミノ酸組成、免疫学的検討より、W-7 Epoxy proteinはS-100蛋白で、W-7 CNBr proteinはcalmodulinと考えられた。一方薬物とSepharoseの種類を変えることにより、naphthalenesulfonamide固定化アフィニティークロマトグラフィーにおけるCa^{2+}結合蛋白とリガンドの関係が明らかになった。即ち、W-7 Epoxy sepharoseとW-5 Epoxy Sepharoseは同一のスペーサーおよびマトリックスを有するため、S-100が前者に、calmodulinが後者に結合する原因はリガンドのクロル基の有無に帰すると考えられる。またW-7 Epoxy SepharoseにS-100が、W-7 CNBr epharoseにcalmodulinが結合することから、S-100、calmodulinとリガンドの結合には、スペーサーとマトリックスが深く関与すると考えられる。我々はcalmodulin阻害剤とcalmodulinの結合に、calmodulinの疎水性領域が関与することを報告した(8)が、クロル基、スペーサー等はリガンドの疎水性を変化させて、Ca^{2+}結合蛋白質への親和性に影響を与えているのかもしれない。以上の結果はS-100とcalmodulinの簡易な精製法を提示するのみならず、S-100、calmodulinの構造研究にも、naphthalenesulfonamide誘導体が有用に利用できることを示す。

<文献>

1) Means, A.R., and Dedman, J.R. (1980) Nature 285, 73-77 2) Hidaka, H., Yamaki, T., Totsuka, T., and Asano, M. (1979) Mol. Pharmacol. 15, 49-59 3) Hidaka, H., Yamaki, T., Naka, M., Tanaka, T., Hayashi, H., and Kobayashi, R. (1980) Mol. Pharmacol. 17, 66-72 4) Endo, T., Tanaka, T., Isobe, T., Kasai, H., Okuyama, T., and Hidaka, H. J. Biol. Chem. in press 5) Isobe, T., Nakajima, T., and Okuyama, T. (1977) Biochim. Biophys. Acta 494, 222-232 6) Teo, T.S., Wang, T.H., and Want, J.H. (1973) J. Biol. Chem. 248, 588-595 7) Laemmli, U.K. (1970) Nature 227, 680-685 8) Ornstein, L. (1964) Ann. N.Y. Acad. Sci. 121, 321-349 9) Davis, B.J. (1964) Ann. N.Y. Acad. Sci. 121, 404-427 10) Hidaka, H., and Asano, T. (1976) J. Biol. Chem. 251, 7508-7516 11) Isobe, T., and Okuyama, T. (1978) Eur. J. Biochem. 89, 379-388 12) Hidaka, H., Sasaki, Y., Tanaka, T., Endo, T., Ohno, S., Fujii, Y., and Nagata, T. (1981) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 78, 4354-4357 13) Tanaka, T., and Hidaka, H. (1981) Biochem. Int. 2, 71-75

60 グリア性細胞の増殖に及ぼすカルモデュリン阻害剤の影響

加藤泰治・奥村久仁子・伊藤仁一
田中　亮
(名古屋市大・医・生化I)

〔要　約〕

カルモデュリン阻害剤(N-(6-aminohexyl)-5-chloro-1-naphthalenesulfonamide hydrochlorides, W-7; trifluoperazine, TFP)は、グリア芽細胞成長因子(GMF)の活性を著しく阻害した。W-7(16.5μM)、TFP(9μM)は、GMFによるDNA合成増加(³Hチミジンの DNA内への取込みで測定)の50%を阻害し、同時に扁平グリア芽細胞が多極性グリア突起を形成する形態変化も抑制した。DNA合成阻害作用を動力学的に解析した結果、W-7は非拮抗的、TFPは混合型阻害形式を示すことが判った。また、TFPの方がW-7より阻害作用が強く、両者の阻害機構の差が示唆された。阻害作用の可逆性は、W-7、TFP共に作用時間が1hr以内のときにみられ2hrを超えると不可逆的な阻害を示した。グリア芽細胞に対する作用相は、静止期(G1期)の後期からDNA合成期(S期)の初めであった。両阻害剤は腫瘍性グリア細胞(C6)の増殖も阻害し、DNA合成阻害で測定した50%阻害は、W-7：40μM以上、TFP：25μMとグリア芽細胞の場合より阻害能が低かった。また、両者共C6の細胞数増加を有意に抑制した。

以上の結果は、グリア性細胞の増殖起点、特にDNA合成開始期にカルモデュリン依存性の反応が存在することを意味している。

Key words：
Calmodulin antagonist, Growth inhibition, Glioblasts

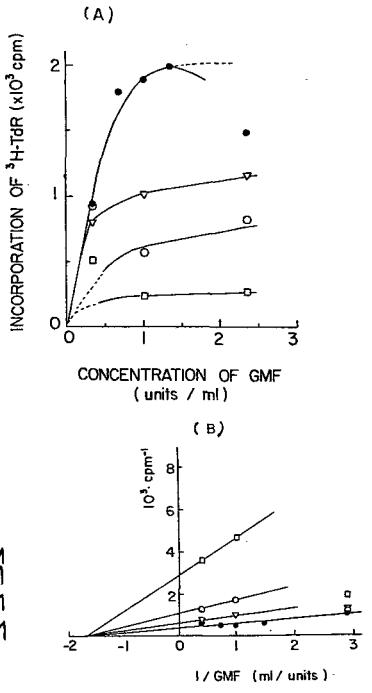


図1
● 0μM
▽ 15μM
○ 25μM
□ 35μM
W-7

〈序文〉

グリア細胞成長因子(Glia maturation factor、以下GMFと略す)はラット胎児の脳から単層培養したグリア芽細胞の増殖と分化を促すタンパク質で、成熟哺乳類の脳に共通して存在し脳神経系の発育を調節していると考えられる[5]。これまで私共はGMFのグリア芽細胞に及ぼす生物学的活性(G1期からS期への誘導[4]、細胞内サイクリックスクレオチドの変動[6]、S-100タンパクの増加等[6])について明らかにした。しかし、GMFの標的細胞に対する分子作用機構については、固定化GMFの実験より膜表面上のGMF受容体の存在が示唆されたのみで依然として不明のままである。

最近、カルモデュリンのDNA合成前期に於ける役割が話題となってきた[1][2][3]。私共も二種のカルモデュリン阻害剤をGMFのBioassay系に加えたところGMF活性を著しく阻害することを見出した。そこで今回は、この阻害機構を解析し、さらにグリア性細胞の増殖過

程におけるカルモデュリンの阻害機構をGMFの分子作用機構と関連させながら理解すべく実験を進めた。

〈実験材料と方法〉

グリア芽細胞及びC6細胞の培養：在胎17日目の胎児ラット脳をトリプシン処理後20%胎児牛血清含有F-10培地で一次培養した。7日後にAssay用の8-ウェルマルチトレイに移し10%新生児牛血清含有F-10培地で二次培養を行った。実験には一次培養後14日目の細胞を使用した。C6細胞は10%新生児牛血清含有F-10培地で培養した。

GMF標品の調整：ウシ脳500gに0.02Mトリス塩酸緩衝液(pH7.4)を加え、25%(w/v)のホモジネートを作成し遠心上清を粗脳抽出液とした。ひきつづき透析後、凍結乾燥した。得られた粉末(5g)を冷エタノール(100%)で処理後0.02Mトリス塩酸緩衝化食塩水で一晩抽出した。この粗出液をDEAE Sephacel で部分精製したGMF(Step II)を実験に用いた。GMF活性はunitで表わし、1mg(タンパク量)の粗脳抽出液が示す活性に相当する活性を1unitとした[3]。

Bioassay：GMF活性はグリア芽細胞の分裂増殖能を[^{3}H]-チミジンのDNA内への取り込み量で測定した。GMFによるグリア芽細胞の形態的変化(石垣状の扁平細胞が多極性のグリア突起を形成)もあわせて測定した。

カルモデュリン阻害剤：N-(6-aminohexyl)-5-chloro-1-naphthalenesulfonamide hydrochlorides (W-7)と trifluoperazine(TFP) を用いた。

〈結果および考察〉

1．カルモデュリン阻害剤による形態変化の抑制

GMF刺激(1.0unit/ml)により惹起されるグリア芽細胞の形態変化はW-7(35μM)で強く阻害された。GMF非存在下のグリア芽細胞にW-7を加えても変化は認められなかった。W-7

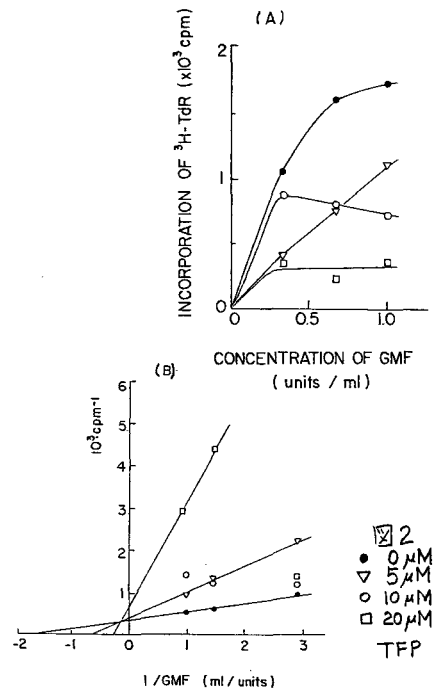


図2

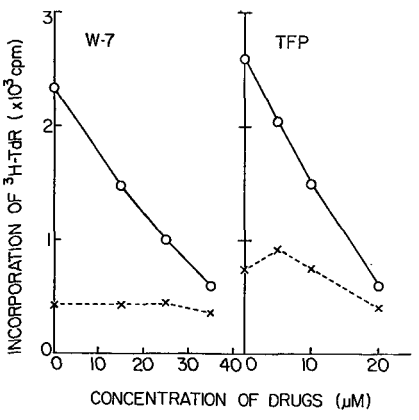


図3

○(+)GMF, ×(−)GMF

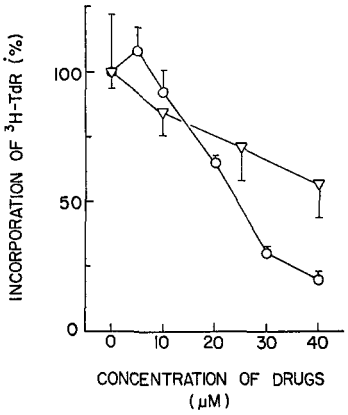


図4
▽W-7，○TFP

自身による細胞毒性は35μM以下では90%以上に保たれる。TFP(20μM)もほぼ同様な作用を示した。

2．カルモデュリン阻害剤によるGMFのMitogenic活性への影響（図1－3）

W-7の作用はGMF濃度に依存して相反する二つの効果を示した。即ち、低濃度のGMF存在下(0.3unit/ml)ではW-7のDNA合成阻害能は弱く却ってDNA合成の活性化の可能性が示唆された。(予備実験では10μM以下のW-7はDNA合成を約30%上昇させた。)TFPの場合も同様の傾向が認められた。

高濃度のGMF存在下ではカルモデュリン阻害剤の濃度に依存してグリア芽細胞のDNA合成は阻害された。(図3) 50%阻害を示すID50はW-7：16.5μM，TFP：9.0μMであった。阻害様式をDouble reciprocal plotsを用いて動力学的に解析すると、W-7は非拮抗的、TFPは混合型の阻害で、少なくとも拮抗的な阻害形式は示さなかった。このことはカルモデュリン阻害剤とGMFが膜表面のGMF受容体上で拮抗しないことを意味する。また、キネティックパラメターはGMF50(Kmに相当する)が0.57 unit/ml、Kiはw-7：36.8μMおよびTFP：7.8μMであった。TFPはW-7より強い阻害作用を示し、2つの阻害剤の作用機構には差があることがわかった。(図1B、2B)

3．C6(アストロサイトーマ)の細胞増殖に与える影響（図4）

両阻害剤共にC6のDNA合成能を濃度依存的に阻害した。しかし阻害能はグリア芽細胞の場合より弱くID50はそれぞれTFP：25μM、W-7：40μM以上であった。

細胞増殖能の阻害を細胞増殖曲線の変化で観察したのが図5である。W-7(25μM)、またはTFP(20μM)の存在下で長期間培養（培養後2日目に阻害剤を添加し2日おきに培地交換と同時に阻害剤を加えた。）すると有意に細胞増殖は抑えられた。しかし阻害剤を除く（矢印で示した時点で阻害剤を除く）と増殖能

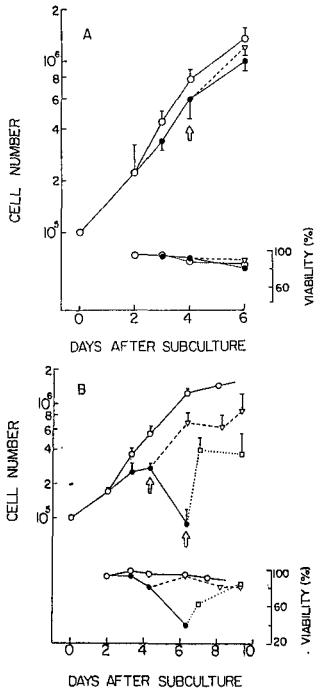


図5
○ control
● W-7 (A)
TFP (B)

は回復する。C6に対する阻害剤の細胞毒性はTFPの方が強く刺激4日間で著明な生細胞率の低下がみられた。

4．阻害作用の可逆性（図6）

GMF刺激後阻害剤の作用時間を変化させ阻害作用の可逆性を検討した。W-7、TFP共に作用時間が1hr以内のときはDNA合成は回復したが、2hr以上のときは不可逆的にDNA合成が阻害された。

5．阻害の作用相（図7）

静止期（G_1, G_0）にあるグリア芽細胞にGMFを加えた後、経時的にW-7を添加し阻害の作用相を分析した。阻害作用はGMF刺激後10hrまではみられるが12hr以後の細胞には認められなかった。DNA合成速度の経時変化（破線）との比較により、W-7の阻害作用はG_0期の後期からS期の初期の細胞にみられることが判った。

以上の結果は、カルモデュリンがDNA合成開始時期、特にG_1期後期からS期への移行期に何らかの機構で関与していることを示唆している。

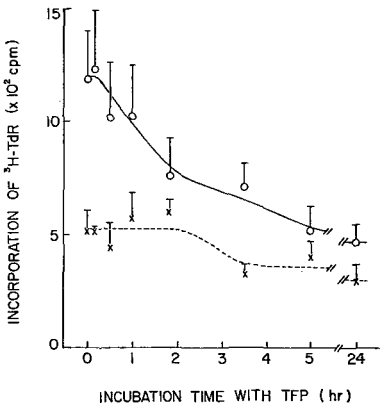


図6

○ (+)GMF , × (−)GMF

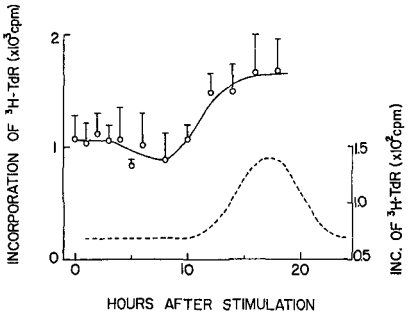


図7

<文献>

1. Crossin,K.L.and Carney,D.H.(1981) Cell 23,61-71
2. Hidaka,H.,Sasaki,Y.,Tanaka,T.,Endo,T, Ohno,S.,Fujii,Y.,and Nagata,T.(1981) Proc.Natl.Acad.Sci.USA(in press)
3. Kato,T.,Fukui,Y.,Turriff,D.E.,Nakagawa, S.,Lim,R.,Arnason,B.G.W.,and Tanaka,R. (1981)Brain Res.212,393-402
4. Kato,T.,Yamakawa,Y.,Lim,R.,Turriff,D.E., and Tanaka,T.(1981)Neurochem.Res.4, 401-412
5. Lim,R.and Mitsunobu,K.(1974)Science 185,63-66
6. Lim,R.,Turriff,D.E.,Troy,S.S.,and Eng,L.F. (1977) Science,195,195-196
7. Otto,A.N.,Urich,M-O,Zumbe,A.,and Jimenez de Asua,L.(1981)Proc.Natl.Acad.Sci.USA 78,3063-3067
8. Turriff,D.E. and Lim,R.(1979)Brain Res.,166,436-441

61 ブタ脳中に存在するdes(Ala-Lys)カルモデュリン

礒辺俊明・石岡憲昭・奥山典生
(都立大・理・化)

〔要　約〕

1. ブタ脳抽出液よりカルモジュリン様の酸性タンパク質を分離精製した。このタンパク質の含量はカルモジュリンの約1/10であった。
2. 精製タンパク質は分子量16500で，カルモジュリンよりやや酸性であった。アミノ酸組成はカルモジュリンと酷似しており，1モル中に1モルのε-N-トリメチルリジンを含んでいた。
3. 陰イオン交換樹脂を用いた高速液体クロマトグラフィーによるトリプシン分解物のペプチドマップと，分離ペプチドの分析結果より，分離されたカルモジュリン様タンパク質は，カルモジュリンのC末端Ala(147)-Lys(148)が欠損したdes(Ala-Lys)カルモジュリンであることがわかった。
4. des(Ala-Lys)カルモジュリンは，カルモジュリンの *in vivo* での限定分解によって生成したと仮定して，その生理的意味について考察した。

Key words：　des(Ala-Lys)calmodulin, amino-acid sequence determination, post-translational peptide bond cleavage

---

カルモジュリン(CaM)は，細胞内の情報伝達物質としてのCa^{2+}の作用を媒介する調節タンパク質である。現在までに広範囲にわたる酵素やタンパク質がCaM作用の"標的"として同定されており，これらの酵素やタンパク質とCaMとの相互作用の様式や活性化の機構が，生化学的観点からの興味ある研究対象となっている。一方，こうしたCaMの多様な作用は，CaM分子自身の活性が細胞内で厳密に制御されている可能性を示唆している。事実，CaMの115位のLysはトリメチル化されており，こうした"転写後修飾"がCaMの酵素に対する選択性や活性化の程度の調節に関与しているのではないかとも考えられる。但しこれに対する確定的な証拠は得られていない。

我々は，ブタ脳抽出液より調製したCaM分画中に，CaMとは異なったCaM類縁タンパク質が存在することを見出した。このタンパク質を分離精製し，構造分析を行なった結果，CaMのC末端Ala(147)-Lys(148)が欠損した"des(Ala-Lys)"カルモジュリン(des CaM)であることがわかった。我々はこれが *in vivo* でのCaMの限定分解によって生じたものと推定し，こうした限定分解がCaMの活性の制御機構の一部を担っているのではないかと考えた。

〔実験材料と方法〕

des CaMを含む粗CaM標品は，ブタ脳抽出液よりIsobeらの方法(3)で調製した。SDS存在下，あるいは非存在下でのポリアクリルアミドゲル電気泳動は，それぞれLaemmliの方法(5)およびDavisの方法(1)に準拠した。タンパク質およびペプチドのアミノ酸組成は，試料を定沸点塩酸で減圧封管中110℃，24あるいは72時間分解後日立KLA-5型アミノ酸分析機を用いて分析した。ε-N-トリメチルリジンは，Shodex

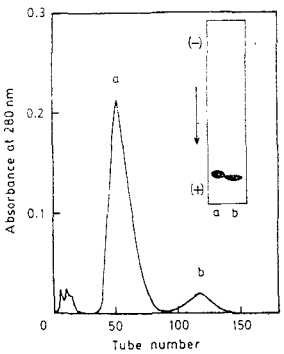


Table 1. Amino Acid Compositions of Des(Ala-Lys)calmodulin and Porcine Brain Calmodulin[a]

Amino acid	Des(Ala-Lys) calmodulin	Porcine calmodulin	Bovine calmodulin[b]
Lys	5.9 (6)	6.8 (7)	7
TNL[c]	1.1 (1)	1.0 (1)	1
His	1.2 (1)	1.2 (1)	1
Arg	5.6 (6)	6.1 (6)	6
Asx	22.1 (23)	22.5 (23)	23
Thr	11.1 (12)	11.2 (12)	12
Ser	4.5 (4)	4.0 (4)	4
Glx	27.5 (27)	27.3 (27)	27
Pro	2.3 (2)	2.1 (2)	2
Gly	11.4 (11)	10.8 (11)	11
Ala	10.3 (10)	10.9 (11)	11
Cys	0.0 (0)	0.0 (0)	0
Val[d]	6.5 (7)	6.7 (7)	7
Met[d]	8.5 (9)	8.7 (9)	9
Ile[d]	7.5 (8)	7.4 (8)	8
Leu	8.7 (9)	8.9 (9)	9
Tyr	1.9 (2)	2.0 (2)	2
Phe	7.6 (8)	7.8 (8)	8
Trp[e]	0.0 (0)	0.0 (0)	0
Total	146	148	148

a; From duplicate analyses of 24- and a single analysis of 72-h hydrolysate. The numbers in parentheses are the numbers of residues found by peptide mapping of the tryptic digests. b; Computed from the sequence. c; ε-N-trimethyllysine. d; From the 72-h hydrolysis value. e; From spectroscopic evidence.

Fig. 1. Separation of porcine brain calmodulin (a) and des(Ala-Lys)calmodulin (b), and polyacrylamide gel electrophoresis of the isolated proteins. The calmodulin preparation (120 mg) was applied to a column (1.0 x 36 cm) of DEAE-Sephadex A-50 equilibrated with 0.1 M potassium phosphate buffer (pH 7.1) containing 1 mM EDTA and 0.28 M NaCl, and eluted with the same solvent at a flow rate of 3.2 ml/h. 3.2 ml-fractions were collected. The electrophoresis was performed as described by Davis (1) in a 10 %-gel slab without SDS.

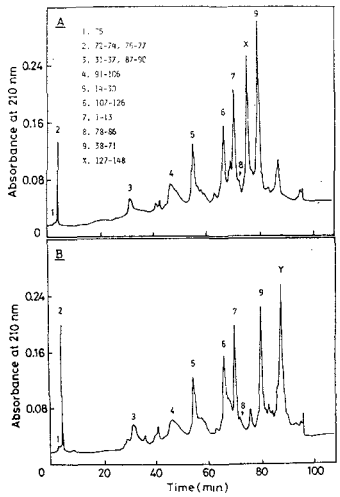


Fig. 2. Peptide maps of calmodulin (A) and des(Ala-Lys)calmodulin (B). The tryptic digests (c.a. 50 μg each) were applied to a column (4 x 250 mm) of Hitachi-Gel 3013N and eluted as described in Methods at a flow rate of 0.5 ml/min. The gradient was formed by placing 30 ml of water in a gradient mixer into which the final solvent was added at a flow rate of 0.25 ml/min. A detector (8 mm-light path) was set at 0.32 a.u.f.s. and a recorder, 1 mV. Assignments were made for the calmodulin peptides 1 to 9 and X, and their positions in the sequence are shown in (A). Amino acid compositions of the 1 to 9 and Y peptides of des(Ala-Lys)calmodulin are given in Table 2.

Table 2. Amino Acid Compositions of Tryptic Peptide of Des(Ala-Lys)calmodulin[a]

	peak number in Fig. 2											
Amino acid	1	2[b]	3a	3b	4	5	6	7	8	9	Y	X[c]
Lys	1.0 (1)	1.1 (1)			1.2 (1)[d]	2.1 (2)	0.9 (1)	1.0 (1)				1.2 (1)
His							1.1 (1)					
Arg		0.9 (1)	1.0 (1)	1.0 (1)	1.0 (1)		1.0 (1)		1.0 (1)			
Asx					2.8 (3)	3.0 (3)	3.0 (3)	1.4 (1)	2.0 (2)	7.0 (7)	4.0 (4)	4.1 (4)
Thr				0.9 (1)		2.7 (3)	1.9 (2)	1.1 (1)	0.9 (1)	2.9 (3)	1.0 (1)	1.3 (1)
Ser		0.3 (0)			0.9 (1)	1.1 (1)			1.2 (1)	1.3 (1)	0.3 (0)	0.3 (0)
Glx			0.9 (1)	1.1 (1)	1.0 (1)	1.0 (1)	3.8 (4)	5.0 (5)	3.1 (3)	5.6 (6)	5.1 (5)	4.7 (5)
Pro										2.0 (2)		
Gly		0.3 (0)	0.4 (0)	1.1 (1)	2.1 (2)	2.1 (2)	1.3 (1)		0.5 (0)	3.1 (3)	2.2 (2)	2.1 (2)
Ala		1.0 (1)	1.1 (1)		2.0 (2)	1.2 (1)		1.8 (2)		2.3 (2)	1.0 (1)	2.0 (2)
Val				0.9 (1)	0.8 (1)		1.6 (2)			1.1 (1)	1.7 (2)	1.9 (2)
Met		1.6 (2)		0.8 (1)			1.6 (2)			1.9 (2)	1.8 (2)	1.9 (2)
Ile					0.9 (1)	1.2 (1)	1.0 (1)	1.2 (1)	0.8 (1)	2.0 (2)	0.9 (1)	1.1 (1)
Leu				1.0 (1)	1.0 (1)	1.1 (1)	1.8 (2)	1.0 (1)		2.5 (3)		0.4 (0)
Tyr					0.8 (1)						1.0 (1)	1.0 (1)
Phe			1.0 (1)		0.9 (1)	1.7 (2)		0.9 (1)		1.9 (2)	1.0 (1)	1.1 (1)
Total residues	1	2,3	4	7	16	17	20	13	9	34	20	22
Positions in sequence[e]	75	72-74 76-77	87-90	31-37	91-106	14-30	107-126	1-13	78-86	38-71	127-146	127-148

a; Amino acids present at a level of less than 0.2 mol/mol of peptide are not shown. Numbers in parentheses are the numbers of residues computed from the sequence of bovine brain calmodulin, except those for the peak Y are the numbers of residues predicted from the composition. b; A mixture of 2- (Lys,Met; 76-77) and 3- (Arg,Ala,Met; 72-74) residue peptides. c; Derived from calmodulin. d; ε-N-trimethyllysine. e; Predicted from the calmodulin sequence.

HC-1258樹脂の8×300mmカラムを用い，0.5M食塩を含む0.2Mクエン酸ナトリウム（pH4.25）を溶離液として57°C，流速1ml/minで分離定量した。

CaMとdesCaMのトリプシン分解は，1/50量のTPCK-トリプシンを用いて10mM炭酸水素アンモニウム（pH8.0）中で37°C，4時間行なった。分解物の高速液体クロマトグラフィーによるマッピングは，陰イオン交換樹脂Diaion CDR-10を用いた既報の方法(7)を一部変更して行なった。すなわち分解物（50~100Mg）をHitachi-Gel 3013Nの4×250mmカラムに添加し，水から50% CH_3CN，25% isoProHを含む0.25Mメタンスルホン酸アンモニウム（pH2.8）への直線的濃度勾配溶出法により溶離した。温度は70°C，流速は0.5ml/minに設定し，ペプチドは210nmで検出定量した。逆相クロマトグラフィーにはZorbax ODSカラム（4.6×150mm）を用いた。ペプチドは50°C，流速1ml/minで，0.1%TFAから60% CH_3CN-0.1%TFAへの濃度勾配溶出法で溶離した。

［結果］

desCaMは，ブタ脳抽出液より調製した粗カルモジュリン分画中に存在するカルモジュリン様タンパク質として検出された。CaMとdesCaMは，DEAEセファデックスA-50カラム（1.0×36cm）を用い，0.28M食塩，1mM EDTAを含む0.1Mリン酸カリウム緩衝液（pH7.1）を溶離液とする"isocratic elution chromatography"により分離された（図1）。分離されたdesCaMは，SDSゲル電気泳動で，CaMと同一移動度の単一バンドを与えた（分子量~16,700）。SDSを含まない10%ゲル電気泳動では，CaMより僅かに酸性側に移動する単一バンドを示した（図1）。図1のピーク面積から計算したdesCaMの含量はCaMの約1/10であった。これは脳湿重量1kgあたり30~40mgに相当する。

desCaMは，図1で得られたブタ脳CaM，あるいはウシ脳CaMと非常によく似たアミノ酸組成を示し，かつCaMに特徴的なトリメチルリジン残基を1モル中に1モル含んでいた（表1）。しかし前者のアミノ酸組成は，後者に比べてLys，Ala含量が少なく，特にLys含量の差はdesCaMがCaMとは異なったタンパク質であることを示すものであると考えられた。

そこで，両者の一次構造の差異を明確にするために比較構造研究を行なった。CaMとdesCaMをそれぞれトリプシンで分解し，高速液体クロマトグラフィー法によって分解物のペプチドマップを作成した（図2）。

ブタ脳CaMは，12種類の主トリプシンペプチドを含む10^3のペプチドピーク（No.1~9およびX）を与えた（図2A）。アミノ酸組成分析により同定した各ピークペプチドの一次構造上の位置を図2A中に示した。ここで同定されたペプチドは，CaM分子（148アミノ酸残基）の全構造部分を網らするものであった。一方，desCaMもまた12種類の主トリプシンペプチドを含む10^3のペプチドピーク（No.1~9およびY）を与えた（図2B）。図2AとBを比較すると，両者から由来したNo.1~9のペプチドは，それぞれマップ上の同じ位置に溶離していることがわかる。しかし，desCaMでは，CaM由来のC末端ペプチド；ピークXが欠損し，そのかわりにCaMでは検出されないピークYが存在している。したがって，両者の一次構造は，C末端付近のみで異なっていると推定された。

desCaM由来の11種類のペプチドピークのアミノ酸組成を表2に示した（ピークNo.3はZorbaxODS逆相クロマトグラフィーで3aと3bに分離してから分析した）。NO.1～9の組成は，CaM由来の対応するペプチドの組成と完全に同じであった。ピークYは，CaMのC末端ペプチド（ピークX）と類似の組成を示したが，Lysが欠損し，Alaが1モルしか存在しない点でピークXとは明らかに異なっていた（表2参照）。CaMの一次構造(4)を考慮して，desCaMではCaMのC末端ジペプチド：Ala(147)-Lys(148)が欠損していると結論した。

［考察］

ブタ脳抽出液よりCaM様のタンパク質を分離精製し，これがCaMのC末端ジペプチドの欠損したdes(Ala-Lys)カルモジュリン（desCaM）であることを示した。desCaMはゲル電気泳動やDEAEセファデックス上で，CaMよりやや酸性の挙動を示す（図1）が，これはLys残基1モルが欠損しているためと考えられる。desCaMはブタ脳以外，ヒト脳やウシ脳にも存在するようである。存在量はブタ脳の場合CaMの約1/10と推定される。

中村ら(6)，田代ら(8)は，それぞれウシ脳のシナプス形質膜およびモルモット迷走神経中に分子量23,000あるいは26,000のCaM類縁タンパク質が存在することを報告している。これらのタンパク質の一次構造はまだ明らかにされていないが，いずれも分子量が大きいという点で，また中村らのタンパク質は膜結合型であるという点で，今回報告したdesCaMとは異なっている。一方これらの高分子量CaM類縁タンパク質やdesCaMのような一連のCaM類縁タンパク質が脳内に存在することは，CaMが生合成され代謝される過程に，段階的なCaMのprocessing機構が存在し，これが何らかの形でCaMの活性制御に関与していることを示唆しているようにも思われる。高分子量CaM類縁タンパク質の一次構造決定が待たれるところである。

desCaMがCaMのin vivoでの限定分解によって生成したと仮定すると，Thr(146)-Ala(147)結合の切断，あるいはAla(147)-Lys(148)部分の段階的な切断が必要である。Ala-Lys部分の除去は，おそらくCaMのCa^{2+}結合能には影響を与えないが，CaMの標的酵素やタンパク質に対する親和性や特異性を，直接，あるいは立体構造変化を通じて間接的に変化させる可能性がある。標的酵素に対する親和性，特異性が異なる異種CaMの一次構造の変異が，特にC末端付近に局在している(9)ことはこの可能性を支持している。しかし，PDEに対する活性化能に関する限り，CaMとdesCaMの間に有意義な差は認められていない（昭和大学薬学部・中村，中谷，中条博士との共同研究による）。一方，CaMの抗原決定部位が，127-144の構造部分であるというFokらの結果(2)は，実際にCaMのC末端付近が分子表面に露出していることを示唆している。

（この研究の一部は第8回国際薬理学会シンポジウムで発表した。）

REFERENCES: 1.Davis,B.J.(1964)Ann.N.Y.Acad.Sci.,121,321-349. 2.Fok,K-F.,van Eldik,L.J., Erickson,B.W. & Watterson,D.M.(1981) Abstr. 7th American Peptide Symposium, p.33. 3.Isobe,T.,Nakajima,T. & Okuyama,T.(1977) Biochim.Biophys.Acta, 494, 222-232. 4.Kasai,H., Kato,Y., Isobe,T.,Kawasaki,H. & Okuyama,T.(1980) Biomed.Res., 1, 248-264. 5.Laemmli,U.K. (1970) Nature (Lond.) 227, 680-685. 6.Nakamura,Y.,Nakahama,T.,Ushiwata,A.,Takeda,M. & Nakaya,K. (1980) FEBS Lett. 112, 155-158. 7.Takahashi,N.,Isobe,T.,Kasai,H.,Seta,K. & Okuyama,T. (1981) Anal.Biochem., 115 (in press). 8.田代朋子，笠井久隆，黒川正則(1980)神経化学 19，354-357. 9.Yazawa,M.,Yagi,K.,Toda,H.,Kondo,K.,Narita,K.,Yamazaki,K.,Sobue,K.,Kakiuchi,S.,Nagao,S. & Nozawa,Y. (1981) Biochem.Biophys.Res.Commun., 99, 1051-1057.

62 脳シナプス膜のカルモデュリン様タンパク質の活性と構造の検討

中村泰治・中条茂男・大松孝樹・相内敏弘・紫山敏子
林 久美子(昭和大・薬・生化)・竹田 稔(同・医・生化)・中谷一泰(同・薬・生化)
石岡憲昭・礒辺俊明・奥山典生(都立大・理・生物化学)

〔要 約〕

ラットおよび牛脳のシナプス膜画分より単離した酸性カルシウム結合タンパク質(SPM-23)は、その性質がカルモジュリン(CaM)とよく似ているが、分子量等いくつかの異なった性質をもつことを前回報告した。今回PDE以外の酵素の活性化およびトリプシン消化ペプチド鎖のマッピング等の研究を行ない次の結果を得た。〔1〕SPM-23はAdenylate cyclaseを、CaMが活性化するのと同じ条件下で活性化しなかった。〔2〕SPM-23はシナプス膜の内在性protein kinaseによるリン酸化反応を活性化しなかった。〔3〕牛脳のSPM-23をFluphenazine-Sepharoseによるアフィニティクロマトグラフィーにより、さらに精製することができた。〔4〕精製SPM-23をトリプシン消化し、高速液クロによりペプチドを分離してCaMと比較した結果、SPM-23はCaMの12のフラグメントの中、8個のフラグメントを共通に持っており、他に4個の未知のフラグメントを含んでいた。しかしCaMの38~71番目のアミノ酸に相当するペプチドが欠けていた。以上の結果からSPM-23は一次構造的にCaMと共通な部分をもつが、CaMとは異なったペプチド鎖部分も持つカルシウム結合性膜タンパク質であることがわかった。

Key words : a calmodulin-like protein
calcium
synaptic plasma membranes

我々はラット大脳のシナプス膜画分より、Lithiumdiiodosalicylate (LIS) による膜可溶化，フェノール抽出，ゲル沪過によりカルモジュリン様酸性タンパク質を単離し、その性質をカルモジュリン(CaM)と比較した(1,2)．本実験では、このタンパク質(便宜上SPM-23と略す)がPDEの活性化以外に生理的活性を示すかどうかを更に調べた。また、SPM-23の一次構造をCaMと比較する為にSPM-23を牛脳より調製し、SPM-23とCaMをトリプシンで消化後、それらのペプチドを液体クロマトグラフィーにより分離し、それらのパターンや各ピークの化学的性質を比較検討した。

〈実験方法〉

(1) SPM-23の調製　P_2画分、シナプス膜およびSPM-23は、前報(1,2)に従って調製した。PDEは牛脳よりWattersonら(3)の方法を改良して調製した(2)。

(2) アデニレートシクラーゼの活性測定　粗シナプス膜のアデニレートシクラーゼ活性は、Brostromら(4)の方法を改良して行なった。0.2 mMの[^{3}H]ATPを含む反応溶液150 μlに粗シナプス膜画分と150 μMの$CaCl_2$および200 μMのEGTAを添加して37℃で反応を行なった。生成した[^{3}H]cAMPをDowexカラムで分離して反応を測定した。

(3) シナプス膜のリン酸化反応　シナプス膜のリン酸化反応は、SchulmanとGreengard(5)により記載された条件下で行なった。

(4) SPM-23のトリプシン消化ペプチドの分離　トリプシン消化およびペプチドの分離は、Isobe, Ishioka, Okuyama (6)の方法で行なった。SPM-23(約100 μg)とCaM(約50 μg)に1/50量(w/w)のTPCKトリプシンを加え、pH8, 37℃で4時間インキュベーションした。反応はトリプシンインヒビターを加えて止めた。高速陰イオン交換液体クロマトグラフィー

は、Hitachi-Gel 3013N のカラムを用い、水-50%(v/v) アセトニトリルとイソプロパノール(pH2.8)を含む 0.5M メタンスルホン酸のリニアグラディエントで溶離を行なった。

〈結果〉

(1) P_2画分よりの SPM-23 の調製

図.1Bは、ラット脳のシナプス膜画分を LIS で可溶化後フェノール抽出したとき水層に含まれているタンパク質の SDS-PAGE の結果で、主バンドは SPM-23である。これに対して、脳の可溶性画分を同様に LIS-フェノール処理したときには、水層に含まれているタンパク質はカルモジュリンであった(図.1A, authentic CaM の場合 図.1Dと比較)。図.1Cは P_2画分を LIS で可溶化後、前に報告した方法(1,2)で精製した SPM-23を電気泳動で分析した結果である。これより P_2画分からも電気泳動的に homogeneous な SPM-23が得られることがわかる。そこで本実験では収量を上げる為、SPM-23を P_2画分より調製した。

(2)粗シナプス膜のアデニレートシクラーゼ活性に対する影響

CaM が粗シナプス膜画分のアデニレートシクラーゼを活性化する条件(図.2B)で、SPM-23はこの酵素をほとんど活性化しなかった(2AとCを比較)。また、Ca^{2+}濃度をいろいろ変化させても、SPM-23によりアデニレートシクラーゼが顕著に活性化されることはなかった。

(3)シナプス膜画分の プロテインキナーゼ活性に対する影響

シナプス膜を[^{32}P]ATP とインキュベーションすると、[^{32}P]の取り込みは 1μg 以下の

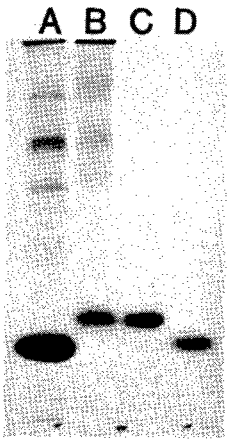


図.1 P_2画分より調製した SPM-23 の SDS-PAGE。
A, 可溶性画分を LIS-フェノール処理したもの
B, シナプス膜画分を LIS-フェノール処理したもの
C, SPM-23　　D, 牛脳 CaM

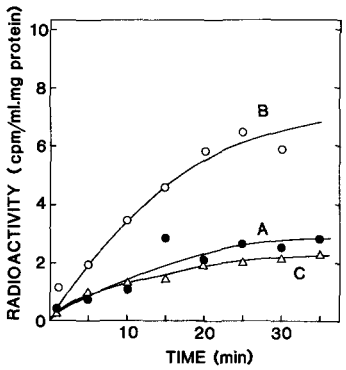


図.2 粗シナプト膜画分のアデニレートシクラーゼ活性の time course。
A, +SPM-23(26 μg/ml)
B, +CaM(22 μg/ml)
C, 無添加
縦軸は使用した膜タンパク(mg/ml)から生成した[^{3}H]cAMP を 1ml 当りの radio-activity で表わした。

CaMの添加によっても著しく増大した(図.3B)。これに対して、SPM-23を約14μg加えても[^{32}P]の取り込みはほとんど増加しなかった(3A)。リン酸化されたシナプス膜をSDS-PAGE後オートラジオグラフィーで分析しても、同じ結果が得られた(図4)。

(4)牛脳のSPM-23

一次構造の研究の為には大量のSPM-23を必要とするので、牛脳より前記の方法で、SPM-23を調製し、さらにこれをfluphenazine-Sepharose4Bを用いたアフィニティクロマトグラフィーにより精製した。得られたSPM-23の化学的性質および電気泳動上の挙動は、すでに報告したラット脳のSPM-23と同一であった。またPDEの活性化能も、ラットの場合と同様CaMより低く、50%活性化に要するタンパク量はCaMの約10倍であった(図.5)。

(5)SPM-23のトリプシン消化ペプチドの分離

実験方法に述べた方法により、SPM-23をトリプシンで消化したペプチドを高速液体クロマトグラフィーにより分離し、得られたパターンをCaMのそれと比較した。その結果図.6より明らかなように、8個のピーク(ピーク1,2,3,4,5,6,7,8)がCaMのそれらと完全に一致した。しかし、CaMのピーク9がSPM-23には欠けており、CaMには存在しないピーク(ピークA,B,C,D)がSPM-23に認められた。

〈考察〉

SPM-23にはシナプス膜のアデニレートシクラーゼおよびプロティンキナーゼの活性化能が認められず、またPDEの活性化能もCaMより弱い。しかし、PDEはnonspecific

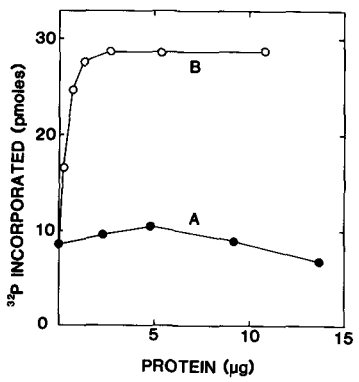


図.3 シナプス膜画分のプロティンキナーゼ活性に対するSPM-23およびCaMの濃度依存性。SPM-23(A) またはCaM(B)を添加後、37°Cで15秒間反応させた。

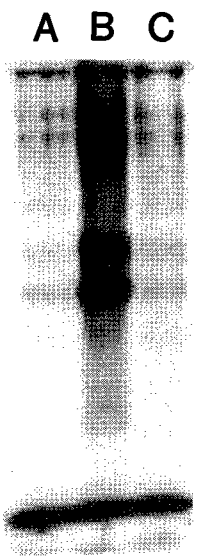


図.4 リン酸化されたシナプス膜の電気泳動後のオートラジオグラム。
A, autophosphorylation
B, + 2.6 μg CaM
C, + 10 μg SPM-23

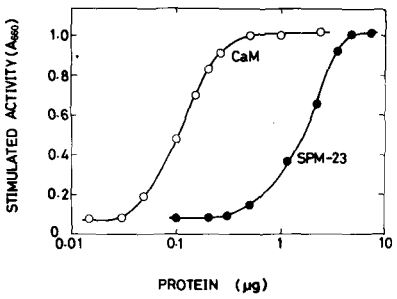


図.5 PDE活性に対する牛脳SPM-23およびCaMの影響。
A, SPM-23
B, CaM

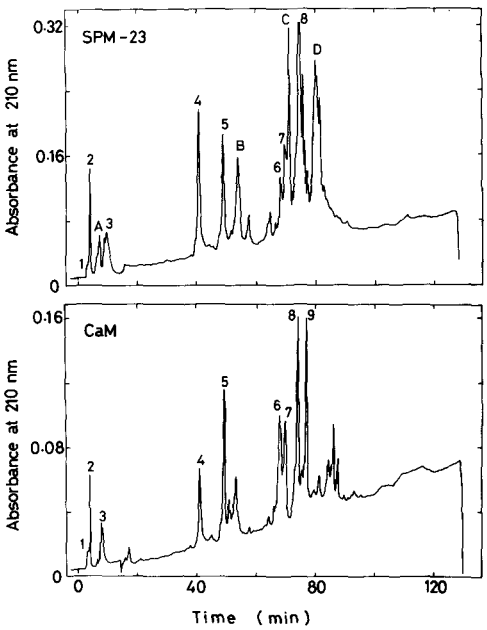


図.6 SPM-23(A)とCaM(B)のトリプシン消化ペプタドの高速陰イオン交換クロマトグラフィーによる分離。CaMペプタドの1~9の番号はIsobeら(6)の命名法による。カラム, 4×250mm Hitachi-Gel 3013N; 流速, 0.5 ml/min; 温度, 70°C; 溶離液, 水-0.5 Mメタンスルホン酸のリニアグラディエント。

に活性化される場合もあるので、SPM-23がin vivoでもPDEを活性化しているかどうかは現在の段階では疑問である。リン酸化については前回と逆の結果が得られたが、これはSPM-23にCaMが混入していた為かもしれないし、あるいは今回使用したシナプス膜がより精製したものである為かもしれない。一次構造的には、SPM-23にはCaMと共通のペプタドフラグメントが8個も存在し、その中にはCaMのN末端に相当するペプタド(ピーク7)も認められた。しかし、SPM-23にはCaMの38~71のアミノ酸に相当するペプタド(ピーク9)が欠けており、代りに4つの新たなペプタドのピークが見出されるので、CaMとはアミノ酸配列が中央部に於ても異なっている可能性が考えられる。

〈文献〉

(1) Nakamura, Y., Nakahama, T., Ushiwata, A., Takeda, M., & Nakaya, K. (1980) FEBS Lett. 112, 115 - 158
(2) 遠藤三重子, 中牧容子, 牛渡明子, 大松秀樹, 中谷一泰, 中村泰治 (1980) 神経化学 19, 90-93
(3) Watterson, D.M., Harrelson, W.G.jr., Keller, P.M., Scarief, F. & Vanaman, T.C. (1976) J. Biol. Chem. 251, 4501-4513
(4) Brostrom, C.O., Brostrom, M.A., Wolff, D.J. (1977) J. Biol. Chem. 252, 5677-5685
(5) Schulman, H., & Greengard, P. (1978) Nature 271, 478-479
(6) Isobe, T., Ishioka, N., & Okuyama, T. (1981) Biochem. Biophys. Res. Commun. in press

63 脳のミオシン軽鎖キナーゼの特異性

福永浩司・山本秀幸・宮本英七
(熊大・医・1薬理)

〔要　約〕

1) ラット脳細胞上清分画にはミオシン軽鎖をリン酸化する2種の酵素が存在し，分子量はゲル ろ過法でそれぞれ 64 万と 10万であった。2) 64万の酵素と 10万の酵素との間には相互転換が認められず，それぞれ別個に存在する酵素と考えられた。3) 64万酵素を酸処理，硫安分画，カルモデュリン - Sepharose 4B 親和性カラム，DEAE-セルロースカラム，ゲル汎過法，DEAE - セルロースカラムにより約800倍にまで精製した。精製酵素はポリアクリルアミド電気泳動上単一の蛋白バンドを示し，ほぼ均質であると考えられた。4) 精製酵素標本には cAMP 依存性プロテインキナーゼ，カゼインキナーゼ，リン脂質依存性キナーゼ，ホスホリラーゼ-b-キナーゼ活性の混入を認めなかった。5) 精製された64万酵素は筋肉組織のミオシン軽鎖キナーゼと異なり，ミオシン軽鎖のほかに，ミエリン塩基性蛋白，カゼイン，アルギニン性ヒストンおよび数種の内因性蛋白を Ca^{2+}，カルモデュリン依存性にリン酸化し，多様な基質特異性を示した。6) 64 万酵素は Ca^{2+}，カルモデュリン依存性に自動リン酸化された。7) 10万の酵素と比較すると64万の酵素は Ca^{2+} とカルモデュリンに対する親和性は低かった。ATP，Mg^{2+}，ミオシン軽鎖に対する動態には差を認めなかった。

Key words： calmodulin, myosin light chain kinase, brain cytosol fraction

---

Ca^{2+} は中枢神経系において重要な役割を演じている。神経伝達物質の生合成，貯蔵，分泌機構などである。Ca^{2+} の作用は少なくともその一部は Ca^{2+} 結合蛋白であるカルモデュリンを介して行なわれている。Ca^{2+}，カルモデュリンによって活性化される酵素系にはいくつかの報告がある[1]。生理的濃度の Ca^{2+} と微量のカルモデュリンによって活性化されるプロテインキナーゼは筋肉系ではミオシン軽鎖キナーゼと呼ばれ，最初，骨格筋に報告されたが，心筋，平滑筋および非筋肉系組織にも存在することが報告されている。私達は広く非筋肉系組織の酵素を調べ[2]その性質を比較，検討した。特に，脳に存在する酵素を部分精製して他の Ca^{2+} 依存性酵素との相違を明らかにした[3,4]。脳におけるミオシン軽鎖キナーゼが多様性をもつことは最初，Yamauchi と Fujisawa[5] により報告された。脳におけるミオシン軽鎖キナーゼを調べると，分子量的に平滑筋などと類似の酵素のほかにゲル汎過上 64 万を示す酵素の存在することがわかった。今回，64 万酵素を電気泳動上，ほぼ均質な状態にまで精製し，その性質を調べたので報告する。

実験方法

実験材料：カルモデュリンは既報の方法[6]，カルモデュリン - Sepharose 4B 親和性カラムは Klee と Krinks の方法[7]によって調整した。カルモデュリンを除いたミオシン軽鎖は既報の方法[4]に従い得た。ミエリン塩基性蛋白は既報の方法[8]により得た。

酵素活性測定法：酵素活性は反応溶液 0.2 ml で既報の方法[9]に従い，測定した。

ポリアクリルアミドゲル電気泳動法：ポリアクリルアミド電気泳動法は Davis の方

法[9]とSDSを用いるLaemmliの方法[10]に従い，行なった。ゲル中の蛋白質へのリン酸の取り込みはオートラジオグラフィーを行ない，放射能の局在部位を定めた。オートラジオグラフィーはレントゲンフィルムを用いて，ゲル染色，脱染色，乾燥後既報の方法[4]に従い，行なった。SDSポリアクリルアミドゲル電気泳動上の分子量の測定にはキモトリプシノーゲンA（25,000），卵アルブミン（43,000），牛血清アルブミン（67,000），ホスホリラーゼb（94,000）を標準蛋白として用い，測定した。[4]

酵素精製法：酵素精製のための材料は新鮮ラット脳を用いた。既報の方法を一部修正し，ホモジェネイトの上清を酸処理（pH 6.1），硫安分画（0-60%），カルモデュリン-Sepharose 4B親和性カラム，DEAE-セルロースカラム，ゲル沪過（Sephacryl S-300）法，DEAE-セルロースカラムにて精製した。酵素の分子量の測定にはゲル沪過法を用い，チログロブリン（67万），アポフェリチン（44万），γ-グロブリン（16万），ウシ血清アルブミン（6.7万），卵アルブミン（4.3万）の標準蛋白を用い，測定した。

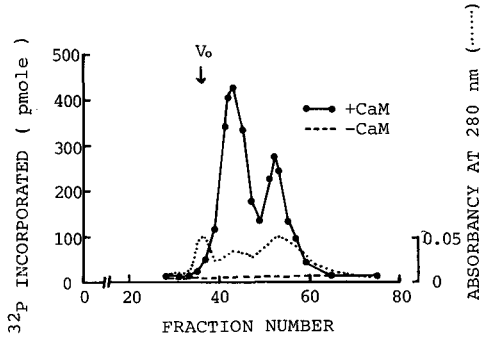


図1 脳ミオシン軽鎖キナーゼのSephacryl S-300によるゲル沪過

実験結果と考察

1）酵素精製：a）ゲル沪過法：図1はSephacryl S-300を用いてのゲル沪過法の結果を示している。ミオシン軽鎖キナーゼ活性は2つの明確なピークとして溶出された。標準蛋白を用いて分子量を測定するとそれぞれ10万と64万であることがわかった。これまでミオシン軽鎖キナーゼは筋肉組織および他の非筋肉組織酵素も分子量約10万といわれている。64万の酵素は筋肉組織には認められなかった。

b）64万酵素精製度：精製された酵素は最終段階で比活性が326 nmole/mg/min，収率5%，精製度は細胞上清分画を基準にして815倍であった。得られた酵素標本についてホスホリラーゼ-b-キナーゼ，cyclic AMP依存性プロテインキナーゼ，カゼインキナーゼ，リン脂質依存性キナーゼ活性をそれぞれ，ホスホリラーゼb，ヒストンホスビチン，ヒストンを基質にして測定したが，いずれの酵素活性も認められなかった。ミオシン軽鎖，ヒストンを基質にした場合もcyclic AMPは効果を示さなかった。

c）酵素の精製純度：精製酵素の一定量をとり，低温室中にてポリアクリルアミド電気泳動を行なった[2]。泳動後，ゲルを2mm毎に切片とし，各切片を緩衝液中につけ，酵素を抽出した。一定量の抽出液を用い，酵素活性を測定した（図2A）。ミオシン軽鎖，カゼイン，ミエリン塩基性蛋白に対する酵素活性のピークが一致していることがわかる。また，一方で酵素を電気泳動した別のゲルの染色を行ない，染色ゲルをデンシトメーターにて測定した。蛋白バンドのピークが上記の酵素活性のピークと一致していることがわかる（図2B）。酵素活性を示した蛋白バンドは単一であり，この条件下で酵素はほぼ均質な状態にまで精製されていると考えられた。さらに，SDSポリアクリルアミドゲル電気泳動上においても，主蛋白バンドは単一であることがわかった。

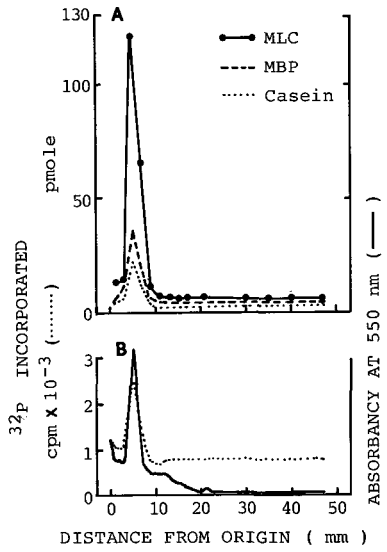


図2 5%ポリアクリルアミドゲル電気泳動

2) 64万酵素と10万酵素との相互転換の可能性：

骨格筋，心筋，平滑筋に存在するミオシン軽鎖キナーゼは約10万の分子量を持っていることの類似性から，脳の10万酵素は多くの組織に共通して存在するミオシン軽鎖キナーゼの範疇に属する酵素と考えられる。このことから考えると脳に存在する64万酵素が10万酵素のaggregate型である可能性が考えられ，検討した。a) ゲル沪過法を用い，酵素をあらかじめ1M尿素と0.2M 2-メルカプトエタノールを含む緩衝液の存在下でインキュベートした後，同緩衝液で平衡化したカラムに展開した（図3）。ミオシン軽鎖キナーゼ活性は尿素，2-メルカプトエタノール処理後も同一の位置に溶出された。このことは64万酵素が10万酵素のaggregate型である可能性を否定するものである。b) 両酵素はnative蛋白の電気泳動上で別の位置に移動することがわかった。c) SDS存在下での電気泳動上の移動度が異なることがわかった。d) 酵素の精製過程で，両酵素の量比がそれ程変動しないことを示している。e) 両酵素の間には，下記に述べるようないくつかの性質の相違点が存在することが明らかとなった。これらの結果は，両酵素は各々別個に存在する酵素として天然に存在し，お互いの相互転換の可能性は極めて低いことを示している。

表 I

Specificity of brain myosin light chain kinase

Substrate	-CaM	+CaM	Relative activity
	pmole		%
Myosin light chain	0	761	100
Myelin basic protein	2	202	27
Casein	0	194	25
Arginine-rich histone	4	110	14
Protamine	1	32	4
Phosphorylase b	1	7	1
Phosvitin	1	7	1
Lysine-rich histone	0	0	0
Slightly lysine-rich histone	0	0	0
Histone	0	0	0

3) 酵素の性質：

a) 基質特異性：酵素の基質特異性を表1に示している。用いた酵素活性測定法の条件下ではミオシン軽鎖へのリン酸の取り込みがもっとも高かった。さらに，本酵素はミエリン塩基性蛋白，カゼイン，アルギニン性ヒストンのリン酸化反応を触媒した。一方，ホスホリラーゼb，ホスビチン，混合ヒストン，リジン性ヒストンはリン酸受容体として役立たなかった。プロタミンはわずかにリン酸の取り込みを認めたが，電気泳動上で蛋白へのリン酸の取り込みを調べると，プロタミンの主要蛋白へのリン酸の取り込みは認められず，混入した他の蛋白によるものと考えられた。これまでの報告によると，ミオシン軽鎖キナーゼは骨格筋，心筋，平滑筋，血小板のものが狭い基質特異性をもち，ミオシン軽鎖のみをリン酸化すると考えられてきた。Waisman[11]らは骨格筋酵素が広い基質特異性をもつと報告したが，後に，ほかのプロ

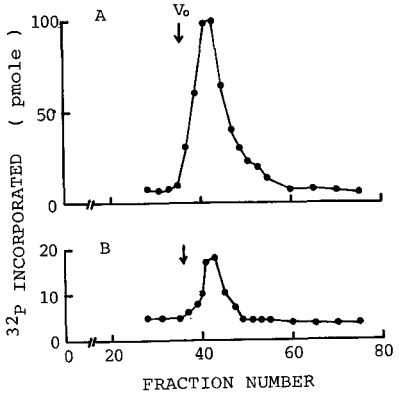


図3 Sephacryl S-300によるゲル沪過

チインキナーゼの混入によるものと考えられた[12]。本酵素はほぼ均質な状態にまで精製され，活性測定の上でも，他のプロテインキナーゼ活性の混入が否定された。このことは，ミオシン軽鎖をリン酸化する酵素がほかの蛋白も基質として利用していることを意味し，広い基質特異性を持っていることを示している。このことは図2の実験でも確められた。即ち，同じ位置に移動した単一の蛋白が3種の基質をリン酸化し，その活性のピークは完全に一致していることが確認された（図2A）。

b）Ca^{2+}，カルモデュリンに対する親和性：本酵素のCa^{2+}，カルモデュリンに対するK_a値はそれぞれ8×10^{-6} Mと48 mMであった。一方，10万酵素は1.2×10^{-6} Mと12 mMであり，両者に対するK_a値の点で約4倍高いことがわかり，親和性の低いことを示している。

c）その他の性質：Mg^{2+}に対する至適濃度は5-10 mM，ATPに対するK_m値は109 μM，ミオシン軽鎖に対するK_m値は30 μMであった。これらの値は10万酵素のそれとほぼ等しく，両者の間に差を認めなかった。

4）酵素の自動リン酸化：酵素はCa^{2+}とカルモデュリンの存在下でそれ自身リン酸化された。図2Bは活性をもつ蛋白（酵素）が同時にそれ自身リン酸化をうけていることを示している。七面鳥砂のうのミオシン軽鎖キナーゼは酵素自身のリン酸化をうけるとカルモデュリンに対する酵素の結合能の減少することがわかった[13]。一方，血小板酵素はリン酸化反応によってカルモデュリンに対する親和性の低下と比活性の減少をおこすと報告された[14]。脳の酵素のリン酸化反応によってもたらされる活性への影響については現在検索中であるが，脳の酵素が多様な基質特異性をもっていることを考慮すると，このことは広範囲な効果を示す，酵素に対する巧妙な調節機構の1つと考えられる。また，脳の酵素は他のいくつかの内在性基質のリン酸化反応を示した（福永浩司ら，未発表）このことは，脳の酵素がミオシン軽鎖のリン酸化反応のみに限らず，他の多くの蛋白質のリン酸化反応に関与し，広くCa^{2+}，カルモデュリンの作用を伝達していることを示唆している。

文献

1) 垣内史朗，福父江襄治：生体の科学 31, 367-379 (1980)
2) Miyamoto,E., Fukunaga,K., Matsui,K.,Nishime,S. and Iwasa,Y.: Biomedical Res. 2,341-346 (1981)
3) Miyamoto,E., Fukunaga,K. and Matsui,K.:Eighth International Congress of Pharmacology, Abstracts p.564 (1981)
4) Miyamoto,E., Fukunaga,K., Matsui,K. and Iwasa,Y.: J. Neurochem. in press.
5) Yamauchi,T. and Fujisawa,H.: FEBS LETT. 116, 141-144 (1980)
6) Miyamoto,E., Hideshima,Y., Teshima,Y., Yamazaki,R. and Kakiuchi,S.: J. Cyclic Nucleotide Res. 3, 85-94 (1977)
7) Klee, C.B. and Krinks,M.H.: Biochemistry 17, 120-126 (1978)
8) Miyamoto,E. and Kakiuchi,S.: J. Biol. Chem. 249, 2769-2777 (1974)
9) Davis,B.J.: Ann. N. Y. Acad. Sci. 121, 404-427
10) Laemmli,U.K.: Nature 227, 680-685 (1970)
11) Waisman,D.M., Singh,T.J. and Wang,J.H.: J. Biol. Chem. 253,3387-3390 (1978)
12) Walsh,M.P., Vallet,B., Autric,F. and Demaille,J.G.:J. Biol. Chem. 254, 12136-12144 (1979)
13) Conti,M.A. and Adelstein,R.S.:J. Biol. Chem. 256, 3178-3182 (1981)
14) Hathaway,D.R., Eaton,C.R. and Adelstein,R.S.: Nature 291, 252-254 (1981)

64 ラット脳のカルモデュリン結合性蛋白質の検索

阿部輝雄・西須英雄
(新大・脳研・神経化学)

〔要　約〕

^{125}Iで標識したカルモジュリン(CaM)を用いて，ラット脳のCaM結合性蛋白質をSDS電気泳動後のゲル上で同定した。

(1) ^{125}Iで標識したCaMはOrnstein & Davis系の電気泳動およびSDS電気泳動でnative CaMと一致する一本のバンドを示し，Phosphodiesteraseの活性化に関しては、native CaMと全く差がなかった。

(2)可溶性分画、および不溶性分画のグアニジン抽出物をフルフェナジン－セファロースカラムにかけて共存するCaMを除いた後、CaM－セファロースに結合した物質をEGTAで溶出することによりCaM結合性分画を得た。

(3)可溶性分画では、Mr 220K，71K，60K，59K，49Kの成分が強いCaM結合能を示した。この他，156K，50K，44K，42Kの蛋白質もCaM結合性蛋白質と同定された。これらの蛋白質へのCaMの結合はCa^{2+}の除去，フルフェナジンの存在，あるいは多量の非標識CaMの存在によって完全に抑制された。

(4)不溶性分画では，Mr 220K，60K，49K，30Kが主なCaM結合活性を示す蛋白質であった。このうち30Kの成分はCa^{2+}を除去しても全く同様なCaM結合能を示した。

Key words : Calmodulin-binding protein, Rat brain, Autoradiography

---

垣内ら[5]およびCheungら[3]によって発見されたカルモジュリン（以下CaM）は，細胞内のCa受容体の一つと考えられ、Ca^{2+}依存性に多くの酵素，蛋白質に結合し，その活性を制御している。脳は，他の組織に比較して，CaMおよびCaM結合性蛋白質に富んでおり、神経系の機能との関連が注目されている。脳に存在するCaM結合性蛋白質については，既に幾つかの報告があるが、まだその全容は明らかでない。今回、我々は、ラット脳蛋白質をSDS電気泳動で展開したゲルに，^{125}Iで標識したCaMを結合させ，オートラジオグラフィーを行うことにより、CaM結合性蛋白質を同定した。

〔実験方法〕

可溶性分画　ラット全脳を10倍容の10mM Hepes-NaOH-2mM EGTA-0.1mM Dithiothreitol(DTT), pH 7.5中でポリトロンによりホモジナイズした後，1/10倍容の5M NaClを含む上記緩衝液を加えて再度ホモジナイズしたものを10^5gで1.5時間遠心して得られた上清を用いた。

不溶性分画　上記のホモジネートを1000gで10分遠心して得られた上清を10^5g，1.5時間遠心し，沈渣を10倍容の0.5M NaClを含む上記緩衝液で洗ったものを用いた。CaM結合性蛋白を抽出するため，祖父江ら[13]に従い，この沈渣を10mM Hepes-NaOH-0.2M NaCl-2mM EGTA-2mM DTT-6M Guanidine-HCl，pH 7.5で0-4°C，2時間処理（蛋白濃度5mg/ml）し，10^5gで1.5時間遠心して得られた上清にLubrol PX（終濃度0.2%）を加え，緩衝液A（20mM Tris-HCl-0.2M NaCl-0.3mM $CaCl_2$-0.1mM DTT-0.2% Lubrol PX, pH 7.5）に一夜透析し，10^5g，1.5時間遠心後の上清を以下に示すアフィニティークロマトグラフィーにかけた。

フルフェナジン・カラム　CaM－セファロースによってCaM結合性蛋白質を得る前

に，同時に存在するCaMをあらかじめ除くために、可溶性分画および不溶性分画の抽出液をそれぞれフルフェナジン－セファロース４Ｂ（Charbonneauらの方法[2]に従って調製，以下FP-Sepと略記）にかける。可溶性分画の場合は，カラム（2.2×8cm）にのせる前に終濃度4mMの$CaCl_2$を加えた。カラムを十分量の緩衝液Ⅰ（20mM Tris-HCl-0.5M NaCl-0.3mM $CaCl_2$ 0.1mM DTT, pH7.5）で洗った後，緩衝液Ⅱ（20mM Tris-HCl-0.5M NaCl-4mM EGTA-0.1mM DTT, pH 7.5）で溶出した。不溶性分画抽出液は透析後，そのままFP-Sepにかけ、緩衝液Ａでよく洗い，緩衝液Ｂ（20mM THS-HCl-0.2M NaCl-4mM EGTA-0.1mM DTT-0.2% Lubrol PX, pH7.5）で溶出した。

CaM－セファロース・カラム　可溶性分画，不溶性分画の両者ともFP-Sepの素通り分画（図2,4）をそのままCaM－セファロース４Ｂ（以下CaM-Sep）にかける。カラム（2.2×4.5cm）の溶出はそれぞれのFP-Sepカラムクロマトの場合と全く同様である。

CaMの^{125}Iによる標識　牛脳よりWattersonら[14]の方法に従って精製したCaMをGrafら[4]に従って放射性ヨード化した。ヨード化は，0.1mgのCaM，2mCiの$Na^{125}I$を用いて、30°Cで10分行い、反応混合物を冷却後直ちにセファクリルS-300カラムにかけ，CaMを含むピークをプールした。Specific activityは約2.5×10^6 cpm/μg CaMであった。

ゲル上での^{125}I-CaMの結合　Carlinら[1]の方法によって行った。Laemmliの方法[8]でSDSゲル電気泳動を行った後，ゲルを各Laneごとに切断し、25%イソプロパノール－10%酢酸で一夜固定するとともにSDSを除き，10%酢酸で２時間洗った後，50mM Tris-HCl-0.2M NaCl pH7.6で２時間洗う。各Laneを50mM Tris-HCl-0.2M NaCl-1mM $CaCl_2$, pH 7.5あるいは50mM THS-HCl 0.2M NaCl-2mM EGTAで８時間洗う（液を最低５回は交換）。その後BSA（1mg/ml）を加えた上記の緩衝液中に２時間保った。各Laneを中2cmに仕切ったアクリル製の容器に入れ，上記緩衝液に^{125}I-CaM（0.2～0.4μg/ml）を含んだ液中で14時間振盪する。各Laneを上記緩衝液で一夜洗ってから，Coomassie brilliant blue（CBB）で染色後、脱色する。なおフルフェナジン（FP）の効果を見る場合は、$CaCl_2$を含む上記緩衝液に0.1mMのFPを加えた。また洗浄の際も最低５時間はFPを含んだ緩衝液で洗った。脱色後のゲルは口紙上で乾燥させ、LKB Ultrofilm（^3H）を重ね合わせ－80°Cに0.5～２日間保った後，現像した。

〔結果と考察〕

^{125}Iで標識したCaM　^{125}I-CaMをOrnstein-Davisの系でEGTA存在下で電気泳動すると図１に示す様に，95%以上の放射能がnative CaMと一致して移動した。また図示してないが，12.5%ゲルでSDS電気泳動を行うと，放射能はnative CaMと完全に一致した位置に存在していた。ヨード化によって、CaMの活性が変化したか否かを知るためにCaMを除いたPhosphodiesterase（PDE，牛脳より調製）のCaMによる活性化を調べた。その結果，^{125}I-CaMはnative CaMと全く変らない活性を有していることがわかった。以上のことから，ここで得られた^{125}I-CaMは，CaMの研究の上で，きわめて有用であると考えられる。

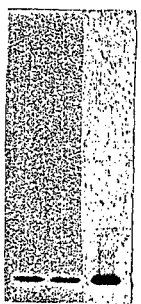


図１ ^{125}I-CaMの電気泳動．A: native CaMのCBB染色，B: native CaM＋^{125}I-CaMのCBB染色，C: Bのオートラジオグラフィー。

CaM結合性蛋白質

(1)可溶性分画：可溶性分画をCa^{2+}存在下でFP-Sepカラムにかけて CaMを除く（図2a）。この素通り分画（FT1）をカラムにかけた試料と、SDS 電気泳動で比較すると，CaMに相当する位置のバンドの濃さ

は，もとの1/3以下に減少しているが、完全には除去されない。しかし，FIに存在するCaMの活性（PDEの活性化）は，もとの1/100以下であるので，FIに存在するCaMの位置のバンドは、失活したCaM，あるいは別の蛋白質によるものと考えられる。

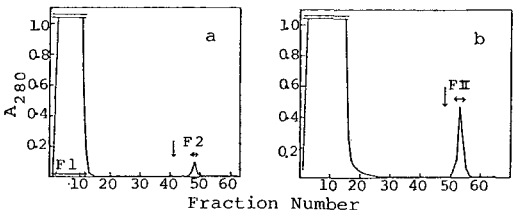


図2　可溶性分画のCaM結合性蛋白質の調製

a: FP-Sepカラム，b:aのF1のCaM-Sepカラム．a,bとも縦の矢印（EGTAでの溶出）以前7ml，以後3mlのフラクション。

FP-Sepの素通り分画をCaM-SePカラムにかけ，保持された部分をEGTAで溶出させて，CaM結合性蛋白質を得た（図2bのFII）。図3Aに示される様に、FIIは多種類の蛋白質を含む。我々が既に報告した電気泳動パターン[9]とやや差異が見られるが、これは，CaM結合性蛋白質の抽出条件，アフィニティクロマトグラフィー条件の違いによるものと思われる。FIIではMr 220K，55Kおよび49Kが主要な成分である。図3Bは3Aのゲルに^{125}I-CaMをかけたものであり、幾つかのCaM結合性蛋白質が同定される。Bで見られる^{125}Iの結合は，Ca^{2+}が存在しない場合（C），Ca^{2+}存在下でのFPの添加（D）および多量の非標識CaMの存在下（E）では完全に抑制される。これらは本実験条件下での^{125}I-CaMのゲル内蛋白質への結合の特異性を示すものである。表1に図3の主要なCaM結合性蛋白質を掲げた。図3および表1を既に報告されている CaM結合性蛋白質と比較して以下に論じたい。

Mr 220Kは強いCaM結合性を示すが，その実態は全く不明である。156Kも同様である，71Kは Wang らによって発見された耐熱性の蛋白質（68K[10]）である可能性がある。60K は calcineurin A（60~61K[6,11]），59K はPDE（58K[12]）に相当する可能性が強い。55Kは以前の報告でも，SDS電気泳動でtubulinと一致した位置にあり，tubulinはCaMを結合することが知られている[7]ので，おそらく，tubulinであろうと考えられるが，現在2次元電気泳動で検討中である。しかし55Kのバンドはほとんどの CaMの結合を示さない。これはtubulinがSDSにより不可逆的に失活して，SDSを除去してもCaM結合能を回復しないためかも知れない。49Kの蛋白質は、我々が以前に報告した50Kの蛋白質[9]と同一であるが，Mrは49Kがより正確であることがわかった。Mrが44K以下にも幾つかのCaM結合性蛋白質が存在するが、その性質，本態等は不明である。

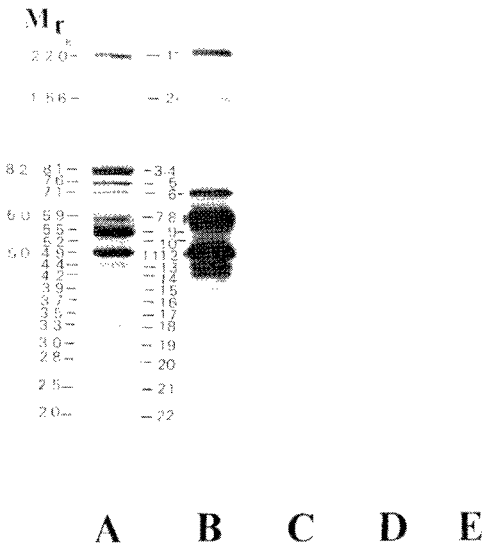


図3　可溶性分画のCaM結合性蛋白質の同定

A: CaM結合性蛋白質分画（図2,FII）のCBB染色，B~E: FIIの^{125}I-CaMのオートラジオグラフィー。B:Ca^{2+}(+)，C: EGTA(+),Ca^{2+}(−)。D: FP(+),Ca^{2+}(+)。E:非標識CaM 100μg/ml添加，Ca^{2+}(+)

(2)不溶性分画：不溶性分画の抽出物のFP-Sepカラムでは，図4aに示されるEGTAによ

って溶出される部分には、SDS電気泳動で、バンドが検出されなかった。また、素通り分画(FI)をもとの試料と、SDS電気泳動で比較すると、CaMの位置に存在するきわめてうすいバンドが、いくらか減少しているのが認められた。不溶性分画のCaM結合性分画(図4FII)は図5Aに示す様に、多数のバンドを含む。可溶性分画のそれ(図3A)と比較すると、特に目立って多量の成分がなく、より多くのバンドが存在するのが特徴である。図5Bは5Aのゲルに^{125}I-CaMをかけたものであるが、M_r 220K、60K、49K 30Kが主要なバンドである。このうち、30KのバンドはCa^{2+}が存在しなくても全く同様な^{125}I-CaM結合能を示す。33Kの成分についても同じである。このことは、33Kおよび30Kの両蛋白質がCa^{2+}に依存せずに特異的にCaMを結合するか、あるいは非特異的に結合するかのいずれかであることを示すが、これらの結合がFPによって抑えられることは前者を支持するように思われる。220K, 60K, 49Kはともに可溶性分画にも存在するが、両者が同一か否かは不明である。なお、不溶性分画については、現在、CaM結合性蛋白の抽出について定量的に検討中である。

本実験では、^{125}I-CaMを用いて、簡便な方法でCaM結合性蛋白質を同定することができた。今後この方法は、全ての組織に適用できるものと思われる。

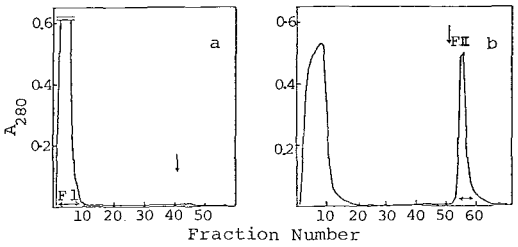


図4 不溶性分画のCaM結合性蛋白質の調製
a: FR-Sepカラム, b: aのFIのCaM-Sepカラム
カラムの条件は図2と同様.

表1 可溶性分画のCaM結合性蛋白質*

Band No.	M_r	CBB stain	^{125}I-CaM bound
1	220k	++	+++
2	156	+	++
3	82	++	-
4	81	++	-
5	76	++	+
6	71	+	+++
7	60	+	+++
8	59	+	+++
9	55	+++	±
10	52	±	+
11	50	±	++
12	49	+++	+++
13	44	+	++
14	42	±	++
15	39	-	+
16	37	-	+
17	35	+	+
18	33	+	+
19	30	+	-
20	28	-	+
21	25	±	-
22	20	+	-

* 図3を参照.

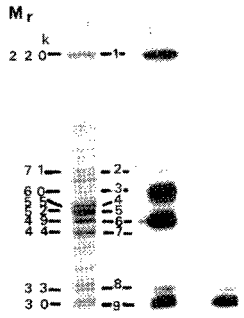




図5 不溶性分画のCaM結合性蛋白質の同定

A: CaM結合性蛋白質分画(図4, FII)のCBB染色. B~D: FIIの^{125}I-CaMのオートラジオグラフィー. B: Ca^{2+}(+). C: EGTA(+), Ca^{2+}(-). D: FP(+), Ca^{2+}(+).

[文献]

1) Carlin, R.K. et al.(1980) Ann. New York Acad. Sci. 356, 73-74. 2) Charbonneau, H. & Cormier, M.J. (1979) Biochem. Biophys. Res. Commun. 90, 1039-1047. 3) Cheung, W.Y. (1970) Biochem. Biophys. Res. Commun. 38, 535-538. 4) Graf, E. et al. (1980) Arch. Biochem. Biophys. 203, 719-726. 5) Kakiuchi, S. et al. (1970) Proc. Jpn. Acad. 46, 587-592. 6) Klee, C.B. et al. (1979) Proc. Nat. Acad. Sci. USA 76, 6270-6273. 7) Kumagai, H. & Nishida, E. (1979) J. Biochem. 85, 1267-1274. 8) Laemmli, U.K. (1970) Nature 227, 680-685. 9) Maékawa, S. & Abe, T. (1980) Biochem. Biophys. Res. Commun. 97, 621-627. 10) Sharma, R.K. et al. (1978) Can. J. Biochem. 56, 598-604. 11) Sharma, R.K. et al. (1979) J. Biol. Chem. 254, 4276-4282. 12) Sharma, R.K. et al. (1980) J. Biol. Chem. 255, 5916-5923. 13) 祖父江鑑治 他 (1979) 神経化学 18, 144-147. 14) Watterson, D.M. et al. (1976) J. Biol. Chem. 251, 4501-4513.

65 向精神薬と calmodulin 及び phospholipid の相互作用

菅野仁喜・佐々木泰治(旭化成・医薬品・生化)
日高弘義(三重大・医・薬理)

〔要　約〕

calmodulin-dependent cyclic nucleotide phosphodiesterase (PDE) を用いて、phospholipid − lysophosphatidylcholine (LPC)、phosphatidylinositol (PI)、及び lysophosphatidylserine (LPS) − と向精神薬の相互作用を検討した。調べたすべての向精神薬は、calmodulin 及び phospholipid で活性化した PDE (calmodulin- 及び phospholipid-PDE) を阻害したが、PDE の basal 活性は阻害しなかった。速度論的解析により、fluphenazine は、calmodulin 及び phospholipid に対する拮抗的阻害剤であることが確認された。

fluphenazine などの抗精神病剤による、phospholipid-PDE の阻害作用の強さは、phospholipid の種類により異なり、LPC- > PI- > LPS-PDE の順であった。一方、desipramine などの抗うつ剤では、LPC- 及び PI-PDE に対する阻害作用の強さは同程度であった。以上の結果は、抗精神病剤と抗うつ剤が、phospholipid との相互作用に関して異なった特徴を持っていることを示唆している。

Key words : psychotropic drug / phospholipid / calmodulin

〔緒言〕　抗精神病剤が、Ca^{2+}依存性で calmodulin に結合することはよく知られている(2)。しかし、近年、phospholipid が、膜結合性酵素の活性調節において重要な役割を演じていることが認識されてくるに伴い、向精神薬と phospholipid の相互作用が注目され始めている(3)。

そこで、本報告では、calmodulin-dependent cyclic nucleotide phosphodiesterase (PDE) を用い、向精神薬と phospholipid の相互作用を検討した。

〔実験方法〕　PDE は、Teo ら(9)の方法によりブタ大脳から部分精製した。calmodulin は、Yazawa and Yagi (12) の方法によりブタ大脳から調製した。PDE 活性は、次の方法により測定した(7, 10)。反応は、80 mM Tris-HCl (pH 7.5), 0.5 mM $CaCl_2$ 又は [ethylenebis(oxoethylenenitrilo)] tetraacetic acid (EGTA), 10μM cAMP を含む 0.5 ml の反応液中で、30℃ 15 分間行なわれた。100℃ 2分処理により反応を停止させ、生成した 5'-AMP は、myokinase-pyruvate kinase 反応系により ATP に変換した。ATP は、luciferin-luciferase 系を用いて、ATP photometer により定量した。

〔実験結果〕　calmodulin 及び種々の phospholipid が、PDE 活性に及ぼす効果を調べた(Fig. 1)。PDE 活性は、EGTA-phospholipid 又は Ca^{2+}-calmodulin を含む反応系で、10μM cAMP を基質として測定した。Wolff and Brostrom (11) の結果と一致して、lysophosphatidylcholine (LPC) と phosphatidylinositol (PI) は、PDE の Ca^{2+}-independent activator として有効であった。一方、phosphatidylcholine (PC)、phosphatidylserine (PS)、phosphatidylethanolamine (PE). 及び

lysophosphatidylethanolamine (LPE) は無効であった。それに加えて、我々は、lysophosphatidylserine (LPS) が、PDE の Ca^{2+}-independent activator として有効であることを見出した。Fig.1 は、PDE を最大活性化するのに必要な activator の最小濃度が、0.32 (calmodulin), 18 (LPC), 37 (LPS), 43 (PI) μg/tube であることを示している。

この最小濃度の各activator存在下で、6種類の向精神薬について、PDE 活性を 50% 阻害する薬剤濃度 (I_{50}値) を求めた (Table 1)。調べたすべての向精神薬は、PDE の basal 活性をほとんど阻害しなかったが、calmodulin 又は phospholipid で活性化した PDE (calmodulin- 又は phospholipid-PDE) を阻害した。Fig.2 は、fluphenazine による calmodulin- 及び LPC-PDE 活性の阻害の Lineweaver-Burk plot である。この結果は、fluphenazine が、calmodulin 及び LPC に対する拮抗的阻害剤であることを意味している。同様に、fluphenazine は、PI 及び LPS に対しても拮抗的であった (data not shown)。これに加えて、PDE の活性化をほとんど完全に阻害する薬剤濃度で、basal 活性は阻害されない (Table 1)。以上の結果は、向精神薬は、activator に直接結合して、PDE の活性化を阻害していることを示唆している。従って、Table 1 の I_{50}値は、向精神薬と activator の相互作用を反映していると考えられる。

Figs. 1, 2, 及び PI, LPS に対する同様の実験から、各 activator に対する fluphenazine の K_i 値を求めると、11μM (calmodulin)、10μM (LPC)、28μM (PI)、72μM (LPS) であった。もし、向精神薬による PDE 活性の阻害が、activator への結合に基づくならば、この結果は、fluphenazine の LPC に対する affinity は、calmodulin に対する affinity と同程度であることを示唆している。

〔考察〕 Levin and Weiss (2) は、抗精神病剤が、Ca^{2+}依存性で calmodulin に強く結合することを報告している。我々は、向精神薬が、calmodulin ばかりでなく、phospholipid とも相互作用し、しかも、phospholipid に対する affinity がかなり高いことを見出した。fluphenazine の LPC に対する affinity は、calmodulin に対する affinity と同程度であった。calmodulin は、Ca^{2+}と結合すると conformation 変化を起こし、疎水性領域が露出することが報告されている (1, 8)。従って、親脂質性を有する向精神薬が、この疎水性領域に結合し、calmodulin が PDE を活性化できないようにすることは、充分考えられる (1, 5)。

調べた phospholipid のうち、PDE は LPC, PI, LPS によってしか活性化されなかったので、向精神薬が、PC, PS などの他の phospholipid と相互作用するかどうかは明らかではない。しかし、薬剤と activator 間の相互作用における疎水性の相互作用の重要性を考慮に入れると、向精神薬が他の phospholipid に対しても高い affinity を持つことは考えられる。

抗精神病剤と抗うつ剤は、phospholipid との相互作用において異なった特徴を持っているように思える。抗精神病剤は、calmodulin- 及び LPC-PDE に対して、抗うつ剤よりも高い阻害能を示した (Table 1)。抗精神病剤の各phospholipid に対する affinity は、LPC > PI > LPS の順であった。一方、抗うつ剤の LPC に対する affinity は、PI に対する affinity と同程度であった。

最近、amitriptyline を慢性投与すると、5-HT_2 及び β-adrenergic receptor へのリガンド結合が、薬剤量及び時間依存性で減少すること (6)、また、抗精神病剤は、dopamine の D_1 及び D_2 receptor への結合を非選択的に阻害すること (4) が報告されている。こ

これらの薬理的効果は、向精神薬が膜のphospholipidと相互作用して、膜機能に影響を及ぼす能力と関係しているのかも知れない。

〔文献〕

1. LaPorte,D.C., Wierman,B.M., and Storm,D.R. (1980) Biochemistry 19, 3814-3819
2. Levin,R.M., and Weiss,B. (1976) Mol. Pharmacol. 12, 581-589
3. Mori,T., Takai,Y., Minakuchi,R., Yu,B., and Nishizuka,Y. (1980) J.Biol.Chem. 255, 8378-8380
4. Nishikori,K., Noshiro,O., Sano,K., and Maeno,H. (1980) J.Biol.Chem. 255, 10909-10915
5. Norman,J.A., Drummond,A.H., and Moser,P. (1979) Mol.Pharmacol. 16, 1089-1094
6. Peroutka,S.J., and Snyder,S.H. (1980) J.Pharmacol.Exp.Ther. 215, 582-587
7. Sasaki,Y., Kodaira,R., Nozawa,R., and Yokota,T. (1978) Biochem.Biophys.Res.Commun. 84, 277-284
8. Tanaka,T., and Hidaka,H. (1980) J.Biol.Chem. 255, 11078-11080
9. Teo,T.S., Wang,T.H., and Wang,J.H. (1973) J.Biol.Chem. 248, 585-595
10. Weiss,B., Lehne,R., and Strada,S. (1972) Anal.Biochem. 45, 222-235
11. Wolff,D.J., and Brostrom,C.O. (1976) Arch.Biochem.Biophys. 173, 720-731
12. Yazawa,M., and Yagi,K. (1977) J.Biochem.(Tokyo) 82, 287-289

Table 1. Effects of psychotropic drugs on activated and unactivated phosphodiesterase

Drug	I_{50} (μM)				
	Unactivated	Calmodulin	Phospholipid		
			LPC	LPS	PI
Trifluoperazine	> 200	7±1	20±5	110	49±9
Fluphenazine	> 200	11±0	17±1	132	67±1
Chlorprothixene	> 200	17±0	17±3	114	45±5
Chlorpromazine	> 200	24±0	24±5	121±12	64±1
Amitriptyline	> 200	90±13	73±16	> 200	103±14
Desipramine	> 200	107±4	82±18	166	81±1

Phosphodiesterase activity was measured as described in the legend to Figs.1 and 2. The I_{50}(unactivated) values were estimated as the concentration of drug required to induce a 50% reduction of phosphodiesterase activity in the presence of 0.5 mM EGTA. The I_{50}(activated) values were calculated as the concentration necessary to produce 50% inhibition of activator-stimulated phosphodiesterase in the presence of 0.5 mM Ca^{2+} (calmodulin) or 0.5 mM EGTA (phospholipid). LPC, lysophosphatidylcholine; LPS, lysophosphatidylserine; PI, phosphatidylinositol. Each I_{50} value except for lysophosphatidylserine represents the mean ± S.E.R. of duplicate determinations of activity.

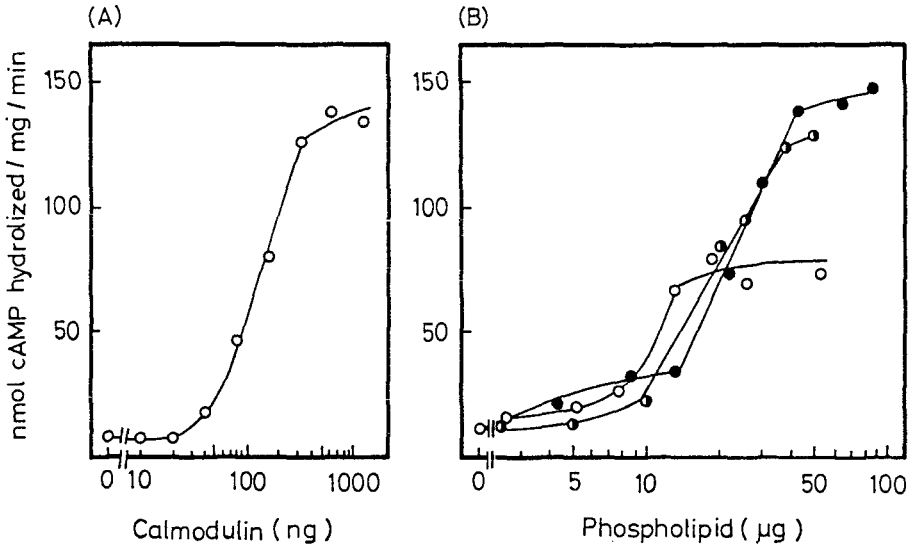


Fig. 1. Calmodulin and phospholipid concentration dependence of phosphodiesterase activation. Phosphodiesterase activity was assayed in 0.5 ml of standard reaction mixture containing 80 mM Tris-HCl (pH 7.5), 10 μM cAMP, 0.5 mM $CaCl_2$ (A) or 0.5 mM EGTA (B), and activator as indicated. (A), Calmodulin concentration dependence of phosphodiesterase activation. (B), Phospholipid concentration dependence of phosphodiesterase activation. ○ , lysophosphatidylcholine; ◑ , lysophosphatidylserine; ● , phosphatidylinositol.

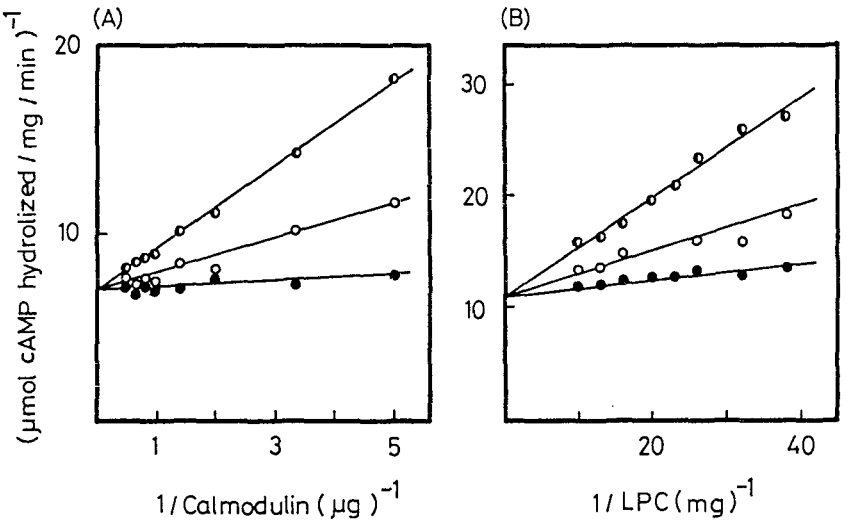


Fig. 2. Double reciprocal plots of the calmodulin- and lysophosphatidylcholine-dependent phosphodiesterase activation in the presence of fluphenazine. Phosphodiesterase activity was measured in a standard reaction mixture containing the indicated concentrations of added activator in the absence (A and B, ●) and presence of 10 μM (A and B, ○), 15 μM (A, ◐), and 30 μM (B, ◐) fluphenazine. LPC, lysophosphatidylcholine.

66 サンゴイソギンチャク毒素とザリガニ神経の結合

藤田省三(生理研・生体膜)・藁科彬(新大・医・I生理)
佐武明(同・脳研・神経化学)

〔要　約〕

サンゴイソギンチャク毒素(Parasicyonis toxin, PaTX)は神経興奮膜のNaチャンネルに作用することが知られている。今回ザリガニ歩脚神経に対する[3H]Propionyl-PaTXの結合の性質を調べ，次のような結果を得た。

1). [3H]Propionyl-PaTXの結合は25℃・1時間の反応でプラトーに達したが，4℃ではほとんど結合がおこらなかった。

2). 1時間にわたり神経を洗浄すると，非特異的結合は大幅に減少したが，特異的結合はほとんど減少せず，かなり解離しにくいことが示された。

3). [3H]Propionyl-PaTXのK_Dは310nM，最大結合量は105 pmol/g wet nerveで，従来報告された他の毒素による値に近い結果が得られた。

4). 他の毒素による結合の阻害を調べた。PaTXの$K_{0.5}$は約200nMでPropionyl-PaTXより低濃度で結合阻害をおこした。Anemonia sulcata toxin II，サソリ毒素の$K_{0.5}$はそれぞれ約30nM，約80nMであった。毒性の膜電位依存性が少ない毒素ほど，今回得られた$K_{0.5}$値は小さかった。

Key words : sea anemone toxin, crustacean nerve, binding characterization

---

Naチャンネルの研究に対して，近年サソリ毒素となりんでイソギンチャク毒素が使用されるようになって来た。その作用はいずれもNaチャンネル不活性化の抑制にある点で共通している。最もよく使用されているイソギンチャク毒素，ATX-IIはサソリ毒素と同様に哺乳類にも作用するが，活動電位に対する作用や膜への結合の膜電位依存性がサソリ毒素に較べ低いことが報告されている(1,2,3)。一方PaTXの作用は大きく膜電位に依存し，甲殻類に特に有効に作用するなど，ATX-IIとはかなり異なる性質を持つように思われる。我々は昨年の本学会において，サンゴイソギンチャクから精製した毒素，Parasicyonis toxin (PaTX)のザリガニ神経に対する作用について報告し，PaTXが神経興奮膜のNaチャンネル不活性化過程を抑えること，^{3}H化したPaTXのザリガニ神経に対する結合が神経の脱分極によっておさえられることを示した(4)。今回^{3}Hラベルした PaTXの結合様式についてさらに検討を加えたので報告したい。

〔方　法〕

[3H]Propionyl-PaTXの合成　PaTXの精製は昨年の抄録集(4)に示した方法に従った。1mCiのN-Succinimidyl[2,3-^{3}H]propionate (Radiochemical Centre, England) 26n molを，PaTX 260n molとNa-borate buffer (10mM, pH 8.5)中で室温・2時間反応させ，CM-Sephadex C-25カラム(0.4×20cm)にかけ，20mM K-phosphate buffer, 0～0.6 M KCl linear gradient (pH 7.7)で溶出した。得られた画分を再びCM-Sephadexカラムにかけ，[3H]Propionyl-PaTX (^{3}H-pr-PaTX)標品とし，1mg/mlの牛血清アルブミン

を加え4°Cで保存した。

結合実験　〔結果と考察〕に示す実験の結果，標準的な結合実験は以下の様に行なった。ザリガニ第一歩脚から神経線維を取り，各々を氷冷したCh液（choline-Cl 207 mM, KCl 5.4 mM, $CaCl_2$ 13.5 mM, $MgCl_2$ 5.3 mM, Tris-Cl 10 mM, pH 7.4）で10～30分洗い，結合反応液（5～10 nM ^{3}H-pr-PaTX, 1 mg/ml 牛血清アルブミンを含むCh液）100 μl 中に約し，25°C・1時間反応させた。その後，神経をナイロンメッシュをはったwell内に約し，氷冷したCh液 150 μl で5分間ずつ12回洗った。その後0.1 N NaOH液で溶解して一部を放射能測定に，一部をLowryらの方法によるタンパク定量に供した。図中の各点は6回の測定の平均を示している。結果はタンパク質あたりの比結合量で示した。

その他　サソリ毒素はSigmaより購入した粗毒（*Leiurus quinquestriatus*）から精製して(5)使用した。*Anemonia sulcata* toxin II (ATX-II) はFerringより購入した。

［結果と考察］

昨年の口演で示したように(4)，^{3}H-pr-PaTXは神経組織では高親和性の結合を示すが，神経膜画分においては低親和性の結合しか示さなかった。したがって以下の実験には神経組織のみを使用している。予備実験の結果，総結合量に占める低親和性結合及び非特異的結合（以後，非特異的結合と略）の割合はかなり高く，そのままでは高親和性結合（以後，特異的結合と略）を有意に検出することは困難である。しかし先に報告したように(4)，電気生理学的実験によってPaTXがquasi-irreversibleに作用していることが示唆され，一方膜画分での結果から非特異的結合は非常にreversibleであることがわかっていたので，^{3}H-pr-PaTXと反応させた神経をCh液中で洗えば非特異的結合だけが減少することが予想された。

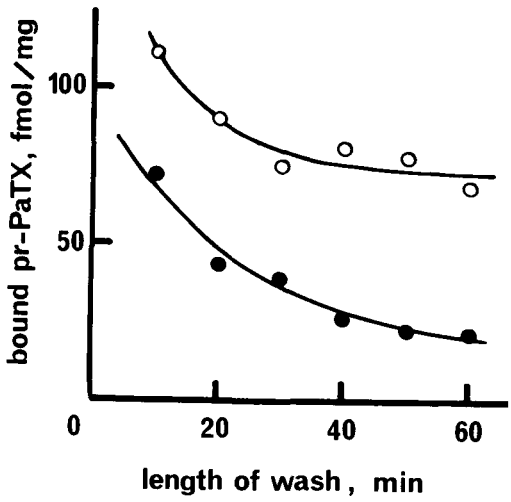


図1．洗浄による非特異的結合の減少。1 μM PaTX存在下（●），非存在下（○）で結合後，5分毎に液を交換し，洗浄した。

図1は氷冷したCh液で5分間ずつ繰りかえし洗った時の総結合量および非特異的結合（1 μM PaTX存在下）の減少の様子を示している。非特異的結合は洗浄によって急速に減少し40分以降ほぼ一定値となっている。また総結合量は非特異的結合と並行して減少した。特異的結合は両者の差で表わされるが，これは洗浄によってほとんど変化していないことが明らかである。このように，5分間×12回のCh液交換で充分に非特異的結合は除去される。

図2は結合反応の際の反応時間および温度の影響をみたものである。25°Cで反応させた場合，総結合量は1時間でプラトーに達し，非特異的結合は低いレベルに

あった(図2A)。 4°C において反応させると非特異的結合は25°Cとほぼ等しい値を示すが，総結合量は25°Cの1/4以下であり，2時間インキュベーションを行なっても増加の傾向はみられなかった(図2B)。 以後の実験では25°C・60分反応後，5分×12回Ch液で洗浄し，神経に残っている ^{3}H-pr-PaTX量を測定した。個々の神経は重量にバラツキがあるので Lowry 法によって各々のタンパク量を測定し，放射能はタンパク量に対する比活性で示した。

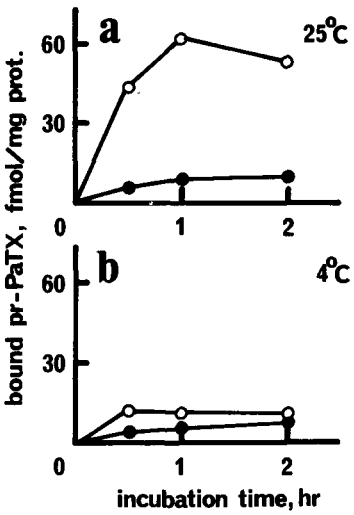


図2. 結合に対する温度と反応時間の影響
●: 10nM PaTX 存在下.
○: PaTX 非存在下.

次に ^{3}H-pr-PaTX の結合飽和実験を行なった(図3a)。 非特異的結合は ^{3}H-pr-PaTX 濃度の増加に伴って直線的に増加し，総結合量は0.4μM前後で飽和状態となっている。 両者の差である特異的結合量を Scatchard プロットすると図3bのような結果となった。 測定点が少ないが，ほぼ直線状と考えられ，解離定数(K_D)および最大結合量(B_{max})を求めると各々 310nM，3.4pmol/mg prot. (105pmol/g wet nerve) となった。 また Hill のプロットでは $n_H = 1.02$ となり，結合に co-operativity のないことを示している。 $K_D = 310$nM という値は同じイソギンチャク由来の ATX-II のラット脳シナプトソームに対する値(240nM)にほぼ近い(2)。 B_{max} は 105 pmol/g tissue であったが，Ritchie S (6)がイセエビ歩脚神経のサキシトキシン結合

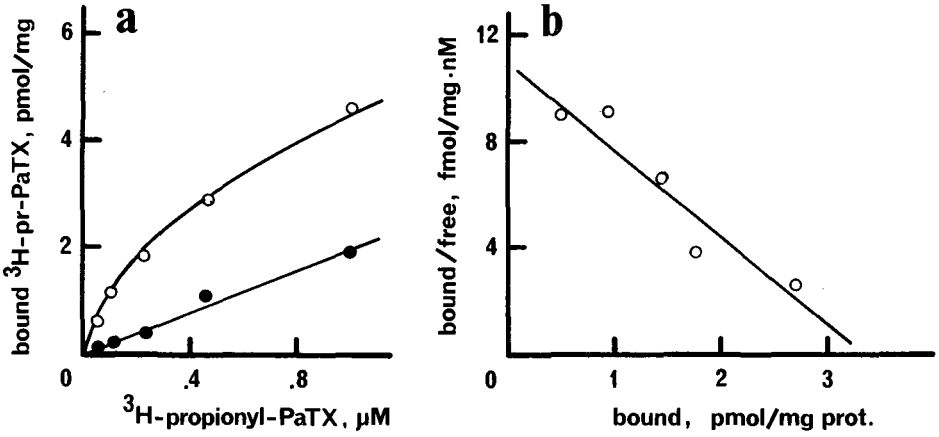


図3. ザリガニ歩脚神経に対する ^{3}H-pr-PaTX結合量の濃度依存性
a: 10μM PaTX 存在(●)，非存在(○)下における結合量の濃度依存性
b: aの特異的結合量を Scatchard プロットしたもの

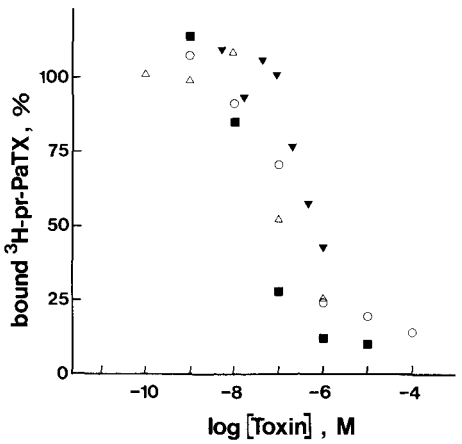


図4. 種々の毒素による結合阻害の濃度依存性
○: PaTX , ▼: pr-PaTX,
△: サソリ毒素 ■: ATX-Ⅱ.

実験で示した値(94 pmol/g tissue), Hucho S (7)のザリガニ神経に対するATX-Iの値(40 pmol/g tissue)と類似の結果が得られた。

Propionyl-PaTXはPaTXに近い毒性を保持しているが(4,8), いくぶん弱毒化していることは否めない。したがって^{3}H-pr-PaTXで算定したK_DはPaTXより大きいことが予想される。そこでPaTXによる結合阻害を非放射性pr-PaTXのそれと比較した(図4 ○,▼)。PaTXはpr-PaTX ($k_{0.5}$ 約500nM)より低濃度で阻害を示し, $k_{0.5}$は約200nMであった。このことはPaTXのK_Dが310nMよりかなり低い範囲にあることを示している。さらにサソリ毒素とATX-Ⅱによる阻害を調べると, $k_{0.5}$は各々約80 nM, 約30 nMであった。従来報告されたサソリ毒素のK_Dは0.2～8 nM (5, 9～11)で今回得られた$k_{0.5}$に較べかなり低い値となっている。(上に引用した値はvertebrateあるいはそれ由来の培養細胞での結果である。) この原因として考えられるのは, ①甲殻類においてはサソリ毒素のK_Dが大きい, ②神経が脱分極しK_Dが大きくなった, ③サソリ毒素の高親和性結合は別の部位にある, などである。ところでイソギンチャク毒素は一般に甲殻類に対する作用が強く(12, 13), 甲殻類のNaチャンネルはやや特殊であることが予想される。そうであればサソリ毒素が甲殻類に効きたくいということも可能性がある。この点については今後検討する必要がある。

PaTXのザリガニ神経に対する結合は膜電位の減少に伴って低下する(8)。同様の現象はATX-Ⅱ, サソリ毒についても生理学的に調べられ(3), 三者を比較すると膜電位に対する感受性はPaTX＞サソリ毒＞ATX-Ⅱであった。一方今回得られた$k_{0.5}$の値は, PaTX＞サソリ毒素＞ATX-Ⅱであった。このことは, PaTX, サソリ毒素はもっと低いK_Dをもつが, 神経標本がやや脱分極したために、みかけ上の$k_{0.5}$の増大をおこしていることを示しているのかも知れない。

〔文 献〕

(1) Catterall,W.A. & Beress,L.(1978) J.Biol.Chem.,253,7393-7396
(2) Vincent,J-P.,Balerna,M.,Barhanin,J.,Fosset,M. & Lazdunski,M.(1980) Proc.Natl.Acad.Sci.USA,77,1646-1650
(3) Warashina,A.,Fujita,S. & Satake,M. Pflügers Arch., in press
(4) 藤田省三, 佐武明人 薬科紀要(1980) 神経化学,19,226-229
(5) Okamoto,H.(1980) J.Physiol.,299,507-520
(6) Ritchie,J.M.,Rogart,R.B. & Strichartz,G.R.(1976) J.Physiol.,261,477-494
(7) Hucho,F.,Stengelin,S. & Bandini,G.(1979) in Recent Advances in Receptor Chemistry, pp.37-58,Elsevier
(8) Fujita,S.,Warashina,A. & Satake,M. in preparation
(9) Jover,E.,Couraud,F. & Rochat,H.(1980) Biochem.Biophys.Res.Commum.,95,1607-1614
(10) Ray,R.,Morrow,C.S. & Catterall,W.A.(1978) J.Biol.Chem.,253,7307-7313
(11) Catterall,W.A.(1977) J.Biol.Chem.,252,8660-8668
(12) Fujita,S. & Warashina,A.(1980) Comp.Biochem.Physiol.,67C,71-74
(13) Bergman,C.,Dubois,J.M.,Rojas,E. & Rathmayer,W.(1976) Biochim.Biophys.Acta,455,173-184

67 神経成長因子によって導き出される培養神経細胞のエンケファリン受容体

畠中　寛・井上順雄
（三菱化成生命研）

〔要　約〕

培養神経細胞PC12（サブクローンh）を用い、神経成長因子（NGF）存在下で長期間培養することにより導き出される、特異的なエンケファリン結合能を見出した。この結合能は、^{3}H-(D-Ala^2-)Met-Enkephalinamideを用いる測定により、結合定数K_D＝2.41nM、最大結合能Bmax＝866 fmol/mg proteinの値を与えた。その立体特異性について以下の予備的結果を得た。ヒトのβ-エンドルフィンの阻害定数、IC_{50}＝15.8nMに対して、植物由来のアルカロイドであるモルヒネはIC_{50}＝214nMにすぎず、またエンケファリンのアンタゴニストであるナロキサンの場合、IC_{50}＝47.9nMと求まり、エンケファリン類に親和性がより高いと思われる結果を得た。PC12h細胞のこのような性質をもつエンケファリン結合能は、細胞をNGF非存在下に培養した場合、極めて低い値にとどまった。NGFは通常50ng/mlの濃度で培養しているが、1ng/ml以下でもエンケファリン結合能の増加がみられる。培養は約10日間しつづけることが必要であり、また、無血清完全合成培地に生育したPC12h細胞においても同様のNGF依存性エンケファリン結合能が見出された。NGF以外には、Epidermal growth factorの場合、能力が100倍低く、またInsulinはまったく効果がなかった。

Key words：　nerve growth factor ; a stereospecific enkephalin receptor ; a rat pheochromocytoma cell line.

神経成長因子（NGF）は，脊椎動物の交感神経および感覚神経系の発生において，たとえば，神経細胞の生存維持，細胞体積の増加，神経突起の伸長およびカテコールアミン合成系の酵素活性の誘導に関して重要な役割を果していることが知られている[5,11]。著者らはラットフェオクロモサイトーマよりNGF応答性をもつ株細胞として単離されたPC12細胞[4]のサブクローンのあるもの（PC12h細胞）が，正常の交感神経細胞と上記のすべての点で同じ性質をもつことを報告した[6]。この細胞PC12hにはまたNGFで感受性の増大するアセチルコリン応答性のカテコールアミン放出系も存在する[7]。一方，最近，培養牛副腎クロマフィン細胞も同様にNGFに応答して分化し，交感神経細胞と多くの点で共通性をもつようになることが知られている[3,12]。この系は細胞が多量のオピエイトペプチドを合成しうる[10]と共に，それがアセチルコリン感受性を調節しうることが最近報告された[9]。

著者らは，今回，PC12h細胞をNGF存在下に一週間以上培養を続けると，はじめほとんど測定できなかった^{3}H-(D-Ala^2-)Met-Enkephalinamideの特異的結合が，有意な値にまでみられるようになり，この結合がアルカロイドであるモルヒネよりはむしろエンケファリン類に特異的であることを見出したので報告する。

[実験方法]

PC12h細胞は，5%CO_2，95% Airで，5%準胎児牛血清（三菱化成中標津血清センター）および5%非働化（56°C，30分）馬血清（Gibco）を含む，DF培地で培養した。

DF 培地は，Dulbecco's modified Eagle's と Ham's F12（共にGibco）の 1:1 混合培地に，1.9mg/ml $NaHCO_3$，30nM セレン酸（共に和光純薬），15mM Hepes buffer (Sigma)，50U/ml ペニシリンG（明治製菓），100μg/ml ストレプトマイシン（協和醗酵）を加えて調製した[2,6]。2.5S NGF は Bocchini と Angeletti の方法で雄マウス顎下腺より精製した[1]。エンケファリン結合能の測定のために，コラーゲン (Sigma) コートのファルコンディッシュ（φ100mm）に生育した PC12h 細胞を Phosphate buffered saline で洗ったのち，氷冷した 0.32 M sucrose を含む 5mM Tris-HCl-buffer，pH 7.5 で集め，遠心ののち上清を捨て，0.5ml の同じ buffer 中にサスペンドし，測定時まで −80°C に保存した。放射性リガンドとして，^{3}H-(D-Ala^2-)Met-Enkephalinamide (Amersham) を，最終濃度で 2nM 用い，non-specific 結合量は，(D-Ala^2-)Met-Enkephalinamide (Peninsula) を 1μM 加えた時の残存放射活性として求めた。アッセイは全量 1ml で 30°C，30分反応させ，細胞に結合した放射活性を，グラスフィルター（GF/B，φ24 mm，Whatman）上にあつめ測定した[8]。測定は duplicate でおこない全結合量から non-specific 結合量を引きさることにより特異的結合量とした。用いた細胞の蛋白量の測定は，sucrose の干渉を避けるために，トリクロロ酢酸で一度沈澱させてから，Lowry法でおこなった。

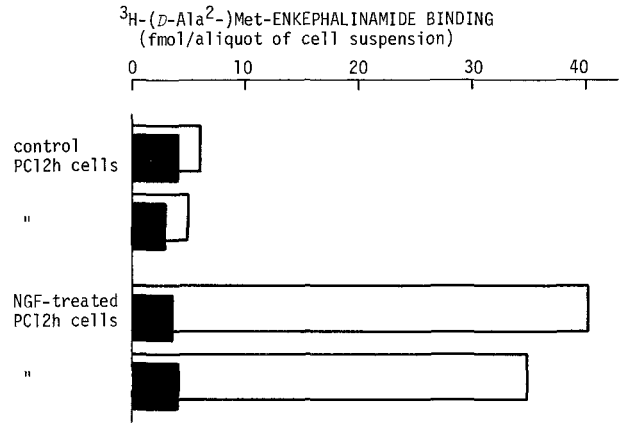


図1. NGF（50ng/ml）存在下および非存在下に9日間培養した PC12h 細胞のエンケファリン結合能。黒四角で示した値は，非放射性のリガンド 1μM 存在のものである。上記4種の cell suspension の測定時の蛋白量は順に，63.5，54.0，80.8，91.2 μg protein である。

［ 実験結果と考察 ］

図1は，PC12h 細胞を NGF 非存在下および存在下（50ng/ml）で9日間培養したのち，細胞を集め，その一定量を用いて ^{3}H-(D-Ala^2-)Met-Enkephalinamide の結合量を測定した結果である。黒四角で表示したのは 500倍量の非放射性リガンド存在下ではかった値で non-specific 結合量を示す。特異的結合量は，白四角で示す値との差であり，これを用いた cell suspension 中の蛋白量で割ることより，図1のそれぞれの細胞での特異的エンケファリン結合量は，順に，32.2，41.2，459，337 fmol/mg protein とおめることが出来る。この結果は，PC12h 細胞のエンケファリン受容体が NGF 非存在下に培養した場合，極めて少なく，NGF 存在下で，はじめて相当量の受容体があらわれることを示している。NGF 存在下であらわれたエンケファリン受容体の結合の性質を図2で示す。飽和曲線を Scatchard plot に移すことにより，K_D= 2.41 nM，Bmax = 866 fmol/mg protein が求まる。最大結合量の値から NGF 存在下に長期間培養し

たPC12h細胞は，約 2.1×10^5 receptor site / cell をもっていることになる。受容体の立体特異性を予備的に調べた結果が図3である。植物由来のアルカロイドであるモルヒネのIC50値は 214 nMであり，ナロキサンのIC50値は 47.9 nM であった。一方，ヒトのβ-エンドルフィンは，それらより高い置換能力を示し，IC50値として 15.8 nM であった。

さて，このような立体特異性を示すエンケファリン受容体がPC12h細胞においてどのような培養条件下にあらわれるのかについてさらに詳しく調べた。図4は，PC12h細胞を 50 ng/ml のNGF存在下に培養した時のエンケファリン結合能の出現を調べたものである。図から，結合能の充分な出現には，8-10日前後の日数を要することが見出された。図5は，NGFの特異性をみたものであり，NGFと同様に雄マウス顎下腺に存在する Epidermal growth factor の場合 500ng/ml 存在下に培養したPC12h細胞のエンケファリン結合能は，5ng/mlのNGFでの値と同程度であった。一次構造でNGFに類似している Insulin では 500ng/ml でも，まったく効果がなかった。NGF非存在下で培養したPC12h細胞

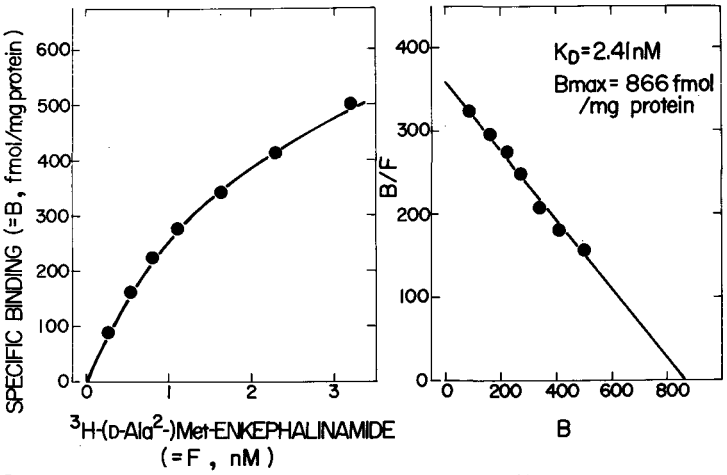


図2. NGF（50 ng/ml）存在下に9日間培養したPC12h細胞におけるエンケファリン結合能の Saturation Curve（左）と Scatchard Plot（右）。

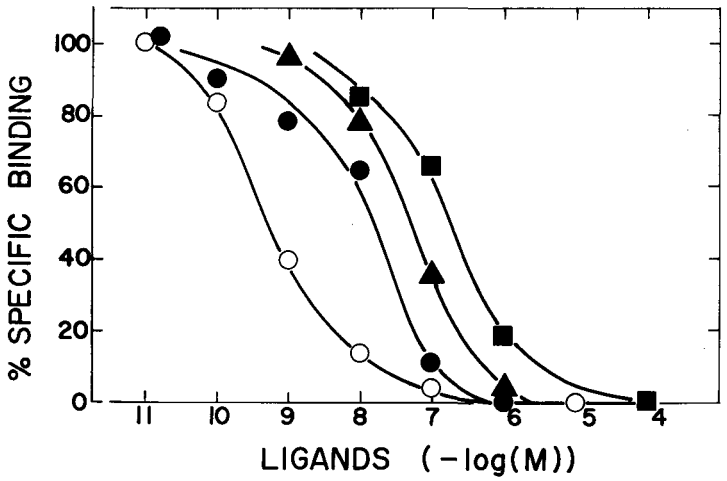


図3. NGF（50 ng/ml）存在下に9日間培養したPC12h細胞におけるエンケファリン結合能に対する種々のリガンドの阻害。○(D-Ala^2-) Met-Enkepalinamide, ●Human β-Endorphin, ▲Naloxone, ■Morphine。

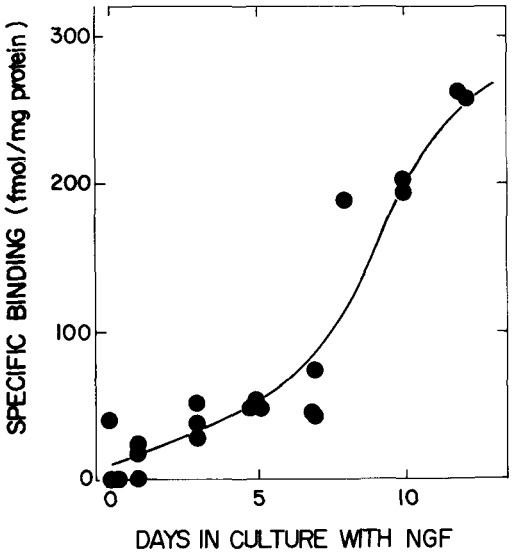


図4. NGF (50ng/ml) 存在下に培養したPC12h細胞のエンケファリン結合能の出現。DAY 0に PC12h 細胞を 10^4 cells/cm^2 でコラーゲンコートした Falcon dish にまき，示された日数培養し，それらのエンケファリン結合量を測定した。

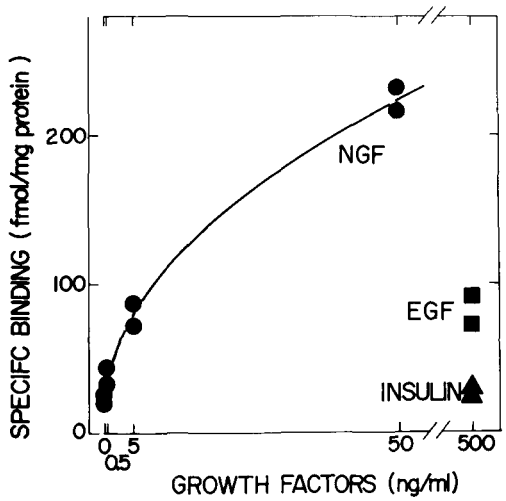


図5. 各種成長因子によるPC12h細胞におけるエンケファリン結合能出現に対する効果。PC12h細胞は 2×10^4 cells/cm^2 でコラーゲンコートした Falcon dish にまき，示された量の成長因子類を加え，9日間培養した。●NGF，■Epidermal growth factor，▲Insulin。

において見出される弱いエンケファリン結合能が培養に必要な血清中に含まれる未知の成長因子類似物質によるものか否かを，無血清培養系を用いて[2,6]確めた。無血清完全合成培地においても，NGF非存在下の培養でやはり弱いエンケファリン結合能が見出され，これはNGF存在によって顕著に増加した。

[REFERENCES]

1. V.Bocchini & P.U.Angeletti, *Proc.Natl.Acad.Sci.,U.S.A.*, 64(1969)787-794.
2. J.E.Bottenstein & G.H.Sato, *Proc.Natl.Acad.Sci.,U.S.A.*, 76(1979)514-517.
3. E.M.Fenwick, P.B.Fajdiga, N.G.S.Howe & B.G.Livett, *J.Cell Biol.*, 76(1978)12-30.
4. L.A.Greene & A.S.Tischler, *Proc.Natl.Acad.Sci.,U.S.A.*, 73(1976)2424-2428.
5. L.A.Greene & E.M.Shooter, *Ann.Rev.Neurosci.*, 3(1980)353-402.
6. H.Hatanaka, *Brain Research*, 226(1981) in the press.
7. H.Hatanaka, M.Takahashi & M.Mitsuka, *in "Synthesis,Storage and Secretion of Adrenal Catecholamine: Dynamic Integration of Functions" ed.by F.Izumi, Pergamon Press, Oxford*, in the press.
8. W.A.Klee & M.Nirenberg, *Proc.Natl.Acad.Sci.,U.S.A.*, 71(1974)3474-3477.
9. K.Kumakura, F.Karoum, A.Guidotti & E.Costa, *Nature*, 283(1980)489-492.
10. R.V.Lewis, A.S.Stern, S.Kimura, J.Rossier, S.Stein & S.Udenfriend, *Science*, 208(1981)1459-1461.
11. H.Thoenen, Y.-A.Barde, D.Edgar, H.Hatanaka, U.Otten & M.Schwab, *Progr.Brain Res.*, 51(1979)96-107.
12. K.Unsicker, G.-H.Griesser, R.Lindmar, K.Loeffelholz & U.Wolf, *Neuroscience*, 5(1980)1445-1460.

68 電気ウナギ電気器官形質膜のテトロドトキシン結合蛋白のホトアフィニティラベル

上原政治・植村慶一
(埼玉医大・I生理)

〔要　約〕

1) テトロドトキシン(TTX)のアジド誘導体, 2-nitro-4-azidephenyl-β alanine-TTX (NAP-β alanine-TTX)を合成し, ホトアフィニティラベルによるTTX結合蛋白の同定を試みた。精製したリガンドの毒力はTTXの1/30であった。2) NAP-β alanine-TTXの結合能は電気ウナギ電気器官の膜画分の^{3}H-TTX結合能に対する抑制を測定することにより検討した。暗所ではTTX結合部位に可逆的に結合し, 光照射により不可逆的に結合することが示された。3) ^{3}H-NAP-β alanine-TTXを合成しTTX結合蛋白を直接標識することを試みた。光照射により膜画分をそのリガンドで標識したあと, Lubrol PXで可溶化してLubrol extractを得, つづいてSepharose 6Bカラムにかけて分析した。その結果Lubrol extractで認められたnet binding (TTX添加で抑制される^{3}H-NAP-β alanine-TTX)の半量がTTX結合蛋白に不可逆的に結合したことが明らかとなった。4) Sepharose 6Bカラムで分画された試料をSDS-ポリアクリルアミドディスクゲル電気泳動にかけて分析した結果, TTX結合蛋白の分子量はSDS存在下で140,000であった。

Key words : Photoaffinity label, Electric eel electroplax, tetrodotoxin binding protein.

テトロドトキシン(TTX)は興奮性膜に存在するNa$^+$チャネルに選択的かつ可逆的に結合することは広く知られている。TTXのこの選択的結合能を利用して, TTX結合タンパクの生理化学的な研究が進められている[1-4]。然し, 興奮性膜の可溶化によりTTX結合能は著明に減少する為に, 可溶化後のTTX結合蛋白の追跡は困難である。Guillory[5]らはTTXのアジド誘導体, 2-nitro-4-azidephenyl-β alanine-TTX (NAP-β alanine-TTX)が光照射によってTTX結合蛋白に不可逆的に結合することを示唆している。我々はこの誘導体の生理活性を詳細に検討し, 更にそのリガンドでTTX結合蛋白を標識しうるとの結論を得たので報告する。

〔実験方法〕

1　NAP-β alanine-TTXの合成(図1)。Guillory[5]らの方法で合成し, セルロース薄層クロマトグラフで精製した(展開溶媒, 0.1M ammonium formate pH 4.5 : Acetonitrile = 25 : 75。R_f = 0.95)。^{3}H-NAP-β alanine-TTX (850 mCi/mmol)は^{3}H-β alanineを用いて合成した。精製したリガンドの毒力はTTXの1/30であった。

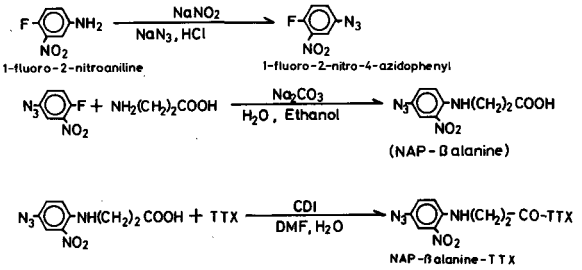


図1　NAP-β alanine-TTXの合成。
略語。NAP-β alanine; 2-nitro-4-azidephenyl-β alanine。CDI; carbonyldiimidazole。DMF; dimethyl-formamide。TTX; tetrodotoxin。

2　電気ウナギ電気器官の膜画分

の調整。 湿重10gの電気ウナギ電気器官 (Electrophorus electricus electroplax) をハサミで細切したのち，10倍量の50mM potassium phosphate buffer (pH 7.4, KPB) 中で磨砕後，ガーゼ2枚で沪過し沪液を40,000g 30分遠心して得られた沈渣を粗膜画分として用いた。

3 NAP-β alamine-TTX の生理活性の検討。 膜画分(2mg 蛋白) を1.0mlのKPBに浮遊しNAP-β alamine-TTX等の薬物を加えて20℃ 30分間incubationし，このあと光照射するときにはプロジェクター ランプで5分間照射した。次いで膜画分を遠心で沈渣とし，更にその沈渣を遠心－磨砕によって3回洗ったあと膜画分の ^{3}H-TTX結合能を次の方法で測定した： 洗った膜画分を1.0mlのKPBに浮遊して2μM TTX添加或は無添加の下で20nM ^{3}H-TTX (200 mCi/mmol) を加えて20℃ 30分間incubationしたあと，遠心で膜画分を沈渣としその沈渣の放射能活性を測定した。TTX無添加(－TTX)及びTTX添加(＋TTX)の下でincubationした膜画分の放射能活性の差分 (⊖TTX－⊕TTX) をNet bindingとした。

4 ^{3}H-NAP-β alamine-TTX による TTX結合蛋白の標識及び Sepharose 6Bカラムによる分画。 膜画分(5mg蛋白)を1.0mlのKPBに浮遊し2μM TTX添加或は無添加の下で100nM ^{3}H-NAP-β alamine-TTX を加えて20℃ 30分間incubationしたあと5分間光照射した。膜画分を遠心で沈渣とし，更に2回沈渣を洗った。沈渣を1% Lubrol PX 5mlで可溶化したあと，40,000g 30分間遠心して上清 (Lubrol extract) を得た。Lubrol extract を凍結乾燥したあと，Sepharose 6Bカラムにかけて分析をした。

5 SDS ポリアクリルアミド ディスクゲル電気泳動及びゲルの放射能活性の測定 電気泳動は4%ポリアクリルアミド－0.1% SDS ディスクゲル(Weber & Osborn[6])内で実施した。染色後，ゲルを薄切して36% H_2O_2 0.5mlで可溶化し放射能活性を測定した。

〔結果と考察〕

1 NAP-β alamine-TTX の ^{3}H-TTX 結合能に対する抑制効果(図2)。 cとdの結果はNAP-β alamine-TTXが暗所では ^{3}H-TTX 結合を可逆的に抑制することを示している。eとfの結果はNAP-β alamine-TTXは光照射によって不可逆的に ^{3}H-TTX 結合を抑制し，かつTTXの存在によってその抑制が阻害されることを示している。 gはNAP-β alamineが選択的結合を有していないことを示している。 以上の結果はNAP-β alamine-TTXが暗所ではTTXと同様の選択的結合能を保持しており，かつ光照射によってTTX結合蛋白に不可逆的に結合することを示唆している。この示唆を基にして，我々は ^{3}H-NAP-β alamine-TTXを合成して直接TTX結合蛋白を標識することを試み以下の成績を得た。

2 標識された膜画分の Lubrol extract の Sepharose 6Bカラムクロマトグラフィー(図3)。 図3の実験より次の2つの事実が明らかとなった。(i) 図3-A及びBのいづれに於ても，放射能活性の差分 (⊖TTX－⊕TTX) は蛋白部分と total bed volume に認められた。図3-B (SDS処理した試料) に於ては，差分はNo 46－54及び total bed volume にほぼ等量づつ分布していた。対照実験により，total bed volume の差分は不可逆的結合に関与しなかった ^{3}H-NAP-β alamine-TTX によるものであった。

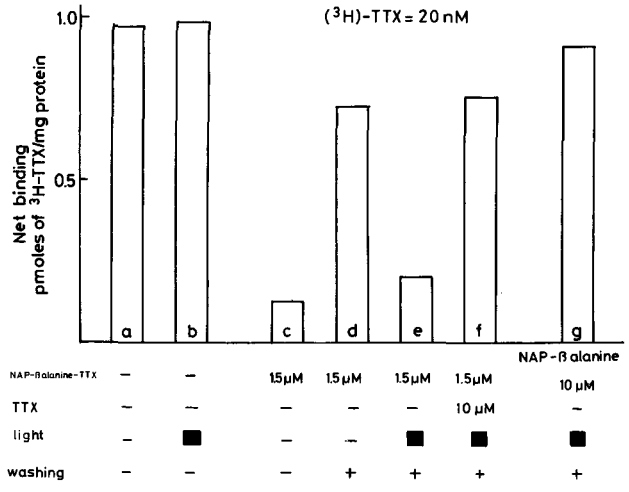


図2　NAP-βalanine-TTXの^{3}H-TTX結合能に対する抑制効果。a；intactな膜画分の^{3}H-TTX結合能。b；5分間光照射した膜画分の^{3}H-TTX結合能。c；1.5 μM NAP-βalanine-TTX存在下での暗所における^{3}H-TTX結合能。d；膜画分を1.5 μM NAP-βalanine-TTX存在下で暗所でpre-incubationし，次いで膜画分を洗ったあとの^{3}H-TTX結合能。e；膜画分を1.5 μM NAP-βalanine-TTX存在下でincubationしたあと光照射し，次いで膜画分を洗ったあとの^{3}H-TTX結合能。f；eでNAP-βalanine-TTXを添加する前に10 μM TTXを加えたときの^{3}H-TTX結合能。g；eでNAP-βalanine-TTXの代りにNAP-βalanineを加えたときの^{3}H-TTX結合能。

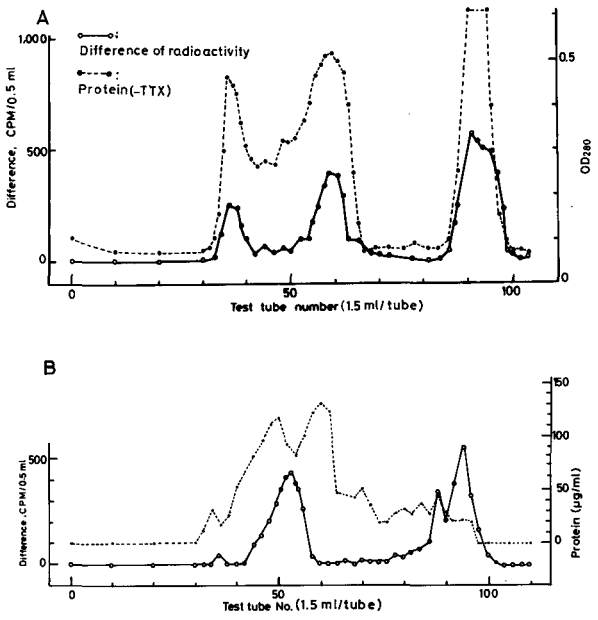


図3　標識された膜画分のLubrol extractのSepharose 6Bカラムクロマトグラフィー。

A] SDS無処理の試料の溶出パターン。^{3}H-NAP-βalanine-TTXで標識した膜画分のLubrol extractの凍結乾燥残渣を2.0 mlのアセトンで洗ったあと，1.0 mlの20 mM Ammonium bicarbomateに溶解してカラムにかけた。縦軸は放射能活性の差分(⊖TTX-⊕TTX)。⊖TTX；12 mg蛋白，140,400 cpm. ⊕TTX；13.2 mg蛋白，81,300 cpm. 溶出液；0.1% Lubrol-20 mM ammonium bicarbomate。カラムサイズ；15×1,000 mm。溶出速度；12 ml/hr。total bed volumeのOD$_{280}$の増大はアセトンによる。

B] SDS処理の試料の溶出パタ

ーン。Lubrol extract の凍結乾燥残渣を2% SDS - 2% Mercaptoethanol に溶解して2カラムにかけた。㊀TTX；0.2 mg蛋白，125,500 cpM。㊉TTX；0.2 mg蛋白，74,800 cpM。溶出液：0.2% SDS - 20mM Ammonium bicarbonate。カラムサイズ及び溶出速度はAと同。

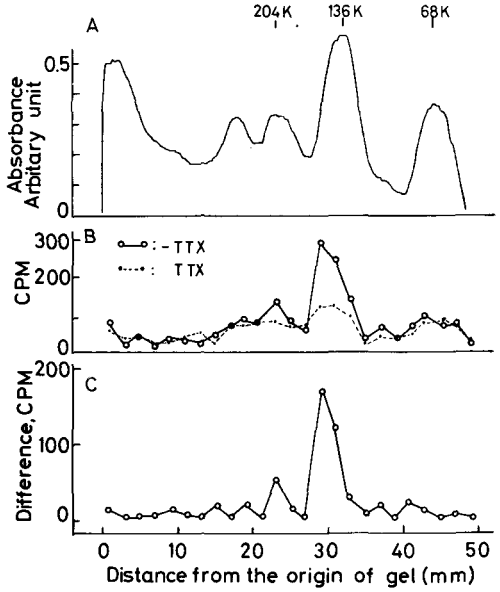


図4 Sepharose 6B カラムの標識された分画の SDS ポリアクリルアミド ディスクゲル電気泳動。図3-Bの No. 49 - 51 を凍結乾燥して2% SDS - 2% Mercaptoethanol に溶解したあと，4% ポリアクリルアミド - 0.1% SDS ディスクゲルにかけ電気泳動した。㊀TTX；150μg蛋白，2,700 cpM。㊉TTX；150μg蛋白，1,500 cpM。

A] 蛋白の分離パターン(- TTX)

B] - TTX 及び + TTX の放射能活性の分布。

C] B の - TTX 及び + TTX の放射能活性の差分の分布。

これらの結果は光照射によって TTX 結合蛋白に不可逆的に結合しうる ^{3}H-NAP-βalanine-TTX は Lubrol extract で認められた Net binding の約 70% であることを示している。(ii) SDS 無処理の試料(図3-A)では void volume に相当量の差分が認められるのに対し，SDS 処理の試料(図3-B)ではその部分の差分は微小であった。このことは SDS 無処理の場合，相当量の蛋白が会合体として存在し，従がって効果的に分画するには試料を SDS で処理することが必要なことを示している。

3 Sepharose 6B カラムの標識された分画の SDS ポリアクリルアミド ディスクゲル電気泳動(図4)。図4-C より放射能活性の差分は分子量 140,000 の部分に認められた。このことは TTX 結合蛋白の分子量は SDS 存在下で 140,000 であることを示唆している。ディスクゲルではこの部分は単一のバンドであったが平板ゲルでは複数のバンドが認められた。これらのバンドのいづれかが TTX 結合タンパクと思われる。

以上の結果から，NAP-βalanine-TTX は光照射によって TTX 結合蛋白に不可逆的に結合し，その蛋白の分子量は 140,000 であることが示された。

[文献]

1. Agnew, W.S., Levinson, S.R., Brabson, J.S. and Raftery, M.A. (1978) Prc.Natl. Acad. Sci. USA. 75, 2606 - 2610. 2. Catterall, W.A. (1977) J. Biol. Chem. 252, 8660 - 8668.3.Catterall, W.A., Morrow, C.S. and Hartshorne, R.P. (1979) J. Biol. Chem. 254, 11379 - 11387. 4. Chicheportiche, R., Balerna, M., Lombet, A., Romey, G. and Lazudunski, M. (1979) J. Biol. Chem. 254, 1552 - 1557. 5. Guillory, R.J.. Rayner, M.D. and D'Arrigo, J.S. (1977) Science 196, 883 - 885. 6. Weber, K. and Osborne, M. (1969) J. Biol. Chem. 244, 4406 - 4412.

69 ラット骨格筋培養細胞の細胞内α-トキシン結合成分の性質

杉山博之・山下幸子
(生理研)

〔要　約〕

ラット骨格筋培養細胞アセチルコリン受容体（AChR）の生合成過程を調べるため、細胞内α-ブンガロトキシン（αBT）結合成分を検討し、次のような知見を得た。

[1] 細胞膜上のAChRは沈降係数としては9S一種類のみであるのに対して、細胞内のαBT結合成分には沈降係数9S（細胞膜AChRの直接の前駆体と考えられる）および5Sの、少くとも2種類の成分が見い出される。

[2] 5S成分のαBT結合は特異的であり（コリン性リガンドで拮抗される）、かつクラーレやカルバミルコリンに対して9S成分、細胞膜AChRと同様の親和性を示す。

[3] 細胞内9S成分を人為的に5S成分に転換する試み（細胞ホモジェネートとインキュベートする、等）は、うまく行かない。

以上の結果は、ひとつの可能性として、細胞内5S成分は9S前駆体の前駆体であり、細胞内の別のある成分と結合することによって9S成分に変る、という解釈を示唆する。

Key words：　Acetylcholine receptor / receptor precursor / muscle cell culture.

ラット骨格筋のアセチルコリン受容体（AChR）には、神経筋接合部型（J型）と非接合部型（E型）の2種類のものが知られている(1)。　我々は前回、ラット骨格筋培養細胞のAChRを検討し、この細胞の表面膜上にはE型およびJ型の両型のAChRが存在すること、同細胞内の前駆体分子には、E型AChRと非常に近い等電点をもつ一種類しか見い出せないこと、を報告した(5)。　今回は、細胞内部のα-ブンガロトキシン（αBT）結合成分を更に詳しく検討し、前回前駆体として分析した成分の他に、それより分子量の小さい（半分以下）αBT結合成分を見い出し、そのいくつかの性質を調べたので報告する。

〈実験方法〉

培養骨格筋細胞：新生ラット後肢より、前回(5)と同じ方法で調製。

放射性同位元素標識α-トキシン：　^{125}I標識αBTはRCC, Amershamより購入したものをそのまま用いた。　^{3}H標識αBTまたはerabutoxin b（ETb；東北大学田宮信雄教授より恵与された）は、N-succinimidyl[^{3}H]propionate（RCC）を用いて合成・精製した mono[^{3}H]propionyl-αBT または mono[^{3}H]propionyl-ETb を用いた（それぞれ、^{3}H-αBT または ^{3}H-ETb と略記）。　合成・精製法の詳細は既に発表した(6)。

細胞内α-トキシン結合成分の調製：　細胞内α-トキシン結合成分は、生きた培養細胞を75mM αBT を含む培養液中で約12時間インキュベートし、細胞表面膜上のAChRを完全にブロックしたあと、細胞をホモジェナイズしたホモジェネート中に検出され

る。このようなホモジェネート（可溶性成分を遠心除去した粗膜ホモジェネート）を11～37 nMの放射性αBTと4°C約2時間インキュベート後、2% Triton X-100で氷中60分おだやかに撹拌し、放射性複合体を可溶化・抽出し、Sephacryl S-200 ゲル沪過（1.6×35 cm）または5→20%ショ糖密度勾配遠心にかけて分画・分析した。薬物親和性を調べる実験の場合には、粗膜ホモジェネートをそのまま可溶化・抽出し、Sephacryl S-200 ゲル沪過で分画後、放射性α-トキシンを用いて検出した（Fig. 1）。ホモジェナイゼーションの溶媒は137 mM NaCl, 3 mM KCl, 10 mM リン酸緩衝液（pH 7.4）, 0.1 mM PMSF, 1 mM EDTA；可溶化以降の過程には、これに1/9容の20% Triton X-100を加えたものを用いた。

薬物親和性の測定：　Sephacryl S-200 ゲル沪過で分画した各成分の薬物親和性は、^{3}H-ETb結合に対する競合実験によって間接的に測定した。試料成分を各種濃度のd-ツボクラリンまたはカルバミルコリンと25°C 15分保温後、^{3}H-ETbを加え（最終濃度45 nM）25°Cで更に60分保温後、Sephadex G-100（0.4×24 cm）ゲル沪過、またはDEAE-セルロース・カラム（0.6×0.9 cm）によって、α-トキシン結合成分と結合した^{3}H-ETbを分離・定量し、それぞれの濃度の薬物がどの程度^{3}H-ETb結合を阻害したかを見積った。2つの方法による測定は、基本的には同等の結果を与えた。

〈結果〉

α-トキシン結合の特異性と薬物親和性：　Fig. 1に示されるように、ラット骨格筋培

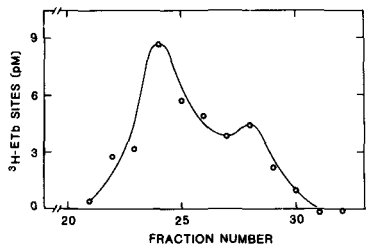


Fig. 1　細胞内α-トキシン結合成分のSephacryl S-200 ゲル沪過.
（カラム全容量はFract# 58に相当）

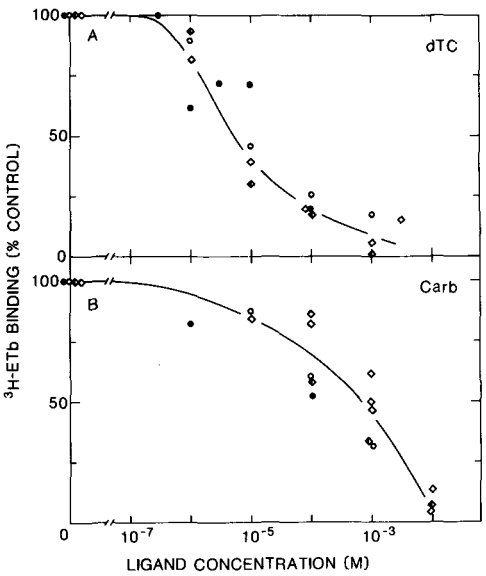


Fig. 2　d-ツボクラリン(A)またはカルバミルコリン(B)による^{3}H-ETb結合の阻害.（●, 細胞表面膜AChR；◆, 細胞内9S成分；○と◇, 細胞内5S成分. ●と○はSephadex G-100 ゲル沪過法による測定結果. その他の印はDEAE-セルロース・カラム法による測定結果）

養細胞内α-トキシン結合成分には、表面膜AChRと同じ分子サイズを持つ成分(Fraction #～24)の他に、これより分子量の小さい成分(Fraction #～28)が見い出される。これらはそれぞれ、Fig.3に示される9Sおよび5S成分に対応する。この両者に対するα-トキシンの結合は、過剰のαBTやd-ツボクラリン、カルバミルコリンによって阻害され、特異的である。より定量的には、Fig.2に示されるように、細胞表面膜AChR、細胞内9S成分、5S成分のいずれも、d-ツボクラリンまたはカルバミルコリンによってほぼ同程度に、^{3}H-ETb結合が阻害される。このことは、これら3者の両薬物に対する親和性が基本的にはほぼ同じであることを示していると考えられる。

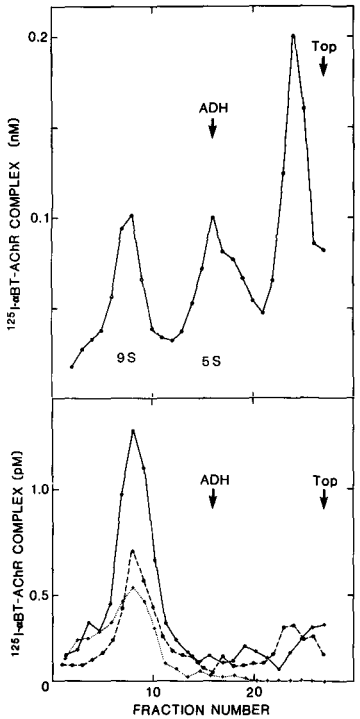


Fig.3 細胞内α-トキシン結合成分のショ糖密度勾配遠心(上段)と、その9S成分を各種条件下で処理した後同じ条件で再遠心したもの(下段):
●—● 無処理9S成分; o--o 37℃ 30分保温後再遠心; +……+ 9S成分を新しい培養細胞とホモジェナイズし 20℃ 19時間保温後再遠心。 5S成分はウマ肝臓アルコールデヒドロゲナーゼ(ADH, 4.8S)と完全に同じ沈降係数を示す。

細胞内9S成分と5S成分の関係: 薬物親和性測定の結果は、細胞内9S成分と5S成分のいずれもがAChRと密接に関連した成分であることを示している。このうち9S成分は表面AChRの直接の前駆体であると考えられる。これに対して、5S成分が何を意味するのかは現在のところ明らかではない。ひとつの可能性として、9S成分が部分的に分解して生じた分解産物であるということが考えられる。実際、Loら(3)は最近ラットやネコの筋肉のAChR(9S)が、ホモジェネート保温中に4Sの分子サイズに転換することを観察した。この可能性を検討するために、Fig.1に示したようなゲル沪過、またはFig.3の上段に示したようなショ糖密度勾配遠心で得られた細胞内9S成分(^{125}I-αBTとの複合体)を次のような条件で処理した後再び同様のショ糖密度勾配遠心で分析し、9S→5Sへの転換が起るか否かを調べた: (1)新しい細胞の粗膜ホモジェネート中で5℃または20℃で40～52時間保温。(2)新しい細胞の全ホモジェネート中で20℃ 19時間保温。(3) 37℃で30分保温。結果の一例をFig.3の下段に示した。この図に見られるように、これらの条件下では9S→5Sへの明らかな転換は見られなかった。

<考察>

ラット骨格筋培養細胞の細胞内α-トキシン結合成分は、コリン性リガンドに対する親和性が、細胞表面AChRのそれと同様であることから、9S, 5S成分ともに、

AChRと密接に関連した分子であると考えられる。シビレエイや電気ウナギのAChRは5つのポリペプチド・サブユニットより成るペンタマー構造をもつが(2,4)、筋肉のAChRも同様の構造をもつとすれば、分子量の比較から細胞表面AChRおよび細胞内9S成分は同様にペンタマーと考えられる。これに対し5S成分は、S値より推測して、ダイマー構造(そのうちの少くとも一つはα-トキシン結合部位をもつα-サブユニット)をもつであろうと現像される。この5S成分については、いくつかの可能性が考えられる。第一は、9S成分より由来した人為的分解産物であるという可能性。第二は、9S前駆体になる前の段階の、オリゴマー構造が完成していない「前駆体の前駆体」である可能性である。この場合、5S成分は細胞内の別のある成分と結合して9Sになると考えられる。現在のところ、いずれともはっきりしない段階にあるが、次の理由によって我々は第二の可能性も十分にあり得ると考えている:

(1) 5S成分は細胞内にのみ見いだされ、細胞表面AChRからは全く同様の処理を行っても、ほとんど得られない。

(2) 細胞内9S成分に対して、もともとの抽出操作と同様の処理を加えても、あるいは、それ以上に分解が起り易いと考えられる処理を加えても、5Sに転換するという明らかな証拠は得られない。

(3) Loら(3)がラット骨格筋のAChRを処理して得た分解産物(沈降係数4S)と、我々が観察した5S成分とは、沈降係数が多少異っており(内部マーカーのADHとの比較による)、完全に同一物ではないと考えられる。

しかし、これらの理由はいずれも、確定的な根拠とは言えず、第一の可能性を除くのに十分なものとは言えない。今後更に検討を重ねて行きたいと考えている。

<文献>

1. Brockes,J.P. and Hall,Z.W.(1975) Biochemistry 14, 2100-2106.
2. Lindstrom,J., Cooper,J. and Tzartos,S.(1980) Biochemistry 19, 1454-1458.
3. Lo,M.M.S., Dolly,J.O. and Barnard,E.A.(1981) Europ. J. Biochem. 116, 155-163.
4. Raftery,M.A., Hunkapillar,M.W., Strader,C.D. and Hood,L.E.(1980) Science 208, 1454-1456.
5. 杉山博之・山下幸子(1980)神経化学 19, 126-129.
6. Sugiyama,H. and Yamashita,Y.(1981) J. Biochem.(Tokyo) in press.

70 ラット脳における^{3}H-kainate bindingの内因性抑制物質

辻村良太郎・野村純一・鳩谷　龍
（三重大・医・精神）

〔要　約〕

Wistar系雄ラット(200~250g)のcerebral cortexとstriatumを50mM Tris-acetate buffer, PH7.1でhomogenizeし、Enna and Snyderの方法でP_2 membranesを分画し、同一bufferで3回washingしたものをfresh and washed P_2として^{3}H-kainate binding assayに用いた。3回のwashing時に得られるsupernatantをプールし、lyophilizeして蛋白量が約30mg/100mlになるよう同一bufferに溶解したものをSup-2とした。Sup-2を^{3}H-kainate binding systemに加えると、dose-dependentにinhibitionがかかり、Scatchard analysisを行なうとBmaxは176 fmol/mg protein、Kdが82nMで（対照群：Bmax, 180 fmol/mg protein, Kd, 21nM）Sup-2により、kainateのbinding sitesへのaffinityのみが著明に減少することが明らかになった。

Sup-2を遠心すると活性は消失するが、95°C、15分間のboiling、クロロホルム－メタノール処理、trypsin、α-chymotrypsin処理ではSup-2の活性は消失しなかった。Sup-2をSephadex-G-50 columnにかけ、活性分画をDowex 50W×8 column (H^+)にかけ、水ついで2N NH_4OHで溶出しinhibitorの精製を行なった。中性糖、ヘキソサミン、シアル酸、リンは検出されず、OD_{280}、Folin phenol反応が陽性でアミノ酸分析でアルギニン、リジン、ヒスチジン、バリン、フェニールアラニンが検出された。inhibitorは低分子の塩基性蛋白である。

Key words : endogenous inhibitor, ^{3}H-kainate binding, rat brain.

Digenea simplexは藻類の一種で日本、中國で古くから駆虫剤として使用されている。1953年、Takemotoによりその活性成分が分離抽出され、構造が決定されkainateと命名された。[20] kainateはL-glutamateとの構造上の類似性からneuroexcitantの作用があるのではないかと考えられ、1970年、Sinozakiら[17]により電気生理学的にneuroexcitantでありglutamateの作用を増強することが示された。1974年、Olneyら[15]はkainateには強いneurotoxicityがあることを示し、1976年、Coyleら[4]とMcGeerら[13]はkainateをラットのstriatumに注入することによりHuntington's choreaのモデルラットを作ることに成功した。一方、1976年、Simonら[19]によりラット脳のP_2 membraneを用いて^{3}H-kainate binding assayが行なわれbinding assayが確立された。[3][11] このような状況の中でHuntington's choreaの病因をめぐりその焦点がglutamate receptorとkainate binding sitesにおけられている。[3][5][9][12] 私達はglutamate receptorとcouplingするNa^+-channelか、或いはその附近にkainateのbinding sitesが存在し、またkainate bindingを調節するendogenous inhibitorがあるのではないかと考えて実験を行なった。

〔実験方法〕

1) P_2 membranes —— Wistar系雄ラット(200~250g)を用いた。cerebral cortexとstriatumを50mM Tris-acetate buffer, PH7.1でhomogenizeしEnna and Snyder[7]の方法でP_2を分画した。このP_2を同一のbufferにsuspensionし$4.8\times10^4\times g$で5分遠心することによりmembranesのwashingを行ない、

Table 1 Standard assay of ^{3}H-kainate binding

Incubation mixtures	
tissue suspension (P_2 membranes, 350 mg protein)	1.00 ml
50 mM Tris-acetate buffer, PH 7.1	0.96 ml
^{3}H-Kainate (5-150 nM)	0.02 ml
unlabelled kainate (final concentration 0.1 mM) or buffer, test drug solution	0.02 ml
Incubation conditions	
incubation time	60 min.
incubation temperature	0-4°C

3回 washing したものを fresh and washed P_2 membranes とした。−20°C で 16～20 時間 frozen した P_2 を 0.02 % Triton X-100 / 50 mM Tris-acetate buffer, PH 7.1 に suspension し、37°C で 30 分間 incubation した後 $4.8\times10^4\times g$ で 5 分遠心し、その pellet を buffer で 3 回 washing したものを frozen and Triton X-100 treated P_2 membranes とした。

2) Sup-2 —— fresh な P_2 membranes を 50 mM Tris-acetate buffer, PH 7.1 で 3 回 washing する時に得られる supernatant を合せ、これを lyophilize し、蛋白量が約 30 μg/100 μl になるように buffer に suspension したものを Sup-2 として ^{3}H-kainate binding assay に用いた。

3) Standard assay of ^{3}H-kainate binding —— Table 1 に standard assay を示した。incubation mixture は Whatman GF/B filter 上で吸引ろ過され、buffer 10 ml で 3 回 washing し、filter を Aquasol 10 ml にとかして β線を測定した。routine assay は最終濃度 40 nM の ^{3}H-kainate で行なった。^{3}H-kainate の specific activity は 4 Ci/mmol で 53 % efficiency で count した。specific binding は total binding の約 60 % であった。

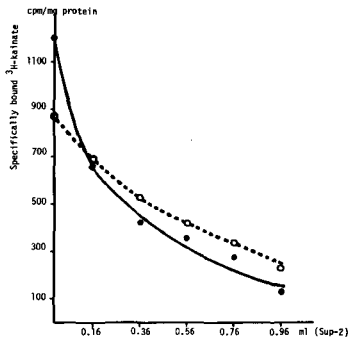


Fig. 1 Effect of Sup-2 on specific binding of ^{3}H-kainate. o--o Fresh and washed P_2 membranes in rat brain. ●—● Frozen and preincubated in 0.02 % Triton X-100 -buffer at 37°C for 30 min., and then washed P_2 membranes in rat brain.

4) Purification of endogenous inhibitor —— Sup-2 を Sephadex G-50 column にかけ 50 mM Tris-acetate buffer, PH 7.1 で溶出し、3 ml づつ集め 0.2 ml を binding system に加え inhibitor の溶出する分画を確認した。(Fig. 3) inhibition のかかる分画をプールして lyophilize し、それを水に溶かし Dowex 50 W x 8 column (H^+型) にかけ水で次いで 2M NH_4OH で溶出した。2 ml づつ集めた分画を lyophilize した後、50 mM Tris-acetate buffer, PH 7.1 2 ml に溶かして 0.1 ml を binding system に加え inhibitor の溶出する分画を確認した。(Fig. 4)

5) Chemical analysis —— 中性糖とヘキソサミンの検出は試料を 4N HCl (100°C, 16 時間) で水解後、Anthrone-H_2SO_4 法[16] と Elson-Morgan 法[6] で、シアル酸は 0.1 N H_2SO_4 (80°C, 1 時間) で水解後チオバルビツール酸法[22] で行なった。リンは Bartlett の方法[1] で、蛋白は 280 nm の吸光と Folin phenol 反応[9] 及び 4N HCl (100°C, 16 時間) で水解後、高速液体クロマトグラフでアミノ酸分析を行なった。試料を trypsin, α-chymotrypsin と 37°C で 3 時間反応させ、95°C で 15 分間 boiling して binding system に加え、試料の蛋白分解酵素に対する抵抗性を検討した。

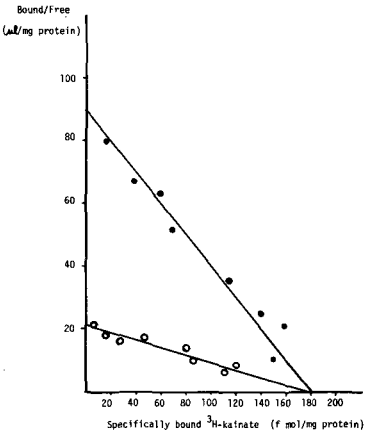


Fig. 2 Effect of Sup-2 on Scatchard plot analysis of ^{3}H-kainate binding to fresh and washed P_2 membranes in rat brain. ●—● No addition of Sup-2; K_d, 21nM, B_{max}, 180 f mol/mg protein, o—o Sup-2 0.76 ml; K_d, 82 nM, B_{max}, 176 f mol/mg protein.

〔結　果〕

Fig. 1 に示したごとく Sup-2 を ^{3}H-kainate binding system に加えると dose-dependent に inhibition がかかり、binding assay に用いた fresh and washed P_2 と frozen and Triton X-100 treated P_2 との間に差は認められなかったので、以後の実験は全て fresh and washed P_2 を用いた。Scatchard analysis を行ない Sup-2 の ^{3}H-kainate binding への影響を検討したのが Fig. 2 である。Wistar ラットの cerebral cortex と striatum における ^{3}H-kainate binding の B_{max} は 180 f mol/mg protein で K_d は 21 nM であるが、Sup-2 を 0.76 ml 加え

ると Bmax は 176 fmol/mg protein で Kd が 82 nM になる。即ち Sup-2 により binding sites の数には変化がおこらないが、binding sites に対する kainate の affinity が著明に減少することが示されている。

Sup-2 の中に存在する inhibitory compound のいくつかの性質を調べたのが Table 2 である。3日間、Tris-acetate buffer に対して dialysis を行なうと inhibition がきかなくなる。95°C、15分間の boiling やクロロホルムーメタノール(2:1)で3回抽出操作を加えても inhibitory compound の活性に変化は認められず、trypsin、α-chymotrypsin で処理しても活性は消失しなかった。種々の Amicon Diaflo membranes で Sup-2 をろ過し、ろ液と残液について活性を調べた。UM05 の場合、残液にのみ活性が認められた。UM2、YM5 ではろ液と残液の両側に活性が認められ、UM2 では残液に YM5 ではろ液により活性が認められたので inhibitory compound の分子量を 500～5000 と推定し、Sup-2 を Sephadex G-50 column にのせ inhibitory compound の精製を行なった。

Table 2 Some characteristics of inhibitory compound in Sup-2.

Addition		Specifically bound ^{3}H-kainate (cpm/mg protein)	% of control
None (Control)		864	100
Sup-2 (0.56 ml)			
Untreated		425	49
Dialysis (3 days)		920	106
Boiling (95°C for 15 min.)		397	46
Chloroform-Methanol(2:1) treatment		527	61
Trypsin treatment		475	55
alpha-Chymotrypsin treatment		449	52
Filtration through Amicon Diaflo membrane			
UM05	Filtrate (0.56 ml)	941	109
	Residue (0.56 ml)	294	34
UM2	Filtrate (0.56 ml)	734	85
	Residue (0.56 ml)	527	61
YM5	Filtrate (0.56 ml)	579	67
	Residue (0.56 ml)	613	71

Each value represents the mean from three separate experiments in triplicate.

Fig.3 に示したごとく、溶出液を 280 nm の吸収でモニターすると2つの peak が得られ、inhibitory compound はその peak に認められた。この分画を lyophilize し、水に溶解して Dowex 50W×8 (H^+) column にのせ、水でついで 2M NH_4OH で溶出し、それぞれを lyophilize して 50 mM Tris-acetate buffer, pH 7.1 2 ml に溶かし、280 nm の吸収でモニターしたのが Fig.4 である。水で溶出される小さな peak と 2M NH_4OH で溶出される大きな peak が認められ、inhibitory compound は 2M NH_4OH で溶出された。

inhibitory compound の認められる分画をプールし、化学的性質を検索した結果が Table 3 に示されている。中性糖、ヘキソサミン、シアル酸は認められなかった。Bartlett 法でリンが検出されないし、Sup-2 をクロロホルムーメタノールで3回抽出操作を加えても Sup-2 の活性は消失しないのでリン脂質の附着はないと考えられる。280 nm の吸収が認められ、Folin phenol 反応が陽性でアミノ酸組成を分析するとアルギニン、リジン、ヒスチジン、バリン、フェニールアラニンが検出された。SDS ディスク電気泳動で inhibitory compound の均一性と分子量の検索をしているが、かなり低分子の塩基性の蛋白で trypsin、α-chymotrypsin に resistant である。

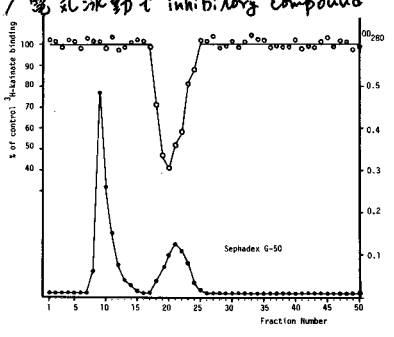


Fig. 3 Sephadex G-50 elution profile of endogenous inhibitor of ^{3}H-kainate binding to fresh and washed P_2 membranes in rat brain.

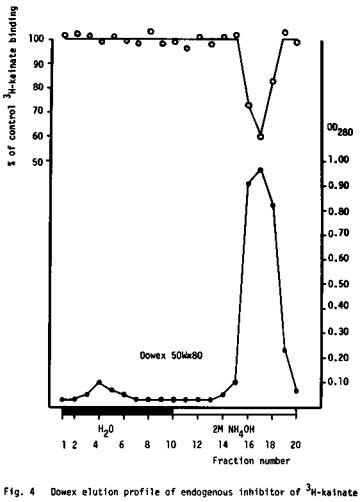


Fig. 4 Dowex elution profile of endogenous inhibitor of ^{3}H-kainate binding to fresh and washed P_2 membranes in rat brain.

〔考　察〕

kainate と glutamate receptor の関係は主としてザリガニの筋肉を用

いて電気生理学的に研究がなされてきたが、[19)21)] ^{3}H-kainate binding assay[19] 及び ^{3}H-glutamate binding assay[8] が出来るようになり、glutamate receptor と kainate binding sites が生化学的に論じられるようになった。glutamate の antagonist に kainate binding を抑制する力がない[3] こと、glutamate binding と kainate binding に対する Ca^{++} の作用が異なること[2)3)] などから glutamate receptor と kainate binding sites が別々のものであろうと考えられていたが、Michaelis ら[14] により、より直接的に示された。彼等は synaptic membranes を Na-cholate で処理すると kainate binding sites は可溶化されて減少するが、glutamate binding sites は可溶化されないことを示し、更に Na-cholate 処理する時に得られる supernatant の中に glutamate binding の inhibitor をみつけ、それが gangliosides であると報告している。今回、私達が報告した inhibitor は中性糖、ヘキソサミン、シアル酸が検出されず、また過酢により Sup-2 の活性が消失するので gangliosides ではない。私達の inhibitor は低分子の塩基性蛋白で glutamate binding system に加えても inhibition はかからない。

Table 3 Chemical characteristics of inhibitory compound.

Anthrone-H_2SO_4 reaction	(—)
Elson-Morgan reaction	(—)
Thiobarbituric acid reaction	(—)
Phosphorus	(—)
OD_{280}	(+)
Folin phenol reaction	(+)
Trypsin treatment	resistant
alpha-Chymotrypsin treatment	resistant

このような所見から glutamate receptor と kainate binding sites は別々のもので、それぞれの binding を調節する endogenous inhibitor が存在することが明らかになってきたが、kainate はどこに bound するのか、その binding sites と glutamate receptor の空間的機能的関係はどうなのか、kainate が bound するとどのようなことがおこるのか、Impulse がきて神経終末から glutamate が release され receptor と bound し synaptic transmission がおこる時に2つの inhibitor は生理的にはなにをしているのだろうか。これらの基本的問題が解決されないと Huntington's chorea の病因は解明されないようである。

〔文　献〕

(1) Bartlett G.R., J. Biol. Chem., 234, 466, (1959). (2) Baudry M., Arst D., Oliver M. and Lynch G., Developmental Brain Res., 1, 37, (1981). (3) Beaumont K., Maurin Y., Reisine T.D., Fields J.Z., Spokes E., Bird E.D. and Yamamura H.I., Life Sci., 24, 809, (1979). (4) Coyle J.T. and Schwarcz R. Nature, 263, 244, (1976). (5) Coyle J.T., McGeer E.G., McGeer P.L. and Schwarcz R., Kainic acid as a tool in neurobiology, ed. by McGeer E.G., Olney J.W. and McGeer P.L., Raven Press, New York, 139, (1978). (6) Elson L.A. and Morgan W.T.J., Biochem. J., 27, 1824, (1933). (7) Enna S.J. and Snyder S.H., Mol. Pharmacol., 13, 442, (1977). (8) Foster A.C. and Roberts P.J., J. Neurochem., 31, 1467, (1978). (9) Foster A.C., Mena E.E., Monaghan D.T. and Cotman, Nature, 289, 73, (1981). (10) Lowry O.H., Rosebrough N.J., Farr A.L. and Randall R.J., J. Biol. Chem., 193, 265, (1951). (11) London E.D. and Coyle J.T., Mol. Pharmacol., 15, 492, (1979). (12) London E.D., Yamamura H.I., Bird E.D. and Coyle J.T., Biol. Psychiatry, 16, 155,(1981).(13) McGeer E.G., and McGeer P.L., Nature, 263, 517, (1976). (14) Michaelis E.K., Michaelis M.L., Chang H.H., Belieu R.M. and Grubbs R.D., Amino acid neurotransmitters, ed. by DeFeudis F.V. and Mandel P., Raven Press, New York, 387, (1981). (15) Olney J.W., Rhee V. and Ho O.L., Brain Res., 77, 507, (1974). (16) Roe J., J. Biol. Chem.,212, 335, (1955). (17) Shinozaki H. and Konishi S., Brain Res., 24, 368, (1970). (18) Shinozaki H. and Shibuya I., Neuropharmacol., 13, 1057, (1974). (19) Simon J.R., Contrera J.F. and Kuhar M.J., J. Neurochem., 26, 141, (1976). (20) Takemoto T., Kainic acid as a tool in neurobiology, ed. by McGeer E.G., Olney J.W. and McGeer P.L., Raven Press, New York, 1, (1978). (21) Takeuchi A. and Onodera K., Neuropharmaco., 14, 619, (1975). (22) Warren L., J. Biol. Chem., 234, 1971, (1959).

71 ラット脳のVIP(vasoactive intestinal polypeptide)受容体

小川紀雄・水野幸子・塚本修司
森　昭胤(岡大・医・脳研)
貫名　至(同・III内)

〔要　約〕

VIP (vasoactive intestinal polypeptide) の中枢神経における作用解明の基礎的検討の目的で、ラット脳シナプス膜を用いた radioreceptor assay (RRA) の開発を試みた。VIPはTyr基を有するので、lactoperoxidase 法により ^{125}I-VIPを作成し、比活性 300 μCi/nmol のものを得、これをリガンドとして使用した。RRAは氷水中で行い、B·Fの分離にはマイクロ遠沈器による遠沈法を用いた場合が最もよい結果が得られた。RRAに際しては、少量の Mg^{2+}, Ca^{2+}, Mn^{2+} などの存在で特異的結合は著しく大きくなった。ラットシナプス膜はVIPの single class の高親和性結合部位を有した (Kd=9.8nM, B_{max}=0.9pmol/mg protein)。このVIP-RRA系は、VIPやsecretinのC鎖側 fragment がごくわずか交叉反応を示すのみで、他の活性アミンや神経ペプチドに全く交叉反応を示さず、VIPに特異的であった。ラット脳のVIP receptorは、海馬、線条体、大脳皮質に高濃度に存在することが判明し、これらの脳部位でのVIPの生理的役割を解明する必要性が示唆された。

Key words : VIP(vasoactive intestinal polypeptide),CNS-receptor,radioreceptor assay(RRA)

VIP (vasoactive intestinal polypeptide) は Said & Mutt によってブタの十二指腸から単離されたもので,[16][17] Fig.1 に示すように 28個のアミノ酸が直鎖的に配列している分子量 3389 のペプチドである。[9] このアミノ酸配列は、secretin や glucagon の構造と比較的類似しており,ことに, secretin はN端より 1, 2, 3, 6, 7, 12, 13, 14, 23 が VIP と同一のアミノ酸からなることが注目される (Fig. 1)。

VIPの特異的な radioimmunoassay や, immuno-histochemical な方法による研究から, VIPは消化管の粘膜層や粘膜下層ばかりでなく、神経線維や腸管神経叢の神経細胞にも存在することが明らかとなった。[7] さらに、種々の動物の脳にも高濃度に分布することが知られるようになった。[1][5][10] VIPは synaptosome 分画に認められ、Ca^{2+} 存在下では高濃度の K^+ によって放出され,[2][6] また、脳において adenylate cyclase-cyclic AMP を増加させる,[2][3] など、中枢神経系において生理的な役割を担っている可能性が示されている。しかし、VIPの中枢作用の詳細はまだ十分に明らかにされておらず、VIPの中枢作用部位である脳の受容体の研究も、わずかに、Robberecht ら[14][15]や、Taylor & Pert[20]の報告をみるにすぎないようである。今回我々は,ラット脳を用いて、VIPの

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
VIP	His	Ser	Asp	Ala	Val	Phe	Thr	Asp	Asn	Tyr	Thr	Arg	Leu	Arg	Lys
secretin	His	Ser	Asp	Gly	Thr	Phe	Thr	Ser	Glu	Leu	Ser	Arg	Leu	Arg	Asp
glucagon	His	Ser	Gln	Gly	Thr	Phe	Thr	Ser	Asp	Tyr	Thr	Lys	Tyr	Leu	Asp

	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28 (29)
VIP	Glu	Met	Ala	Val	Lys	Lys	Tyr	Leu	Asn	Ser	Ile	Leu	Asn-NH_2
secretin	Ser	Ala	Arg	Leu	Gln	Arg	Leu	Leu	Gln	Gly	Leu	Val	-NH_2
glucagon	Ser	Arg	Arg	Ala	Gln	Asp	Phe	Val	Gln	Trp	Leu	Met	Asp-Thr

Fig.1. VIP, secretin, glucagon のアミノ酸配列

radioreceptor assay (RRA) の開発を試み、VIP receptor のラット脳内分布を明らかにすると共に、従来から我々が行って来た、神経ペプチドの RRA の方法との違いについて考察したい。

〔方法〕

1) receptor 標品の作成

SD 系雄ラットの脳を用いて、既報の方法[12]に準じて粗シナプス膜分画(P2分画)を作成し、250 μg protein/100 μl となるように調整した。また、脳内の receptor の分布を調べるためには、すでに報告した方法[11]に準じて、脳ホモジネートを作成したが、使用にあたっては 150 μg protein/100 μl に調整した。receptor 標品はいずれも Tris buffer (50 mM-Tris/HCl buffer, pH 7.6) に懸濁し、タンパク量の定量は、Lowry らの方法[8]によった。

2) ^{125}I-VIP の作成

RRA のためのリガンドとして、lactoperoxidase 法により VIP の Tyr 基に ^{125}I を標識した。標識の条件は、すでに報告した ^{125}I-somatostatin 作成の時と全く同様である[10]。^{125}I-VIP と未反応の Na^{125}I との分離は、Sephadex G-25 カラム (1×50 cm) によるゲル沪過によって行い、elution buffer には 0.3 M acetic acid / 1 M urea を用いた。通常 specific activity 200 μCi/nmol の ^{125}I-VIP が得られた。

3) RRA の手順

RRA 用の assay buffer 及び dilution buffer としては 5 mM $MgCl_2$, 1% 牛血清アルブミン, 100 μg/ml bacitracin を含む Tris buffer を用いた。RRA はプラスチック製マイクロチューブ (東亜医用電子, MT-40) に、100 μl assay buffer, 50 μl ^{125}I-VIP (最終濃度 3.4×10^{-10} M), 100 μl receptor 標品を入れ、氷水中 (~1°C) で 60 分間 incubate した。incubation 終了後、氷冷 0.32 M sucrose 液 (Tris buffer で作成, 1% 牛血清アルブミン及び 5 mM $MgCl_2$ 含有) 1 ml を加え、Kubota KA-10500 A 型マイクロ遠沈器で 15,000×g, 1 分間遠沈。上清を吸引除去した後、再び同一の sucrose 液 1.4 ml を加え同様に遠沈。その沈渣を γ-カウンターで測定した。specific binding は total binding から、1 μM VIP の存在下での結合放射能量を差引いて求めた。通常、過量の VIP により結合量の 70% が displace された。

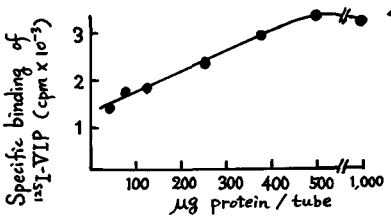


Fig. 2. ^{125}I-VIP 特異的結合に及ぼす receptor タンパクの量の影響.

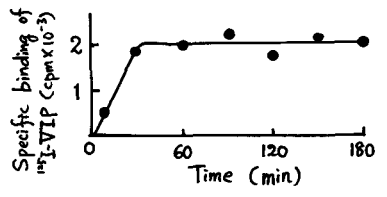


Fig. 3. ^{125}I-VIP 特異的結合に及ぼす incubation 時間の影響.

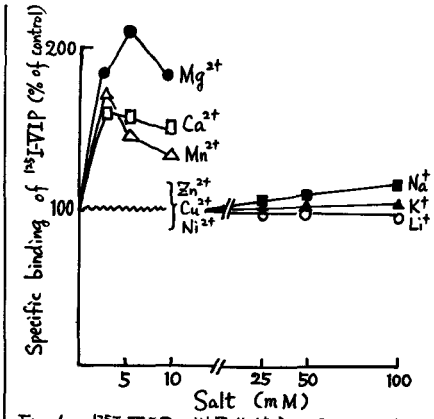


Fig. 4. ^{125}I-VIP の特異的結合に及ぼす陽イオンの効果.

〔結果〕

VIP-RRA 系に使用する receptor 標品量を検討したところ、500μg protein/tube まで receptor 量を増量するに従って、直線的に ^{125}I-VIP の特異的結合は増加した (Fig. 2.)。以下通常の RRA には 250μg protein/tube を使用した。

次に incubation 時間を検討したが、特異的結合は時間と共に比較的急速に増加し、45~180 分の間では平衡状態を保った (Fig. 3.) ので、通常の RRA では、incubation 時間を 60 分とした。

RRA assay buffer から、Mg^{2+} を除いたものを作成し、各種の陽イオンを Cl 塩で添加し、その影響をみた (Fig. 4.)。2価の陽イオンのうち、Mg^{2+}, Mn^{2+}, Ca^{2+} の 2.5~10mM の存在で、特異的結合が著しく大きくなり、他の Zn^{2+}, Cu^{2+}, Ni^{2+} などの 2 価の陽イオンは、特異的結合に影響を持たなかった。Na^{+}, Ka^{+}, Li^{+} などの 1 価の陽イオンは 100mM の濃度まで添加しても VIP の特異的結合には影響しなかった。

VIP-RRA の標準曲線と特異性を Fig. 5. に示す。静岡薬科大学 矢内原昇教授より供与された VIP_{11-28} 及び、$secretin_{7-27}$ はこの RRA 系では交叉反応性が極めて小さかった。また glucagon は全く交叉反応性を示さなかった。その他 $ACTH_{1-24}$, β-endorphin, TRH, acetylcholine, dopamine, GABA 等は、10μM の濃度でも ^{125}I-VIP の receptor 結合を阻害しなかった。以上からこの RRA 系は、VIP に特異的なものと考えられる。

Fig. 5. に示した標準曲線のデータを Scathard 分析すると、Fig. 6. のようになり、K_d = 9.8 nM, B_{max} = 0.9 pmol/mg protein であった。

ラット脳における VIP receptor の分布を特異的結合で検討してみると (Table 1.)、hippocampus, striatum, cerebral cortex (frontal lobe) に多く、brain stem, cerebellum では著しく少なかった。

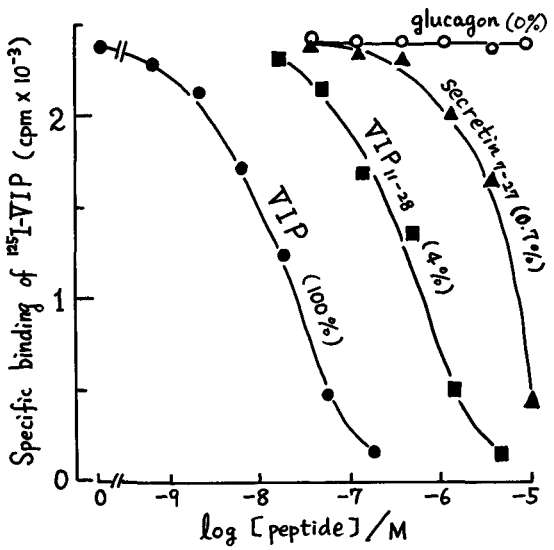


Fig. 5. VIP-RRA の標準曲線と VIP_{11-28}, $secretin_{7-27}$, glucagon の交叉反応性. ( ) 内は交叉率.

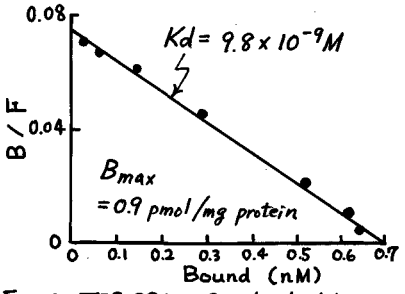


Fig. 6. VIP-RRA の Scatchard plot.

Table 1. Regional distribution of VIP-receptor binding in rat brain.

Region	Specific binding of VIP (fmol/mg protein)
Hippocampus	40.1 ± 4.8
Striatum	39.2 ± 3.4
Cerebral cortex	34.0 ± 1.9
Olfactory bulb	24.2 ± 2.0
Thalamus+Midbrain	19.3 ± 3.0
Hypothalamus	16.2 ± 2.7
Brain stem	8.2 ± 0.9
cerebellum	6.0 ± 0.3

Samples of each receptor preparation were incubated with 0.85 nM ^{125}I-VIP. Values shown the mean ± SEM of three experiments.

〔考按〕

RRAを用いた中枢神経のreceptorの研究を行うには 放射性物質で標識されたリガンドが必要である。多くの神経伝達物質や、enkephalin, TRHなどの小神経ペプチドは[3H]で標識されたものがよく使用される。しかしながら、VIPの標識されたものは、入手が不可能であったので〔^{125}I〕で標識した。VIPはsomatostatinやsubstance Pとは異なって、その構造にTyr基を含むので、lactoperoxidase法またはchloramine T法で直接ヨード化が可能である。前者の方法を採用した理由は標識される物質が変性することの少ないことが広く知られているからである。^{125}I-VIPは-70°Cに保存すれば、少なくとも2週間は安定であった。

VIP-RRA系では少量のMg^{2+}, Ca^{2+}の添加により特異的結合が著しく増大し、この点ではenkephalin-RRA, TRH-RRAとは大きく異なり、[13] むしろ下垂体ホルモンである成長ホルモンやプロラクチンのRRAと類似している。[19] これはVIPがenkephalinやTRHよりはるかに大分子であり、古典的な意味でのホルモン的な性格を残しているためかもしれない。

B-Fの分離方法として Robberechtら[14]は、Millipore filterによる吸引沪過法を用いているが、我々はglass fiber paperによる吸引沪過法，50%硫安による塩析法，エタノール処理法等を試みたが、いずれも非特異的結合が著しく大きく、よい結果が得られなかった。これはVIPが吸着性が強く、filterや試験管壁に吸着してしまうためと思われる。

ラット脳のVIP receptorの分布を特異的結合で調べた結果をTable Iに示したが、Taylor & Pertの成績[20]と平行するものの、約4倍の高値であった。これは我々が彼らの実験より約3倍多い^{125}I-VIPを使用したという、方法の差異によるものと思われる。VIP receptorの分布は、ラット脳のimmunoactive VIPの分布[1]と比較的相関したが、視床下部はVIP含量の割にVIPのreceptorが少なかったが、これは視床下部のVIPが下垂体門脈を通って、下垂体に作用し、下垂体ホルモンの分泌に関与するものであることを示唆する。VIP receptorが、海馬，線条体，大脳皮質に高濃度に検出されたことから、これらの脳部位でのVIPの生理的機能の解明に力を注ぐ必要がある。

（謝辞：VIP及びsecretin fragmentを提供して下さいました静岡薬科大学矢内原昇教授に感謝します。なお、本研究の一部は文部省科学研究費に依った。）

〔文献〕

1) Besson,J.,Rotsztejn,W.,Laburthe,M.,Epellbaum,J.,Beandent,A.,Kordon,C. & Rosselin,G.(1979) Brain Res., 165, 79-85. 2) Borghi,C.,Nicosia,S.,Giachetti,A. & Saed,S.I.(1979) Life Sci., 24, 65-70. 3) Deschodt-Lanckman,M.,Robberecht,P. & Christophe,J.(1977) FEBS Lett.,83, 76-80. 4) Emson,P.C.,Fahrenkrug,J., Schaffalitzky,O.B.de Muckadell,Jessell,T.M. & Iversen,L.L.(1978) Brain Res.,143, 174-178. 5) Fahrenkrug, J. & Schaffalitzky,O.B.de Muckadell(1978) J.Neurochem.,31, 1445-1451. 6) Giachetti,A.,Said,S.I., Reynolds,R.C. & Koniges,F.C.(1979) Proc.Natl.Acad.Sci.USA,74, 3424-3428. 7) Larrsson,L.I.,Fahrerkrug, J.,Shaffalitzky,O.B. de Miclade;;,Sundler,F.,Hakanson,R. & Rejfeld,J.F.(1976) Proc.Natl.Acad. Sci.USA,73, 3191-3200. 8) Lowry,O.H.,Rpsembrough,N.J.,Farr,A.L. & Ramdall,R.J.(1951) J.Biol.Chem.,193, 265-275. 9)Mutt,V. & Said,S.I.(1974)Eur.J.Biochem.,42, 581-589. 10) Ogawa,N.,Thompson,T.,Friesen,H.G.,Martin.J.B. & Brazeau,P.(1977)Biochem.J.,165, 269-277. 11)Ogawa,N.,Yamawaki,Y.,Kuroda,H.,Ofuji,T.,Itoga,E. & Kito,S.(1981)Brin Res.,205, 169-174. 12) Ogawa,N.,Yamawaki,Y.,Kuroda,H. & Ofuji,T.(1981)Neuroscience Lett.,23, 215-218. 13) Ogawa,N.,Yamawaki,Y.,Kuroda,H.,Ofuji,T.,Itoga,E. & Kito,S.(1981)Neurotransmitter receptors: Biochemical aspect and physiological significance.(Yoshida,H. & Yanamura,H.I.,eds.)John Wiley & Sons,Inc., U.S.A.,(inpress) 14) Robberecht,p., de Neef,P.,Lammens,M.,Deschodt-Lanckman,M. & Christophe,J-P.(1978) Eur.J.Biochem.,90, 147-154. 15) Robberecht,R.,König,W.,Deschodt-Lankman,M.,de Neef,P. & Christophe,J. (1979) Life Sci.,25, 879-884. 16)Said,S.I. & Mutt,V.(1970) Nature,225, 863-864. 17) Said,S.I. & Mutt,V. (1972) Eur.J.Biochem.,28, 199-204. 18) Said,S.I. & Rosenberg,R.N.(1976) Science,192, 907-908. 19) Shiu, R.P.C.,Kelly,P.A. & Friesen,H.G.(1973)Science,180, 968-971. 20) Talor,D.P. & Pert, C. (1979) Pro. Natl. Acad. Sci. USA, 76, 660-664.

72 High affinitive GABA receptor site をもつ synaptic membrane の精製

栗岡　普・堀　誠治・松田　誠
（慈恵医大・医化）

〔要　約〕

Rat crude synaptic membrane への[3H]GABA結合に与える各種 detergents の影響について調べ、GABA receptor 可溶化の為の基礎的条件，及び可溶化に適する membrane の調製について検討した。

1. Synaptic membrane への[3H]GABA結合量は 1%以下の Triton X-100, Octylglucaside によって変化しない。ionic detergents は 1%以下の濃度でも[3H]GABA結合量を減少させるが、detergent の種類によってその程度は大きな違いがみられた。
2. 1M KCl-1% Triton X-100 を含む Tris 緩衝液で処理しても、membrane への[3H]GABA結合量にはほとんど変化がなく、比結合量は増加した。このときの[3H]GABA結合は muscimol によって displaceable であり、infinite dilution で解離し、Kd は 9.5 nM と 171 nM であった。以上の結果はこの[3H]GABA結合が high affinitive GABA receptor への結合であることを示し、GABA receptor をもつ membrane として精製できたことを示している。
3. 2.で述べた membrane は、蔗糖密度勾配遠心でさらに精製することができた。精製した membrane の phospholipid/protein (w/w) は 0.115 であった。

Key words : GABA receptor, synaptic membrane

今迄に、rat synaptic membrane の GABA receptor の性質を明らかにしてきたが(1-3)、今回は GABA receptor への[3H]GABA結合が各種 detergents により如何なる影響を受けるかを検討した。最近になって、各種の哺乳動物の synaptic membrane から、GABA receptor を可溶化した報告(4-7)がみられるが、可溶化時の収率など不明確な点も多い。GABA receptor を可溶化する前に、membrane レベルでの精製を試みることは、receptor の可溶化前後の性質を明確に把握し、可溶化時の収率を明らかにする為に必要なことである。今回は、synaptic membrane を 1M KCl-1% Triton X-100 で処理することにより、high affinitive GABA receptor をもち、可溶化に適する membrane を精製することができたので報告する。

〈実験方法〉

Crude synaptic membrane (syn. memb.)：Rat syn. memb. は Zukin らの方法により調製し、0.05% Triton X-100 処理，凍結，融解、洗滌を繰り返し、既報(3)のように Na^+ dependent GABA uptake site を含まない syn. memb (0.05% TX-Syn. memb) を得た。

[3H] GABA binding assay：[3H] GABA (40 Ci/mmol) をリガンドとし、10 mM Tris-SO4 (pH 7.4) を溶媒として、0-5°C で 20 分間放置後、遠心法又は沪過法により特異的結合量を求めた。この時、1mM GABA 共存下での結合量を非特異的結合量とし、ブランクとした。

Detergent 処理：次の各 detergents を用いた。1) nonionic; Triton X-100 (TX), Octyl-glucoside (OG)　2) anionic; sodium dodecylsulfate (SDS), sodium deoxycholate (DC)

3) cationic : lauryltrimethylammonium (LT), lauroylcholine (LC), stearyltrimethylammonium (ST)。 syn. memb. の処理は 600~800 μg. of memb. protein / 400 μl を 5°C で 20 分間放置後, 35,000 g で 20 分間遠心し、pellet を 10 mM Tris-SO4 (pH 7.4) で洗滌, 再ペレットとすることによった。detergent 処理した syn. memb はそれぞれ用いた detergent の濃度、略号をつけ、例えば 1% TX-syn. memb のようにあらわした。

蔗糖密度勾配遠心：1 MKCl-1% TX-10 mM Tris-SO4 (pH 7.4) をベースにして、0.1 M, 0.3 M, 1.0 M, 1.5 M の不連続な蔗糖密度勾配を作製した (Fig. 4)。0.05% TX-Syn. memb を 1 MKCl-1% TX で処理し、その 10^5 g pellet を 蔗糖 0.1 M を含む上記溶媒に再懸濁し、0.3 M 蔗糖を含む溶媒上に重層し、80,000 g 90 分間遠心した。

〈実験結果〉

[3H]GABA 結合量の detergent 処理による変化

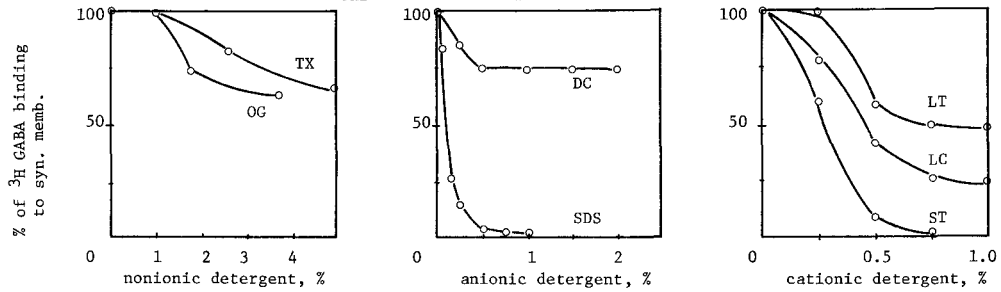


Fig.1 Effect of detergents on ^{3}H GABA binding to syn. memb.

detergent 処理後の syn. memb への [3H]GABA 結合は、detergent 処理前の syn. memb. (0.05% TX-syn. memb) への [3H]GABA 結合量の % として Fig. 1 に示した。binding assay は 20 nM [3H]GABA を用い、遠心法によった。nonionic detergent 1% 以下では結合量に変化はみられなかった。これに対して、ionic detergent は 1% 以下の低濃度でも結合量の低下をもたらし、特に SDS, ST ではほとんどの結合が失われた。detergent 処理の上清についての [3H]GABA binding assay は polyethyleneglycol による沈澱法で試みたが、共存する detergent に影響され assay 不可能なものもあった。TX, DC および ST は assay 可能であり、特に ST 処理上清には失われた [3H]GABA 結合がほぼ定量的にみいだされた。しかし 5°C, 24 時間内に完全に失活した。又塩類溶液の添加で凝集した。

1% TX- および 1% OG-syn. memb への [3H]GABA 結合

Fig. 1 で明らかなように [3H]GABA 結合量は 1% TX 及び 1% OG で処理しても変らない。Fig. 2 は 1% TX 及び 1% OG-Syn·memb への [3H]GABA 結合の性質の一部を示すものであり、比結合量の増加、非特異的結合量の低下を示している。又両 Syn-memb への [3H]GABA 結合は GABA agonist の muscimol により displace され, infinite dilution により速かに dissociate される性質をもち, GABA receptor への結合であると考えられた。1% TX 及び 1% OG の上清には特異的 [3H]GABA 結合はなかった。

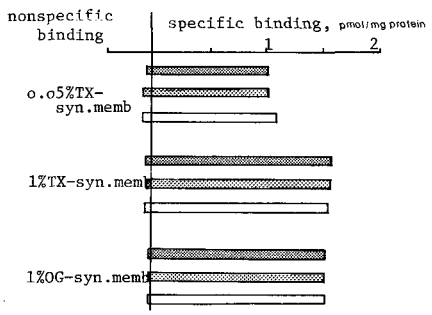


Fig.2 ^{3}H GABA binding displaced by GABA(▩), muscimol(▩)and infinite dilution(□)

1MKCl-1%TX-Syn. memb への [3H] GABA 結合

0.05% TX-Syn-memb を 1MKCl-1%TX-10mM Tris-SO4 (pH 7.4) で処理し、$10^5 g$・20分遠心し、pellet として 1M-KCl-1% TX syn-memb を得た。この memb への [3H] GABA 結合量を Fig.3 に示すように、処理前と比べて殆んど変らなかった。しかし大量の蛋白質が可溶化除去されるので比結合能は 2.4~2.5 倍に増加した。1MKCl-1%TX処理した pellet と sup. との binding activity の割合は 1:0.15 であった。この memb への [3H] GABA結合を GABA agonist である muscimol により displace され、infinite dilution により速やかに dissociate されるので GABA receptor site への結合を意味していると考えた。この memb. は Fig.4 に示すような不連続蔗糖密度勾配遠心により、さらに精製することができた。遠心後 ⓐ.ⓑ.ⓒ の各分画を集め、[3H]GABA

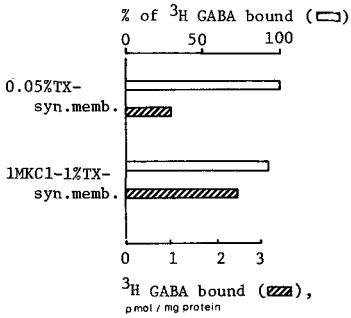


Fig.3. Effect of 1MKCl-1%TX on ^{3}H GABA binding to syn. memb.

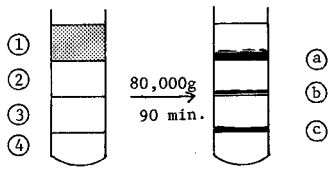


Fig.4. Sucrose density gradient centrifugation of 1MKCl-1%TX-syn.memb. ① 0.1M, ② 0.3M, ③ 1.0M, ④ 1.5M-sucrose

結合、蛋白質およびリン脂質含量を測定した結果が Table I に示されている。ⓒ分画に [3H] GABA結合の 93%以上が存在していた。ⓐ分画はリン脂質含量が高いが、ⓒ分画は低かった。Fig.5 は ⓒ 分画を用いて [3H] GABA 結合の濃度依存性をみたものである。完全に saturable な結合であり、Scatchard plot から Kd 9.5 および 17.1nM と求められた。なお、Table I および Fig. 5 の [3H] GABA binding assay は GF/c (Whatman) を用いて沪過法でおこなわれたものであるが遠心法にくらべ [3H] GABA結合量は低く求められた。しかし Kd 値には変化がなかった。0.05% TX-Syn. memb では同定できた low affinitive (Kd 80~150nM) GABA receptor は、精製した syn. memb では同定できなかった。

Table I

fraction	^{3}H GABA bound* (dpm)	protein (μg / 100 mg brain eq.)	phospholipid**
ⓐ	282 (0.8%)	49.7 (15.5%)	2.57
ⓑ	2,026 (5.6%)	74.9 (23.4%)	0.47
ⓒ	33,509 (93.6%)	196.1 (61.1%)	0.11

* ^{3}H GABA 20 nM, 100 mg brain eq.
** mg/mg protein

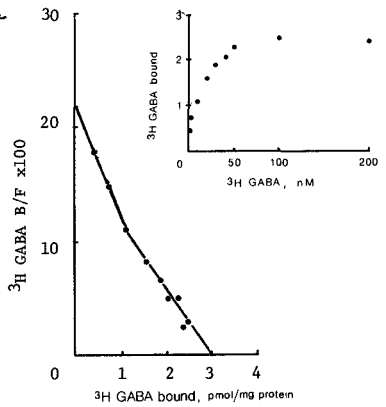


Fig.5 Scatchard plot analysis of ^{3}H GABA binding to 1MKCl-1%TX-syn.memb.

〈考 察〉

Matus & Pehling (8) は rat syn. memb を TX 処理した標品には synapse の超微細構造物である postsynaptic density が多く、そこに high affinitive GABA receptor が存在することを明らかにしている。これは、rat syn. memb を 1% TX または 1M KCl-1% TX で処理しても high affinitive GABA receptor は memb に存在しているとする今回の我々の結果と一致する。Gavish & Snyder (5) は calf brain の syn. memb の GABA receptor を 1% TX で可溶化、精製しているが、これは GABA receptor の種族差を反映しているのかもしれない。

rat syn. memb を 1M KCl-1% TX で処理しても、[3H]GABA 結合量が変化てないことは、内在性 GABA または inhibitor の除去による syn. memb への結合量の増加と、一部可溶化による結合量の減少とが偶然に相殺された結果とする考え方は、処理上清の[3H]GABA binding assay から否定できた。したがって、今回の結果は、high affinitive GABA receptor を維持した状態で memb として精製されたとするのが妥当である。Fig. 5 の結果から low affinitive GABA receptor の存在を同定することができないが、その原因は現在のところ不明である。

rat の syn. memb からの GABA receptor の可溶化は 1M KCl-0.2% DC によりおこなわれている (4,6,7)。しかし、いずれも定量的な可溶化ではないようである。Matus & Taff-Jones (9) は rat syn. memb を TX, ついで DC で処理することにより、疎水性にとんだ postsynaptic junctional lattice と呼ばれるものが得られることを報告している。この lattice には GABA receptor は存在していない (8)。これらのことは、DC は postsynaptic density にあったと考えられる GABA receptor を可溶化できることを示唆していて興味ぶかい。先に述べたように DC によってなおも GABA receptor を定量的に可溶化できないのは、多分、syn. memb の精製が不十分であるうえ、detergent として DC のみを使用していることに原因があるのかもしれない。

1M KCl-1% TX 処理によって Fig. 4 の ⓐ 分画を除去できるが、この分画はリン脂質含量が高い。逆に GABA receptor の存在する ⓒ 分画はリン脂質含量が低く、intact な syn. memb の単位蛋白質重量あたりのリン脂質含量と比較すると 1/9~1/7 にすぎない (10)。このこと自体は、GABA receptor がリン脂質分解酵素によって影響を受けないという事実と矛盾しない。現在、精製した memb を用いて、GABA receptor の定量的な可溶化をすべくその方法を検討中である。

〈文 献〉

(1) Kurioka S. and Matsuda M. (1981) J. Neurochem. 36, 313-316.

(2) Kurioka S., Hayata H. and Matsuda M. (1981) J. Neurochem. 37, 283-288.

(3) Kurioka S., Kimura Y. and Matsuda M. (1981) J. Neurochem. 37, 418-421.

(4) Greenlee D.V. and Olsen R.W. (1979) Biochem. Biophys. Res. Comm. (1979) 88, 380-387.

(5) Gavish M. and Snyder S.H. (1981) Proc. Natl. Acad. Sci. 78, 1939-1942.

(6) Asano T. (1980) 昭和55年薬理学会総会 抄録集 p. 224

(7) Ito Y. and Kuriyama K. (1981) 昭和56年薬理学会総会 抄録集 p. 117

(8) Matus A. and Pehling G. (1981) J. Neurobiology 12, 67-73.

(9) Matus A. and Taff-Jonest D.H. (1978) Proc. R. Soc. Lond. B. 203, 135-151.

(10) Breckenridge W.C., Gombos G., and Morgan I.G. (1972) Biochim. Biophys. Acta 266, 659-707.

73 GABA受容体およびbenzodiazepine受容体に対するGABA構造類似体の作用の差異

水野幸子・塚本修司・小川紀雄・森　昭胤
（岡大・医・脳代謝研・機能生化）

〔要　約〕

GABA receptor および benzodiazepine (BDZ) receptor に対するGABA分子の構造－結合相関を知る目的で実験を行った。rat 脳P2分画をreceptorとし、[3H]-GABAをligandとするradioreceptor assayを行い、GABA receptor に対する約50種のGABA構造類似体の交叉反応性を調べ、その内数種の物質については、それらのBDZ-radioreceptor assayに対する影響についても検討した。GABA receptor に対する交叉性を持つためには、カルボキシル基は必ずしも必要ではないが、アミノ基はfreeの状態で存在することが要求される。また、α位の炭素とアミノ基までの距離が一定の範囲を越えると交叉性を失い、交叉性の大小は物質の立体特異性に左右されることが判明した。また、GABA自身の有するBDZ receptor親和性上昇作用のためには、GABA receptor への交叉反応性が必要であるが、GABA receptor への交叉反応性で差の見られたd-GABOBとl-GABOBの間にBDZ receptor の親和性上昇作用では差が認められなかった。これはBDZ receptorへの作用には、GABA receptorへの結合とは異なって、β位の炭素の立体特異性が重要ではなく、GABA分子のGABA receptor への結合部位と、BDZ receptor への作用部位は異なった分子の部位であることを示唆する。

Key words：　GABA receptor , Benzodiazepine receptor , Stereospecificity

---

γ-aminobutanoic acid (GABA) は脳内に多く存在する抑制性神経伝達作用のあるアミノ酸であり、[4][5] 近年このreceptorに関する研究が進み、ことにbenzodiazepine (BDZ) との相互作用はよく知られるところとなっている。BDZの存在下でGABA receptor の親和性が上昇し、逆に、GABAの存在下でBDZ receptor の親和性が上昇する。[1][2][7][8] しかしながら、前者については GABA modulinを介するという仮説があるものの、詳しい機序は未解決のままである。今回、我々は種々のGABA構造類似体を用いてreceptorレベルでの解析を行い、GABA receptor とBDZ receptor に対するGABA分子の作用に差異を見出したので報告する。

〔方法〕

(A) GABA-radioreceptor assay (GABA-RRA)：SD系雄rat (200~250g) を断頭屠殺し、すみやかに脳を取り出し10容量の氷冷0.32 M sucrose 中でホモゲナイズ (Brinkman Polytron PT-10, dial set 7, 10秒×2回) し、ガラスホモゲナイザーで軽くホモゲナイズした後、900×g, 4°C で10分間遠沈し、上清をさらに11,500×g で20分間遠沈した。その沈渣 (P2分画：mitochondria-synaptosome 分画) を10容量のTris緩衝液 (50 mM-Tris/HCl pH7.6) に懸濁し、50,000×g, 4°C で20分間遠沈して得られたpelletに、100 容量Tris緩衝液 (0.05％のTriton X-100含有) を加え37°Cの温浴中で30分間振盪しながらインキュベートし、さらに、50,000×g, 4°C で20分間の遠沈を2回繰り返した後pelletを500μg protein/mlとなるようにTris緩衝液で再懸濁し、これをreceptorとした。GABA-RRAによるGABA構造類似体の交叉反応性を調べるには、0.5ml のreceptor, 0.3mlのTris緩衝液, 0.1mlの試料 (4~7種の濃度のもの), 0.1ml の[3H]-GABA (specific activity 50 Ci/mmol, 最終濃度

Table 1. Relative potency of GABA related compounds in GABA-RRA and BDZ-RRA

Name	Chemical structure	Potency in GABA-RRA(%)	Potency in BDZ-RRA V_{max}/EC_{50}
GABA	$H_2NCH_2CH_2CH_2COOH$	100.0	21.8
homotaurine	$H_2NCH_2CH_2CH_2SO_3H$	87.5	2.0
homohypotaurine	$H_2NCH_2CH_2CH_2SO_2H$	16.3	
d-GABOB	$H_2NCH_2CH(OH)CH_2COOH$	10.0	1.3
3-guanidinopropanoic acid	$H_2NC(NH)NHCH_2COOH$	3.7	
2-hydroxyhomotaurine	$H_2NCH_2CH(OH)CH_2SO_3H$	3.5	
l-GABOB	$H_2NCH_2CH(OH)CH_2COOH$	2.3	1.1
guanidinoacetic acid	$H_2NC(NH)NHCH_2COOH$	2.1	
GABA-choline	$[H_2NCH_2CH_2CH_2COOCH_2\overset{+}{N}(CH_3)_3]Cl^-$	2.0	
5-aminovaleric acid	$H_2NCH_2CH_2CH_2CH_2COOH$	1.1	0.5
4-amino-4-methylvaleric acid	$H_2NC(CH_3)_2CH_2CH_2COOH$	0.7	
β-ethylthio-GABA	$H_2NCH_2CH(SC_2H_5)CH_2COOH$	0.7	
3-amino-2-hydroxyhomotaurine	$H_2NCH_2CH(OH)CH_2SO_3H$	0.5	
β-alanine	$H_2NCH_2CH_2COOH$	0.3	0.2
taurine	$H_2NCH_2CH_2SO_3H$	0.2	
L-2-amino-3-guanidinopropanoic acid hydrochloride	$H_2NC(NH)NHCH_2CH(NH_2)COOH\cdot HCl$	0.2	
DL-4-guanidino-3-hydroxybutanoic acid	$H_2NC(NH)NHCH_2CH(OH)CH_2COOH$	0.1	
GABA-L-cystathionine	$H_2NCH_2CH_2CH_2CONHCH(COOH)CH_2S$ $H_2NCH(COOH)CH_2CH_2$	0.1	0.2
4-guanidinobutanoic acid	$H_2NC(NH)NHCH_2CH_2CH_2COOH$	0.03	
d-GABOB-L-cystathionine	$H_2NCH_2CH(OH)CH_2CONHCH(COOH)CH_2S$ $H_2NCH(COOH)CH_2CH_2$	0.02	
DL-2,4-diaminobutanoic acid	$H_2NCH_2CH_2CH(NH_2)COOH$	0.02	
l-GABOB-L-cystathionine	$H_2NCH_2CH(OH)CH_2CONHCH(COOH)CH_2S$ $H_2NCH(COOH)CH_2CH_2$	0.01	
4-amino-3-ethylsulfonyl-butanoic acid	$H_2NCH_2CH(SO_2C_2H_5)CH_2COOH$	0.01	

ineffective compounds in GABA-RRA; GABOB-histidine, L-homocysteic acid, D-homocysteine sulfinic acid, DL-hydroxy-2-pyrrolidinone(GABOB lactam), glycine, baclofen, γ-glutamylhistidine, D-glutamic acid, butanoic acid, valeric acid, DL-3-amino-n-butanoic acid, L-glutamic acid, 2-amino-iso-butanoic acid, 6-amino-n-caproic acid, D-homocysteic acid, l-carboxyhomotaurine sodium salt, L-2-amino-4-guanidinobutanoic acid hydrochloride, N-acetyl-GABA, L-homocysteine sulfinic acid, DL-2-amino-n-butanoic acid, 2-pyrrolidone(GABA lactam)

6.5×10^{-9}M) を混じ氷水中で40分間インキュベートした。B-Fの分離にはglass-fiber filter (Whatman GF/C) を用いて吸引沪過し、3ml氷冷緩衝液で2度洗い、そのfilterをcounting vialに入れscintillatorを加え、β-counterで測定した。各々の物質について log-probit analysisにより[3H]-GABAの結合を50%阻害する濃度; IC_{50} を求め、GABAの場合を100%として、交叉性を%で表示した。

(B) BDZ-radioreceptor assay (BDZ-RRA)：(A)で得られたP_2分画をTriton処理せずに、30倍容量のTris緩衝液に懸濁し、50,000×g, 4℃で20分間遠沈を2回繰り返した後、得られたpelletを900μg protein/mlになるようにTris緩衝液に再懸濁し、これをreceptorとした。BDZ-RRAにおけるGABA構造類似体の作用を見るには、0.5mlのreceptor, 0.2mlのTris緩衝液, 0.1mlの試料, 0.1mlのcold diazepam, 0.1mlの[N-methyl-^{3}H]diazepam (specific activity 90Ci/mmol, 終濃度 3.0×10^{-9}M)を混じ氷水中で1時間インキュベートした。B-Fの分離は(A)と全く同様の方法で行った。1μMのdiazepamの存在下と非存在下での[N-methyl-^{3}H]diazepamのrat脳P_2分画への結合の差を特異結合(specific binding; SB)とし、receptor結合能の指標とした。またScatchard analysisを行う際には同様に1μMのdiazepam存在下でのpelletの放射能量を非特異的結合としてすべての結果から差引いた。BDZ receptorの親和性上昇作用の大小を知る一応の目安としてV_{max}/EC_{50}を用いた。ここでV_{max}としてはその物質が存在することによるSBの増加度(%)の最大値を示し、EC_{50}としてはSBが$V_{max}/2$増になるために必要な物質の濃度(μM)である。

〔結果と考按〕

GABA構造類似体約50種のGABA receptorへの交叉反応性を調べた結果をTable 1に示す。homotaurineが非常に大きな交叉反応性を示し、以下homohypotaurine, d-GABOB, 3-guanidinopropanoic acid, 3-hydroxyhomotaurine, L-GABOBと続く。N-acetyl-GABAが交叉反応性を全く示さないことからみても、交叉反応性を示す物質はすべてfreeのアミノ基を有することが必要と思われる。しかしながらカルボキシル基は、スルフォン基, スルフィン基で置換されても交叉反応性を維持された。また、β-alanine, 5-aminovaleric acidが交叉反応性を有するのに対し、6-amino-n-caproic acidは交叉反応性を有せず、カルボキシル基とアミノ基までの距離がC鎖にして5個以上のものはGABA receptorには作用しないことが判明した。以上の性質はBDZ receptorに対する時も、同様の事が言えるようである。V_{max}/EC_{50}の値の大小がGABAへの交叉反応性の大小と殆ど一致することから見ても、BDZ receptorへのGABA分子の作用部位はGABA receptorとかなり似た選択性を有していると言える。ところが、d-GABOBとl-GABOBの比較を行うと、両receptorへの作用に差があることが判明した。d-GABOBとl-GABOBとではGABA receptorに対する交叉反

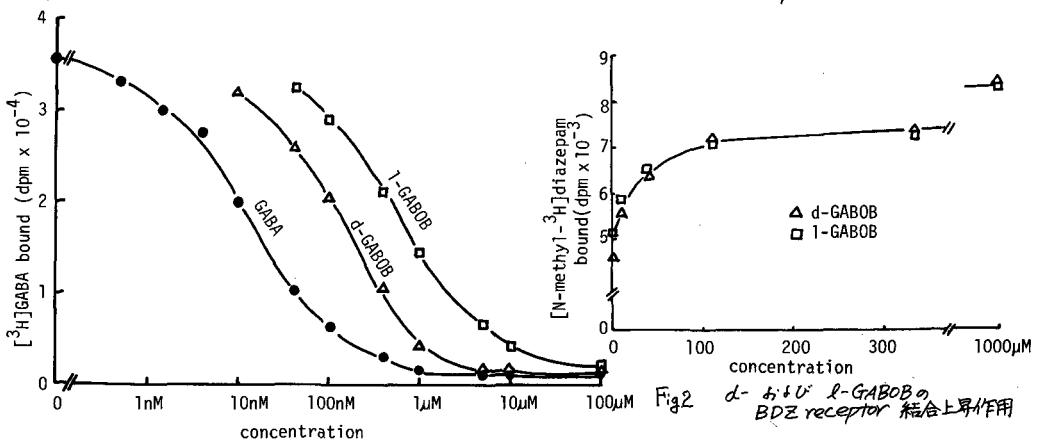


Fig.1 GABA-RRAに対するd-およびl-GABOBの交叉反応性

Fig.2 d-およびl-GABOBのBDZ receptor結合上昇作用

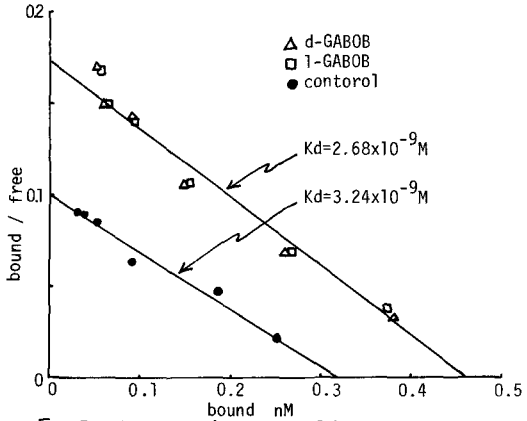


Fig.3 d-および l-GABOB存在下(1mM)における BDZ-RRA の Scatchard plot

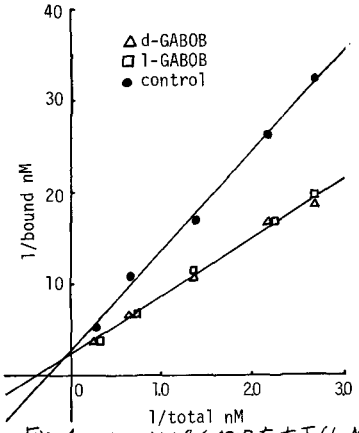


Fig.4 d-および l-GABOB存在下(1mM)における BDZ-RRA の Lineweaver-Burk plot

応性に著しく差異がある(Fig.1, Table 1)。これは Robertsらによる報告[6]にも一致する。ところが、BDZ receptor の親和性上昇作用については d-, l-GABOB の間に差が認められなかった(Fig.2)。終濃度 1mM となるように d-, l-GABOB を加え、Scatchard plot (Fig.3), Lineweaver-Burk plot (Fig.4) を行ってみても差は見られない。従って、BDZ receptor の親和性上昇作用のためには少なくともβ位の炭素の立体特異性は影響していないと思われる。これは GABA receptor への結合とは異なった形で、GABA分子が BDZ-receptor へ作用していることを示唆するものと考えられる。Karobath らは GABA誘導体のうちで炭素鎖の可変性を失い平面構造をとる誘導体は、たとえ GABA receptor へ強く作用しても BDZ receptor へは弱い作用しか示さないと報告している[3]。同著者はさらに dl-GABOB について BDZ-receptor への作用が GABA に類似していることを示しているが、d体と l体の差については触れていない。我々の今回の成績は GABOB の d体と l体とでは GABA receptor への反応性が著しく異なるにもかかわらず、BDZ receptor への作用に全く差のないことを明らかにしたものである。GABOB 分子は炭素鎖の可変性が十分に残されていることから、Karobath らの言う、炭素鎖の可変性の有無のみで、GABA分子の BDZ receptor への作用力を単純には論じられないことを示唆する。

(本研究の一部は文部省科学研究費に依った。)

〔文献〕

1) Chiu, T. & Rosenberg, H.C. (1979) Europ. J. Pharmacol., 56, 337-345.
2) Gallager, D.W., & Tallman, J.F. (1980) Fed. Proc., 39, 3043-3049.
3) Karobath, M., Placheta, P. & Lippitsch, M. (1979) Nature, 278, 748-749.
4) Roberts, E. & Frankel, S. (1950) J.Biol.Chem., 187, 55-63.
5) Roberts, E. & Kuriyama, K. (1968) Brain Res., 8, 1-35.
6) Roberts, E., Krause, D.N., Wong, E. & Mori, A. (1981) J. Neuroscience, 1, 132-140.
7) Tallaman, J.F., Thomas, J.W. & Gallager, D.W. (1978) Nature, 274, 383-385.
8) Wastek, G.J., Speth, R.c., Reisine, T.D. & Yamamura, H.I.(1978) Europ. J. Pharmacol., 50, 445-447.

74 バルビツール酸誘導体によるGABA受容体結合の増強

浅野富子・小笠原信明(愛知県コロニー)

〔要　約〕

1. ウシ大脳膜標品へのNa^+非依存性GABA結合はpentobarbitalにより増強された。この増強作用はClイオン依存性であった。
2. GABA結合は種々のバルビツール酸誘導体により増強され，その増強能力はこれらの薬物の薬理作用と高い相関がみられた。
3. ClイオンのほかI^-, Br^-, NO_3^-, SCN^-などの陰イオンも有効であったが，SO_4^{2-}, CH_3COO^-, F^-は無効であった。このイオン選択性は抑制性シナプス後膜を通過するイオンの選択性と一致している。
4. pentobarbitalによるGABA結合の増強は最大結合量の増加によるもので，親和性に変化はみられなかった。
5. pentobarbitalにより増強されたGABA結合はpicrotoxininによって抑制された。
6. 膜標品をTriton X-100で37°C，30分incubateするとpentobarbitalによるGABA結合の増強効果は著しく低下した。
7. 大脳皮質，小脳，海馬の各部位膜標品へのGABA結合に対するpentobarbitalの効果を調べると，小脳では増強の程度が低いことがわかった。

Key words： GABA receptor, Barbiturates, Chloride ion

バルビツール酸誘導体は鎮静催眠，麻酔，抗けいれん作用をもつ薬物で，広く臨床に用いられている。電気生理学的実験結果から，バルビツール酸はGABA作動性抑制の増強がその作用機序と考えられている(4, 8)。バルビツール酸誘導体によるGABA受容体結合の増強を示そうとする試みがいくつかなされたが，ほとんど失敗に終り(3, 6)，Willow and Johnston(11)が注意深く調製した膜標品を使用して，pentobarbitalによる30-50%の増強を示すのに成功したにだけであった。

ベンゾジアゼピン受容体は少なくとも一部はGABA受容体とcomplexを形成していると考えられているが，最近pentobarbitalがベンゾジアゼピン結合を増強し，その効果はClイオン依存性であることが報告された(5)。今回，われわれはNa^+非依存性GABA結合はClイオン存在下でpentobarbitalにより著しく増強されることを見い出したので報告する。

〔実験材料および方法〕

膜標品の調製　ウシ大脳皮質は5倍量の0.32M sucroseでhomogenizeし，1000×g，10分遠心し，その上清を20,000×g，20分遠心して得られるpellet(P_2分画)を−20°Cで凍結した。P_2分画は融解してTris緩衝液で1回洗ったのち再び−20°Cで使用するまで保存した。P_2分画を融解後リン酸カリウム緩衝液で5回洗ったのち，タンパク濃度約4 mg/mlになるように50mMリン酸カリウム緩衝液(pH 7.4)でsuspensionを調製し，Binding assayに使用した。

Binding assay　膜標品を5nM [^{3}H]GABA，50mMリン酸カリウム緩衝液(pH 7.4)と，100mM KCl存在または非存在下，0°C，15分incubateしたのち，20,000×g，20分

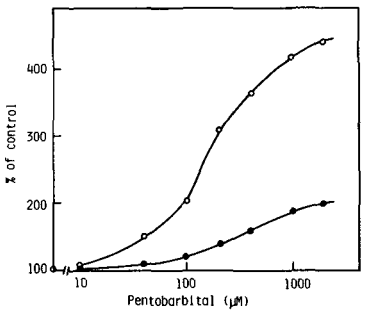


図1 [³H]GABA結合に対するpentobarbitalの影響。(○) 100mM KCl (●) none

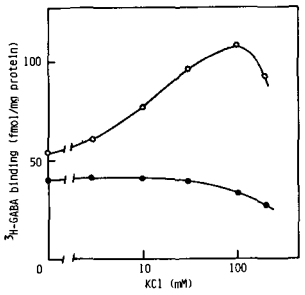


図2 pentobarbitalによる[³H]-GABA結合増強に対するKClの影響。(○) 500μM pentobarbital (●) none

遠心した。遠心後上清をすて，pelletの表面を2回水で洗い，pelletをProtosolに溶かしその放射能を測定した。ベンゾジアゼピン結合は0.25 nM [³H]flunitrazepamを使用して測定した(2)。

〔実験結果〕

pentobarbitalはKCl存在下，非存在下いずれの場合にも[³H]GABA結合を増強するが，KCl存在下の方が増強の程度が著しく，かつEC50 (half max. stimulation に必要な濃度) も低い(図1)。pentobarbitalによるGABA結合増強はClイオンの濃度に依存しており100mM KClで最大の増強がみられた(図2)。種々のバルビツール酸誘導体のGABA結合に対する影響を調べると，用いたいずれの薬物も増強効果を示した(表1)。その増強能力はこれらの薬物の薬理作用と高い相関がみられた。さらに種々のイオンの影響を調べた(表2)。$MgCl_2$がKClと同様の増強効果を示すので，この増強作用は陽イオンではなく陰イオンによるものであると考えられる。また，陰イオンではI^-, Br^-, NO_3^-, SCN^-がCl^-と同様に有効であったが，SO_4^{2-}, CH_3COO^-およびF^-は無効であった。このイオン選択性は抑制性シナプス後膜を通過するイオンの選択性とよく一致している(1)。

Scatchardプロットでpentobarbitalの[³H]GABA結合に対する影響を調べると，GABA結合の増強は最大結合量の増加(pentobarbital 200μM存在下：Bmax = 2.61 ± 0.14 pmol/mg protein, control：Bmax = 0.91 ± 0.08 pmol/mg protein)によるもので，親和性の変化(pentobarbital：Kd = 109 ± 6 nM, control：Kd = 98 ± 6 nM)によるものではないことがわかった(図3)。pentobarbitalにより増強

表1 種々のバルビツール酸誘導体による[³H]GABA結合の増強

Compound	% Enhancement
Secobarbital	160
Pentobarbital	140
Amobarbital	63
Mephobarbital	58
Phenobarbital	26
Barbital	23
Metharbital	21
Primidone	19

バルビツール酸誘導体の濃度200μM，KCl 100mM存在下で[³H]GABA結合を測定した。

表 2　pentobarbital による [³H] GABA 結合増強に対する種々のイオンの影響

Ion	% Control
none	122
KCl	240
$MgCl_2$	228
KI	232
KBr	238
KNO_3	270
NH_4SCN	252
$MgSO_4$	151
CH_3COOK	150
KF	136

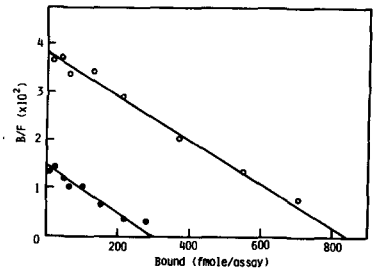


図 3　大脳皮質膜標品に対する [³H] GABA 結合の scatchard プロット．(○) 200μM pentobarbital (●) none

pentobarbital 200μM 存在下，各種塩類 100mM ($MgCl_2$ のみ 50mM) を添加して [³H] GABA結合を測定した。

表 3　膜標品の Triton X-100 前処理が pentobarbital による [³H] GABA および [³H] flunitrazepam 結合増強効果におよぼす影響

	% Control			
	[³H]GABA binding		[³H]Flunitrazepam binding	
Concentration of pentobarbital	Non-treated membrane	Triton X-100 treated membrane	Non-treated membrane	Triton X-100 treated membrane
0.1 mM	204	115	127	109
1 mM	418	146	163	118

Non-treated membrane は"実験方法"に述べたように調製した。Triton X-100 treated membrane は P_2 分画を 0.05% Triton X-100 と 37°C，30 分 incubate したのち遠心し，pellet をリン酸緩衝液で 4 回洗ったものを使用した。

された [³H] GABA 結合は picrotoxinin 添加により抑制された。

膜標品を 0.05% Triton X-100 で 37°C，30 分 incubate すると pentobarbital による [³H] GABA 結合の増強効果は著しく減少した（表 3）。同一の膜標品を使用して [³H] flunitrazepam 結合に対する pentobarbital の効果を測定すると，やはり著しく低下していた。

ウシ小脳および海馬の膜標品を大脳皮質と同様に調製し，[³H] GABA および [³H] flunitrazepam 結合に対する pentobarbital の効果を調べた（表 4）。両結合とも，海馬では大脳皮質とくらべわずかに増強されやすい傾向にあった。一方小脳では [³H] GABA 結合の増強が非常に低く，[³H] flunitrazepam のそれは他の部位とあまり差はなかった。

〔考察〕

GABA 結合増強に有効な pentobarbital の濃度は種々の電気生理学的実験で GABA 作働性抑制を増強する濃度とほぼ一致している（4, 8）。さらに種々のバルビツール酸の GABA 結合増強能力がそれらの薬理作用とよく相関していることから，バルビツール酸の薬理作用発現に GABA 受容体結合増加が重要な役割をはたしていると考えられる。

バルビツール酸はdihydropicrotoxinin結合を拮抗阻害することが知られており，pentobarbitalの50%阻害を与える濃度は50 μMと報告されている(9)。これはGABA結合を増強する濃度に近い値で，picrotoxinin(バルビツール酸)結合部位がGABA受容体とcoupleしていることを示唆している。また，GABA結合増強に必要なpentobarbitalの濃度はベンゾジアゼピン結合増強に必要な濃度とよく一致している(5)。さらに，両結合増強に有効なイオンは一致しており，両結合増強ともTriton X-100処理で減少する。これらの結果はGABA/ベンゾジアゼピン/バルビツール酸受容体complexの存在を支持するものである。

表4　ウシ脳各部位膜標品への[^{3}H]GABAおよび[^{3}H]flunitrazepam結合に対するpentobarbitalの影響

	% Control	
Brain region	[^{3}H]GABA	[^{3}H]Flunitrazepam
Cerebral cortex	380	158
Cerebellum	171	156
Hippocampus	440	165

両結合とも100mKCl，1mM pentobarbital存在下で測定した。

crudeな膜標品中のGABA受容体は内在性阻害剤などの影響で多くの受容体が"mask"されており，Triton X-100処理(10)や精製(2)によって結合が増加することが知られている。pentobarbitalはGABA受容体の最大結合量を増加させるが，これも1つの"unmasking"と考えられる。小脳は脳の他の部位と異なり，ベンゾジアゼピン受容体の数に比べGABA受容体が著しく高いことが知られており(7)，今回の小脳のGABA結合がpentobarbitalで増強されにくいという結果と考え合わせると，小脳にはベンゾジアゼピンやバルビツール酸受容体とcoupleしていない別のGABA受容体が多く存在しているか，あるいは"unmask"されたGABA受容体が多いため，crudeな膜標品ではGABA受容体が高く測定され，pentobarbitalによる増強が顕著でないのではないかと考えられる。

〔文献〕

1. Araki, T., Ito, M. and Oscarsson, O. (1961) J. Physiol. 159, 410-435
2. Asano, T. and Ogasawara, N. (1980) Life Sci. 26, 1131-1137
3. Enna, S. J. and Snyder, S. H. (1976) J. Neurochem. 26, 221-224
4. Evans, R. H. (1979) Brain Res. 171, 113-120
5. Leeb-Lundberg, F., Snowman, A. and Olsen, R. W. (1980) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77, 7468-7472
6. Olsen, R. W., Ticku, M. K., Greenlee, D. and Van Ness, P. (1979) GABA-Neurotransmitters. Munksgaard, Copenhagen, pp. 165-178
7. Placheta, P. and Karobath, M. (1979) Brain Res. 178, 580-583
8. Ransom, B. R. and Barker, J. L. (1976) Brain Res. 114, 530-535
9. Ticku, M. K. and Olsen, R. W. (1978) Life Sci. 22, 1643-1652
10. Toffano, G., Guidotti, A. and Costa, E. (1978) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 75, 4024-4028
11. Willow, M. and Johnston, G. A. R. (1980) Neurosci. Lett. 18, 323-327

75 抗精神病の賦活作用とα_2-Adrenergic Receptor 阻害作用; ^{3}H-Clonidine および ^{3}H-Yohimbine 結合親和性

朝倉幹雄・塚本　徹・鴨志田智津恵
平田進英・長谷川和夫(聖マリアンナ医大・神経精神)

〔要　約〕

抗精神病薬の賦活作用を α_2 - receptor agonist の ^{3}H - clonidine および antagonist の ^{3}H - yohimbine を標識物質とした α_2 - receptor 結合阻害実験から検討した。

^{3}H - clonidine 結合阻害実験は clocapramine, carpipramine が著明に強く，次いで perphenazine, lovomepromazine, thiothixene の順で haloperidol と sulpiride のその作用は極めて弱い。^{3}H - Yohimbine 結合阻害では順位はほぼ同じであるが，^{3}H - clonidine 結合部位の 6 - 15 倍の高い親和性を示した。これらの抗精神病薬の α_2 - 阻害作用は臨床的賦活作用に一致するように思われる。Dopamine は ^{3}H - clonidine site に対して nH≒1 で阻害し，α_2 - agonist の性質を示した。一方 yohimbine は ^{3}H - yohimbine site に対して nH = 0.6 の負の cooperativity を示し，α_2 - receptor 以外に DA - receptor にも結合していると考えられる。

Iminodibenzyl 系などの賦活作用をもつ抗精神病薬は，yohimbine 類似の特性を有し，強い α_2 - receptor 阻害作用をもつ。そしてこの α_2 - receptor はまた D_1 や D_2 とは異なるタイプの DA - receptor を共有する可能性が示された。したがってこの α_2 - receptor 阻害作用は NE を遊離するだけでなく DA - 機能と密接に関連していることが考えられる。

Key words : Disinhibitory neuroleptics, ^{3}H-clonidine binding sites, ^{3}H-yohimbine binding sites.

I　緒言

ある種の抗精神病薬は賦活効果もしくは抗うつ効果をもつことが知られている。この作用は一般に慢性分裂病の無為・自閉・自発性減退に対する賦活に用いられるのみならず，抗うつ剤としてうつ病治療にもしばしば用いられる。Thioxanthine 系，iminodibenzyl 系，benzamide系やある種の phenothiazine 系などは，単独あるいは三環系抗うつ剤との併用で用いられる。これらの薬物の抗精神病作用は ^{3}H-neuroleptics結合阻害作用と相関することは知られているが，賦活作用についてはこの dopamine(DA) receptor(D_2)阻害作用だけでは理解し難い。また一般の抗うつ剤のもつ monoamine uptake阻害作用や monoamine oxidase 阻害作用をほとんどもたず，現在のところこの賦活作用の生化学的背景は明らかとなっていない。一方，三環系抗うつ剤の amitriptyline や四環系抗うつ剤の mianserin は，NE取込み阻害のみならず presynaptic α-receptor(α_2)を阻害しNEの遊離を増加させることが知られている[3]。Clozapine や thioridazine などの "atypical"な抗精神病薬は limbic area に作用し，錐体外路副作用を起こしにくく，"classical"な haloperidol や spiroperidol にみられる大量投与による運動の抑制を引き起こさず，むしろ locomotor activity を増加させる。そしてこの clozapine や thioridazine は，NEの遊離を増強することが知られている。一方，yohimbine は α_2 - receptor の阻害により NE の遊離を増加させる[2]だけでなく，"atypical"な抗精神病薬の特性をも有している。この研究の目的は，賦活作用をもつ抗精神病薬の ^{3}H-clonidine および ^{3}H-yohimbine binding site すなわち α_2 - receptor の agonist と antagonist site に対する阻害作用から賦活作用と α_2 - receptor および dopamine receptor との関連についても検討を加えた。

II　方法

1. 動物

Wistar系雄性ラット体重180-250gを使用した。ラットは明暗周期と室温（12時間周期，24℃）を一定に保たれた条件下で，水と飼料は自由に摂取させて飼育した。

2. 脳分割および tissue preparation

ラットは断頭屠殺後，ただちに脳を摘出した。摘出した脳は氷上にて cerebral cortex(CC)，limbic forebrain(LB)を分割した。各脳部位は4－6匹分をプールし，U'Prichardらの方法に従い20容の ice-cold 50 mM Tris-HCl buffer(pH 7.2，25℃)にてホモジナイズ後，50,000g，10分間遠心分離した。Pelletは同 tris bufferにて洗浄の後，同様に遠心した。最終 Pelletは100容の同Tris-bufferに懸濁し，この tissue suspension(0.4－0.6mg protein/ml)を用いた。

3. ^{3}H-Clonidineおよび^{3}H-yohimbine 結合阻害実験

a. ^{3}H-Clonidine 結合阻害実験

^{3}H-Clonidine binding assayは tissue suspension 1mlと0.5 nM ^{3}H-clonidine(23.8Ci/mmol)を各種薬物の10^{-10}－10^{-4}Mおよび1 mM $MnCl_2$存在下で25℃，45分間インキュベートした。非特異的結合は100μM clonidineの存在下で同様におこなった。

b. ^{3}H-Yohimbine結合阻害実験

^{3}H-Yohimbine binding assayは tissue suspension 1mlと1nM ^{3}H-yohimbine(82.6Ci/mmol)を各種薬物10^{-10}－10^{-4}M存在下で25℃，45分間インキュベートした。非特異的結合は100μM yohimbine存在下で同様におこなった。

Assay内容はインキュベーションののちWhatman GF/Bフィルター上に吸引ろ過した。フィルターは15mlのTris-bufferで洗浄の後，液体シンチレーションスペクトロメトリーでβ線を測定した。^{3}H-Clonidineおよび^{3}H-yohimbineの特異的結合は，それぞれ全結合の約90％および約75％であった。^{3}H-Clonidine，^{3}H-yohimbineそれぞれの結合阻害実験からlog probit-analysisをおこない，IC_{50}(nM)およびKi(nM)を求めた。さらにHill analysisによりHill係数(nH)を求めた。蛋白量の測定はLowry法を用いた。

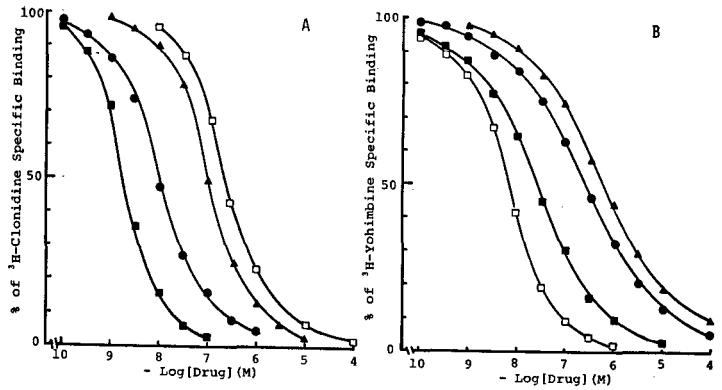


Fig. 1. Inhibition of ^{3}H-clonidine and ^{3}H-yohimbine binding by clonidine(■), l-NE(●), yohimbine(□) and dopamine(▲).

Ⅲ 結果

1. ^{3}H-Clonidine 結合に対する薬物の作用

^{3}H-Clonidineの結合はMn^{2+}存在下では high-affinity siteへの結合を示しCCにおける結合飽和実験のScatchard解析およびHill解析からは K_D =～1.1 nM，Slope(nH)≒1.0であり cooperativityを示さない[1]。^{3}H-Clonidineの特異的結合の adrenegic drugの阻害作用はα_2-agonistの clonidineが最も強く次いでℓ-NE，yohimbineの順でありα_1-antagonistの prazosinは極めて弱い。Dopamineはα_2-antagonistのyohimbineよりも強い阻害作用を示した。そして他の薬物のHill係数はnH=0.6～0.8であるのに対しdopamineはClonidine同様nH=～1.0を示した(Fig.1A，Table.1)。抗精神病薬の^{3}H-Clonidine結合阻害作用は

Drug	Ki(nM) [^{3}H]Clonidine binding, A.	n_H	[^{3}H]Yohimbine binding, B.	n_H	B/A	A/B^2
Clonidine	1.6 ± 0.3	0.97	36.4 ± 5.4	0.65	22.8	0.0012
l-Norepinephrine	5.5 ± 0.6	0.64	132 ± 30	0.62	23.9	0.0032
Dopamine	62.7 ± 4.7	0.95	677 ± 29	0.68	10.8	0.0001
Yohimbine	92.4 ± 16	0.85	11.2 ± 2.9	0.88	0.12	0.738
Prazosin	6807		-		-	
Clocapramine	58.3 ± 2.2	0.78	13.3 ± 1.8	0.87	0.23	0.328
Carpipramine	64.2	0.70	-		-	
Perphenazine	540 ± 82	0.65	90.2 ± 22	0.62	0.17	0.066
Levomepromazine	667 ± 33	0.68	79.3 ± 8.1	0.69	0.12	0.106
Thiothixene	726 ± 92	0.76	98.2 ± 26	0.64	0.14	0.075
Haloperidol	16008 ± 783	0.41	1798 ± 166	0.55	0.11	0.005
Sulpiride	18290 ± 624	0.54	2789 ± 195	0.52	0.15	0.002
Mianserin	28.5 ± 5.9	0.76	19.9 ± 3.1	0.58	0.70	0.072
Amitriptyline	538 ± 70	0.68	-		-	
Clomipramine	4164 ± 280	0.71	-		-	
Desipramine	8240 ± 520	0.65	-		-	
Imipramine	8487 ± 238	0.80	-		-	

Table 1.

Inhibition of [^{3}H]Clonidine and [^{3}H]Yohimbine Binding in CC.

Tissue suspensions were assayed with 5 or more concentrations of each drug in triplicate. IC_{50} values were determined by log-probit plots and converted to Ki's according to the fomula:
$Ki = IC_{50}/(1 + C/K_D)$
where C is the concentration of [^{3}H]ligand(0.5nM for [^{3}H]clonidine and 1.0nM for [^{3}H]yohimbine). Binding of [^{3}H]clonidine was independently determined(by Scatchard plots) to have a K_D of ∿1.1nM while that of [^{3}H]yohimbine was ∿8.0nM. n_H was determined by Hill plots. Each value is expressed as the mean ± S.E. of 2 to 4 determinations.

The agonist index was calculated as the ratio; B/A, antagonist potency; A/B^2.

clocapramine, carpipramine が著明に強く，次いで perphenazine, levomepromazine, thiothixene の順で haloperidol と sulpiride のその作用は極めて弱い。Hill 係数はほとんどの抗精神病薬は nH=0.6～0.8であり負の cooperativity を示している（Fig. 2, Table 1）。抗うつ剤の中で mianserin は極めて強い阻害作用を示し，次いで amitriptyline も比較的強い阻害作用を示すが mianserin の 1／20 であった。その他の三環系抗うつ剤は，amitriptyline の 1／8－1／15 であった。これらの薬剤の Hill 係数は，0.6－0.8 で負の cooperativity を示している。20nMおよび100nM dopamine 存在下におけるこれらの薬物の ^{3}H－clonidine 結合阻害実験を

Drug	Region Ki(nM) [^{3}H]Clonidine CC	[^{3}H]Clonidine LB	[^{3}H]Yohimbine CC	[^{3}H]Yohimbine LB
Clonidine	1.7	2.2	31.9	20.5
l-Norepinephrine	5.4	8.5	126	106
Dopamine	47	72	677	870
Yohimbine	92	96	11.5	8.4
Haloperidol	16000	17000	1724	1446
Sulpiride	18290	15000	2085	1694

Table 2. Regional Comparison of [^{3}H]Clonidine and [^{3}H]Yohimbine Binding Competition

Cerebral cortex(CC) and limbic forebrain(LB) were assayed with 4 or more concentrations of each drug and IC_{50} values were determined by log-probit plots. Ki's were calculated as in Table 1. Each value listed is the mean of 2 or more determinations.

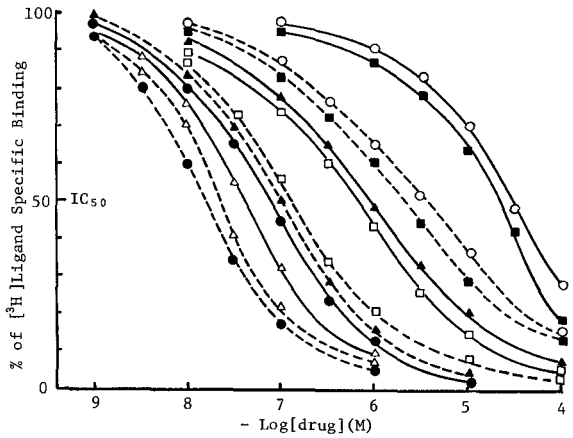


Fig. 2. Inhibition of [^{3}H]Clonidine and [^{3}H]Yohimbine Binding by Neuroleptic Agents

Experiments were performed as in Table 1. Ki values calculated were listed in Table 1. Clocapramine(●), mianserin(△), levomepromazine(▲), perphenazine(□), haloperidol(■) and sulpiride(○) are illustrated.
————, [^{3}H]Clonidine.
- - - -, [^{3}H]Yohimbine.

おこなったがHill係数はほとんど変化しなかった（data not shown）。Clonidine, 1-NE, dopamine, sulpirid および haloperidol の ^{3}H-clonidine 結合に対する IC_{50} 値とHill係数はCCおよびLBの両部位で有意な変化を認めなかった（Table 2）。

2. ^{3}H-Yohimbine 結合に対する薬物の作用

^{3}H-Yohimbine の特異的結合に対する adrenergic drug の阻害作用は，α_2-antagonist の yohimbineが最も強く，次いで clonidine, 1-NE, dopamine の順であった。これらの薬物のHill係数は nH=0.5～0.7 であり負の cooperativity を示している（Fig.1B, Table 1）。抗精神病薬の ^{3}H-yohimbine 結合阻害作用は，clocapramine に著明に強く，次いで levomepromazine, perphenazine の順であり，haloperidol, sulpiride は clocapramine の 1／135 ～ 1／150 であった。Hill係数はほぼ nH=0.4 ～ 0.6 の範囲にあり負の cooperativity を示した。一方抗うつ剤の mianserin は極めて強い結合阻害作用を示した（Table 1）。これらの薬物の ^{3}H-yohimbine 結合阻害の IC_{50} 値およびHill係数はCCとLBの両部位とも有意な差を認めなかった（Table 2）。

Ⅳ 考 察

^{3}H-Clonidine 結合部位（α_2-C site）と ^{3}H-yohimbine 結合部位（α_2-Y site）に対するそれぞれの親和性の比（A／B）を agonist index とし，A／B^2 を antagonist potency とすると，α_2-agonist は α_2-C site に親和性が高く（A／B＞1），また α_2-antagonist は α_2-Y site に親和性が高い（A／B＜1）(Fig.2) ここで使用した抗精神病薬はA／B＜1であり，α_2-antagonist の性質を示すと考えられる。また antagonist potency の順位は，clocapramine＞levomepromazine＞perphenazine＞thiothixene ≫ haloperidol＞sulpiride である。この順位は臨床的な抗精神病薬の賦活作用にほぼ一致するものと思われる。しかし sulpiride の賦活作用は，α_2-receptor 阻害作用では説明できない。

Mianserin は carpipramine に次いで強い α_2-antagonist potency をもつ。しかし α_2-receptor 阻害による賦活作用のメカニズムは，たんにNE遊離の増加だけでなくDAニューロンとの関係も否定できない。DAは α_2-C site に親和性が高く，Hill係数はほぼ1で，B／A＞1であることは，DAが α_2-receptor の agonist として作用する可能性を示している。一方，yohimbine は apomorphine や amphetamine による stereotyped behaviour を抑制し[4]，DA turnover を増加させる。このことから yohimbine は D_2-receptor 阻害作用をもつように見えるが，α_2-Y site の親和性と haloperidol-binding（D_2）のそれとは一致しない。α_2-C と α_2-Y site はともにLBとCCに豊富であるのに対し，D_1 や D_2 はこれらの部位には極めて少ない[5]。以上より賦活作用をもつ抗精神病薬は，yohimbine 類似の性質を有し，強い α_2-receptor 阻害作用をもつ。そしてこの α_2-receptor はまた D_1 や D_2 とは異なるタイプのDA-receptor を共有する可能性が示された。したがってこの α_2-receptor 阻害作用はNEを遊離するだけでなくDA-機能と密接に関連していることが考えられる。

＜文献＞

1. 朝倉幹雄，塚本 徹，長谷川和夫（1980）神経化学 19, 106-109.
2. Anden, N.E. and Strömbom, U.(1974) Psychopharmacology 38, 91 - 101.
3. Baumann, P.A. and Maitre, L.(1977) Naunyn-Schmiedeb. Arch. Pharmacol. 300, 31 - 37.
4. Boissier, J.R., Simon, P. and Giudicelli, J.F.(1968). Arch. int. Pharmacoldyn. Ther. 171, 68 - 80.
5. Burt, D.R., Creese, I. and Snyder, S.H.(1976) Molec. Pharmacol. 12, 800 - 812.

76 抗うつ剤長期投与とα_2,βリセプター感受性調節機構

塚本 徹・朝倉幹雄・鴨志田智津恵
平田進英・長谷川和夫(聖マリアンナ医大・神経精神)

〔要 約〕

三環系抗うつ剤をはじめ各種抗うつ剤長期投与のラット脳部位のα_2およびβ_2−receptorに対する作用を検討した。^{3}H−Clonidine、^{3}H−dihydroalprenolol（DHA）をそれぞれα_2およびβ−receptor binding assayに用いた。Desipramine（DMI）5−7日投与でα_2−receptor数はcerebral cortex（CC）とhippocampus（HC）で最大に増加したがlimbic forebrain（LB）では3週投与期間を通じ減少傾向を示した。一方β−receptorは3部位で7−21日で減少し最少を維持した。三環抗うつ剤（imipramine、clomipramine、nortriptyline）とmonoamine oxidase（MAO）阻害剤nialamineの7日投与もまたα_2−receptorの増加とβ−receptorの減少を引起した。Mianserinはα_2−receptorを著明に増加したがβ−receptorを変化させなかった。またNisoxetineは両receptorに影響を与えなかった。Propranolol、prazosinはともにDMIによるα_2−receptorの増加を阻止せずprazosinはむしろα_2−receptorの増加とβ−receptorの減少を増強した。以上の結果からCCとLBではα_2−receptor systemが異なること、抗うつ剤によるα_2−receptorの増加にはnorepinephrine（NE）以外に別のfactorが関与しα_1やβ−receptorを介するものでないことが考えられた。またα_2−receptorの増加はβ−receptorの減少よりむしろ抗うつ効果の指標となり得ることが示唆された。

Key words： Antidepressant drugs, α2-receptor supersensitivity, β-receptor subsensitivity.

Ⅰ 緒言

近年三環系抗うつ剤慢性投与によるラット脳β−adrenergic receptor（以下β−receptor）数の減少が報告されている[3]。こうしたβ−receptor subsensitivityは抗うつ剤慢性投与後にのみ認められることから抗うつ作用の生化学的指標とされている。そしてこれはNE利用の増加にもとづく代償性変化（β−receptor down regulation）と考えられている[7]。一方、NE機構には増加したNEのpresynaptic α−receptor（α_2−receptor）に対する刺激によりNEの遊離を抑制するautoregulationの存在が知られている[5]。Maggiらはα_2−receptorはβ−receptor同様postsynapseに存在しており、β−receptorを介したα_2−receptor sensitivityの調節機構が中枢NEのautoregulatory mechanismであることを示唆している[4]。著者らはすでに三環系抗うつ剤desipramine、imipramineの慢性投与でfrontal cortex、hippocampusにおけるα_2−receptor数の増加を報告している[1),2)]。この研究では臨床的に広く用いられている種々の三環系抗うつ剤や四環系抗うつ剤mianserin、monoamine oxidase inhibitor（MAOI）のnialamideおよび選択的NE取り込み阻害剤nisoxetine投与によるα_2およびβ−receptorの変化から抗うつ効果とNE機能におけるα_2とβ−receptorの意義について検討した。

Ⅱ 方法

1. 動物と薬物処理

Wistar系雄性ラット体重180−250gを用いた。4−6匹を1群とし以下の薬物を投与した。Desipramine（DMI）、imipramine、clomipramine、nortriptyline、mianserin、nisoxetineを20mg/kgを皮下投与し、prazosin 20mg/kg、nialamide 40mg/kg、yohimbine 10mg/kgそしてpropranolol 10mg/kgを腹腔投与した。また生理食塩水投与群を対照群とした。ラットは最

終投与12時間後断頭屠殺した。

2. 脳分割および tissue preparation

摘出した脳は氷上にて cerebral cortex (CC)、limbic forebrain (LB)および hippocampus (HC)を分割した。各脳部位は4–6匹分をプールし、U'Prichardらの方法[6]に従い、20容の ice-cold 50mM tris•HCl buffer (pH 7.65、25℃)にてホモジナイズ後50,000g、10分間遠心分離した。Pellet は同 tris buffer にて洗浄の後、同様に遠心した。最終 pellet は100容の同 tris buffer に懸濁し、この tissue suspension (0.4–0.6mg protein/ml)を用いた。

3. α_2およびβ–receptor binding assay

a. α_2–Receptor binding assay は tissue suspension 1ml と0.25–6.0 nM ^{3}H–clonidine(23.8 Ci/mmol)を1mM $MnCl_2$ 存在下で25℃、45分間インキュベートした。非特異的結合は10 M clonidine 存在下で同様におこなった。

b. β–Receptor binding assay は tissue suspension 1ml と0.25–6.0 nM ^{3}H–dihydroalprenolol (DHA)(60 Ci/mmol)を25℃、30分間インキュベートした。非特異的結合は50 M d,l–propranolol 存在下で同様におこなった。Assay 内容はインキュベーションののち Whatman GF/B フィルター上に吸引ろ過した。フィルターは15ml の tris buffer で洗浄の後、液体シンチレーションスペクトロメトリーで放射線を測定した。^{3}H–Clonidine および^{3}H–DHA の特異的結合はそれぞれ全結合の約90%および約80%であった。Scatchard 解析により最大結合数(Bmax)および結合親和性(K_D)を求めた。蛋白量の測定は Lowry 法を用いた。

Ⅱ 結果

1. DMI 3週間投与のα_2およびβ–receptor数の継時的変化

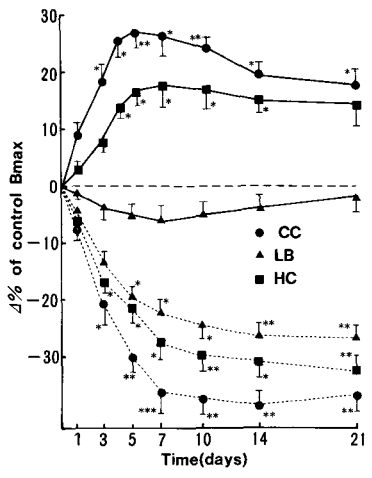


Fig. 1. Time course of α_2- and β-adrenergic receptor changes in cerebral cortex(CC), limbic forebrain(LB) and hippocampus(HC) after treatment with DMI for 7 days.
————; ^{3}H-Clonidine(α_2), -------; ^{3}H-DHA(β).
Results shown are the mean ± S.E. of % changes of control Bmax values determined by Scatchard analysis. *Significantly different from control, P < 0.05; **P < 0.01; ***P < 0.001.

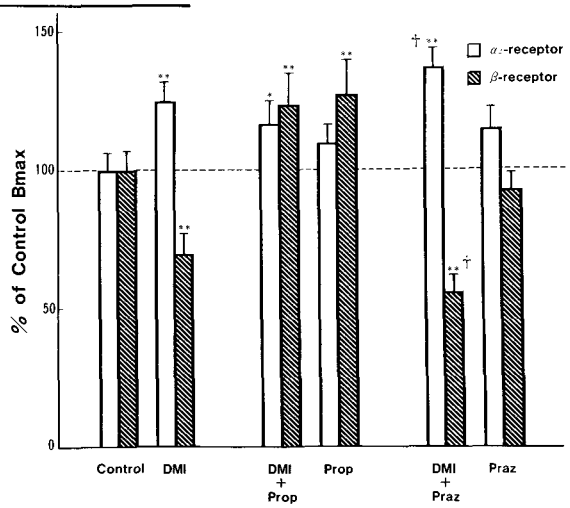


Fig. 2. Effects of propranolol(Prop) and prasosin(Praz) on DMI-induced changes in α_2- and β-receptors in CC.
Rats were treated with DMI, Prop(10 mg/kg i.p.), Praz (20 mg/kg i.p.), DMI + Prop, DMI + Praz and vehicle for 7 days. Results are expressed as the mean ± S.E. of % percentage of control Bmax values for four to six determinations. There was no significant difference in K_D values compared to control. *Significantly different from control, P < 0.05; **P < 0.01. †Significantly different from DMI-treated, P < 0.05.

Fig. 1.はDMI投与1日から3週に至るCC、LB、HCの両receptor数の時間的推移を対照群に対するBmaxの変化率であらわしたものである。α_2-Receptorはccでは3日で、HCでは4日で有意に増加し、ともに5－7日で最大値に達している。LBでは3週を通じ終始減少傾向を認めた。一方β-receptorはCC、HCでは3日で、LBでは5日で有意に減少し、7日から14日で最少値に達した。CCとHCにおいては、DMI投与開始後7日まではα_2とβ-receptorの変化は、ほぼreciprocalである。しかし、14日から21日にかけてのα_2-receptor数の増加の程度は、最大に増加した5日のそれよりも少なかったがβ-receptor数は7日から21日を通して最少であった。ところがLBではα_2とβ-receptorの変化は3週を通じ完全に解離しており、reciprocityを認めない(Fig. 1.).

2. 種々の抗うつ剤7日投与のCCにおけるα_2とβ-receptorに対する作用

ここで用いた三環系抗うつ剤は、すべてα_2-receptor数の増加とβ-receptor数の減少を示し、とくにimipramine、DMIに著明であった。ところがmianserinでは著明なα_2-receptor数の増加を認めたが、β-receptor数に有意な変化を認めなかった。Nisoxetine (selective NE uptake inhibitor)は、両receptorに有意な変化を示さなかった(Fig. 3.).またここで認められたα_2とβ-receptorの変化はreceptor数の変化であり結合親和性に変化を認めなかった。

3. DMIによるα_2-receptor数の増加に対するpropranololあるいはprazosinの作用

DMIによるα_2-receptor数の増加が、増加したNEの刺激がβあるいはα_1-receptorを介して起こるものかどうかを知る目的で、DMIとβ-antagonistのpropranololあるいはDMIとα_1-antagonistのprazosinとの併用を7日間おこなった。その結果、propranololとの併用により、α_2とβ-receptor数の有意な増加を認めた。またprazosinとの併用では、α_2－

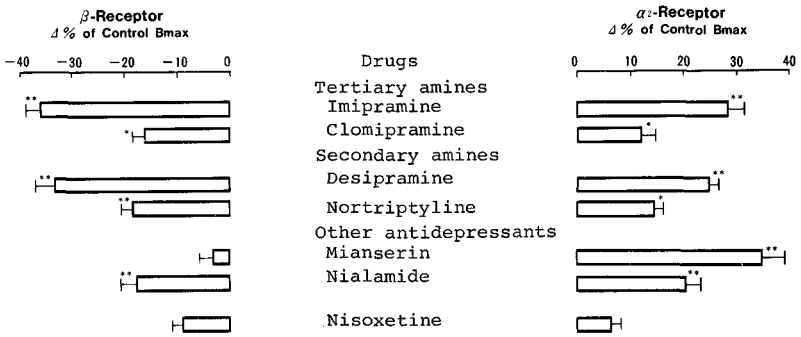


Fig. 3. Effects of chronic treatments with a variety of antidepressant drugs on α_2- and β-receptor density in the cerebral cortex.
Rats were treated with the drug and vehicle for 7 days as described in the method. Tissue suspension(∿ 0.5 mg protein/tube) obtained from 4 -6 rats were incubated with ^{3}H-clonidine or ^{3}H-DHA. Results are expressed as the percent change of control(vehicle-treated) Bmax. Values are the mean ± S.E of three to six determinations by linear regression analysis of equilibrium Scatchard plots data. Statistical comparisons were made using t-test. *Significantly different from control, $P < 0.05$; **$P < 0.01$.

receptor 数の増加とβ-receptor数の減少はDMI単独投与のそれよりも著明であった。Propranolol および単独投与はともにα2-receptor に有意な変化をもたらさなかったが、β-receptorはpropranolol 単独投与では有意に増加した(Fig. 2.).

Ⅳ考察

抗うつ剤に対するCCとLBにおけるα2-receptor の反応性の違いは、両部位でのα2-receptor systemの相違を示している。このことは、α2-receptor 数の増加はNE、薬物もしくは代謝産物のこのreceptor に対する直接作用でないことを示している。ここで使用した三環系抗うつ剤とnialamide はα2-receptor 数の増加とβ-receptor数の減少という逆の変化を示している。α2-Receptor の増加は、β-down-regulation 同様過剰なシナプス内のNEに対する自動調節機構としてNEの遊離を抑制するように働いたと考えられる。四環系抗うつ剤mianserinは、最も著明なα2-receptor 数の増加を示したが、mianserin はNE uptake 阻害作用は弱く、α1、α2-receptor 阻害作用をもつ。したがって、NE uptake、MAO inhibition α2-receptor阻害によるNEの増加がα2-receptor 数の増加を引き起こしたことが推測される。しかしながら、最も強力でかつ選択的なNE uptake阻害剤の nisoxetineは、α2、β両 receptor に全く影響しない。このことはα2-receptor はβ-receptor同様、たんにシナプス内のNEレベルだけでその receptor density が調節されているわけでなくNE以外に別のfactorの関与が示唆された。Nisoxetineの臨床効果は極めて弱い、一方mianserin は臨床的に有効である。したがって、β-down-regulationよりもα2-receptor の増加がむしろ抗うつ効果の指標となるようである。α2とβ-receptorとの関係について、LBやmianserinの結果のごとく両receptorは必ずしも常に逆の関係になく、またpropranolol はDMIによるα2-receptor の増加を阻止しない。したがってβ-receptorに対するNEの刺激がα2-receptorを増加させるというMaggi らの説[4]に一致しない。またα1-receptor 阻害剤のprazosin もDMIによるα2-receptor の増加を阻止しないばかりかむしろα2-receptor の増加とβ-receptor の減少を増強した。Prazosin はMHPGを増加するといわれる、しかし単独ではα2-receptor に効果をもたないことは先の解釈に一致する。またこの結果はα1-阻害作用をもつ薬物との併用は抗うつ効果を増強する可能性を示すものとして興味深い。

しかしながら、receptor 数だけでその機能を論ずることは極めて危険である。Mianserin によるα2-receptor の増加がα2-receptor に対する直接の阻害によるとすれば、他の抗うつ剤によるα2-receptor の増加はα2-inhibitory function の低下を意味する可能性も残される。α2-Receptor 増加の詳細なmolecular mechanism は明らかでないが、抗うつ効果との関連は十分に考えられる。当日はα2-receptor antagonist の ^{3}H-yohimbine bindingの結果も加えて報告する。

この研究の一部は1981年国際薬理学会総会で発表しました。

<文献>

1. 朝倉幹雄、塚本 徹、長谷川和夫.(1980) 神経化学 19, 106-109.
2. 朝倉幹雄、塚本 徹、長谷川和夫.(1981) 神経精神薬理 (in press).
3. Banerjee, S.P., Kung, L.S., Riggi, S.J. and Chanda, S.K.(1977) Nature 268, 455-456.
4. Maggi, A., U'Prichard, D.C. and Enna, S.J.(1980) Science 207, 645-647.
5. Starke, K.(1979) In:The Release of Catecholamines from Adrenergic Neurons.(Paton, D.M. ed.) Pergamon Press, Oxford, pp. 143.
6. U'Prichard, D.C., Betchel, W., Rouot, B.R. and Snyder, S.H.(1979) Mol. Pharmacol. 16, 46-60.
7. Wolfe, B.B., Harden, T.K., Sporn, J.R. and Molinoff, P.B.(1978) J. Pharmacol. Exp. Therp. 207, 446-457.

77　ラット輸精管のα_2受容体とアデノシン受容体との関連の可能性について

渡辺康裕・頼　榮燦・前田　一
吉田　博
（阪大・医・I薬理）

〔要　約〕

レセルピン投与によってラット輸精管に増加した ^{3}H-clonidine 結合部位（α_2受容体）に対する種々の cation，nucleotide 等の影響を観た。種々の cation の中で，Mn^{++} は，^{3}H-clonidine の結合を抑制した。ATP は 10^{-5}M の濃度で，結合部位を約30％増加させることを見い出した。ATP は，adenosine 受容体の agonist であるので，adenoside，2-chloro-adenosine の影響を観た所，それぞれ，約38％，約42％，増加をもたらし，Scatchard plot より，親和性に差はなく，Bmax の増加であることを知った。また，その増加は，1.25mM の theophylline で抑制され，adenosine 受容体を介しての反応と考えられる。adenosine と同じく，Co-transmitter と思われる methionine-encephalin は，^{3}H-clonidine の結合を増加させなかった。また，この adenosine の効果は，無処置ラット輸精管においても同様の結果を得た。この結果より，α_2受容体と adenosine 受容体との関連の可能性が示唆された。また，β受容体に結合する ^{3}H-dihydroalprenolol，α_1受容体に主として結合する ^{3}H-WB4101 の結合部位に対し，2-chloroadenosine は効果を持たず，その作用は，α_2受容体に特異的な反応，または，agonist の結合部位に特異的と思われる。

Key words：alpha-2 receptor, adenosine receptor, rat vas deference.

昨年度の本学会において，reserpine 投与，6-hydroxydopamine（6OHDA），denervation operation によって，ラット輸精管に，^{3}H-clonidine（clo）結合部位が増加することを示したが，[6] 今回，増加した結合部位が，どのような性質を持つかを検討するため，^{3}H-clo を用いて結合実験を行なった。また，^{3}H-clo の結合部位に，量的質的変化をもたらすと報告[4]されている種々の cation，nucleotide 等の影響を観察した。その中で，adenosine 受容体の agonist とされる ATP[1] の影響がみられたので，adenosine 受容体の agonist，antagonist の効果を観た。^{3}H-clo で detect されるα_2受容体は，adenylate cyclase と couple していること[3]，また，受容体とその酵素の coupling に adenosine が関与していることが報告されている[2]ので，本実験で観察された adenosine の効果に対する Gpp(NH)p の影響も検討した。

（実験材料と方法）

ラット輸精管ホモジネートの調製，^{3}H-clonidine，^{3}H-WB4101 を用いる結合実験，reserpine，6OHDA 投与法については，既に報告した。^{3}H-dihydroalprenolol（DHA）（50 Ci/mmol）の結合実験の反応液は，トリス塩酸緩衝液 50mM，pH7.4，塩酸マグネシウム 10mM であり，37°C 12分間 incubate した。cation，nucleoside，nucleotide，theophylline 等は，incubation medium 中に共存させ，その効果を観察した。

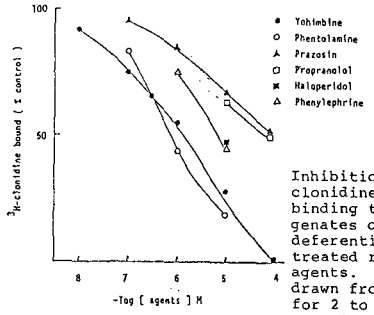
表1　^{3}H-clonidine（22.5nM）結合に対する種々の処置の影響
（mean ± S.E，pmoles/g. 湿重量）

control	0.1 ± 0.1 (8)
reserpine treatment.	2.0 ± 0.3 (10)
chemical denervation with 6-OHDA.	0.9 ± 0.3 (3)

（実験結果と考察）

<u>^{3}H-clonidine の結合部位について</u>：reserpine を2日間投与したラット輸精管ホモジネートに対する ^{3}H-clo の結合は，25°C 30分間で飽和に達し，22.5nM の濃

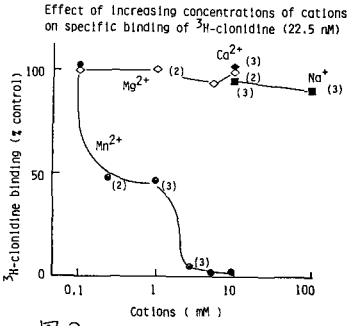
図1



Inhibition of ^{3}H-clonidine(22.5 nM) binding to the homogenates of vasa deferentia of reserpine-treated rats by various agents. The curve is drawn from the means for 2 to 3 separate experiments.

度の結合部位数は，2.0±0.35 pmoles/g湿重量（表1）であり，Scatchard plot より，そのKDは3～6 nMであった。種々の薬物の阻害実験を行なった所，図1に示すように，22.5 nM ^{3}H-clo 結合の50％阻害濃度は，α2-antagonistである yohimbine，α1-antagonist である prazosin，α-antagonist である phentolamine，β-antagonistである dl-propranolol，dopaminergic antagonistである haloperidol，α1-agonist である phenylephrine について，それぞれ，1×10^{-6}，1×10^{-4}，8×10^{-7}，1×10^{-4}，1×10^{-5}，7×10^{-6} M であり，α2受容体の性質を持つと思われる。

図2



cation, nucleotide 等の影響：図2に示す濃度において，Mg^{++}，Ca^{++}，Na^{+}は，reserpine 投与で増加した ^{3}H-clo の特異的結合に影響しなかったが，Mn^{++}は，約1 mMで，^{3}H-clo の特異的結合を約50％減少させた。図3に示すように，GTPは，低濃度では約20％増加させたが，10^{-5} Mにおいて，controlに比し，約43％に減少させた。GTPと，1mM Mn^{++}を共存させても，controlの約50％に留まった。この結果は，reserpine 投与で増加した ^{3}H-clo の結合部位は，Snyder ら[4]のラット脳における ^{3}H-clo の low affinity の結合部位に近い性質を持つと思われる。この際，10^{-5}M ATPも約30％増加させたが，EDTA 10^{-4}M は，増加させなかったので，ATP の作用は，chelating によるものではないであろう。ATPは，神経系の adenosine 受容体の agonist として知られ[1]，また，始めに述べた理由にて，α2受容体に対する adenosine 等の影響を検討した。

図3

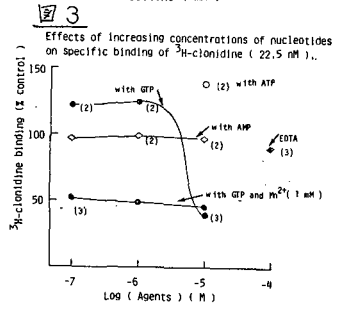
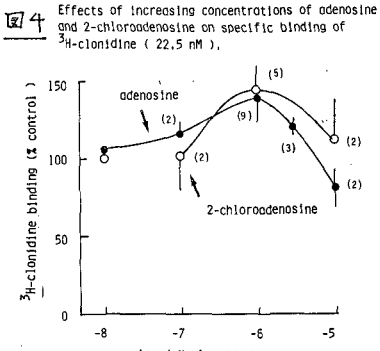
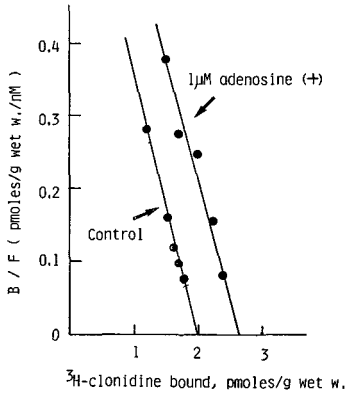


図4



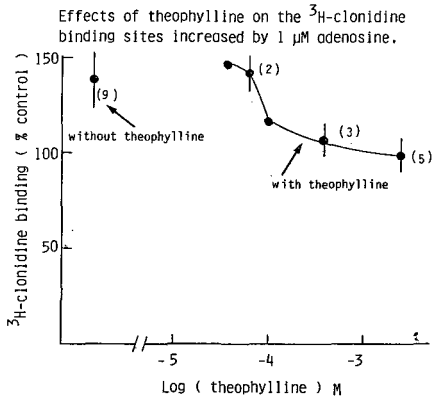
^{3}H-clonidine 結合部位と adenosine 受容体の関連：図4に，reserpine 投与で増加した ^{3}H-clonidine（22.5 nM）に対する adenosine（10^{-8}～10^{-5}M）の影響を示した。adenosine は，10^{-6}Mにおいて，controlに比し，約38％増加せしめた。この時の Scatchard plot を，図5に示したが，^{3}H-clo の affinity は変わらず，最大結合部位数の増加が観察された。この増加に対する，adenosine 受容体の antagonist，theophylline の影響を示したのが，図6である。theophylline 単独では，^{3}H-clo の結合に影響はみられなかった。図6に示すように，theophylline 3×10^{-5} M では，adenosine の効果を阻害しなかったが，1.25×10^{-3} M においては，adenosine の効果を完全に阻害した。ATP による ^{3}H-clo の結合部位の増加（図3）に対する，theophylline の阻害は，

図5 The effect of adenosine on the ^{3}H-clonidine binding.



Scatchard plot for ^{3}H-clonidine binding to reserpinized rat vasa deferentia homogenates.

図6



弱く，^{3}H-clo結合部位に対するadenosineの効果は，adenosine受容体，特に，末梢神経系において，Burnstock[1]らの唱するP$_1$受容体を介する可能性があると思われる。次に，adenosine deaminaseによって分解されない2-chloroadenosineの効果を検討した。図4に示すように，adenosineとほぼ同じ傾向を示し，10^{-6}Mの濃度において，controlに比し，約42%増加させた。($N=5$)。10^{-6}Mの2-chloroadenosineのこの効果を，1.25mMのtheophyllineは，抑制した。始めに述べたように，A_2受容体とadenylate cyclaseのcouplingに，adenosineは，関与する可能性があるので，guanine nucleotide regulator proteinに，働くとされるGpp(NH)pを10^{-4}M加えて，adenosineの効果に対する影響を，^{3}H-clonの結合において検討した。22.5nMの^{3}H-clon.の結合に対して，Gpp(NH)p 10^{-4}Mは，単独にて，controlに比し，約23%に減少させた。この時，adenosine 10^{-6}Mを共存させて，incubateしても，Gpp(NH)p単独の場合と，差はなかった。また，シナプス小胞仮説に従えば，ATPは，シナプス小胞中に，transmitterと共存し，共に放出され，シナプス間隙に放出されたATPは，すみやかに，adenosineに分解されることになり，adenosineのco-transmitterとしての働きが考えられているが，近年，co-transmitterとされている，opioid peptideの効果を観た。Methionine-Enkephalin (10^{-8}～10^{-5}M)は，図7に示すように，reserpine処理にて増加した^{3}H-clonidine (22.5nM)の結合に対して，影響を持たなかった。

表2 無処置ラット輸精管における^{3}H-clonidine (22.5nM) 結合に対するadenosine等の影響 (mean±S.E., pmoles/g. 湿重量)

control	0.2 ± 0.1	(8)
adenosine 10^{-5}M,	0.6 ± 0.1	(5)
adenosine 10^{-5}M, yohimbine 10^{-5}M	0.1 ± 0.1	(3)
adenosine 10^{-5}M prazosin 10^{-5}M	0.7 ± 0.2	(3)
adenosine 10^{-5}M theophylline 10^{-3}M	not detected	

無処置ラット輸精管ホモジネートに対するadenosine等の影響：次に，reserpine投与等で，ふせ，^{3}H-clo.の結合部位が増加するのかを調るため，無処置ラット輸精管ホモジネートで，^{3}H-clo結合におけるadenosine 10^{-5}Mの効果を検討した。表2に示すように，約0.4 pmoles/g湿重量と，

有意の増加がみられた。この増加は，1.25 の theophylline で阻害され，adenosine 受容体を介すると思われる。また，10^{-5} M yohimbine で阻害されるが，10^{-5}M prazosin で阻害されず，増加した部位は，α_2受容体の性質を持つと思われる。adenosine による増加の絶対量は，無処置，レセルピン投与ラットにおいて差は小さく，adenosine の効果に関して，無処置動物の他臓器を用いた実験にて検討する必要がある。

図 7

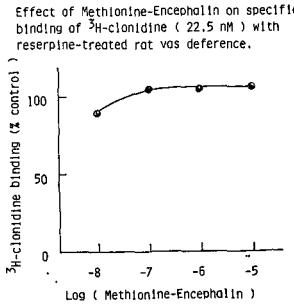


表 3　他の受容体に対する 2-chloroadenosine の影響 (pmoles/g. 湿重量)

^{3}H-DHA binding (10 nM)	
no treatment	not detected
reserpine treatment	
without 2-chloroadenosine	2.2
with 2-chloroadenosine (10^{-6}M)	2.3
^{3}H-WB4101 binding (18 nM)	
reserpine treatment	
without 2-chloroadenosine	12.2
with 2-chloroadenosine (10^{-7}M)	12.0
(10^{-6}M)	12.1
(10^{-5}M)	12.3

他の受容体に対する 2-chloroadenosine の影響：レセルピン投与をすると，ラット輸精管に β-antagonist である ^{3}H-DHA の結合部位が出現するが，(表 3)，その ^{3}H-DHA の結合部位に対して，2chloroadenosine 10^{-6}M は，影響を持たず，また，主として，α_1受容体に結合する ^{3}H-WB4101 の結合部位に対しても 2-chloroadenosine は 10^{-7}～10^{-5} M の濃度において，影響は持たなかった。これらの結果は，adenosine が，他の受容体の agonist の結合部位にのみ影響を持つ可能性，また，α_2受容体に，特異的に作用する可能性を示唆するが，α_2-antagonist を用いた実験にて，さらに検討する必要がある。(第 59 回薬理学会近畿地方会にて一部既報)。

[References]

1) Burnstock, G. (1978) Cell Membrane receptors for drug and hormones, Raven Press, New York, 107.

2) Fain, J.N. and Malbon, C.C. (1979) Molecular and cellular biochemistry 25, 143-169.

3) Harwood, J.P., Moskowitz, J. and Krishna, G. (1972) Biochim. Biophys. Acta 261, 444-456.

4) Rauot, B.M., U'Prichard, D.C. and Snyder, S.H. (1980) J. Neurochem. 34, 374-384.

5) Thoenen, H. and Tranzer, J.P. (1968) Naunyn-Schmiedebergs Arch. Pharmak. exp. Path. 261, 271-288.

6) 渡辺康裕，頼栄燦，平田彰，樋口宗史，前田一，吉田博 (1980) 神経化学 19, 110-113.

7) Wilson, S.P., Klein, R.L., Chang, K.J. Gasparis, M.S., Viveros, O.H. and Yang, W.H. (1980) Nature 288, 707-709.

78 中枢神経系のcyclic AMP産生系に対する高級不飽和脂肪酸作用機構

馬場明道・季 英培・龍野 徹・岩田平太郎
(阪大・薬・薬理)

〔要 約〕

ラット大脳皮質シナプス膜のadenylate cyclase活性およびモルモット大脳皮質切片のcAMP産生系に対する高級不飽和脂肪酸とそのhydroperoxideの作用について検討を加えた。不飽和脂肪酸は低濃度でadenylate cyclaseを活性化し、高濃度では強い阻害作用を有していた。また、飽和脂肪酸は高濃度において酵素活性を増加させた。一方、脳切片でのcAMP産生系に対してリノール酸はnorepinephrine (NE)の反応性を増強させた。このリノール酸の効果は不飽和脂肪酸に特有で、切片とのpreincubationを必要とした。リノール酸処置切片のcAMP生成に対するNEのED50は対照と同じであったが、最大反応は約4倍増加した。リノール酸によるNE反応性の増加はadenosine deaminaseや2'-deoxyadenosineにより完全に消失した。リノール酸はlipoxygenaseとの反応によりadenylate cyclase活性をさらに増加させた。この酵素の活性化は、lipoxygenaseによるhydroperoxideの生成量と平行していた。脳切片においてもlipoxygenaseと反応させたリノール酸はより低濃度でcAMP産生能を増加させた。以上の結果は神経系において不飽和脂肪酸あるいは脂肪酸のlipoxygenationがcAMP産生系を修飾する作用を有することを示すものである。

Key words :

Polyunsaturated fatty acids, Adenylate cyclase, Lipoxygenation.

生体膜の主要構成成分であるリン脂質は種々の膜機能や膜構造の維持に重要な役割を果している。これらのリン脂質の作用の一部はその構成成分である脂肪酸の性質(たとえば膜流動性の制御)によると考えられている。近年、遊離脂肪酸の膜機能への作用が注目され、ある種の脂肪酸は膜酵素活性[2),10)]、糖や[11)]カチオン[15)]の輸送などの膜機能を修飾することが報告されている。

すでに我々は膜脂質の過酸化によりadenylate cyclase[4)]が活性化されることを見い出し、この現象が神経膜に特異的であることを明らかにした。脂質の過酸化はリン脂質の不飽和脂肪酸に作用してhydroperoxide[8)]を形成し、さらに膜構造の変化などをきたすこと[12)]が知られており、脂質の過酸化によるadenylate cyclase活性化に不飽和脂肪酸あるいはそのhydroperoxideの関与する可能性が考えられる。そこで今回、ラット脳シナプス膜のadenylate cyclase活性ならびにモルモット大脳皮質切片でのcAMP生成に対する高級不飽和脂肪酸およびそのhydroperoxideの効果を検討した。

実験方法

ラット大脳皮質粗シナプス膜(M_1分画)の調整およびadenylate cyclase活性測定は既報の方法[4)]に従い行なった。モルモット大脳皮質切片は厚さ0.25 mmのものを作成し、Krebs-Ringer buffer中で37°C, 30分間preincubationした。その後、30分間脂肪酸の存在もしくは非存在下でincubation[3)]し、遊離の脂肪酸を除去するため切片を洗浄したものについてcAMP産生を既報の方法により測定した。

リノール酸のhydroperoxideは0.1M borate buffer中で大豆lipoxygenase (Sigma)と反応

することにより調整し、生成したperoxide量はA_{234}を測定することにより求めた。

膜の流動性は螢光偏光解消法[16]により測定し、probeとしてdiphenylhexatrieneを用いた。

結果

1. ラット大脳皮質粗シナプス膜における adenylate cyclase活性

種々の高級脂肪酸のadenylate cyclase活性に対する効果はFig 1に示した。オレイン酸（18:1），リノール酸（18:2），アラキドン酸（20:4）のような不飽和脂肪酸は低濃度（約50 μM）で酵素活性を増加させ、さらに濃度をあげると逆に抑制する二相性の作用を示した。この不飽和脂肪酸のadenylate cyclase活性に対する阻害効果は二重結合の数の多いものほど強かった。一方、飽和脂肪酸であるパルミチン酸（16:0）やステアリン酸（18:0）は高濃度で酵素活性を増加させた。リノール酸によるadenylate cyclaseの活性化および不活性化は膜分画をリノール酸で処置（30°C，20分間）した後，遊離の脂肪酸を洗浄により除去した場合でも認められ、不可逆的なものであった。リノール酸処置によりadenylate cyclaseの不活性化がみられた標品について膜の流動性を測定したところ，リノール酸処置で膜がより流動的になっていることが判明した（対照，4.43 poise；リノール酸，2.88 poise at 30°C）。

Fig 2はリノール酸をlipoxygenase処置した時のadenylate cyclase活性に対する影響を調べた結果である。リノール酸により酵素活性は増大するが、lipoxygenaseと反応したものについてはさらに強い活性化作用が認められた。また、阻害効果についてはdose response curveが右にシフトするのが認められた。この時のlipoxygenaseによるperoxideの生成は約40％（基質であるリノール酸は2.5 mMを使用した）であった。

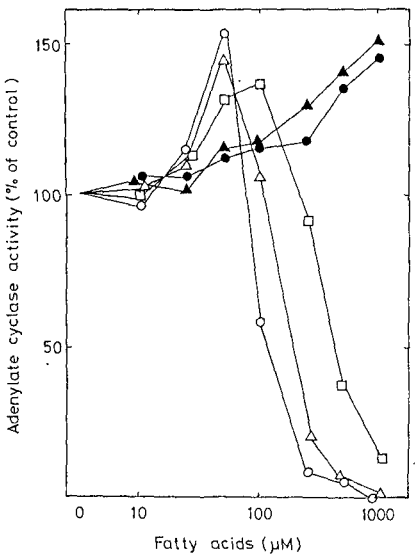


Fig. 1. Effect of various fatty acids on adenylate cyclase activity. ●, parmitic acid; ▲, stearic acid; □, oleic acid; △, linoleic acid; ○, arachidonic acid.

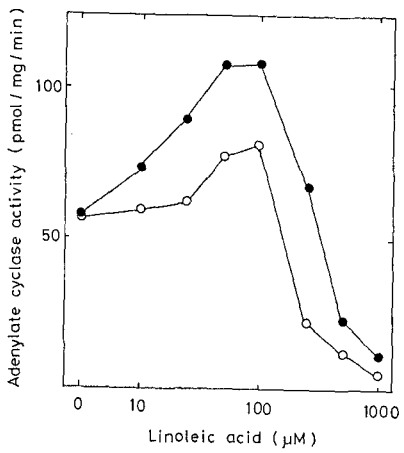
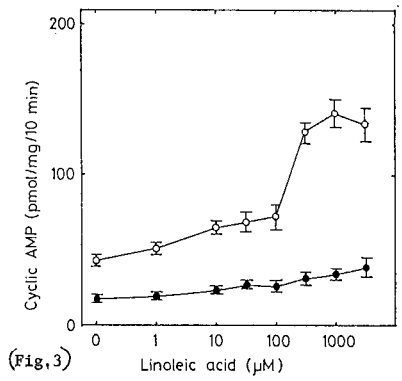


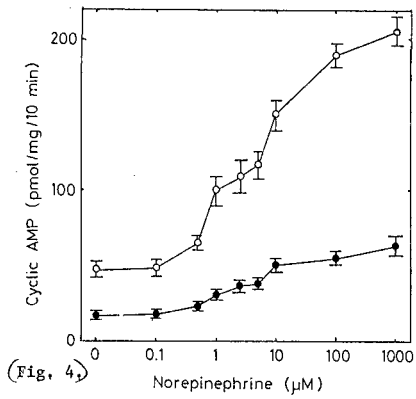
Fig. 2. Effect of peroxidized linoleic acid on adenylate cyclase activity. Linoleic acid (2.5 mM) was incubated for 30 min at 30° with (●) or without (○) lipoxygenase (250 μg/ml). Then, the mixture was diluted and added to the assay medium for the enzyme activity.

2. モルモット大脳皮質切片における cAMP 産生系

リノール酸と反応させた切片について norepinephrine (NE) による cAMP の生成を調べたところ，リノール酸は NE による cAMP 産生を増強させ，0.3mM リノール酸で最大効果がみられた (Fig 3)。なお，対照の値も有意に増加した。このリノール酸による NE の反応性の増強効果は切片とリノール酸との preincubation を必要とし 30 分間の反応



(Fig. 3)



(Fig. 4)

Fig. 3. Effect of the concentration of linoleic acid on cAMP accumulation of the slices in the absence (●) or presence (○) of norepinephrine (100 μM).

Fig. 4. Effect of the concentration of norepinephrine on cAMP accumulation of the slices treated with (○) or without (●) linoleic acid (0.3 mM).

で最大効果がみられた。また，一連の高級脂肪酸の効果も検討した結果，飽和脂肪酸であるパルミチン酸とステアリン酸に NE の反応性の増大はみられなかったがアラキドン酸やオレイン酸はリノール酸と同様の効果を有しており，NE 反応性の増加は不飽和脂肪酸に特異的であった。対照およびリノール酸処置した切片での NE による cAMP の生成は dose dependent であり，この時の ED50 はどちらの場合も 4.0 μM で一致した値であった (Fig 4)。リノール酸処置による NE 反応性の増強に対する種々の薬物の効果を検討したところ，α- および β-blocker により部分的に阻害されたが，Fig 5 に示すように，adenosine の効果を消失させる adenosine deaminase や 2'-deoxyadenosine により NE 反応性の増加は完全に阻害された。更に stimulant として adenosine を用いても NE と同様に反応性の増強がみられたことからリノール酸による NE 感受性 cAMP 生成の増強は adenosine を介したものであることが明らかとなった。

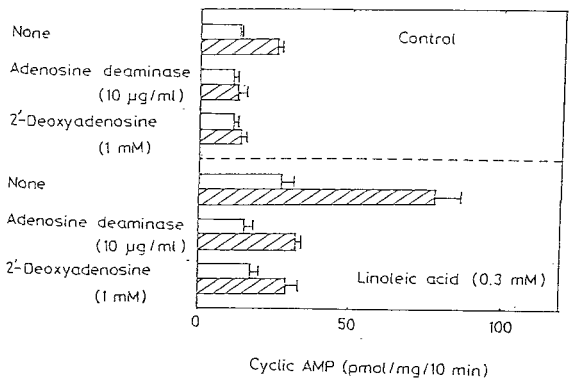


Fig. 5. Effect of adenosine deaminase and 2'-deoxyadenosine on cAMP accumulation of the slices in the absence (□) or presence (▨) of norepinephrine (100 μM).

考　察

すでに線維芽細胞[1]および脂肪細胞[6]のadenylate cyclase活性に対して不飽和脂肪酸が阻害作用を示すことが報告されているが、今回我々は不飽和脂肪酸がラット大脳皮質粗シナプス膜のadenylate cyclaseを不活性化するだけでなく、活性化作用も有することを見い出した。この不飽和脂肪酸によるadenylate cyclaseの活性化は肝形質膜ではみられなかったことから神経膜に特異的な現象である可能性がある。不飽和脂肪酸によるadenylate cyclaseの不活性化には高濃度が必要で、従来より報告されているようにタンパク質と脂質の相互作用の変化によるものであると考えられる[1]。しかしながら、不飽和および飽和脂肪酸が酵素活性に対して抑制と増加作用を有することは、膜の流動性を荷着が上昇させ性荷着が低下させることを考えあわせると[7]、膜の流動性によるadenylate cyclase活性の制御を想定するとき興味深い知見である。

脳切片を用いた系においてはリノール酸によりNE感受性のcAMP産生が増強される結果が得られた。モルモット脳切片ではNEによるcAMP量の上昇はadenosineの関与が示されているが[10]、リノール酸処置によるNE反応性の増大はadenosine依存性のcAMP生成の増強を介したものであることが明らかとなった。不飽和脂肪酸によるhormone感受性adenylate cyclase活性の増加は膜の流動性を高めることにより[13]、hormoneとadenylate cyclaseのcouplingを増加させるためであると報告されているが、リノール酸（0.3mM）処置した切片における膜の流動性は対照のものと変化がなかった（対照，6.61 poise；リノール酸，6.60 poise　at 30°C）。膜流動性と反応性増大の関連は膜のよりミクロな部位での流動性を検討していく必要がある。

リノール酸のhydroperoxideがリノール酸よりも著明なadenylate cyclaseの活性化作用を有していた（Fig 2）。同様に、切片においてもリノール酸のhydroperoxideがリノール酸[9]よりも低濃度でadenosineの反応性を増強するという知見を得ている。最近、血小板や白血球[5]でlipoxygenaseの存在することが明らかにされ、アラキドン酸のlipoxygenase系の代謝物の作用が注目されている。これらのことは、今回得られた高級不飽和脂肪酸のcAMP産生系への作用機構が脂肪酸のlipoxygenationに関与する可能性を示唆するものである。

文　献

1. Anderson, W. B., and Jaworsky, C. J. (1977) Arch. Biochem. Biophys. 180, 374-383
2. Asakawa, T., Takenoshita, M., Uchida, S., and Tanaka, S. (1978) J. Neurochem. 30, 161-166
3. 馬場 明道，李 英姫，龍野 徹，岩田 平太郎，(1980) 含硫アミノ酸 3，9～12
4. Baba, A., Lee, E., Ohta, A., Tatsuno, T., and Iwata, H. (1981) J. Biol. Chem. 256, 3679-3684
5. Borgeat, P., and Samuelsson, B. (1979) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 76, 2148-2152
6. Fain, J. N., and Shepherd, R. E. (1975) J. Biol. Chem. 250, 6586-6592
7. Klausner, R. D., Kleinfeld, A. M., Hoover, R. L., and Karnovsky, M. J. (1980) J. Biol. Chem. 255, 1286-1295
8. May, H. E., and McCay, D. B. (1968) J. Biol. Chem. 243, 2296-2305
9. Nugteren, D. H. (1975) Biochim. Biophys. Acta 380, 299-307
10. Orly, J., and Schramm, M. (1975) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 72, 3433-3437
11. Pilch, P. F., Thompson, P. A., and Czech, M. P. (1980) Proc. Natl. Acad.Sci. USA 77, 915-922
12. Plea, G. L., and Witch, M. (1976) Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol. 16, 125-141
13. Rimon, G., Hanski, E., and Levitzki, A. (1978) Nature 276, 394-396
14. Sattin, A., Rall, T. W., and Zanell, J. (1975) J. Pharmacol. Exp. Ther. 192, 22-32
15. Schaeffer, B. E., and Zadunaisky, J. A. (1979) Biochim. Biophys. Acta 556, 131-142
16. Shinitzky, M., and Barenholz, Y. (1978) Biochim. Biophys. Acta 515, 367-394

79 脳切片における興奮性アミノ酸のcyclic AMP増加作用
— とくに海馬におけるシステインスルフィン酸の特異性について —

龍野　徹・季　英　培・馬場明道・岩田平太郎
（阪大・薬・薬理）

〔要　約〕

モルモット脳切片における興奮性アミノ酸のcyclic AMP増加作用について検討した。興奮性アミノ酸のひとつであるcysteine sulfinic acid（CSA）は、特に海馬において切片内cyclic AMP量を著明に上昇させるが、この作用はtaurine（Tau）により拮抗される。CSAのcyclic AMP増加作用に対するTauの抑制作用は、海馬で最も強く、最大約40%の阻害が見られた。線条体でもTauの抑制作用が認められたが、大脳皮質では見られなかった。海馬において、Tauはadenosine, norepinephrineおよびhistamineによる切片内cyclic AMP増加に対しても抑制効果を示したが、大脳皮質では、Tauは無効であった。一方、海馬切片において、Tauは興奮性のアミノ酸であるglutamate（Glu）やaspartate（Asp）のcyclic AMP増加作用に対して何ら影響を与えなかった。Tauと同じく抑制性のアミノ酸と考えられているGABA, glycine（Gly）, β-alanine（β-Ala）は、Tauと同様に海馬においてCSAによるcyclic AMP量の増加を抑制したが、Gluによるcyclic AMP上昇に対しては抑制作用を示さなかった。以上のように、海馬におけるCSAのcyclic AMP増加作用は、抑制性アミノ酸による拮抗という点で、GluやAspの作用とは異なった側面を有していることが考えられる。

Key words：
Cysteine sulfinic acid, Cyclic AMP, Hippocampus.

Cysteine sulfinic acid（CSA）は、cysteineからtaurine（Tau）に至る代謝系の中間代謝物であり、脊髄において興奮作用を示すこと[4]が知られている。Glutamate（Glu）, aspartate（Asp）と同様CSAも切片内cyclic AMPを上昇させるが[7~11]、CSAの作用はこれらアミノ酸のうち最も強力なものである。一方、同じ代謝系のTauについては神経系において抑制性の作用が示唆されている[2~4,5,7,8]ことから、中枢神経系におけるこれらの含硫アミノ酸の生理的意義の解明は興味あることである。

すでに我々は、中枢神経系におけるCSAの動態、並びにTauとの機能的関連について検討を加え、その結果、CSAがシナプトゾーム分画へNa^+依存性の高親和性取り込み機構により取り込まれること、脳切片からhigh K^+により^{35}S-CSAの遊離が著明に増加すること、シナプス膜分画にCSAの特異的結合部位が存在することが明らかとなった[12]。さらに、側脳室内投与したCSAにより脳波レベルで海馬由来のseizure波が生じ、これをTauが抑制すること[6]や海馬切片におけるCSAのcyclic AMP上昇作用に対してTauが拮抗するという知見も得られている[1]。

今回、中枢神経系におけるCSAの機能をより明確にする目的で、脳切片における興奮性アミノ酸のcyclic AMP増加作用についてTauの拮抗作用の面から検討を加えた。

〔実　験　方　法〕

実験にはHartley系雄性モルモット（350g～450g）を用いた。モルモットを断頭後脳を取り出し、Tissue chopperを用い、海馬、線条体および大脳皮質から、厚さ250μmの切片を作成し、Krebs-Ringer重炭酸塩緩衝液（KR）中で、37°C、60分間preincubation

した。この間に2回、KRを新しいものと交換した。KRの組成は 122mM NaCl, 3mM KCl, 1.2mM $MgSO_4$, 1.3mM $CaCl_2$, 0.4mM KH_2PO_4, 10mM D-glucose, 25mM $NaHCO_3$ であり、95% O_2 − 5% CO_2 で通気したものを用いた。Preincubation終了後、切片を 1ml (1mg protein /ml) に分け、さらに、10分間preincubationしたのち、薬物と10分間反応させた。Tauは薬物添加の10分前に反応液中に加えた。薬物はすべてKRに溶かし、そのpHはNaOHもしくはHClを用いてpH 7.3 ± 0.1に調整した。Cyclic AMPおよび蛋白は、既報の方法[17]に従って定量した。

〔実験結果〕

1) CSAの脳切片内Cyclic AMP増加作用に対するTauの効果

CSAは興奮性アミノ酸として知られているGluやAspと同様、切片内のcyclic AMP量を著明に増加させる[10]。このCSAの作用に対するTauの効果を海馬、線条体および大脳皮質の切片について比較検討した。海馬では、CSAに対する反応性が他に比べて特に高く、TauはCSAによるcyclic AMP量の増加を抑制した。Tauの濃度を変化させたときのTauの阻害効果をFig. 1に示した。Tauの作用は、海馬において1mM CSAの作用に対して0.1mMから認められ、10mMで最大の阻害(約40%)を示した。線条体でもTauの阻害効果は0.3mMから見られ、30mMでは約30%の阻害が認められた。これに対して、大脳皮質ではTauの抑制は認められなかった。

2) 種々の薬物によるCyclic AMP増加作用に対するTauの効果

Adenosine, norepinephrine およびhistamineによるcyclic AMP量の増加に対するTauの効果を海馬、大脳皮質切片について検討した。海馬においてTauはそれぞれ30~50%の抑制を示したのに対して、大脳皮質では、Tauの抑制効果は認められなかった(Fig. 2, 3)。

3) 海馬切片におけるGlu, AspによるCyclic AMPの上昇作用に対するTauの効果

Tauの抑制作用が認められた海馬切片について、GluやAspによるcyclic AMP量の増加に対するTauの影響を検討した(Fig. 4)。Glu(10mM) Asp(10mM)は、海馬切片においてcyclic AMP量を10倍以上に増加させたが、この作用に対してTauは30mMの高濃度においても何ら影響を与えなかった。また、CSA, Glu, Aspについて比較検討した結果(Fig. 5)、1mM CSAの作用をTauは抑制したが、1mM Glu、1mM Aspによるcyclic AMP量の上昇に対してTauは無効果であった。このTauの抑制効果の点で、CSAの作用はGluやAspの作用と異なった側面を有していることが示唆される。

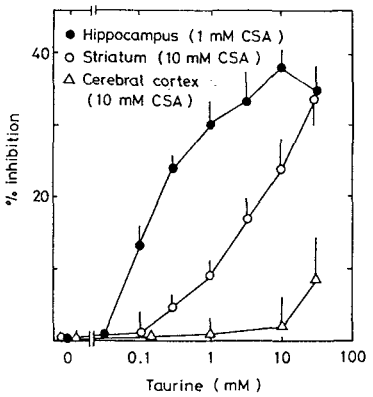


Fig. 1. Effect of the concentration of taurine on cyclic AMP formation elicited by CSA in hippocampal, striatal and cerebral cortical slices.

4) CSAおよびGluによるCyclic AMP増加作用に対する種々の抑制性アミノ酸の効果

Tauと同じく抑制性アミノ酸として知られて

いる[4] GABA, glycine (Gly) および β-alanine (β-Ala) についても、CSA および Glu の cyclic AMP 量の増加作用に対する影響を海馬切片を用いて検討した。CSA の切片内 cyclic AMP 増加作用に対する GABA, Gly, β-Ala の阻害効果は認められたが、Glu の cyclic AMP 上昇作用に対する抑制は見られなかった。

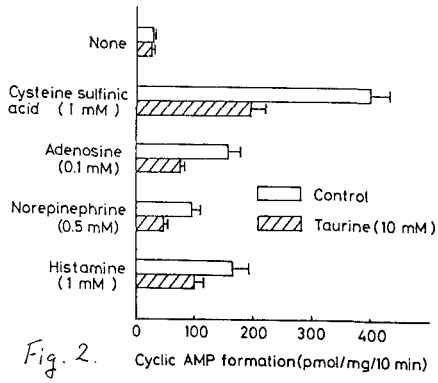


Fig. 2.

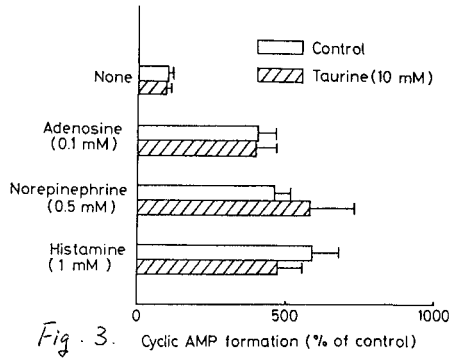


Fig. 3.

Fig. 2. Effect of taurine on cyclic AMP formation elicited by various stimulants in hippocampal slices.
Fig. 3. Effect of taurine on cyclic AMP formation elicited by various stimulants in cerebral cortical slices.

〔考　察〕

CSA は、Na^+ 依存性高親和性取り込み、取分極による Ca^{2+} 依存性の遊離、Na^+ 非依存性の特異的結合部位の存在[2]など神経化学的側面から見ると、Gln や Asp と同様の性質を有することが考えられる。今回の実験結果は、反応系である cyclic AMP 系について検討したものであり、CSA の作用にいくつかの特異性が認められた。

まず、CSA による cyclic AMP 増加作用を脳の部位別に見ると、海馬における反応性が著明であり、CSA の作用に対する Tau の拮抗作用も海馬に特異性が高いことが明らかとなった。この Tau の抑制作用は、CSA の作用に対してだけでなく、adenosine、norepinephrine および histamine の作用に対しても認められた。しかし、従来、CSA と同様に考えられていた Glu や Asp の cyclic AMP 増加作用に対する Tau の拮抗は全く見られなかった。

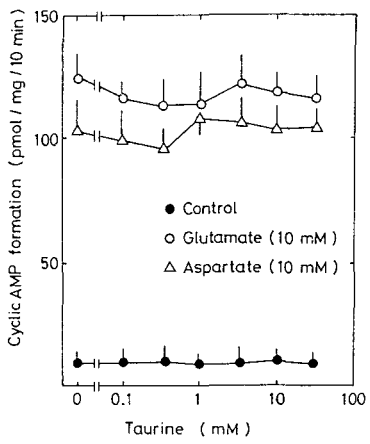


Fig. 4. Effect of taurine on cyclic AMP formation stimulated by glutamate and aspartate in hippocampal slices.

また、CSA の cyclic AMP 上昇作用に対する抑制作用は、Tau と同様に抑制性アミノ酸として考えられている GABA、Gly, β-Ala にも認められたが、これらの抑制性ア

ミノ酸もTauと同じくGluの作用に対して拮抗を示さなかった。

以上のような結果は、共通の作用が考えられる興奮性アミノ酸の中で、海馬においては、CSAのcyclic AMP増加作用に特異性が見られることを示している。

本発表論文の一部は、「第58回日本薬理学会近畿部会（1980年11月、大阪）」において発表した。

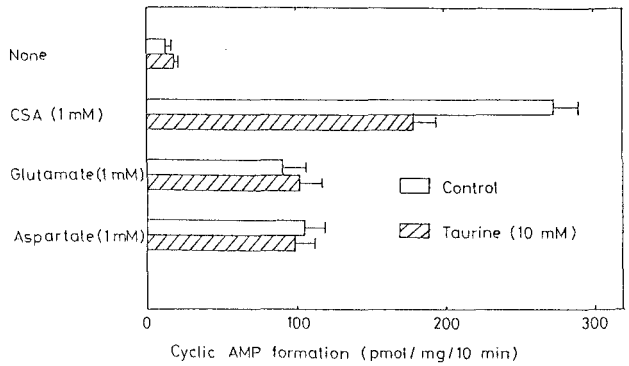


Fig. 5. Effect of taurine on cyclic AMP formation stimulated by exitatory amino acids in hippocampal slices.

〔文　献〕

1. 馬場明道、李　英培、龍野　徹、岩田平太郎　(1980) 含硫アミノ酸　3, 9～12
2. Barker, J. L., Nicoll, R. A., and Padjen, A. (1975) J. Physiol. (London) 245, 521-536
3. Barker, J. L., Nicoll, R. A., and Padjen, A. (1975) J. Physiol. (London) 245, 537-548
4. Curtis, D. R., and Watkins, J. C. (1960) J. Neurochem. 6, 117-141
5. Huxtable, R., and Bressler, R. (1973) Biochim. Biophys. Acta 323, 573-583
6. 岩田平太郎、山上悟，水尾浩之，馬場明道（1980）含硫アミノ酸　3, 25～28
7. Kuriyama, K., Muramatsu, M., Nakagawa, K., and Kakita, K. (1978) in Taurine and Neurological Disorders, ed. by Barbeau, A., and Huxtable, R. J., Raven Press, New York, pp 281-287
8. Nicoll, R. A., and Barker, J. L. (1973) Nature (New Biol) 246, 224-225
9. Shimizu, H., Ichishita, H., and Odagiri, H. (1974) J. Biol. Chem. 249, 5955-5962
10. Shimizu, H., Ichishita, H., Tateishi, M., and Umeda, I. (1975) Mol. Pharmacol. 11, 223-231
11. Shimizu, H., Ichishita, H., and Umeda, I. (1975) Mol. Pharmacol. 11, 866-873
12. 山上　悟，馬場明道，岩田平太郎（1980）神経化学、19, 18～21

80 節前あるいは節後神経切断による白鼠上頸部交感神経節のサイクリックGMP生成量の変動

安藤正人・難波経篤・永田　豊
（保健衛生大・医・生理）

〔要　約〕

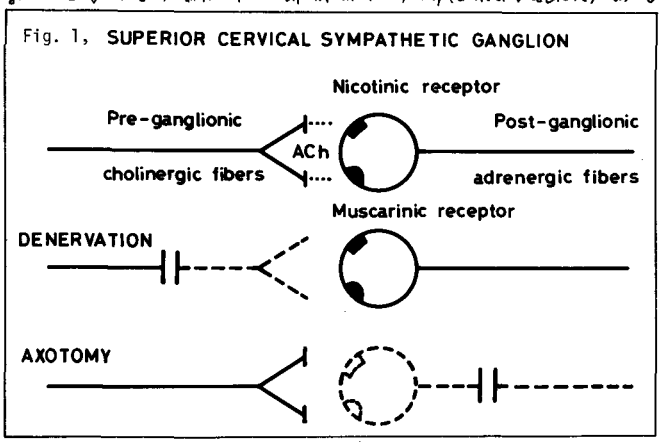
コリン作動性シナプス伝達に共軛しておこるcGMP生成系について、比較的簡単なシナプス結合をもつ白鼠上頸部交感神経節の摘出標本を用いて検討した。

摘出上頸部交感神経節に電気刺激(10Hz)を加えると、cGMP量は明瞭に増加するが、これにatropineを添加すると著明に減少し、hexamethonium(C_6)添加は無効であった。一方、神経節にAChを添加しても著明なcGMP生成が増加するが、これに更にatropineやC_6を添加すると、共にかなり抑制的に作用した。しかし、神経節を高K^+溶液中でincubateして生ずるcGMP生成の増加は、これらcholinergic antagonists添加によっても殆んど変化を受けなかった。ただ、veratridine添加によるcGMP生成増加はtetrodotoxineによって完全にblockされた。このような電気刺激，AChあるいは高K^+添加によって生ずる神経節のcGMP量の増加は、節前線維切断手術(denervation)後1~7日間に亘って著明に減少した。しかしながら、節後神経切断手術(axotomy)をおこなった神経節では、電気刺激やAch添加によってはcGMP増大は見られなかったが、高K^+添加によっておこるcGMP生成の増大はかなり維持された。したがって、高K^+による脱分極刺激は、節前神経末端からのAch遊離とcoupleした現象と推察される。

Key words : cyclic GMP (3',5'-cyclic guanosine monophosphate), superior cervical symapthetic ganglion, denervation or axotomy

---

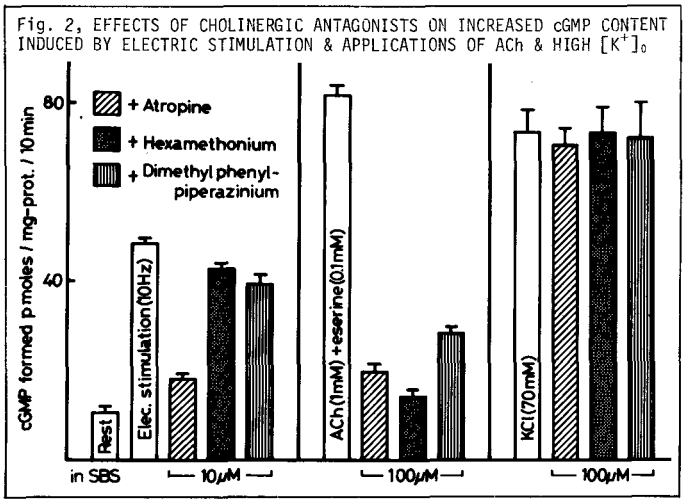
cyclic GMP (3',5'-cyclic guanosine monophosphate, cGMP) は、神経系のコリン作動性シナプス伝達機能に関連して、cyclic AMPと同様に2nd messengerとして働いていることが知られている[6]。我々は、神経線維と神経細胞とがシナプス結合している比較的単純な神経組織で、生体から摘出後も神経伝達機能を維持し、かつかなり高い物質代謝系をもつラット上頸部交感神経節 (cervical sympathetic ganglion, CSG)[9] を用いて、シナプス伝達とcGMP生成との関連を追求した。即ち、節前神経からの電気刺激，ACh添加，高$[K^+]_o$あるいはveratridineなどによる脱分極によって増大した神経節内のcGMP量が、種々のcholinergic antagonistの添加や、節前線維切断(denervation)あるいは節後線維切断(axotomy)などの処置によってどのような影響を受けるかを検討した。



〔実験材料および方法〕

〔1〕節前および節後線維切断手術[1],[8]：Pentobarbitalで麻酔下に無菌的に、一側の上頸部交感神経節の節前線維を切断し、反対側神経節の節後線維を頭蓋内に入る直前で切断した後、皮膚を縫合した(Fig1)。

〔2〕上頸部交感神経節の摘出：Wistar系成熟ラットよりurethane



麻酔下に両側の上頸部交感神経節を摘出し、周囲の結合被膜を注意深く除去して実験に用いた。

(3) Incubationと電気刺激：摘出神経節は、standard bathing solution (SBS)[9]中で95%O_2-5%CO_2 gas を通じながらincubationを行ない、各種の脱分極剤や、antagonist を添加した。また、摘出神経節の節前、節後線維を特殊なガラス毛細管電極に装着して、節前線維より電気刺激(10Hz)を与え、シナプスを伝達したaction potential を確認しながらincubation を行った。

(4) 摘出神経節の化学的定量：Incubation終了後の神経節は、TCAで反応を止め、homogenize した後、遠沈上清をsuccinyl 化した後に、YAMASA cyclic GMP assay kit によりcGMP量を測定した[4]。AChの合成および分解系酵素活性は、それぞれRossier et al[11] およびEllman et al[2]の方法で、またmuscarinic cholinergic receptor binding assay はYamamura & Snyderの方法[12]に依った。タンパクの定量はLowry et alの方法[7]で行った。

〔実験成績および考察〕

(1) 電気刺激，AChおよび高$[K^+]_o$によるCSG内cGMP生成量の増大におよぼすcholinergic antagonistの影響：Fig2に見られる如く、節前側から電気刺激(10Hz)を加えると、明らかなcGMP生成の増大が示された。この増大は、muscarinic antagonistのatropine により著明に抑制されたが、hexamethonium(C_6)やdimethylphenyl piperazinium のnicotinic antagonistでは殆んど抑制されなかった[14]。また、ACh(1mM)をincubation 溶液中に添加すると、cGMP生成量は電気刺激の場合の約2倍の増大を示した。しかし、この場合にはatropine のみならずC_6の添加によってもcGMPの生成がかなり著明に低下した。このことは、外から添加したAChと電気刺激により遊離されるAChとはantagonist との相互作用でpost synaptic receptorへの結合性の差異があるのかも知れない。一方，KCl(70mM)添加による脱分極作用は、ACh添加で示されたと同程度に著明なcGMPの上昇を示し、この上昇は何れのcholinergic antagonist によっても全く抑制されなかった[10]。このことは、高$[K^+]_o$条件による脱分極は

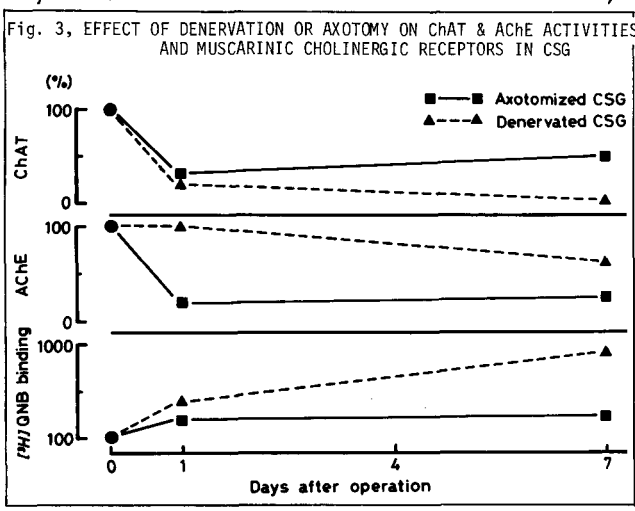


Fig. 4, EFFECT OF DENERVATION OR AXOTOMY ON ACh-INDUCED cGMP INCREASE IN CERVICAL SYMPATHETIC GANGLIA

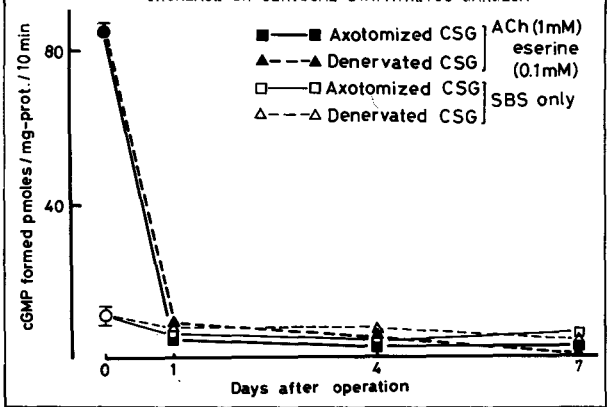
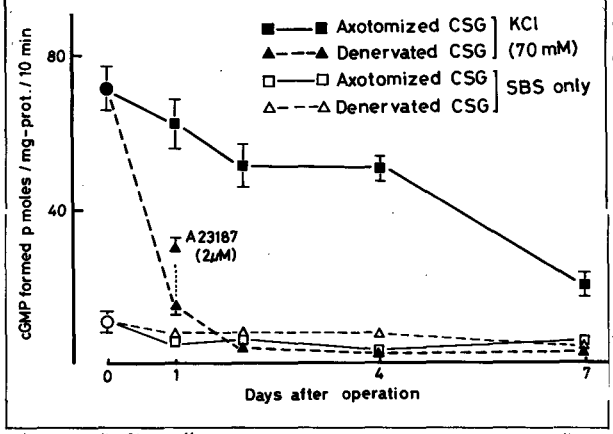


Fig. 5, EFFECT OF DENERVATION OR AXOTOMY ON HIGH $[K^+]_o$-INDUCED cGMP INCREASE IN CERVICAL SYMPATHETIC GANGLIA



、cholinergic receptorを介さないcGMP増大をひきおこしている可能性が考えられる。また、Na^+-channelを開いて脱分極をおこすveratridineの効果は、tetrodotoxine(TTX)により完全にblockされた[5](Table 1)。

[2] Denervationとaxotomyによる ACh 合成および分解系酵素活性、ならびにmuscarinic cholinergic receptorの変動：そこで、これら脱分極条件でのcGMPの増大が節前線維でおこるのか、あるいは節後神経細胞でおこるのかを明らかにするために、denervationとaxotomyを行った神経節を作製した。Fig3に示すようにCSGのChAT活性は手術後1日目で共に一過性に低下したが[1]、axotomyでは1週間後にはかなり回復した。一方、AChE活性はaxotomyにより著明に低下して回復しないが、denervationでは殆んど変化せず保たれた[3]。つまり、このChATは主にpresynaptic terminalに、また、AChEはpostsynapticに局在することが示唆される。また、^{3}HQNBの特異結合として測定されるmuscarinic cholinergic receptorは、denervateした直後から急激に増加し始め、術後1週間では10倍近い増加が認められた。これは、denervationによる'Super sensitivity 現象'に相当するものであろう。

[3] AChによるcGMP増加におよぼすdenervationとaxotomyの効果：Fig4に示すように、Ach刺激に対するcGMP生成の増加は、神経切断により何れも術後1日目から全く失われた。また、これら手術したCSGに電気刺激を与えても、やはりcGMP生成の増加は全く認められなかった。Denervationによりmuscarinic cholinergic receptorは著明に増大しているにも拘らず、このようにcGMPの増大が見られないのは、神経切断によって、receptor-guanylate cyclase couplingが解離するのかも知れないが、今後検討すべき課題であろう。

[4] 高$[K^+]_o$によるcGMP生成におよぼすdenervationとaxotomyの影響：Axotomy CSGでは術後4日を経過しても高$[K^+]_o$によりかなりのcGMPの生成は保たれた。このことは、axotomyにより節後neuronの変性が起っても、高$[K^+]_o$脱分極による節前neuronからのAChの遊離がおこり、この現象とcoupleしたcGMP増加として把えられるものであろう。しかし、denervationによって、高K^+によるcGMP増大は、著明に低下するが、術後1日目では、Ca^{2+}-

Table 1. EFFECTS OF DENERVATION & AXOTOMY ON DEPOLARIZATION- OR NaN_3-INDUCED cGMP INCREASES IN CSG

Conditions	Intact	Denervation	Axotomy
No addition	11.0 ± 2.4 (6)	4.0 ± 1.5 (6)	5.5 ± 2.5 (6)
Veratridine (0.25mM)	82.5*± 6.0 (4)	7.5 ± 2.0 (4)	14.6 ± 5.1 (4)
Vera.+ TTX (1μM)	8.0 ± 2.9 (4)	4.2 ± 1.8 (4)	2.1 ± 1.7 (4)
Na^+-free	10.3 ± 1.7 (4)	3.4 ± 1.9 (4)	4.9 ± 1.8 (4)
Na^+-free + Vera.	8.0 ± 1.6 (4)	2.5 ± 2.0 (4)	4.0 ± 1.4 (4)
Na^+-free + KCl (70mM)	27.1 ± 2.2 (3)	- - -	- - -
Na^+-free + ACh (1mM)	8.3 ± 1.7 (3)	- - -	- - -
Ca^{2+}-free + Vera.	9.1 ± 2.8 (3)	2.0 ± 1.8 (3)	1.6 ± 1.5 (3)
KCl (70 mM)	70.6*± 6.5 (4)	2.5 ± 0.4 (4)	21.6 ± 3.5 (4)
ACh (1mM) + Eser.(.1mM)	82.3*± 3.3 (4)	2.0 ± 0.6 (4)	2.5 ± 2.0 (4)
Ca^{2+}-free	4.2 ± 1.5 (4)	2.2 ± 0.9 (4)	1.9 ± 1.0 (4)
Ca^{2+}-free + KCl (70mM)	25.1 ± 3.9 (4)	2.2 ± 0.6 (4)	10.0 ± 2.4 (4)
Ca^{2+}-free + ACh (1mM)	4.6 ± 2.5 (4)	2.1 ± 0.4 (4)	2.7 ± 0.5 (4)
Na azide (0.01mM)	12.0 ± 1.5 (4)	14.5 ± 1.0 (4)	12.2 ± 1.3 (4)
" (0.1mM)	42.0 ± 2.0 (4)	23.3 ± 2.2 (4)	12.2 ± 2.0 (4)
" (1 mM)	46.8 ± 5.0 (4)	28.8 ± 4.8 (4)	25.0 ± 2.0 (4)

Values are cGMP formed (pmol.)/mg protein/10 min S.E.M., TTX:tetrodotoxin

ionophore (A-23187) を KCl と共に添加すると抑制されていたcGMP生成は、一部回復した。これは、denervation 1日後では未だ充分変性していない節前神経末端部から、Ca^{2+} entryにより ACh 遊離がおこりそれに共軛して guanylate cyclase の活性化が起こるものであろう。

[5] Ca^{2+}の効果：溶液中の Ca^{2+} を除去すると、ACh や KCl 添加によるcGMP生成は著明に抑制された。これは、Ca^{2+}が神経末端の脱分極による ACh-release や muscarinic ACh receptor と共軛した guanylate cyclase の活性化に必須な重要な役割をしていることを示唆している (Table 1)。

[6] NaN_3 の効果：Azideは、guanylate cyclase に直接作用して cGMP を増大させると考えられているが、denervation や axotomy CSG では何れも明瞭な cGMP の減少が見られた。これは、神経切断によって neuron 成分の変性・脱落が起こるためと考えられ、なおかつ示されるcGMP生成は、残った glia 成分が NaN_3 に反応して guanylate cyclase の活性化をひきおこすものであろうか。何れにしても、denervation あるいは axotomy をおこなった神経節を用いた上記の実験から，post synaptic muscarinic ACh receptor に couple したcGMP生成系のほかに，presynaptic nerve terminal の脱分極による ACh-release に共軛した guanylate cyclase の活性化も考慮されなければならないだろう。

[REFERENCES]

1) Burt, D.R.,(1978) Brain Res., 143: 573-579
2) Ellman, G.L., Courtney, D., Andres, Jr.,V. and Featherstone, R.T.,(1961) Biochem. Pharmacol., 7: 88-95
3) Fumagalli, L., De Renzis, G. and Miani, N.,(1976) J. Neurochem., 27: 47-52
4) Honma, M., Satoh, T., Takezawa, J. and Ui, M.,(1977) Biochem. Med., 18: 257-273
5) Kalix, P.,(1976) J. Neurochem., 27: 1563-1564
6) Kebabian, J.W., Steiner, A.L. and Greengard, P.,(1975) J. Pharmacol. Expl. Therap., 193: 474-488
7) Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L. and Randall, R.J.,(1951) J. Biol. Chem., 193: 265-275
8) Nagata, Y. and Tsukada, Y.,(1968) Expl. Brain Res., 5: 202-209
9) Nagata, Y., Yokoi, Y. and Tsukada, Y.,(1966) J. Neurochem., 13: 1421-1431
10) Quenzer, L.F., Patterson, B.A. and Volle, R.L.,(1980) J. Neurochem., 34: 1782-1784
11) Rossier, J., Bauman, A. and Benda, P.,(1973) FEBS Lett., 32: 231-234
12) Yamamura, H.I. and Snyder, S.H.,(1974) Proc. Natl. Acad. Sci. USA., 71: 1725-1729
13) Weight, F.F., Petzold, G. and Greengard, P., (1974) Science, 186: 942-944

81 Ca^{2+}, リン脂質依存性蛋白質リン酸化酵素の精製とその性状

吉川　潮・水口龍次・猪原慎一・山西淳司
越智　聡・高橋十郎・高井義美
（神戸大・医・II生化）

〔要　約〕

種々の神経伝達物質の受容伝達機構にはCa^{2+}と細胞膜イノシトールリン脂質（PI）の代謝回転が関与していることが知られている。私共はこのCa^{2+}とPIの代謝回転が制御する蛋白質リン酸化酵素（C酵素）を見出し解析を行っているが、今回はラット大脳におけるC酵素の細胞内分布とその細胞膜および細胞骨格系との相互関係について解析を行った。ラット大脳のC酵素にはCa^{2+}依存性に細胞膜に結合する可溶型と、Ca^{2+}が存在しなくても細胞膜に結合する膜結合型の2型が存在した。界面活性剤により可溶化した膜結合型C酵素は可溶型C酵素とほぼ同一の性状を示した。可溶型C酵素を種々のカラム操作で単一蛋白質にまで精製した。精製C酵素は分子量約77,000の単一ポリペプチドからできており、サブユニット構造は認められなかった。可溶型C酵素には細胞膜に結合する疎水性部分と、活性中心を有する親水性部分があり、活性中心は細胞質側に位置していると推定された。また、C酵素はH-アクチンにより活性が増強され、H-アクチンと結合した。したがって、C酵素は細胞膜リン脂質の代謝回転のみならず細胞骨格系とも密接に関連し、細胞膜あるいはその下打ちの蛋白質を作用点としている可能性が強い。

Key words：　Protein kinase, Diglyceride, Cytoskeleton

エピネフリン（α作用）やアセチルコリン（ムスカリン作用）など種々の神経伝達物質の受容伝達機構にはCa^{2+}と細胞膜イノシトールリン脂質（PI）の代謝回転が密接に関与していることが知られている(1)。私共はこのCa^{2+}とPIの代謝回転を介する受容伝達機構について解析を行っている(2-4)。この機構では神経伝達物質の刺激によってPIが加水分解されてジグリセリド（DG）が生成される。このDGがCa^{2+}と共に細胞内伝達物質として作用し、セリンリン脂質（PS）の存在下にある種の蛋白質リン酸化酵素（C酵素）を活性化する。活性化されたC酵素が種々の蛋白質をリン酸化し、その結果神経伝達物質の作用が発現される。今回は、この受容伝達機構の中心的役割を果たしているC酵素のラット大脳における細胞内分布と、その細胞膜および細胞骨格系との相互関係について解析を行い、また、ラット大脳の可溶性画分よりC酵素をほぼ均一に精製することに成功したのでその結果を報告する。

〔実験材料と方法〕

ラット大脳の細胞分画はKruegerらの方法(5)に従った。Ca^{2+}依存性プロテアーゼ（Ca^{2+}-プロテアーゼ）はInoueらの方法(6)により精製した。cyclic AMP依存性蛋白質リン酸化酵素（A酵素）およびグリコーゲンホスホリラーゼキナーゼ（GP酵素）はウサギ骨格筋よりそれぞれYamamuraらの方法(7)、Cohenの方法(8)で精製した。赤血球膜はヒト末梢血赤血球よりDodgeらの方法(9)により調整した。H-アクチンはRegensteinとSzent-Györgyの方法(10)により調整した。C酵素活性はCa^{2+}とリン脂質およびDGの存在下に〔γ-^{32}P〕ATPから仔牛胸腺H_1ヒストンへの^{32}Pの転移反応により測定した(2)。A酵素活性はcyclic AMP存在下にC酵素と同一条件下で測定した。GP酵素活性はCa^{2+}の存

在下に[γ-^{32}P]ATPよりグリコーゲンホスホリラーゼへの^{32}Pの転移により測定した。

〔実験結果〕

(I) C酵素の細胞内分布

ラット大脳をEGTAおよびEDTAの存在下に細胞核(P_1)、粗ミトコンドリア(P_2)、ミクロソーム(P_3)、可溶性画分(S)に分画した。上記4画分中の蛋白量とC酵素活性を表Iに示した。P_2画分をミエリン(A)、シナプトソーム(B)、ミトコンドリア(C)に分画し、さらにB画分を低調処理により可溶性画分(B soluble)と膜画分(B membrane)とに分画した結果を表IIに示した。C酵素活性はCa^{2+}の非存在下でも種々の顆粒画分に認められた。またP_2画分のC酵素活性の大部分はシナプトソームに存在しており、その活性の大半は膜結合型であった。膜結合型C酵素は界面活性剤を用いなければ膜より抽出されなかった。膜結合型C酵素を可溶化し部分精製して解析したところ、その物理的、酵素力学的性質や触媒作用および活性化様式は可溶型C酵素とほぼ同一であった。

Table I Subcellular distribution of C-Kinase

Fraction	Protein	Activity	Distribution
	(mg)	(nmol/min)	(%)
H*	232	334	—
P_1	53	61	20
P_2	79	109	37
P_3	19	21	7
S	61	107	36

* H : Homogenate

Table II Distribution of C-Kinase in P_2 fraction

Fraction	Protein	Activity	Distribution
	(mg)	(nmol/min)	(%)
A	2	2	2
B	66	87	97
C	5	1	1
B soluble	9	17	21
B membrane	54	65	79

(II) 可溶型C酵素の精製とその性状

ラット大脳可溶性画分よりC酵素の精製をおこなった。表IIIに示したようにラット大脳(25g)の可溶性画分よりC酵素をDEAEセルロース、セファデックスG-150によるカラム操作、等電点電気泳動、ブルーセファロース、フェニルセファロースによるカラム操作により500～1,000倍精製した。精製標品をSDSポリアクリルアミド電気泳動(SDS-PAGE)により解析したところほぼ単一のバンドが認められた(図1)。C酵素の分子量はSDS-PAGE法では約80,000、セファデックスG-150を用いたゲル沪過法では約87,000、ショ糖密度勾配法では約77,000と算定された。したがって、C酵素にはサブユニット構造はなく単一のポリペプチド鎖より構成されると考えられる。C酵素の活性化には細胞膜のDG、PS、およびCa^{2+}の三者が必要であり、

Table III Purification of C-Kinase

Step	Protein	Activity	Yield
	(mg)	(nmol/min)	(%)
S fraction	672	956	100
DEAE cellulose	38.6	604	63.2
Sephadex G-150	5.36	520	54.4
IEF*	0.60	307	32.1
Blue sepharose	0.09	54	5.6
Phenyl sepharose	0.04	47	4.9

* IEF : Isoelectrofocusing electrophoresis

Table IV Properties of C-Kinase

Molecular weight	77,000
Stokes radius	42 Å
Isoelectric point	pH 5.6
Km for ATP	6.6 μM
Activators	
Ka for PS	36 μg/ml
Ka for DG	0.5 μg/ml
Ka for Ca^{2+}	3 μM

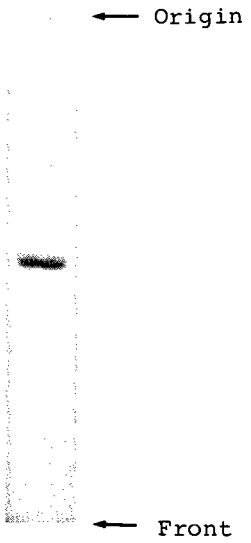


Fig. 1. SDS-PAGE of purified C-Kinase

Table V Release of catalytic fragment from membrane

Ca^{2+}-protease treatment	Protein kinase activity	
	Membrane-bound	Released
	(%)	(%)
(−)	100	0
(+)	22	78

DGは酵素のCa^{2+}とPSに対する親和性を増大させた。表Ⅳに C酵素の性質をまとめて示した。これらの結果は従来部分精製した酵素を用いて得られた結果と同じであった。

(Ⅲ) C酵素と細胞膜との相互作用

可溶型C酵素を赤血球膜とCa^{2+}存在下に混合し、遠心法により膜画分と可溶性画分に再分離すると、C酵素活性の大部分は赤血球膜に結合した。この結合はCa^{2+}が存在しないと認められなかった。赤血球膜に結合したC酵素をCa^{2+}-プロテアーゼで処理すると、大部分のC酵素が活性型の触媒フラグメントとなって膜から遊離した(表Ⅴ)。この触媒フラグメントにはCa^{2+}、PS、DGに対する依存性は認められず、またその分子量をショ糖密度勾配法により解析すると約51,000であった。以上の実験結果より図2に示したように、C酵素には細胞膜に結合して活性化を導く疎水性部分と活性中心の存在する親水性部分があり、活性中心は細胞質側に位置していると考えられる。

(Ⅳ) C酵素とF-アクチンとの相互関係

C酵素反応にF-アクチンを添加すると、DG、リン脂質、およびCa^{2+}の三者の存在下における最大活性がさらに1.5~2倍増強した(図3)。一方、A酵素やGP酵素の酵素反応にF-アクチンを加えても、それらの活性にはほとんど影響はみられなかった。C酵素とF-アクチンの相互作用を遠心法で解析したところ、C酵素はF-アクチンと結合能力をもつことが認められた。F-アクチンとC酵素の結合様式、および他の細胞骨格系の蛋白質との相互関係については現在解析中である。

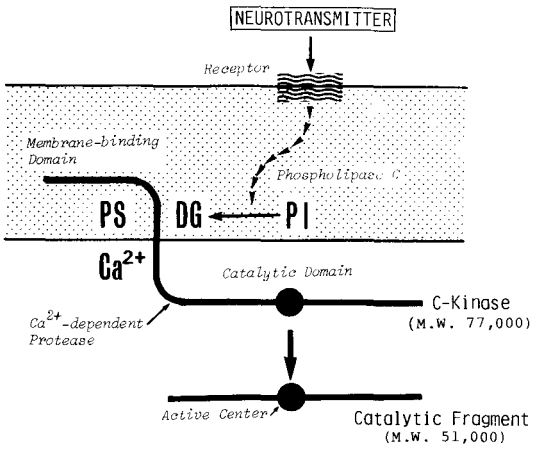


Fig. 2. Interaction of C-Kinase with membrane

〔考察〕

以上の解析結果より、ラット大脳のC酵素には膜結合型と可溶型の二型が存在することが明らかとなった。両型ともにCa^{2+}とリン脂質の相互作用のもと

にDGによって活性化される。しかし、その存在様式が異なることから両型の機能には何らかの相違があると推定されるが、大脳におけるその具体的機能については不明である。DG－C酵素系はカルモジュリン（CaM）とは無関係であり、Ca^{2+}とCaMによって活性調節をうけるミオシン軽鎖リン酸化酵素やGP酵素による蛋白質リン酸化反応系とは異なる伝達機構であることは明白である。一方、微小管、中間フィラメント、アクチンフィラメントの細胞骨格系は細胞膜受容機構の調節に関与している可能性があり、Ca^{2+}によりその重合・脱重合が制御されていることが知られている(11)。またアクチンフィラメントを細胞膜に付着させる蛋白質（ビンクリンなど）がリン酸化されることが報告されている(12)。C酵素は細胞膜とF－アクチンの両者と密接に関連していることから、細胞膜あるいはその下打ちの蛋白質をリン酸化している可能性がある。

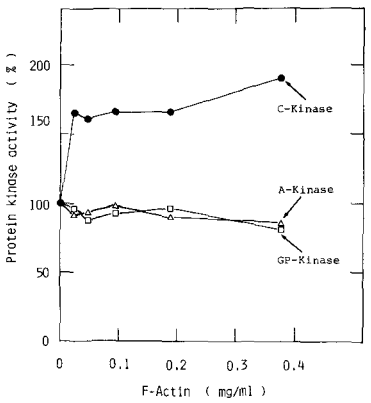


Fig. 3. Effect of F-actin on C-Kinase activity

〔参考文献〕

(1) Michell, R.H. (1975) Biochim. Biophys. Acta 415, 81-147

(2) Takai, Y., Kishimoto, A., Kikkawa, U., Mori, T., and Nishizuka, Y. (1979) Biochem. Biophys. Res. Commun. 91, 1218-1224

(3) Minakuchi, R., Takai, Y., Yu, B., and Nishizuka, Y. (1981) J. Biochem. 89, 1651-1654

(4) Kawahara, Y., Takai, Y., Minakuchi, R., Sano, K., and Nishizuka, Y. (1980) Biochem. Biophys. Res. Commun. 97, 309-317

(5) Krueger, B.K., Forn, J., and Greengard, P. (1977) J. Biol. Chem. 252, 2764-2773

(6) Inoue, M., Kishimoto, A., Takai, Y., and Nishizuka, Y. (1977) J. Biol. Chem. 252, 7610-7616

(7) Yamamura, H., Nishiyama, K., Shimomura, R., and Nishizuka, Y. (1973) Biochemistry 12, 856-862

(8) Cohen, P. (1973) Eur. J. Biochem. 34, 1-14

(9) Dodge, J.T., Mitchell, C., and Hanahan, D.J. (1963) Arch. Biochem. Biophys. 100, 119-130

(10) Regenstein, J.M., and Szent-Györgyi, A.G. (1975) Biochemistry 15, 917-925

(11) Dedman, J.R., Brinkley, B.R., and Means, A.R. (1979) Adv. Cyclic Nucleotide Res. 11, 131-174

(12) Sefton, B.M., Hunter, T, Ball, E.H., and Singer, S.J. (1981) Cell 24, 165-174

82 Superoxide Dismutaseによる脳内Guanylate Cyclaseの活性化：アスコルビン酸要求性について

栗山欣弥・吉川和明・神守功二
（京府医大・薬理）

〔要　約〕

1) ラット全脳 100,000×g (60分) 上清 (S) 分画中の Guanylate Cyclase (GC)は，Superoxide dismutase (SOD)によって著明に活性化された。

2) S 分画に対して酢酸による pH 5.0 沈澱を行なうと，沈澱分画中のGCの SOD 感受性は消失したが，pH 5.0 上清分画を添加すると感受性が回復した。

3) S 分画中の SOD 感受性因子の性質を検討したところ，還元物質の性質に類似しており，またアスコルビン酸 (Asc) が SOD 感受性回復効果を示した。

4) Asc- SOD 系による GC の活性化は，KCN, Diethyldithiocarbamate (DEDTC), Tiron, retinol, hemoglobinによって完全に抑制された。

5) Asc- SOD 系の存在下におけるGCは Mg^{++} 感受性を示したが，微量の Ca^{++} は，これに阻害的に作用した。

6) Asc や SOD の阻害剤である DEDTC をマウスの腹腔内に投与して，小脳内 cyclcGMP 濃度を測定したところ，両物質によって著明な濃度低下が認められた。

以上の結果より，SOD による脳内GCの活性化には Asc の存在が必須であること，また SOD-Asc 系が生理的なGCの活性調節機構に関与している可能性が考えられる。

Key words : Cerebral guanylate cyclase; Superoxide dismutase, Ascorbate

私達はラット中枢神経系の Guanylate Cyclase (GC) の性質について検討し，可溶型酵素は NO ラジカル感受性をもち，またシナプトソーム可溶分画中の GC は NO ラジカルと類似の機序で内在性に活性化を受けている可能性があることを報告した[6),7),9),10)]。一方，シナプトソーム可溶分画中の GC は，種々のフリーラジカル反応物質によって阻害を受けるが，Superoxide dismutase (SOD; Cu, Zn-SOD) によって逆に活性化されることも報告した[8)]。この SOD による活性化は，シナプトソーム可溶分画のみならず可溶型 GC 一般に認められる特徴であり[11),12)]，また可溶分画中の内在性の因子が活性化に関与している可能性がある。今回は，この SOD による GC の活性化機構について，ラット全脳より調製した 100,000×g (60分) 上清 (S) 分画の GC を用いて検討したので報告する。

（実験方法）

酵素標品の調製　雄性 Wistar 系ラットの全脳を，赤血球を注意深く除いたのち9倍量の 0.32 M sucrose で homogenize し，これを 100,000×g (60分) 遠沈して上清 (S) 分画を得た。pH 5.0 沈澱分画は，S 分画に酢酸を滴下して pH 5.0 に調製し，20分間放置後，10,000×g 20分間遠沈して得られた沈渣を 10mM Tris-HCl buffer (pH 7.7) で再溶解して得た。

Guanylate Cyclase (GC) 活性の測定　50mM Tris-HCl buffer (pH 7.7), 4mM $MnCl_2$, 0.1mM [^{3}H]GTP (0.5 Ci/n.mol), 0.5mM isobutylmethylxanthine, 10mM theophylline, 3mM cyclic GMP, 15mM creatine phosphate, 20μg creatine kinase および酵素標品 (10-25μg protein) を含む反応液を 37°C で10分間反応させ，生成した [^{3}H] cyclic GMP を PEI-セルロース薄層クロマトグラフィー[2)]で分離し，その放射活性を測定することによりGC活性を算出した。また実験に用いた SOD (Sigma) はウシ血液から，Ascorbate oxidase (Boehringer Mannheim)

はウリ科植物より，それぞれ調製されたものである。またマウス小脳内cyclic GMP濃度は，マイクロウェーブ照射後，6% TCAで抽出した標品を，radioimmunoassay法(Yamasa-Kit)によって測定して算出した。また蛋白量はLowryらの方法3)によって測定した。なおTable中の数値は3-4例の平均値±標準誤差(S.E.)として表示した。

（実験結果）

1) pH5.0沈澱によるGCのSOD感受性消失

S分画中のGCはSODによって著明に活性化されたが，この分画に酢酸によるpH5.0沈澱を行なったところ，沈澱分画中のGCはSODによって全く活性化されなくなった。しかしこれにpH5.0沈澱上清分画をTrisによって，pH7.7にしてから添加すると，感受性が部分的に回復した (Table1)。このことはpH5.0沈澱上清中にGCのSOD感受性付与因子（SOD-sensitizing factor; SSF）が存在することを示唆する。次にこのSSFの性質をpH5.0沈澱分画中GCのSOD感受性回復能を指標として検討したところ，1)水溶性の低分子(分子量500以下) 2)酸に安定であるがアルカリには不安定，3)熱に比較的不安定，4) Fe^{2+}，Cu^{2+}などの金属イオンが存在すると速やかに失活する，などの性質が明らかになった。

Table 1 SOD-sensitivity of guanylate cyclase (GC) in cerebral 100,000 x g supernatant(S) fraction before and after pH 5.0 precipitation

Preparation	GC activity (pmoles/min/mg prot. ± S.E.)	
	-SOD	+SOD(10 μM)
100,000 x g supernatant (S)	26 ± 2	532 ± 67
I) pH 5.0 precipitate	75 ± 6	76 ± 8
II) pH 5.0 supernatant	N.D.	N.D.
I) + II)	37 ± 4	244 ± 33

N.D. ; not detected.

2) アスコルビン酸によるGCのSOD感受性の回復

上記のSSFの諸性質は還元物質の性質に類似しているため，中枢神経系に多量に存在する還元物質であるアスコルビン酸(Asc)と還元型グルタチオン(GSH)のGCのSOD感受性回復効果を検討した(Table 2)。両者のうちAscはSOD感受性回復作用を示した。一方，GSHにはこの作用はないが，Ascの効果を増強した。次にS分画中のSSFが実際にAscそのものであることを確認するため，S分画をAscorbate oxidase (AO)で処理し，その後SODに対するGCの反応を検討した (Table 3)。AOで前処理をするとSODによって全く活性化されないが，熱処理で失活させたAOで前処理した場合は，著明に活性化されることが判明した。このことは，SSFがAscそのものである可能性を強く示唆する。

Table 2 Effect of ascorbate and glutathione on SOD-sensitivity of GC in pH 5.0 precipitated fraction

Compounds added	GC activity (pmoles/min/mg prot. ± S.E.)		+SOD/-SOD ratio
	-SOD	+SOD(10 μM)	
None	82 ± 6	85 ± 8	1.0
Ascorbate (Asc),1mM	108 ± 22	568 ± 60	5.3
Dehydroascorbate,1mM	53 ± 7	44 ± 6	0.8
Glutathione (GSH),1mM	109 ± 15	114 ± 20	1.0
Asc + GSH	146 ± 12	1161 ± 104	8.0

Table 3 SOD-sensitivity of GC in cerebral S fraction preincubated with ascorbate oxidase

Treatment	GC activity (pmoles/min/mg prot. ± S.E.)	
	-SOD	+SOD(10 μM)
Non-treated (original S fraction)	24 ± 2	593 ± 73
Preincubated (37°C, 5 min)		
with ascorbate oxidase (AO),0.2mg/ml	22 ± 2	20 ± 2
with heat-inactivated AO (90°C, 2 min)	21 ± 3	540 ± 68

Fig. 1にAscとSODの濃度と，GCの活性化との関係を示した。Ascは0.5mMで最大の活性化を示したが，それ以上の濃度では抑制傾向を示した。一方，Asc 0.5mM存在下でのSODのhalf-maximal activationを示す濃度は2.2μMであった。これらは，いずれも生理的に脳内に存在し得る濃度であり，このSOD-Asc系が生理的に機能し得る可能性が示唆される。

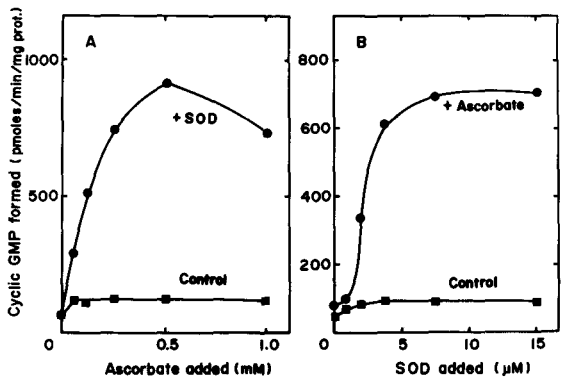


Fig.1 *Activation of GC in pH 5.0 precipitated fraction by ascorbate and SOD*

A: ■——■ -SOD ●——● + 10 μM SOD

B: ■——■ -Asc ●——● + 0.5 mM Asc

3) フリーラジカル反応物質のSOD-アスコルビン酸系によるGCの活性化に及ぼす効果

シナプトソーム可溶分画中GCのSODによる活性化は，種々のフリーラジカル反応物質によって抑制されることは既に報告した[8]。そこで今回は，SOD-Asc系によるGCの活性化に及ぼすフリーラジカル反応物質の影響を検討した(Table 4)．Cu,Zn-SODの阻害剤であるKCNやDiethyldithiocarbamateは，SOD-Asc系によるGCの活性化を完全に阻害した。一方，活性化酸素のScavengerとして知られている物質のうち，Tironやretinolはは，SOD-Asc系によるGCの活性化をほぼ完全に阻害したが，mannitol, ethanol, α-tocopherolには，全く阻害作用が認められなかった。またNOラジカルによるGCの活性化の阻害剤として報告されているhemoglobin[4]は，SOD-Asc系によるGCの活性化をも完全に阻害した。これらのフリーラジカル反応物質の影響から，SOD-Ascによって生じる活性化因子がフリーラジカルの一種である可能性が示唆される。

Table 4 Effect of various compounds reacting with free radicals on GC activity in the presence of SOD

Compounds	GC activity (pmoles/min/mg prot.± S.E.)	
	100,000 x g supernatant (S)	Ascorbate(0.5 mM)-added pH 5.0 precipitate
None	30 ± 2	102 ± 18
SOD, 10 μM	536 ± 45	609 ± 53
SOD + KCN	28 ± 2	98 ± 9
SOD + Diethyldithiocarbamate	27 ± 1	101 ± 12
SOD + Tiron	30 ± 3	97 ± 11
SOD + Retinol	34 ± 4	104 ± 8
SOD + Hemoglobin, 10 μM	28 ± 1	95 ± 7
SOD + Mannitol	548 ± 61	653 ± 73
SOD + Ethanol	587 ± 65	672 ± 62
SOD + α-Tocopherol	561 ± 59	681 ± 50

The concentration of each compound added was 1 mM unless otherwise indicated.

4) SOD-アスコルビン酸系存在下での Mg^{++} 感受性

シナプトソーム可溶分画中のGCは，Mg^{++} の存在下でもSODによって著明に活性化される[5]，そこでSOD(10μM)およびAsc(0.5mM)存在下でのGCの Mg^{++} 感受性について検討した(Fig 2)．SOD-Asc系存在下でGCは Mg^{++} 添加によって高活性を示したが，EGTAを添加するとGC活性の著明な増強が起った。また微量の Ca^{++} は，5mM以下の Mg^{++} の存在下では抑制的に作用した。このことは Mg^{++} の存在下では，SOD-Asc系によるGCの活性化は微量の Ca^{++} によって抑制を受けることを示唆

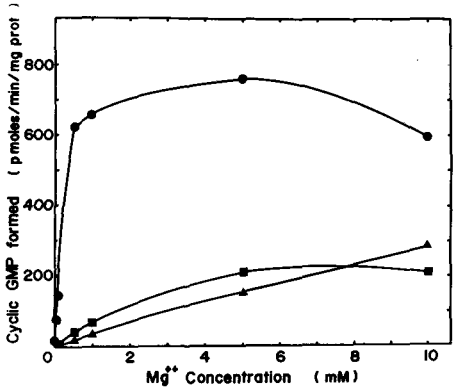


Fig.2 Mg^{++} requirement of GC activity in the Presence of ascorbate and SOD

■——■ Control ▲——▲ + 10 μM Ca^{++}

●——● + 1 mM EGTA

する。一方，Mn^{++} (4mM)の存在下では，EGTAは活性化を著明に抑制した。

5) アスコルビン酸投与によるマウス小脳内 cyclicGMP 濃度の変化

SOD-Asc系によるGCの活性化が生体内で生理的または病態生理学的意義を有するか否かを検討するため，マウスにAscとSOD阻害剤であるdiethyldithiocarbamateを腹腔内に投与し，20分後マイクロウェーブ照射を行ない，小脳内 cyclic GMP 濃度を測定した(Table 5)。両物質はいずれもcyclic GMP濃度を著明に低下させた。Asc は生理的にも多量に存在するため，大量投与によって逆に阻害的に働いた可能性もあるが，使用した量がいずれも大量であるため，マウスの運動量の著減による二次的な変化である可能性も考えられ，これらの実験成績の意義については今後の検討に待たねばならないと思われる。

Table 5 Effect of intraperitoneal administration of ascorbate and diethyldithiocarbamate on cyclic GMP level in mouse cerebellum

Drugs administered	cerebellar cyclic GMP concentration (pmoles/g tissue ± S.E.)
Control (0.9% NaCl)	225 ± 26.0
Asc (2 g/kg)	118 ± 26.9
DEDTC (2 g/kg)	38 ± 21.3
Asc + DEDTC	26 ± 12.6

Asc : ascorbate, DEDTC : diethyldithiocarbamate

（考　察）

Clymanら[1]はヒト臍動脈組織中のcyclic GMPはAsc投与によって著明に増加するが，この過程には他の生理活性物質(bradykinin, histamine)と異なり，外液中のCa^{++}や酸素を必要とせず，むしろ両者は阻害的に働くことを報告している。またcyclicGMPを上昇させる物質は，白血球の遊走性を促進することが知られているが，Ascは白血球のcyclic GMPを上昇させると同時に，ヒト白血球の遊走性を促進する[5]。SODは種々の臓器に広汎に分布しているため，上記の現象は，Asc投与によってSOD-Asc系が作働しGCが活性化されたことによる可能性も考えられる。またin vitroで微量のCa^{++}は，この系に阻害的に作用する（Fig2参照）という事実は，前述のClymanらの報告と考え合わせると興味深い。SODとAscによってどのようなGCの活性化因子が生じるかという点や，神経系におけるこのGC活性化系の生理的あるいは病態生理学的意義については今後の検討を要する課題である。

（文　献）

1) Clyman, R.I., Blacksin, A.S., Manganiello,V.C., and Vaughan, M.(1975) Proc.Nat.Acad.Sci. USA, 72, 3883-3887.

2) Keirns, J.J., Wheeler, M.A. and Bitensky, M.W. (1974) Anal.Biochem. 61, 336-348.

3) Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L. and Randall,R.J. (1951) J.Bilo.Chem. 193, 265-275.

4) Miki, N., Kawabe, Y. and Kuriyama, K. (1977) Biochem.Biophys.Res.Commun. 75, 851-856.

5) Sandler, J.A., Gallin, J.I. and Vaughan, M. (1975) J.Cell.Biol. 67, 480-484.

6) Yoshikawa, K. and Kuriyama, K. (1979) Shinkei-Kagaku 18, 100-103.

7) Yoshikawa, K. and Kuriyama, K. (1980) Biochim.Biophys.Acta 628, 377-387.

8) Yoshikawa, K. and Kuriyama, K. (1980) Biochem.Biophys.Res.Commun. 95, 529-534.

9) Yoshikawa, K. and Kuriyama, K. (1980) Shinkei-Kagaku 19, 58-61.

10) Yoshikawa, K. and Kuriyama, K. (1981) Neurochem.International (in press).

11) Yoshikawa, K. Nishimura, C. and Kuriyama, K. (1981) Neurochem.International (in press).

12) Yoshikawa, K. and Kuriyama, K. (1981) Biochem.Biophys.Res.Commun. (in press).

83 ラット脳可溶性Guanylate cyclaseに対する単クローン性抗体

中根正樹・出口武夫
（都神経研・医化）

〔要　約〕

1. 細胞融合法の技術により、ラット脳可溶性Guanylate cyclaseに対する単クローン性抗体を得た。得られた抗体は可溶性酵素とのみ反応し、シナプス膜の膜結合性酵素とは反応しなかった。また、抗体と酵素を結合させただけでは酵素活性は低下しないことから、活性部位とは異なる部位を認識していると考えられた。
2. 得られた単クローン性抗体は、ラットの各種臓器の可溶性Guanylate cyclaseとはよく反応したが、他の動物種（マウス、ウサギ、トリ、サルなど）の脳の可溶性酵素とはほとんど反応しなかった。
3. 免疫滴定法により、ラットの各種臓器のGuanylate cyclaseを調べたところ、脳のシナプス可溶性分画（M3）および肺では、脳、肝臓、心臓などの酵素と比較して、顕著に活性化されていることがわかった。

Key words：　guanylate cyclase,　monoclonal antibody,　immunochemical titration,

神経系においてacetylcholineによりcyclic GMPが増加することが明らかになって以来、acetylcholineによるムスカリン性神経伝達とcyclic GMPの関連が注目されてきた。我々は、cyclic GMPを合成するGuanylate cyclase（以下GCaseと略す）が、脳のシナプス可溶性分画に特に多く存在することを見出し（2）、神経伝達とcyclic GMPの関連を示唆した。また、GCaseを精製し（7, 8）牛脳可溶性GCaseに対する抗体を得てその性質を明らかにした（8）。この抗体は、各動物種、各臓器の可溶性GCaseとはよく反応するが、膜結合性GCaseとはほとんど反応せず、このことから可溶性GCaseと膜結合性GCaseとは抗原性の点において異なる酵素であるが、各動物種の可溶性酵素は抗原性の上でほぼ同一の酵素であろうと推論した。

最近、従来の抗体にかわって、細胞融合法を用いた単クローン性抗体が注目されている。単クローン性抗体は、抗原のある特定の部位を認識する抗体の均一な集団が得られること、そして一たん得られれば無限に同一の抗体が得られるなど、優れた特長を持っている。

そこで我々は、均一な抗体を得るためと、異なる反応性を持ついくつかの抗体を得る目的で、免疫マウスの脾臓細胞とマウスのミエローマ細胞との融合により、ラット脳の可溶性GCaseに対する単クローン性抗体を産生しながら増殖する融合細胞のクローンを得て、その単クローン性抗体の性質を明らかにし、あわせて免疫滴定法によりGCaseの量を測定しようと試みたのでここに報告する。

〔実験方法〕

(1) GCaseの精製：ラット脳　約300gを、6倍量の25mM Tris·HCl (pH7.6)でホモジナイ

ずし、遠心して得た上清を出発材料とし、等電点沈殿、硫安分画、Phenyl-Sepharose DEAE-Sepharose, Sephacryl S-300 の各ステップにより GCase を部分精製した。標品の比活性は、約 97 nmol/min/mg 蛋白 であった。

(2) 単クローン性抗体の作成：Balb/c マウスの腹腔に 640 μg の部分精製した GCase を百日ぜキワクチン（2×10^9/マウス）と混合して注射した。2週間ごとに2回ブースターを注射し、最後のブースターから3日目にマウスを殺して脾臓を取り出し、メッシュを通して cell suspension をつくった。この脾臓細胞を、ポリエチレングリコール #4000 を使って Balb/c マウスのミエローマ NS-1 細胞と融合させた。融合細胞は、HAT 培地により脾臓細胞とミエローマ細胞から選択し、2回のクローニングをくり返して クローンを得た。

(3) 抗体活性の測定：融合細胞の culture fluid と、ラット脳から部分精製した可溶性 GCase を氷中で一晩インキュベートし、15μg 抗マウス IgG を加えてさらに1時間インキュベートし、105,000×g 30分間遠心して抗原抗体 complex を除去後、上清に残った GCase 活性を測定しその活性低下の程度を抗体活性とした。

(4) GCase 活性の測定：すでに記載した方法に従い、行なった（2, 7）。

〔結果および考察〕

(1) 抗 GCase 抗体を分泌する融合細胞の作成

ラット脳可溶性 GCase を免疫したマウスの脾臓細胞と、ミエローマ NS-1 細胞を融合させ、190個の well にまき込んだところ、全部の well から融合細胞が増殖してきた。その中から比較的抗 GCase 活性の高かったもの4個を選びそれぞれクローニングを行ない、その中からさらに4個のクローンを選んだ。それをさらに二次 クローニングも行ない、最終的に7個のクローンを確立した。その7個のクローンについて性質を調べたところ、いずれも可溶性 GCase とのみ反応し、膜結合性酵素と反応するクローンや活性部位と結合して活性を低下させるクローンは、見出すことはできなかった。

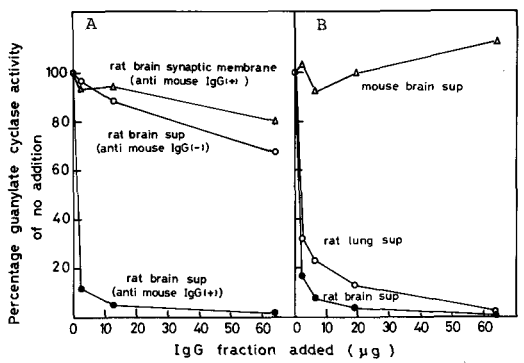


Fig. 1 Effect of monoclonal antibody on various preparations of guanylate cyclase

(2) 単クローン性抗 GCase 抗体の性質：

そのうちで最も活性が高かった クローン（7-B7）を選び、以下の実験に用いた。細胞を大量に培養し、血清を含まない培地で3日間培養後、培養液を集めて細胞が分泌した抗体を 50% 硫安にて沈殿させ、少量の PBS に溶解後、PBS に対して透析したものを IgG 分画として用いた。この抗体は、図1A に示したように、① ラット脳の可溶性 GCase とはよく反応するが、シナプス

Table I Effect of monoclonal antibody on soluble guanylate cyclase from various rat tissues

Tissues	Guanylate cyclase activity (pmol/assay)		% activity of control IgG
	+control IgG	+hybridoma IgG	
brain	360	12.2	3.4
liver	368	24.7	6.7
lung	338	34.4	10.1
heart	315	11.0	3.5

膜の膜結合性酵素とはほとんど反応しない。②抗体とGCaseを結合させただけではGCase活性はほとんど低下しないので、活性部位とは異なる部位を認識している、ことがわかった。また、図1Bおよび表Iに示したように、ラットの各臓器のGCaseとは脳の酵素と同様に反応し、ラットの持つ可溶性GCaseは各臓器とも共通していることを示唆した。それに対し、他の動物種の脳可溶性GCaseとはあまり反応せず(図1B, 表II)、特に同じゲッ歯類であるマウスの脳可溶性酵素およびマウス由来の培養神経芽細胞腫N1E115の可溶性酵素とも、ほとんど反応しなかった。ただ、ウシの酵素とはある程度反応した(表II)。

Table II Effect of monoclonal antibody on soluble guanylate cyclase from brains of various species

Species	Guanylate cyclase activity (pmol/assay)		% activity of control IgG
	+control IgG	+hybridoma IgG	
rat	976	25	3
rabbit	1709	1519	89
mouse	1034	905	88
chick	1133	961	85
bovine	1122	365	32
monkey	1162	1126	97
neuroblastoma N1E 115	1072	1021	95

従来から可溶性GCaseと膜結合性GCaseとは、抗原性、キネティクス、メタル要求性、分子量、蛋白分解酵素に対する反応性など、様々な点で異なる性質を示し(8, 4, 5, 1, 6)かなり異なる蛋白であろうと考えられており、我々もウサギに免疫してつくった牛脳可溶性GCaseに対する抗体が、広く各動物種の可溶性GCaseと交差することを報告した(8)。しかしそれは、ウサギにつくった抗体が多数の部位を認識する抗体の混合物であるために、抗原のわずかな構造の差を認識した抗体があっても、多数の共通部位を認識する抗体の中にあってその差が出てこない可能性がある。それに対し、ここで作った単クローン性抗体は、原理的に抗原の唯一つの部位(おそらくアミノ酸にして数個)を認識する抗体のみから成っている。そのためわずかな構造の違いでも、抗体がその部位を認識していれば明確に差ができるはずである。ここに示したように、ラット脳の可溶性GCaseに対する単クローン性抗体が他の動物種とほとんど交差しないという事実は、進化の過程でGCaseが変化してきていることを示すものである。

(3) 免疫滴定法による各種臓器GCaseの解析

一般に酵素活性を測定しても、それは酵素蛋白としての量を意味しない。特に多くの阻害物質、活性化物質が生体内に存在することが知られているGCaseでは、単に酵素活性を測

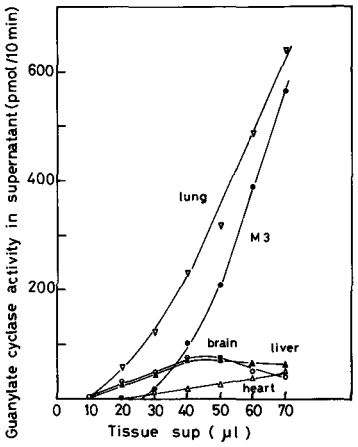


Table III Immunochemical titration of soluble guanylate cyclase of rat tissues

Tissues	Guanylate cyclase activity (pmol/10 min/μg antibody bound)
brain	9.9
synaptosomal soluble fr. (M3)	289
lung	36.5
liver	9.9
heart	7.3

Fig. 2 Immunochemical titration of soluble guanylate cyclase of rat tissues

定するだけでなく、酵素蛋白の量を知ることがGCaseの細胞中での状態を知る上で重要である。そこで、得られた単クローン性抗体を使って、免疫滴定法によりラットの各臓器のGCaseの量を算出し、単位量あたりのGCase活性を調べることにより、各臓器のGCaseが活性化されているのか、あるいは阻害されているのかを知ろうと試みた。図2はラット各臓器の免疫滴定法によるパターンを示した。一定量（1.92μg IgG：各臓器のGCaseの一部と結合する量）の抗GCase抗体を各臓器の遠心上清と混合し、抗体に結合したGCaseを二次抗体・遠心によって除去し、上清に残ったGCase活性をプロットしたものである。上清が少ないうちはGCaseは完全に抗体と結合して除去されるが、上清の量を増やすにつれて結合しきれなかったGCase活性が検出される。この結果を単位抗体量に結合したGCaseの活性として表わすと表Ⅲのようになり、シナプス可溶性分画（M3）や肺は、おそらく内在性の活性化因子のために顕著に活性化された状態であることがわかった。我々はすでにシナプス可溶性分画（M3）にGCaseの内在性活性化因子が存在し、GCaseの活性調節に重要な役割をはたしているらしいことを報告しているが（2, 3）、ここで示したデータはシナプス可溶性分画におけるGCaseの高い活性が、GCase分子が多量に存在するためではなく（図2：M3のX軸切片）、内在性活性化因子による顕著な活性化のためであることを示している。肺のGCaseが活性化された状態にあることも、肺にも内在性の活性化因子が存在するという報告（9, 10）と合致する。

単クローン性抗体は、その抗原に対する認識部位が全く同一の抗体からなること、同一の抗体が無限に得られることなど、今までの抗体では得られなかった優れた特長を持つ。今後、この特長を生かして、免疫組織化学によってGCaseの局在を明らかにしたり、酵素免疫法による蛋白としての量の測定など、cyclic GMPの神経系における機能を明らかにする上での手がかりにしたいと考えている。

最後に、単クローン性抗体の作成にあたり、多くの有益な助言をいただいた本研究所　微生物学研究室　安東民衛博士に感謝いたします。

本研究の一部は、文部省科学研究費補助金　奨励研究（No. 56771115）の援助によって行なわれた。

REFERENCES

1. Chrisman, T. D., Garbers, D. L., Parks, M. A. and Hardman, J. G. (1975) J. Biol. Chem. 250, 374-381
2. Deguchi, T., Amano, E. and Nakane, M. (1976) J. Neurochem. 27, 1027-1034
3. Deguchi, T. (1977) J. Biol. Chem. 252, 7617-7619
4. Garbers, D. L. (1978) J. Biol. Chem. 253, 1898-1901
5. Kimura, H. and Murad, F. (1975) J. Biol. Chem. 250, 4810-4817
6. Lacombe, M. and Hanoue, J. (1979) J. Biol. Chem. 254, 3697-3699
7. Nakane, M. and Deguchi, T. (1978) Biochim. Biophys. Acta 525, 275-285
8. Nakane, M. and Deguchi, T. (1980) Biochim. Biophys. Acta 631, 20-27
9. Nakazawa, K. and Kitajima, S. (1980) Biochim. Biophys. Acta 612, 171-177
10. White, A. A. and Karr, D. B. (1980) J. Cyclic Nucleotide Res. 6, 271-282

84 培養神経芽細胞腫NIE115に於けるPhosphatidic acidによるCa^{2+}の取り込みとcyclic GMP生成の促進

大迫俊二*・出口武夫
（都神経研・医化）

〔要　約〕

Phosphatidic acid（PA）を培養液に添加すると、神経芽細胞腫N1E115内の、cyclic GMP（cGMP）量が、極めて顕著に増加した。PA 1 μg/mlで有意の増加を示し、100 μg/mlで最高値に達した。PA以外のリン脂質は、cGMP量を全く増加させないか、僅かな増加を示すに過ぎなかった。PAによるcGMP量上昇には、細胞外Ca^{2+}が必須である。PAは、細胞内へのCa^{2+}の取り込みを2～5倍に促進し、この経時変化は、cGMP量上昇の変化と良く一致した。PAによる細胞内へのCa^{2+}の取り込みは、培養心筋細胞でも観察され、PAが様々な細胞膜で、Ca^{2+} ionophoreとして作用するか、もしくは、Ca^{2+}に特異的なgateを開かせる可能性を、示唆するものと思われる。細胞を、phospholipase C（PLase C）で処理すると、PAへの$^{32}P_i$の取り込みが増加し、それと平行して細胞内へのCa^{2+}の取り込みとcGMP生成が促進された。このように、内在性及び外から添加したPAは、細胞内へのCa^{2+}の流入を促進し、その結果cGMP生成を増加させるものと思われる。

Key words：　Phosphatidic acid,　Calcium,　Cyclic GMP

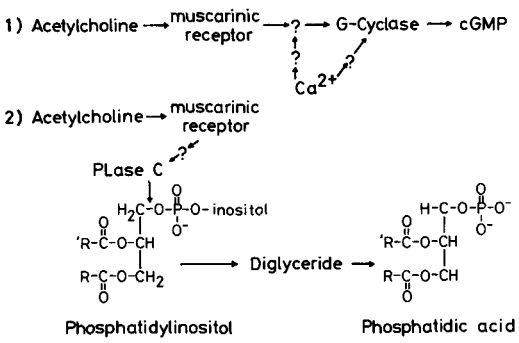
Acetylcholine（Ach）や他の伝達物質は、組織切片や培養細胞等で、細胞外Ca^{2+}存在下にcGMP量を増加させる。[7,9,10,14,15,19,21] しかし、Achは無細胞系では、cGMP合成酵素、guanylate cyclase（G-cyclase）を活性化しない。[4,6,12,22] G-cyclaseに対するCa^{2+}の作用は、様々であり、[2,12,13,25] Achによるcgmp生成の促進の機構とこの反応に於けるCa^{2+}の役割は、不明のままである。（図1(1)）

一方、Achと他のhormoneは、様々な組織でphosphatidylinositol（PI）代謝回転を昂進し、phosphatidic acid（PA）の蓄積を引き起こすことも種々の組織について証明されている。[16] これはAchによるmuscarinic receptorの刺激が、phospholipase C（PLase C）を活性化し、diglycerideの生成を経て、PAを蓄積させるものと想定されている。（図1(2)）これらの知見をもとに、MichellはPI代謝回転が、細胞膜のCa^{2+}透過性調節機構に関与すると云う仮説を提出している。[16] またTyson等は、二つの水層を有機溶媒で仕切った系に於いて、PAがCa^{2+}の移動を媒介することを報告した。[24] 最近、平滑筋や耳下腺などで、PAが、Achと類似の作用を示すことが報告された。[3,18,20] しかし、PAが生体膜でCa^{2+}の取り込みを促進していると云う証拠は未だ示されていない。

Ach等の伝達物質は、様々な組織でcGMP生成とPAの蓄積の両方を促進するので、これら二つの反応に関連性があると思われる。我々はここに、PAの培養液への添加により、培養神経芽細胞腫のCa^{2+}の取り込みとcGMP生成が、顕著に促進されることを見出したので報告する。

脚注：＊　所属　名古屋大学理学部生物学科

Fig. 1. Biochemical events induced by stimulation of muscarinic receptor.



〔実験方法〕

(1) 細胞培養：神経芽細胞腫 NLE 115 は、三菱生命研の天野博士から頂き、培養は、プラステックシャーレを用い、5% 牛胎児血清を含む Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) 10% CO_2 - 90% 空気、37°C 中で静置培養を行った。[1]

(2) cGMP の測定：既に記載した方法に従い行なった。[5]

(3) Ca^{2+} の取り込みの測定：60mm ディッシュを 2ml DMEM-Hepes (pH 7.4) で 3 回洗い、37°C 30 分間 1.8 ml DMEM-Hepes でインキュベートした。反応は、4μCi $^{45}CaCl_2$ と目的の試薬を含む 0.2ml DMEM-Hepes を入れ開始し、任意の時間に、培養液を吸引により除去し、150mM NaCl、5mM $CaCl_2$、0.1ml $LaCl_3$、10mM Hepes (pH 7.4) 4ml で、3 回洗って反応を止めた。0 時間の試料は、$^{45}CaCl_2$ を添加後即座に吸引除去し (5秒以内)、上記の様に洗浄した。$^{45}Ca^{2+}$ の取り込みの値は、0 時間の値を引いたものである。細胞は 0.05% デオキシコール酸 1.5ml に懸濁し、放射活性を測定した。[8,17]

(4) PA への $^{32}P_i$ の取り込みの測定：35mm ディッシュをリン酸を除いた DMEM-Hepes で洗い、5μCi $^{32}P_i$ を含む同液で 45 分間インキュベートした。反応は、目的の試薬の添加により始め、任意の時間に培養液を吸引除去し、冷 10% TCA を加え、反応を停止させた。脂質は既報の方法に従い抽出し、薄層クロマトで分離後、標準 PA の部分を掻き取り放射活性を測定した。[17]

〔実験結果と考察〕

培養液に PA を添加すると、神経芽細胞腫内の cGMP 量が、顕著に増加した。(図 2A) phosphodiesterase 阻害剤である IBMX を添加しない場合は、15~30 秒で最高値に達し、その後速やかに減少する。IBMX 存在下でも、15~30秒で最高値に達するが、減少は緩やかである。PA による cGMP 量の経時変化は、

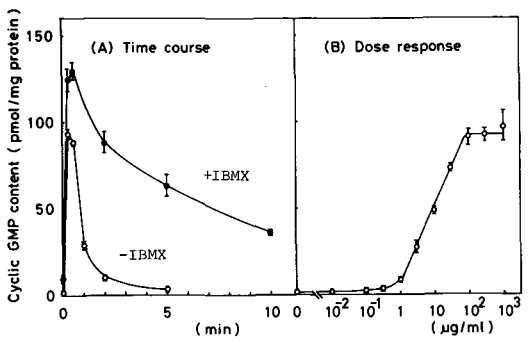


Fig. 2. Response of intracellular cyclic GMP content in neuroblastoma cells to phosphatidic acid.

Table I. Effect of various phospholipids on cyclic GMP content in neuroblastoma cells.

Addition	Cyclic GMP content (pmol/mg protein)
None	1.6 ± 0.1
Phosphatidic acid	101.0 ± 5.6
Phosphatidylcholine	1.7 ± 0.2
Phosphatidylethanolamine	4.5 ± 1.0
Phosphatidylinositol	1.9 ± 0.3
Phosphatidylserine	3.4 ± 0.1
Sphingomyelin	3.6 ± 0.7
Cardiolipin	7.1 ± 1.3
Diglyceride	4.4 ± 0.2

Ach, PGE_1[15], histamine[19]によるcGMPの変化と同様である。cGMP量増加に対するPAの濃度は、1μg/mlで既に有意の増加を示し、100μg/mlで最高値に達する。最高値では、cGMP量は無添加群に比べて50～70倍もの上昇を示した。(図2B)なおPAはcAMPに対しては影響を与えなかった。

atropineとpyrilamineはそれぞれ、Achとhistamineによるの上昇を抑制したが、PAによる増加は、両阻害剤によって影響されなかった。従ってPAによるcGMP上昇は、少なくともmuscarinic或いはhistaminic receptorを介したものではないと考えられる。

PAの作用の特異性を検討するため、生体内に存在する種々のリン脂質の効果を比較した。(表1) 100μg/mlの濃度で、PAはcGMP量を63倍も増加させたが、他のリン脂質はcGMPを全く増加させないか、僅かに増加させるに過ぎなかった。PIからPAへの中間生成物であるdiglyceride は、2.5倍の増加を示すに過ぎなかった。この僅かな増加は、PAの混入によるためとも考えられる。

Ach等の伝達物質によるcGMPの増加には、細胞外Ca^{2+}の存在が必須であると云われている[7,10,21]。PAによるcGMP上昇も細胞外Ca^{2+}に依存した。(表2) 無Ca^{2+}, 1mM EGTAを含む培養液で反応させると、PAによるcGMPの上昇は完全に阻害された。合成dipalmitoyl PAの場合も、細胞外Ca^{2+}に依存したcGMP上昇が観察された。

PAが細胞内へのCa^{2+}の取り込みを促進するかどうかを検討するため、細胞による$^{45}CaCl_2$の取り込みを測定した。無添加群では、時間と共にCa^{2+}の取り込みが直線的に増加するのに対し、PA添加群では、最初の30秒で2～5倍に増加した。(図3A) この結果は、PAによるcGMP増加が、30秒以内に最高値に達するという事実と一致する。(図2A) PAに依存したCa^{2+}の取り込みは、細胞外Ca^{2+}濃度0.6mMでほぼ最高値に達した。(図3B) PAによるcGMP上昇も細胞外Ca^{2+}濃度0.6mMで最高値に達し、PAによるCa^{2+}の取り込みの変化はcGMP増加と良く一致する。

PAによるCa^{2+}の取り込みは、培養マウス胎児心筋細胞

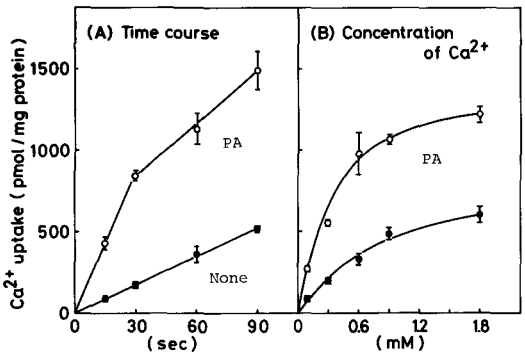


Fig. 3. Stimulation of Ca^{2+} uptake by phosphatidic acid in neuroblastoma cells.

Table II. Effect of removal of extracellular Ca^{2+} on the elevation of cyclic GMP by phosphatidic acid.

Addition	Cyclic GMP (pmol/mg protein) $+Ca^{2+}$ (1.8 mM)	$-Ca^{2+}$ + EGTA
None	2.2 ± 0.4	2.1 ± 0.3
Phosphatidic acid	85.8 ± 11.7	5.7 ± 0.7
Dipalmitoyl phosphatidic acid	99.0 ± 10.3	4.9 ± 0.7

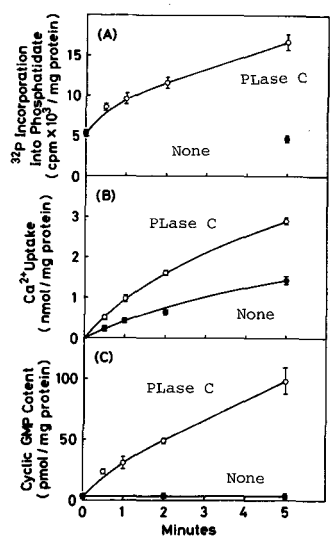


Fig. 4. Effect of phospholipase C treatment on (A) ^{32}Pi incorporation into phosphatidic acid, (B) uptake of Ca^{2+}, and (C) cyclic GMP content in neuroblastoma cells.

に於いても観察された。100μg/ml と 250μg/ml の PA はそれぞれ 6 倍と 13 倍に、Ca^{2+}の取り込みを促進した。

Ach 等の伝達物質は、muscarinic receptor を介し、PI に特異的な PLase C を活性化し、その結果、細胞膜の PA を蓄積するものと推定されている。[16] この可能性を調べるために、細胞を Bacillus cereus の PLase C で処理した。PLaseC により、PA への $^{32}P_i$ の取り込みが次第に増加した。それと平行して $^{45}Ca^{2+}$ の取り込みと cGMP 生成が 5 倍以上も促進された。(図4)

このように内因性及び外から添加した PA は、細胞内への Ca^{2+} の流入を促進し、その結果 cGMP 生成を促進することが明らかになった。PA は培養心筋細胞に於いても、Ca^{2+} の取り込みを促進するので、PA による細胞内への Ca^{2+} の流入の促進は、細胞膜に普遍的な作用であると思われる。PA による細胞膜の Ca^{2+} 透過性調節機構には二つの可能性が考えられる。一つは、PA が Ca^{2+} と複合体を形成し、生体内の Ca^{2+} ionophore として機能するということであり、もう一つは、PA が生体膜に取り込まれ Ca^{2+} gate を開かせることである。

Ach 等の伝達物質は、様々な組織で PI 代謝回転を昂進し、PA の蓄積を促進すると共に、細胞内 cGMP を増加させることが知られている。[16] 今回の我々の実験結果は、Ach 等の伝達物質による生体膜の PA の蓄積が、細胞内への Ca^{2+} 流入を促進し、ひいては、cGMP 量が増加するという可能性を示唆するものである。また、我々の観察は、平滑筋や耳下腺等に於いて PA が Ach と類似の作用を示すという報告[3,18,20] とも一致している。

最近、Hirata と Axelrod は、リン脂質のメチル化が、Ca^{2+} 透過性調節と共役し、その結果、様々な細胞内の反応を引き起こす機構を提唱している。[11] また、Takai 等は PI 代謝回転中に生成される diglyceride によって活性化される protein kinase の存在を報告し、細胞膜受容伝達機構に密接な関連性がある可能性を示唆している。[23] このように、情報伝達機構に於いて、リン脂質の挙動、PI 代謝回転やリン脂質のメチル化などが、重要な役割を果している可能性があり、生体に於ける情報の受容伝達機構の解明に当り、一連の細胞膜のリン脂質の動きの生化学的解析は、重要な課題と思われる。

本研究の一部は、文部省科学研究費補助金、一般研究(No. 548121)と特定研究「代謝応答とその病態」の援助によって行なわれた。

〔文 献〕

(1) Amano, T., Richelson, E. and Nirenberg, M. (1972) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 69, 258-263 (2) Chrisman, T. D., Garbers, D. L., Parks, M.A. and Hardman, J. G. (1975) J. Biol. Chem. 250, 374-381 (3) Clark, R. B. Salman, D. M. and Honeyman, T. M. (1980) J. Cyclic Nucleotide Res. 6, 37-49 (4) Deguchi, T. (1977) J. Biol. Chem. 252, 7617-7619 (5) Deguchi, T., Saito, M. and Kono, M. (1978) Biochim. Biophys. Acta 544, 8-19 (6) DeRubertis, F. R. and Craven, P. A. (1976) J. Biol. Chem. 251, 4651-4658 (7) Ferrendelli, J. A., Kinsherf, D. A. and Chang, M. M. (8) Fosset, M., DeBarry, J., Lenoir, M. C. and Lazdunski, M. (1977) J. Biol. Chem. 252, 6112-6117 (9) George, W. J., Polson, J. B., O'Toole, A. G. and Goldberg, N. D. (1970) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 66, 398-403 (10) Goldberg, N. D. and Haddox, M. K. (1977) Ann. Rev. Biochem. 46, 823-896 (11) Hirata, F. and Axelrod, J. (1980) Science 209, 1082-1090 (12) Kimura, H. and Murad, F. (1974) J. Biol. Chem. 249, 6910-6916 (13) Kimura, H. and Murad, F. (1975) J. Biol. Chem. 250, 4810-4817 (14) Lee, T. P., Kuo, J. F. and Greengard, P. (1972) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 69,3289-3291 (15) Matsuzawa, H. and Nirenberg, M. (1975) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 72, 3472-3476 (16) Michell, R. H. (1975) Biocim. Biophys. Acta 415, 81-147 (17) Ohsako, S. and Deguchi, T. (1981) J. Biol. Chem. in press. (18) Putney, J. W., Weiss, S. J., Van De Zande, C. M. and Haddas R. A. (1980) Nature 284, 345-347 (19) Richelson, E. (1978) Science 201, 69-71 (20) Salmon, D. M. and Honeyman, T. W. (1980) Nature 284, 344-345 (21) Shultz, G., Hardman, J. G., Shultz, K., Baird, C. E. and Sutherland, E. W. (1973) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 70, 3889-3893 (22) Stoner, J., Manganiello, V. C. and Vaughan, M. (1974) Mol. Pharmacol. 10, 155-161 (23) Takai, Y., Kishimoto, A., Iwasa, Y., Kawahara, Y., Mori, T. and Nishizuka, Y. (1979) J. Biol. Chem. 254, 3692-3695 (24) Tyson, C. A., Vande Zande , H. and Green, D. E. (1976) J. Biol. Chem. 251, 1326-1332 (25) Wallach, D. and Pastan, I. (1976) Biochem. Biophys. Res. Commun. 72, 859-865

85 コリンアセチルトランスフェラーゼ(EC2.3.1.6)の超微量測定法

加藤尚彦(東大・医・脳研)

〔要　約〕

コリンアセチルトランスフェラーゼ(ChAT)の超微量測定法を開発し、単一運動神経細胞のChAT活性を測定した。

(1) ChATの逆反応により生成されるアセチルCoA(2~130 fmol)を、CoAサイクリング(酵素的増幅定量法)を用いて2,000~6,000倍量のNADPHに増幅転換し、続いてこのNADPHをNADPサイクリングを用いて30~600倍に増幅し測定した。最少12.8 nlの反応液に単一細胞体(又はその一部)を加えて反応させ、最終的にアセチルCoAを420,000倍に増幅し、最大感度として2.5 fmol/測定を得ることができた。

(2) ウサギの脊髄前角細胞は、155±86(S.D.) mmol/kg乾燥重量/時の活性をもち、個々の細胞の活性は大きくばらついた。単一細胞体を分割して、その分割小片の活性を測定しても活性は大きくばらつき、細胞内でChATは不均一な分布を示していることが明らかとなった。

(3) ウサギの脊髄後根神経節細胞(非コリン作動性)にはChAT活性は見出せなかった。

Key words : Choline acetyltransferase, Microassay, Motor neuron

---

従来のChAT測定法は感度が不十分であるため、哺乳類の中枢神経系におけるコリン作動性要素を細胞レベルで定量的に解析することができなかった。本報告では、新しく酵素反応を利用したChATの超微量測定法を開発し、この方法を用いて単一運動神経細胞の活性を測定し、また単一細胞体内でのChATの分布を調べた結果について述べる。

実験方法

〔測定試料〕　瞬間凍結した2匹のウサギ(雄, 2.8 kg)の脊髄と大脳、および2匹のマウス脳から、凍結切片(14 μm)を切り出す。切片を凍結乾燥し、乾燥切片より顕微鏡下で脊髄前角細胞(0.8~3 ng乾燥重量、以下同じ)、脊髄後根神経節細胞(0.6~3 ng)[5),7)]、脳の各部位(表2参照、0.6~2 μg)を切り出して、秤量した後試料とした。同時にマウスの大脳(上丘より上部の脳幹を含む)を20 mM-トリス塩酸(pH 8.0)中でホモジナイズして試料とした。

〔測定方法〕　ChATの逆反応によって生成されるアセチルCoAを、酵素を用いる増幅反応(CoAサイクリング[8)]およびNADPサイクリング[11)])により特異的に増幅し測定した(表1の反応式参照)。

反応液は、100 mM-トリス塩酸(pH 7.5)、500 mM-NaCl、1 mM-硫酸エゼリン、200 μM-ジチオスレイトール(DTT)、300 μM-CoASH、10 mM-アセチルコリン(Ach)塩酸塩を含み、その12.8 nl~50 μlを試料の量に応じて用いた。典型例として、前角細胞の活性測定実験について説明する。54.3 nlの反応液を蒸発を防ぐためパラフィン油層

(1) アセチルコリン + CoASH ⟶ アセチルCoA + コリン ; ChAT逆反応

(2) アセチルCoA —(n倍に増幅)⟶ $NADPH_n$; $n = 2{,}000 \sim 6{,}000$, CoAサイクリング

(3) $NADPH_n$ —(m倍に増幅)⟶ $NADPH_{mn}$; $m = 30 \sim 600$, NADPサイクリング

表1 酵素反応

の底（2mm×4mmの"井戸"をテフロン板に穿ち、パラフィン油を満たす，"油井法"[5),7)]）に小滴として沈め、顕微鏡下で細胞試料を直接小滴中に加えて反応を開始する。38℃、30分反応後、260μlの400μM N-エチルマレイミド（NEM）を加えて反応を止める。NEMはChATを失活させるのと同時に、基質のCoASH、またDTTとチオエーテルを生成し、CoASHはCoAサイクリング反応により増幅されなくなる。混合液の小滴を38℃、30分加温し続け、チオエーテルを十分生成させた後、94℃で15分加熱して試料中の酵素を失活させる。これらの加温・加熱操作により、加えたNEMの97%が破壊される。次に残ったNEMがサイクリングの酵素反応を阻害せぬようにするため、還元グルタチオン（GSH）を加えたCoAサイクリング反応液（citrate synthase，430μgタンパク/ml；phosophotransacetylase，207μgタンパク/ml；10.7μM GSH；2倍濃度の他の成分）260μlを加えてアセチルCoAを2,400倍増幅する。続いて3.20μlの"指示反応液"[8)]を混合液の小滴に加えて反応させると、生成されたアセチルCoAは2,400倍のNADPHに転換される。"指示反応液"は過剰量の$NADP^+$を含み、NADPHを保存したまま$NADP^+$を破壊するため、593mlの2.5M NaOHを加えた小滴を70℃、30分加熱した後、全量をパラフィン油中からとり出してNADPサイクリング液（100μl，8mm×65mmパイレックス試験管中にとる）に加えて、NADPHのみを特異的に37倍に増幅して測定する。CoA-およびNADP-サイクリング（二重サイクリング）による増幅率は、最終的に88,800倍となった。ブランクには反応液そのまま、スタンダードとしては10～173fmolのアセチルCoAを反応液に加えて、試料とともに処理した。この例ではブランク値は27.5fmolに相当し、試料による生成アセチルCoA量の半分以下となった。

脳の各部位の試料（μgオーダー）を測定するときは，2.20μlの反応液を用いて油井中で反応を行い，CoAサイクリング（50μl、増幅率：6,000～10,000倍）のみをパイレックス試験管内で行った。ホモジェネート試料は、50μlの反応液中に加えて反応させ、細胞試料と同様に処理した後、反応液の1.10μlをとりCoAサイクリングによって増幅測定した。

実験結果

〔ChATの逆反応の性質〕 反応の見かけのK_mは、$K_{mCoASH} = 137\mu M$（10mM Ach存在下）、$K_{mAch} = 2.81mM$（190μM CoASH存在下）であった。1.26mg湿重量/mlのマウス大脳ホモジェネートを用いると、300μMのDTTは加えないときに比べて活性を3.5倍に増加させ、ブランクを25%減少させた。またNaClによる活性化は、500mMでプラトーに達した。この試料濃度で反応は30分間直線的に進み、その後は次第に減少して、60分後には直線的に進んだときの80%となった。30分の反応時間では、マ

ウス大脳ホモジェネートによって生成されるアセチルCoAの量は、4mg湿重量（または0.8mg乾燥重量）/ml以下で、組織濃度に比例した（図1）。実際の反応は2mg湿重量/ml相当の濃度以下で行い、活性の有無を調べる場合（後根神経節細胞や小脳試料）は、出来るだけ高濃度で測定を試みた。部分精製したChAT酵素標品（ウシ脳、Sigma）の活性は、2.5 U/mgタンパクであり、反応液中のCoASHとAchを305μMアセチルCoAと0.5mMコリン塩酸塩に置きかえて測った正反応速度（23.2 U/mgタンパク）の0.108倍であった。

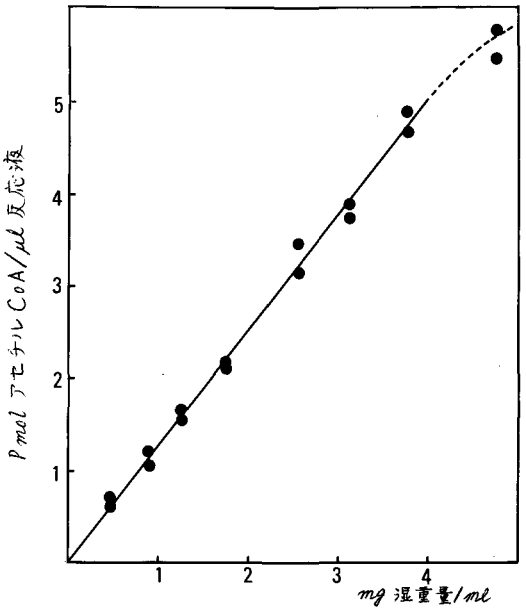


図1　マウス大脳ホモジェネートのChAT活性
反応液中で38℃，30分反応（方法参照）。各点は1回の測定値を示す。

〔各試料のChAT活性〕　マウスの大脳ホモジェネートは、乾燥重量当りで換算すると、大脳皮質やアンモン角の1/5の活性を示した（表2）。マウスの線状体は、脳部位試料中最も活性が高く、ウサギの大脳皮質はマウス試料と同程度の活性を持っていた。ウサギおよびマウスの小脳の分子層、顆粒層、白質は、ほとんど活性を持っていなかった（測定の詳細省略）。

マウス	[mmol/kg（湿重量）/h ± S.D.]
大脳ホモジェネート*	2.33 ± 0.36 (10)
大脳皮質	[mmol/kg（乾燥重量）/h ± S.D.]
前頭葉	2.00 ± 0.89 (8)
頭頂葉〔新鮮〕	2.25 ± 0.60 (17)
〔失活〕**	2.03 ± 0.67 (8)
アンモン角	2.10 ± 0.67 (30)
線状体	11.8 ± 3.6 (24)
ウサギ	
大脳皮質	
頭頂葉	1.65 ± 0.63 (20)

表2　脳部位試料のChAT活性

＊1試料につき2測定の平均を求め、その値の平均値を示す。

＊＊酵素の安定性を調べるため、試料を20℃、湿度50%に24時間放置した。

ChATの部分精製標品の水溶液を用いて測定法のバラツキを検討すると、その活性値の変異係数（v.c. = 100×S.D./平均）は2.9%であった。これにくらべ大脳ホモジェネートのv.c.は17.5%で、個体差が活性値のバラツキに反映され、脳部位試料ではv.c.は27～45%で、試料内のコリン作動性要素（細胞体、軸索、シナプスなど）の含有量のバラツキを表わしていると思われた。試料中のChATは比較的安定であった（表2，〔失活〕** 参照）。

ウサギの単一脊髄前角細胞は、大脳皮質の100倍の活性を示し、細胞体内にはChATが活性を持った形で高濃度に含まれることが明らかとなった（図2）。各々の細胞間の活性のバラツキは大きく（v.c. = 55.5%）細胞による個体差を反映してしていると思われる。単一細胞体を2～3ケの小片に分割し、各分割片の活性を測定すると、その活性が大きくばらつくことが見出された。これはChATが細胞体内で不均一に分布する

ことを意味しており、各細胞試料間のバラツキにもこの不均一な分布が一部関与していると考えられる。後根神経節細胞の測定では、一見低い活性を持つように見える試料が少数個見出されたが（図2）、反応液の体積と増幅率を2通りとって測定を行っても（54.3 nl, 63,400倍; 12.8 nl, 168,000倍）、この見かけの活性は不変であった。このことは、この低活性は実験上の誤差から由来しており、後根神経節細胞はChAT活性を持っていないことを意味すると考えられる。これらの2通りの測定では、測定値の平均とブランク値の平均には統計的な差異が見られず（データ省略）、この事実も上の結論を支持している。

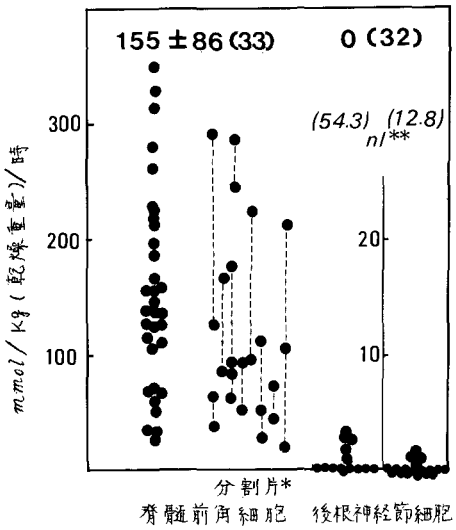


図2　ウサギの単一神経細胞のChAT活性

*点線で結んだ値は、同じ細胞体からの分割片の活性を示す。

**( )内の体積(nl)の反応液によって測定したことを示し、12.8 nlの場合は縦軸の目盛が10倍に拡大されている。

考　察

従来のChAT測定法は、正反応により生成されるAchを主に測定するが[3),4),12),13)]、本方法では逆反応を測定に利用している。正反応におけるCoASHも測定が試みられており[1)]、そのCoASHを増幅測定することもできるが、この場合試料に混在するacetyl-CoA hydrolase (EC 3.1.2.1) がCoASHを生成し、また反応速度が時間に比例しない（詳細省略）。従って逆反応を用いるほうが有利である。逆反応による生成アセチルCoA測定法はHersh[6)]らによって工夫されたが、この測定法は感度も低く部分精製した酵素標品にしか適用できなかった。

本方法により単一細胞や細胞下試料の活性測定が可能となり、コリン作動性細胞の活動状態や細胞の種類、動物種によるChATの濃度の変動や、ChATの軸索輸送の軸索単位での定量的解析等が将来のテーマとして考えられる。近年発展して来た免疫組織化学によるChATの定性的検出法[2),9),10)]と、ここにのべた定量的な解析法は、哺乳動物の中枢神経系におけるコリン作動性機構の細胞レベルでの研究に大いに役立ち、相補的な役割をはたすものと期待される。

文　献

1) Chao,L.-P.& Wolfgram,F.(1972)Anal.Biochem.46,114 2) Cozzari,C.& Hartman,B.K.(1980)Proc.Nat.Acad.Sci.USA, 77,7453 3) Fonnum,F.(1975)J.Neurochem.24,407 4) Glover,V.& Green,D.P.L.(1972)J.Neurochem.19,2465 5) Hayashi, H.& Kato,T.(1978)J.Neurochem.31,861 6) Hersh,L.B.,Coe,B.& Casey,L.(1978)J.Neurochem.30,1077 7) Kato,T. & Lowry,O.H.(1973)J.Neurochem.20,151 8) Kato,T.(1975)Anal.Biochem.66,372 9) Kan,K.-S.K.,Chao,L.-P.& Eng,L.F. (1978)Brain Res.146,221 10) Kimura,H.,McGeer,P.L.,Peng,F.& McGeer,E.G.(1980)Science,208,1057 11) Lowry,O. H.,Passonneau,J.V.,Schulz,D.W.& Rock,M.K.(1961)J.Biol.Chem.236,2746 12) McCaman,R.E.& Hunt,J.M.(1965)J. Neurochem.12,253 13) Schrier,B.K.& Shuster,L.(1967)J.Neurochem.14,977

86 線条体アセチルコリン受容体の生理的役割について

高野行夫・桜井康子・糀本芳郎・本多健治
楠木隆博・神谷大雄(福岡大・薬・薬理)
内村公一(福岡大病院・薬剤部)

〔要　約〕

(1)脳内のムスカリン様アセチルコリン受容体(m-AChR)およびニコチン様アセチルコリン受容体(n-AChR)の分布を ^{3}H-quinuclidinyl benzilate (^{3}H-QNB)ならびに ^{125}I-α bungarotoxin (^{125}I-αBTX)をそれぞれリガンドとする結合実験により、て調べた。m-AChRは線条体に密で以下側坐核，海馬，皮質，淡蒼球の順で、n-AChRは逆に線条体や側坐核でその分布は低く、視床下部や海馬に高かった。(2) m-AChR および n-AChRの生理的役割を調べる目的で線条体 micropunch 組織ならびにシナプトゾームからの ^{3}H-dopamine (^{3}H-DA) と ^{3}H-ACh の遊離に対するコリン作働薬の効果を調べた。AChは ^{3}H-DAの自発遊離を増加させ、この増加はd-tubocurarineにより抑制された。Nicotinic agonistsであるnicotine, lobeline, coniine, sparteine はいずれも ^{3}H-DA遊離を増加させたが、muscarinic agonistの oxotremorine は ^{3}H-DA遊離に対して無影響であった。一方、nicotineとlobelineは50mMKで惹起される ^{3}H-ACh 遊離を有意に抑制した。

以上の結果から線条体にはm-AChRとn-AChRとが存在し、DA遊離に対してn-AChRは促進的に働いていると考えられる。一方 n-AChRはコリン作働性神経終末にも局在し、その遊離をm-AChRと同様調節している可能性を示唆している。

Key words : dopamine release, nicotinic receptor, striatum.

近年、受容体に高親和性を持ち、かつ高い比放射活性を有する種々のリガンドを利用して、受容体の諸性質を研究することが可能となり、脳にも末梢で分類されている2種のアセチルコリン受容体(AChR)のうち、ムスカリン様アセチルコリン受容体(m-AChR)は存在が明らかになり、ニコチン様アセチルコリン受容体(n-AChR)についてもその存在が示唆されてきた。我々はすでにmicropuncture法を用い、ラット線条体コリン作働性神経の微細分布について検討し[4)9)10)]、さらに線条体におけるm-AChRおよびn-AChRの一般的性質についても研究してきた。[5)10)]

本研究では線条体の m-AChR および n-AChR の生理的役割を検討する目的で、線条体 micropunch 組織ならびにそのシナプトゾームからの ^{3}H-dopamine (^{3}H-DA) と ^{3}H-AChの遊離に対するコリン作働薬の効果について研究した。

実験方法

実験には体重200±20gのWistar系雄性ラットを用い、micropunch 組織は断頭後直ちに脳を摘出し、線条体背外側部位からすでに報告している方法で得た[4)8)9)]。また線条体粗シナプトゾーム画分(P_2)は Grayらの方法[2)]に準じて調製した。

[1] ^{3}H-quinuclidinyl benzilate (QNB)結合の測定：採取したmicropunch組織をホモジネイトして得られたホモジネイト(約 1μg protein/μl) 25μlを500μlのincubation溶液に移し、1nM ^{3}H-QNB と共に 37℃ 30分間incubateした。反応停止後 glass filter (GF/B)を用いて吸引沪過し、filter の放射能を測定した。100μM atropine 存在下で同様に実験を行ない、このときの値を差し引いて ^{3}H-QNBの特異的結合量とした。

[2] ^{125}I-α bungarotoxin (BTX)結合の測定： 採取した micropunch 組織をホモジネイトし、得られたホモジネイト(約2μg protein/μl) 150μl を 350μl の incubation 溶液に移し、2.5 nM の ^{125}I-α BTX と共に 25°C 90分間 incubate した。反応停止後2回遠心分離し(10.000g x 20分)、非結合アイソトープを除き沈殿物の放射活性を測定した。特異的 ^{125}I-α BTX 結合量は上記の操作によって得られた結合量から 1mM nicotine 存在下での結合量を差し引いたものとした。

[3] ^{3}H-DAの遊離実験： micropunch 組織からの ^{3}H-DA遊離実験は採取した micropunch 組織(約0.4mg wet weight)を 0.22μM ^{3}H-DA を含む Krebs-Ringer bicarbonate 溶液にて37°C 20分間 ^{3}H-DA を取り込ませた後、氷冷した溶液にて十分洗浄後、superfusion 用チェンバーに移した。superfusionによる ^{3}H-DA遊離実験は灌流液を 0.25ml/min の割合で流し、2分間ごとにバイヤルに回収し放射活性を測定した。

線条体シナプトゾーム画分からの ^{3}H-DA 遊離実験は、得られた線条体シナプトゾームを Krebs-Ringer bicarbonate 溶液に再び戻し 0.22μM ^{3}H-DA を 37°C 20 分間取り込ませた。次に 10.000g 20分間遠心分離し、遊離している ^{3}H-DA を除いた後、セファデックス G-15 カラムにシナプトゾームを詰め、以下 micropunch 組織と同様に superfusion 法によって遊離実験を行なった。

[4] ^{3}H-ACh の遊離実験： 採取した粗シナプトゾーム試料を 0.12μM ^{3}H-Choline を含む溶液にて37°C 20分間取り込ませた後、生合成した ^{3}H-ACh の遊離実験を ^{3}H-DA の場合と同様に行なった。

結果・考察

Region	Punch No.	^{3}H-QNB binding (p moles/g protein)	^{125}I-αBTX binding (p moles/g protein)
Nucleus accumbens	2	977 ± 92 (6)	32.4 ± 2.3 (4)
Nucleus caudatus			
(A 8200)	6	1285 ± 89 (7)	28.1 ± 2.8 (5)
(A 7200)	11	958 ± 160 (6)	33.1 ± 5.1 (5)
(A 6700)	12	1294 ± 50 (6)	28.6 ± 3.7 (6)
Globus pallidus	14	121 ± 17 (3)	52.0 ± 4.1 (5)
Hippocampus		853 ± 102 (5)	77.7 ± 6.2 (5)
Cortex	15	560 ± 91 (5)	67.5 ± 5.6 (5)
Hypothalamus		———	80.3 ±10.7 (4)

表1. 脳内各部位での ^{3}H-QNB結合と ^{125}I-αBTX結合の分布
punch No. 文献(4)(9)(10)参照

§1. AChRの分布：

脳内AChR の分布を調べる目的で ^{3}H-QNB および ^{125}I-αBTX をそれぞれ m-AChR および n-AChR のリガンドとしてその結合量を比較した。すでに報告したように[4)10)]、^{3}H-QNB結合量は線条体が最も高く以下側坐核，海馬，皮質の順で、線条体内でも背外側が最も分布が密であった(表1)。

一方、^{125}I-α BTX 結合量の分布は ^{3}H-QNB結合の場合とは逆に線条体や側坐核では少なく、海馬や視床下部に高い分布がみられた(表1)。

以上の実験成績から、線条体には m-AChR が密に分布しており、一方 n-AChR も少ないながら線条体に存在していることが明らかになった。しかし興味深いのは脳内の n-AChR の分布は他のコリン作働性神経の指標に認められる分布と傾向を異にしている点である。

§2. ^{3}H-DA遊離に対する AChR の関与：

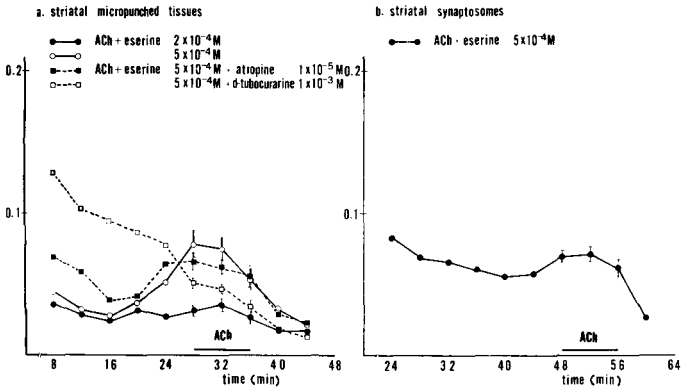


図1. ^{3}H-DA 遊離に対する ACh の効果

最近、黒質－線条体系 DA 作働性神経の破壊により ^{3}H-QNB 結合や ^{125}I-αBTX 結合が減少することが確められ[13][17]、DA 作働性神経終末に m-AChR および n-AChR が局在していることが示唆されたので、線条体 DA 作働性神経終末からの DA 遊離に対する m-AChR および n-AChR の関与について検討した。

まず高濃度ではあるが ACh(5×10^{-4}M) を incubation 溶液に添加すると、線条体 micropunch 組織，およびそのシナプトゾームからの ^{3}H-DA の自発遊離は増加した。この ACh による増加は atropine では抑制されなかったが、高濃度の d-tubocurarine では部分的に抑制された(図1 a.b)。次に muscarinic agonist である oxotremorine と nicotinic agonist である nicotine の ^{3}H-DA 遊離に対する効果について調べた。nicotine を灌流液中に添加すると ^{3}H-DA の自発遊離は増加するが、oxotremorine ではなんら変化は認められなかった(図2 a.b)。

次に神経節において nicotinic agonist である lobeline について調べた。Lobeline は濃度依存的に線条体 micropunch 組織およびシナプトゾームからの ^{3}H-DA の遊離を増加させた(図3 a.b)。同様に神経節での nicotinic agonists である coniine や sparteine も神経終末からの ^{3}H-DA の自発遊離を増加させた(図略)。結局 DA 作働性神経終末からの ^{3}H-DA の遊離効果は lobeline > coniine, sparteine > nicotine, ACh の順に強かった。しかし lobeline による ^{3}H-DA の遊離増加は末梢神経系における代表的な nicotinic blockers では抑制されなかった。一方 25mM K^+ によって惹起される ^{3}H-DA の遊離に対しても lobeline や nicotine はその遊離をさらに増加させたが、oxotremorine 単独ではなんら変化はなかった(図略)。^{3}H-DA の取り込みに対しては高濃度の lobeline でやや取り込み阻害が認められたが(IC_{50}: 1.36×10^{-4}M)，他の薬物では変化なかった。これは先に報告した[6] imipramine, cocaine に比べて非常に弱

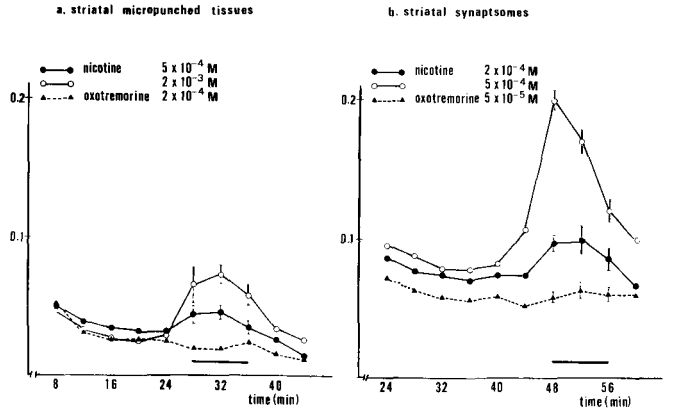


図2. ^{3}H-DA 遊離に対する nicotine と oxotremorine の効果

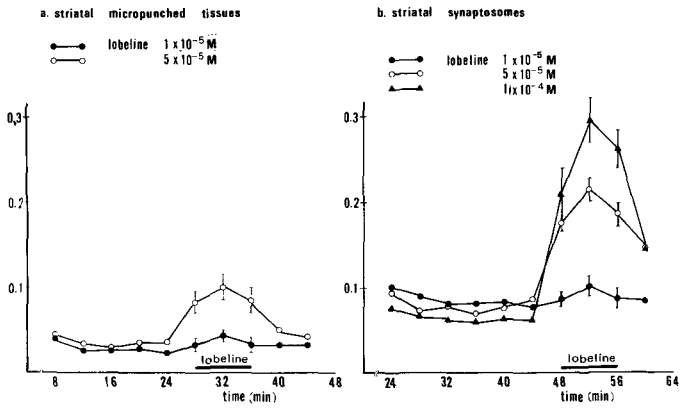


図3. ^{3}H-DA遊離に対するlobelineの効果

いので、^{3}H-DAの増加はDA uptake阻害によるものではない。

以上の結果から線条体のDA作働性神経終末からのDA遊離に対してn-AChRは促進的に作用しているものと考えられる。例えばlobelineによるDA遊離増加を末梢における代表的なnicotinic blockersは抑制しなかったことや、自律神経節で比較的作用の弱いlobelineやconiineがnicotineよりDA遊離効果の強かったことから、この部位におけるn-AChRと末梢神経系におけるn-AChRの相違を明らかにするためにはさらに検討を必要とする。

§3 ^{3}H-ACh遊離に対するAChRの関与：AChの遊離に対して前シナプス部位のm-AChRによる遊離調節についてはすでに多くの報告がある。図4に示されるように線条体シナプトゾームからのhigh K$^+$による^{3}H-ACh遊離をnicotinic agonistのlobelineは有意に抑制した(図4)。同様にnicotineも高濃度で、high K$^+$によるACh遊離を抑制した(図略)。

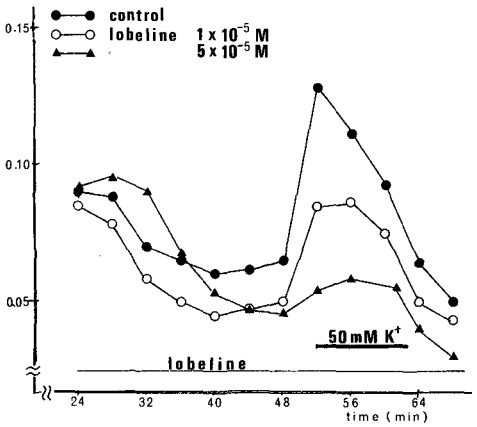


図4. ACh遊離に対するlobelineの効果

この結果はコリン作働性神経終末にもn-AChRが局在し、これを介するAChの遊離調節機構の存在を示唆している。

本研究の一部は第8回国際薬理学会(東京)ならびにサテライトシンポジウム(Molecular Pharmacology of Neurotransmitter Receptor Systems: 広島)にて報告した。

文献

1) de Belleroche, J., Lugmani, Y. and Bradford, H.F., (1979) Neurosci. Lett. 11, 209-213.
2) Gray, E.G. and Whittaker, V.P., (1962) J. Anat. (Lond.) 96, 79-87.
3) Gurwitz, D., Kloog, Y., Egozi, Y. and Sokolovsky, M., (1980) Life Sci. 26, 79-84.
4) 神谷大雄, 高野行夫, 堀本芳郎, 内村公一, 桜井康子, 神経化学 (1980) 23, 134-137
5) 神谷大雄, 高野行夫, (1980) 第54回 日本薬理学会総会 抄録 P86
6) Kamiya, H., Takano, Y., Sakurai, Y., Saito, R. and Kohjimoto, Y., (1981) Res. Commum. Pathol. and Pharmacol. in press.
7) Kato, G., Carson, S., Kemel, M.L., Glowinski, J. and Giorguieff, M.F., (1978) Life Sci. 22, 1607-1614.
8) Takano, Y., Kohjimoto, Y. and Kamiya, H., (1980) Brain Res. 182, 478-481.
9) Takano, Y., Kohjimoto, Y., Uchimura, K. and Kamiya, H., (1980) Brain Res. 194, 583-587.
10) Takano, Y., Uchimura. K., Kohjimoto, Y. and Kamiya, H., (1981) European J. Pharmacol. 70, 559-564.

87 脳のムスカリン性アセチルコリン受容体とアゴニスト[^{3}H]CDの結合特性及びその調節

額田敏秀・芳賀達也
(浜松医大・生化)

〔要　約〕

ブタ脳尾状核のシナプス膜分画を用いて、ムスカリン性アセチルコリン受容体と標識したagonistである[^{3}H]CD (*cis methyldioxolane*) との結合特性を調べ、併せて、GTP, Na^+イオン及びNEM (*N-ethylmaleimide*) の[^{3}H]CD結合に対する効果を調べた。[^{3}H]CD結合のScatchard plotは、60 nM以下の濃度で直線的で、Kd, Bmaxはそれぞれ13.2 nM, 242 fmol/mg·proteinと求められた。このBmaxは、antagonistである[^{3}H]QNB (3-*quinuclidinyl benzilate*) 結合のBmax (3600 fmol/mg·protein) の約7%に相当し、carbachol, oxotremorine等のmuscarinic agonistsによる[^{3}H]CDと[^{3}H]QNBの結合のdisplacement curveの比較より、[^{3}H]CDはagonistに親和性の高いサブタイプ (或いは状態) に選択的に結合すると考えられた。GTPとNa^+イオンは共に、[^{3}H]CDに対するBmaxを低下させ、且つ、結合した[^{3}H]CDの解離を促進させる効果を示した。しかし、NEMで前処理した膜では、GTPの示した解離促進効果が消失した。一方、Na^+イオンの解離促進効果は、NEMの前処理の有無に関わらず認められた。選択的部位に結合する[^{3}H]CDを用いての結合実験は、サブタイプ間の関係やGTPとの相互作用を研究する際、有効な手段と考えられる。

Key words : Muscarinic receptor , [^{3}H]CD , GTP

Guanine nucleotidesが、antagonistに対する親和性には効果を持たずに、agonistに対する親和性を下げることが、ラットの心臓や小腸平滑筋に存在するムスカリン性アセチルコリン受容体で報告されている (2, 7, 12)。また、Na^+イオンもagonistに対する親和性を下げ (3, 7, 12)、NEM (*N-ethylmaleimide*) は逆にagonistに対する親和性を上げることが (1, 8) 知られている。

一方、ムスカリン性受容体は、agonistに対する親和性の異なる三種 (SH [super high], H [high], L [low]) のサブタイプ又は状態として存在すると推定されており (4)、最近ではある種のantagonistに対する親和性の違いにより更に区別される受容体サブタイプの存在の可能性が指摘されている (10)。GTP, Na^+イオン, NEMの効果が、これらサブタイプの全てに各ぶものなのか、更にはサブタイプ間の相互変換が起こるのか、又その作用の様式はといった問題は現在明らかではない。従来ムスカリン受容体の同定によく使われてきた[^{3}H]QNB (3-*quinuclidinyl benzilate*) は、全てのサブタイプに結合すること、antagonistである為agonistと受容体の相互作用は間接的にしかみれないこと等の為、これらの問題を研究するには限界があった。我々は、Yamamuraらにより開発されたagonistで、agonistに親和性の高い部位に選択的に結合するといわれている[^{3}H]CD (*cis methyldioxolane*) (5, 6, 8, 9) を用い、特定のサブタイプの受容体とagonistやGTPとの相互作用の様式を追求することを試みた。

〔実験方法〕　シナプス膜分画は、ブタ脳尾状核よりJones & Matus (11) の方法に従い、0.32 M sucrose－5 mM Hepes buffer (pH 7.5)－50 μM $CaCl_2$を用い調整した。0.32 M sucroseに

約 8 mg/ml のタンパク濃度に懸濁し、これを −80°C に保存した。

結合実験 (14) は、以下を標準とした：1) 20mM Tris-Maleate buffer (PH 7.5)、2) [^{3}H]CD 5mM 又は [^{3}H]QNB 0.4 mM、3) 30°C, 30分 incubation、4) ガラス沪紙 (Whatman GF/C)、5) 20mM リン酸 buffer (PH 7.0、氷冷) でガラス沪紙を 4 回洗浄、6) ガラス沪紙を乾燥後 (80°C、2時間) 放射能測定。シナプス膜標品はタンパク量として 0.3 mg / tube ([^{3}H]CD の場合)、0.06 mg / tube ([^{3}H]QNB の場合) を用い、又、nucleotides 使用の際は 2mM $MgCl_2$ を添加した。特異的な結合は、1 μM atropine 存在下の結合との差で求めた。

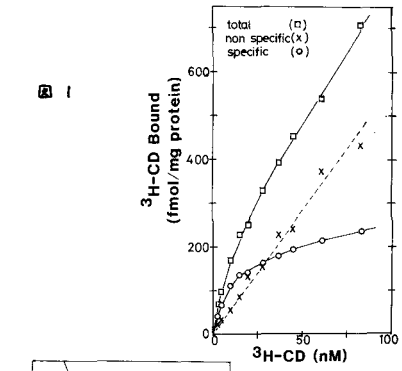
[結果及び考察]

[^{3}H]CD の結合特性

ブタ脳尾状核より得たシナプス膜分画への [^{3}H]CD 結合を、3〜83 mM の濃度範囲で調べた (図1)。Scatchard plot (図2) は、60mM 以下では直線的で、これより Kd, Bmax 値として 13.2 mM, 242 fmol / mg · protein を得た。ラット前脳を用いた Yamamura ら (6) の [^{3}H]CD 結合実験では、Scatchard plot が曲線で、低 Kd 結合の他、Kd = 123 mM という高い Kd を示す結合の存在を報告している。我々の実験条件でも、高濃度の CD を用いれば高い Kd を持つ結合部位が検出される可能性が考えられるが、非特異的結合が大きくなる為正確な値が得られなかった。しかし少くとも 60mM 以下の CD 濃度では、高 Kd 値を持つ結合部位の寄与は少なく、実質上均一の結合部位への結合と見なせるものと考えられる。

同一のシナプス膜標品を用いた [^{3}H]QNB 結合実験では、Kd 及び Bmax が、11 pM, 3600 fmol / mg · protein と求められ、[^{3}H]CD の結合部位は [^{3}H]QNB のそれの約 7 % に相当することが分った。次に、[^{3}H]CD 結合の kinetics を調べた (図3)。[^{3}H]CD の受容体への結合は可逆的であり、且つ解離曲線は一次反応に

図 1



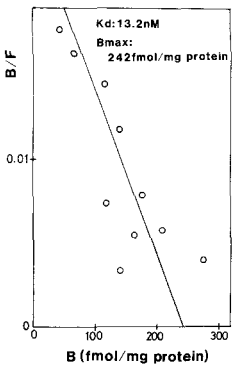


図 2

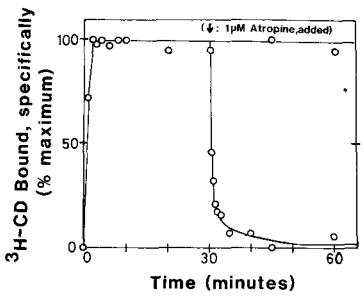


図 3

Table 1. Inhibition of [^{3}H]QNB and [^{3}H]CD Bindings by Muscarinic Ligands

Ligands	[^{3}H]QNB		[^{3}H]CD	
	Kd (μM)	Hill coeff.	Kd (μM)	Hill coeff.
Agonists				
Carbachol	130	0.44	0.066	0.80
Arecoline	22.0	0.53	0.079	0.97
Oxotremorine	2.2	0.57	0.014	0.97
Acetylcholine	20.0	0.53	0.079	0.97
Antagonists				
Atropine	0.001	1.?	0.003	0.96
Scopolamine	0.002	1.0	0.008	0.97

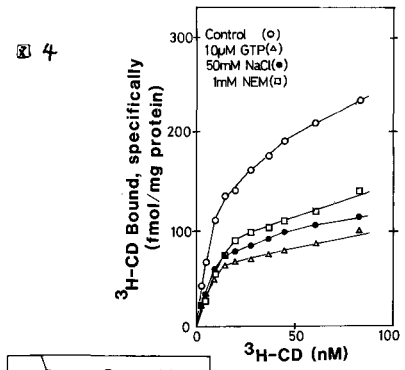
従った。このデータより求められた Kd は 28 nM であり、図2由来の Kd (13.2 nM) に近い値をとった。

ムスカリン性の様々な ligands の種々の濃度における [3H]CD 結合に対する displacement を見た（表1）。[3H]QNB の displacement から求めた Kd との比較により、[3H]CD は明らかに agonist に対する親和性の高い部位に結合し、しかも Hill 定数が n=1 により近づくことが判った。antagonist に関しては、Kd, Hill 定数共に差はなかった。上記（図3）解離曲線の直線性、及び n=1 に近い Hill 定数の値は、[3H]CD が均一部位に結合することを更に示唆している。また、表1の [3H]CD の displacement から求めた Kd 値は、SH 部位の Kd 値（4）に極めて近い値を示し、[3H]CD は SH 部位に選択的に結合するものと考えられた。

GTP, NaCl 及び NEM の効果

種々の濃度の Guanine nucleotides 及び無機イオンの [3H]CD 結合に対する影響を調べた（表2）。CD 結合に対する抑制効果は、Gpp(NH)p > GTP ≧ GDP > GMP であった。又イオンによる CD 結合の抑制効果には、顕著なイオン特異性は認められなかった為、[3H]CD に対するイオンの効果をみるために、NaCl をその代表とした。5nM [3H]CD の時、約50%結合を減少させる 10μM GTP と 50mM NaCl を用い、これらの効果が Bmax 或いは Kd に影響するのかを調べた。図4,5,表3にみられるように、何れの場合にも Kd は殆んど変化せず、Bmax の低下が見られた。この結果の解釈としては、GTP 或いは NaCl により、受容体は [3H]CD に対する親和性の高い状態からこの実験条件では測定できない親和性の低い状態に移行し、その分だけ Bmax が低下したと考えられる。既ち、受容体の [3H]CD に対する親和性が連続的に減少するのではなく、他の親和性の低い状態に転換するのであり、この転換の割合が、GTP や NaCl 濃度と共に増加するものと考えられる。又、[3H]CD 結合の時間

図4



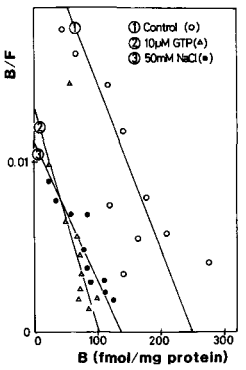


図5

Table 2. Inhibition of [^{3}H]CD Binding by Nucleotides, Ions and -SH Agent

Addition	IC_{50} (M)	Addition	IC_{50} (M)
Nucleotides		Ions	
GMP	5.6×10^{-3}	NaCl	5.6×10^{-2}
GDP	4.5×10^{-5}	KCl	3.2×10^{-2}
GTP	3.2×10^{-5}	$CaCl_2$	1.0×10^{-2}
Gpp(NH)p	1.3×10^{-6}	$MgCl_2$	2.2×10^{-2}
ITP	5.0×10^{-5}	-SH Agent	
CTP	1.8×10^{-4}	pCMB	6.3×10^{-5}
UTP	4.0×10^{-4}		

Not effective at the concentrations of 1mM : AMP, ADP, ATP, AMP-p-NH-p, cAMP, CMP, CDP, cGMP, IMP, UMP, UDP, NAD, NADH, NADP, NADPH

Table 3. Summary of Scatchard plot

Addition	Kd (nM)	Bmax (fmol/mg·protein)
none	13.2	240
10μM GTP	10.0	110
50mM NaCl	14.5	130

経過を追ったが、GTP或いはNaClの存在の有無で大きな差はみられなかった。次に、結合した[³H]CDに対するGTP又はNaCl添加の影響をみた。[³H]CDの解離は、30°Cでは速すぎるので、この場合に限り4°Cで実験した(図6)。0.1mM GTPの添加により速やかな[³H]CDの解離が生じ、30秒で約70%が遊離された。atropineを同時に添加し、結合を止めて解離速度を比べると、GTP存在時には少なくとも5倍以上に増加していることが判った。同様にNaCl添加によっても解離速度が速くなることが見出された(図6,左上下)。このGTP, NaClによる解離の促進は、GTP, NaClによる[³H]CD結合の低下の少なくとも一因と考えられる。一方、膜に1mM NEM前処理(30°C, 10分)を加えると、atropine添加時の[³H]CDの解離は殆ど影響を受けないのにも関わらず、GTPの有したCDの解離促進効果は消失した(図6右上)。しかし、NaClの有した解離促進効果は保持された(図6右下)。ラット心臓のムスカリン性受容体においても、NEMがGTPのagonistに対する親和性を下げる効果を打ち消すことが、[³H]QNBとcarbachalを用いた間接的な方法で報告されている(13)。また、NEMが、[³H]QNBを用いた実験より、agonistに対する親和性を高める作用を持つことが(1)言われているが、NEM自体がagonistである[³H]CDに対する親和性を高める作用を示すことはなかった。

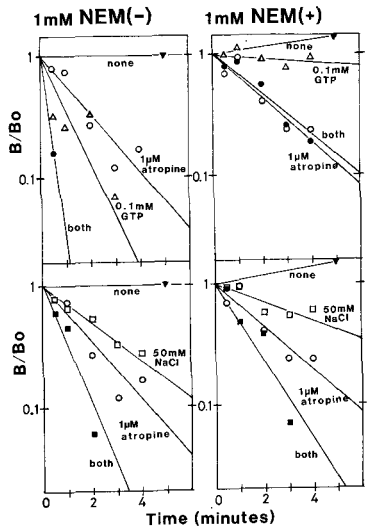


図6

以上の結果より、ブタ脳尾状核のムスカリン性受容体の約7%は、agonistに対して非常に高い親和性を持つ状態で存在し、この状態はGTPにより低い親和性の状態に移行すること、この移行はagonistの結合後でも生ずるが、NEMで修飾することにより阻害されることが推定された。NaClの様な塩もagonistに対する親和性を低下させるが、この効果はNEMで阻害されず、異なる様式によるものと考えられる。

[文献]
1. Aronstam R.S.,Abood L.G.,Hoss W.(1978) Mol.Pharmacol. 14 575-586
2. Berrie C.P.,BirdsallN.J.M.,Burgen A.S.V.,Hulme E.C. (1979) Biochem.Biophys.Res.Commun. 87 1000-1005
3.Birdsall N.J.M.,Burgen A.S.V.,Hulme E.C.,Wells J.W.(1979) Br.J.Pharmacol. 67 371-377
4.Birdsall N.J.M,Hulme E.C.,Burgen A.S.V.(1980) Proc.R.Soc.Lond.B. 207 1-12
5.Chang K.J.,Deth R.C.,Triggle D.J.(1972) J.Med.Chem. 15 243-247
6.Ehlert F.J.,Dumont Y.,Roeske W.R.,Yamamura H.I. (1980) Life Sci. 26 961-967
7.Ehlert F.J.,Roeske W.R.,Rosenberger L.B.,Yamamura H.I. (1980) Life Sci. 26 245-252
8.Ehlert F.J.,Roeske W.R.,Yamamura H.I. (1980) J.Supuramol.Struct. 14 149-162
9.Ehlert F.J.,Yamamura H.I.,Triggle D.J.,Roeske W.R. (1980) Eur.J.Pharmacol. 61 317-318
10.Hammer R.,Berrie C.P.,Birdsall N.J.M.,Burgen A.S.V.,Hulme E.C. (1980) Nature 283 90-92
11.Jones D.H.,Matus A.I. (1974) Biochim.Biophys.Acta 356 276-287
12.Rosenberger L.B.,Roeske W.R.,Yamamura H.I. (1979) Eur.J.Pharmacol. 56 179-180
13.Wei J-W,Sulakhe P.V. (1980) Naunyn-Schmiedeberg's Arch.Pharmacol. 314 51-59
14.Yamamura H.I.,Snyder S. (1974) Proc.Nat.Acad.Sci.USA 71 1725-1729

88 ムスカリン様アセチルコリン受容体の研究 — トリプシン処理および線照射の影響 —

松本一夫・内田修次・竹安邦夫
樋口宗史・吉田 博(阪大・医・I薬理)

〔要 約〕

モルモット小腸ミクロゾーム分画においてムスカリン様アゴニスト(carbachol)の ^{3}H-QNB結合阻害曲線は，Gpp(NH)p，trypsin，DTNB処理によりそれぞれ右方，右方，左方に移動した。carbachol(CCh)の結合の性質に対するGpp(NH)pおよびtrypsin処理の効果は類似し，かつnon-additiveであった。この両処理をそれぞれDTNB処理と組み合わせると，DTNB単独処理の効果に一致し，DTNB処理によりmAChRがアゴニストに対しstableな高親和性の状態になることが示唆された。また，γ線照射によってもCChの^{3}H-QNB結合阻害曲線は右方に移動した。DTNB，Gpp(NH)p，trypsin処理およびγ線照射はmAChRに対するアンタゴニスト(atropine，^{3}H-QNB)の親和性には影響しなかった。γ線照射によるRadiation Inactivationにより標的論に基づいてムスカリン様アセチルコリン受容体(mAChR)の分子量(M.W.)は約8万，Gpp(NH)pの効果に関与するM.W.は約18万と推定され，Gpp(NH)pがGTP結合蛋白質(G-protein)を介して間接的にmAChRに対するアゴニストの親和性を低下させることが裏づけられた。以上よりGTPがG-proteinに結合すると，mAChRからG-proteinが解離し，その結果mAChRがアゴニストに対して親和性の低い状態となることが示唆される。

Key words： Guanine nucleotide，Muscarinic cholinergic receptor，Trypsin-treatment

---

種々の神経伝達物質受容体(1~4)と同様にmAChR(5~8)においてもグアニンヌクレオチドがアゴニストの親和性を特異的に低下させることが報告されているが，その詳細な作用機序は未だ明らかでない。今回，我々はモルモット小腸ミクロゾーム分画においてトリプシン処理およびγ線照射がムスカリン様アゴニストの親和性を特異的に低下させ，かつこれらの効果とGpp(NH)pの効果とがnon-additiveであることを観察し，ムスカリン様アゴニストの親和性に対するグアニンヌクレオチドの作用機構に関して若干の考察を加えた。また，NEMおよびDTNBがmAChRに対するアゴニストの親和性を特異的に増大させることから，アゴニストの親和性に対するSH基の関与も重要視されていた(9，10)が，今回，我々はGpp(NH)pおよびトリプシン処理をDTNB処理と組み合わせると，DTNB単独処理の効果に一致することを観察したので報告する。

〔実験方法〕

①モルモット小腸ミクロゾーム分画の調製　モルモット(250~400 g)の小腸を粘膜除去後，5倍量の0.3mM phenylmethylsulphonyl fluorideを含む0.25M蔗糖液中でヒスコトロン(power 70-75，2分)にて破砕し，7,000×g，30分の上清，70,000×g，30分の沈渣を0.25M蔗糖液に懸濁し，0.9M-0.4M蔗糖液の上に重層し，70,000×g，60分遠心後，0.4M-0.9M蔗糖界面に回収された分画をミクロゾーム分画とした。　②トリプシン処理　ミクロゾーム分画を100,000×g，30分遠心して得た沈渣を25mM Tris-HCl buffer (pH 7.4)に懸濁し(蛋白濃度 約1mg/ml)，1mg蛋白当たり40μgのトリプシンを加え，等張トリス溶液(100mM NaCl，50mM Tris-HCl buffer (pH 7.4)，1mM $MgCl_2$)中にて30℃，20分インキュベートし，トリプシンの10倍量のsoybean trypsin inhibitorを加えてさらに2分インキュベーションを続けた後，氷冷し，結合実験に使用し

た。 ③γ線照射 ミクロゾーム分画を100,000×g, 30分遠心して得た沈渣を5mM Tris-HCl buffer (pH 7.4)に懸濁し, Pyrexアンプルに入れて凍結乾燥後, 真空中で室温にて50時間 ^{60}Co 線源からのγ線照射を行なった後, 10mM Tris-HCl buffer (pH 7.4)に懸濁し, 結合実験に使用した。 ④^{3}H-QNB結合実験 ミクロゾーム分画を100μM guanyl-5'-yl-imidodiphosphate ($Gpp(NH)_p$), 1mM 5,5'-dithiobis(2-nitrobenzoic acid) (DTNB) の両者またはいずれか一方を含む等張トリス溶液中で30℃, 10分インキュベート後, 種々の濃度のCChまたはatropine (Atr) を加えた後, 0.9nM ^{3}H-quinuclidinyl benzilate (QNB) を加えて結合実験を開始した。結合反応は全量2.0mlの等張トリス溶液(100mM NaCl, 50mM Tris-HCl (pH 7.4), 1mM $MgCl_2$)中で37℃, 15分間行ない, 直ちにグラスフィルター(Whatman GF/F)上に吸引沪過し, 3mlの等張トリス溶液で3回洗浄し放射能を測定した。^{3}H-QNBの非特異的結合は10^{-5}M Atr存在下で測定し, 10^{-5}M Atr非存在下での総結合量との差をもって^{3}H-QNBの特異的結合とした。

Fig. 1. Effects of trypsin pretreatment at 30℃ for 20 min on ^{3}H-QNB bindings in the presence and absence of 1μM CCh to untreated and $Gpp(NH)_p$-treated membranes.

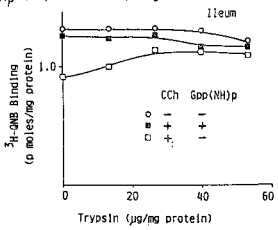
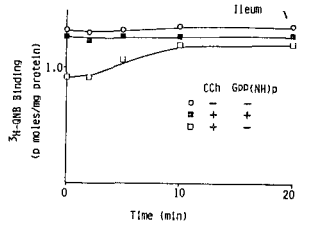


Fig. 2. Time course of effects of trypsin (40μg/mg protein) pretreatment at 30℃ on ^{3}H-QNB bindings in the presence and absence of 1μM CCh to untreated and $Gpp(NH)_p$-treated membranes.



[結果と考察]

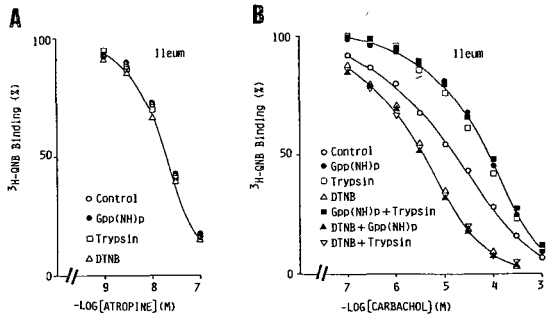
①トリプシン処理 10^{-6}M CCh存在時の^{3}H-QNB結合量はトリプシン処理の濃度と時間の増大に伴って増加し, 1mg蛋白当たり40μgのトリプシン濃度における30℃, 20分間の処理により最大となったので, 以後この条件でトリプシン処理を行なった(Fig. 1, 2)。トリプシン処理は, 100μM $Gpp(NH)_p$ と同様, CChの^{3}H-QNB結合阻害曲線を右方に移動させた(Fig. 3)。CChのbinding parameterに対するトリプシン処理および$Gpp(NH)_p$の効果は類似し, かつ始めnon-additiveであったので, この両処理のtarget areaは一致または重複していると推察された(Fig. 3, Table. 1)。また, この両処理をそれぞれDTNB処理と組み合わせると, DTNB単独処理と同程度までCChの^{3}H-

Table. 1. Effects of DTNB, $Gpp(NH)_p$ and trypsin-treatment on the binding parameters of carbachol (A) and atropine (B).

	Hill coefficient	IC_{50} (μM)
(A) control	0.51 (0.47 – 0.54)	14.2 (12.2 – 16.5)
$Gpp(NH)_p$	0.72[b] (0.64 – 0.79)	71.8[b] (60.2 – 85.7)
trypsin	0.69[b] (0.66 – 0.73)	46.6[b] (42.0 – 51.8)
$Gpp(NH)_p$ + trypsin	0.70[b] (0.69 – 0.71)	82.2[b] (67.2 – 100.6)
DTNB	0.63[b] (0.59 – 0.67)	2.96[b] (2.51 – 3.48)
DTNB + $Gpp(NH)_p$	0.63[b] (0.59 – 0.66)	2.52[b] (2.22 – 2.86)
DTNB + trypsin	0.62[b] (0.59 – 0.65)	2.63[b] (2.34 – 2.97)
	Hill coefficient	**IC_{50} (nM)**
(B) control	1.09 (1.01 – 1.17)	23.4 (21.3 – 25.8)
$Gpp(NH)_p$	1.11 (1.05 – 1.17)	23.0 (21.5 – 24.7)
trypsin	1.02 (0.97 – 1.08)	20.5 (19.2 – 22.0)
DTNB	0.98 (0.93 – 1.02)	19.2[a] (18.3 – 20.1)

a, b significantly different from control. [a] ($p<0.05$), [b] ($p<0.01$). 95% confidence intervals are indicated in parentheses beneath each parameter estimate.

Fig. 3. Effects of DTNB, $Gpp(NH)_p$ and trypsin-treatment on the inhibition curves of QNB bindings by atropine (A) and carbachol (B).



QNB結合阻害曲線は左方に移動した(Fig.3, Table.1)。このようにDTNB処理の方がGpp(NH)pおよびトリプシン処理よりもCChのmAChRへの結合に対して より強い影響を及ぼすことから,DTNBがmAChRに直接作用することが示唆される。Aronstam(9)らはN-ethylmaleimide(NEM)処理によりmAChRがアゴニストに対してstableな高親和性の状態をとると報告しており,DTNBもNEMと同様の影響をmAChRに対して及ぼすと考えられる。ところでmAChRにはアゴニストに対して親和性の異なる少なくとも2種以上の結合部位が存在すると報告されている(11)。このtwo sites modelに基づいて解析すると,Gpp(NH)pおよびトリプシン処理はhigh affinity siteの比率と親和性とを低下させ,DTNB処理はlow affinity siteの比率を減少させ,その親和性を増大させた(Table.2)。なお,DTNB, Gpp(NH)p, トリプシン処理は,^{3}H-QNB結合のKd(0.15nM)およびBmax(1.8p moles/mg protein)に対しても,また,Atrの^{3}H-QNB結合阻害曲線に対しても殆ど影響を及ぼさなかった(Fig.3, Table 1)。

Table. 2. Effects of DTNB, Gpp(NH)p and trypsin-treatment on the binding parameters of CCh.

	% high affinity sites	K_H (μM)	K_L (μM)
control	48	0.37	19.6
Gpp(NH)p	25	1.18	20.3
trypsin	32	0.58	20.0
Gpp(NH)p + trypsin	29	1.07	27.7
DTNB	61	0.34	3.3
DTNB + Gpp(NH)p	74	0.39	4.9
DTNB + trypsin	64	0.38	5.1

Estimates of the high and low affinity dissociation constants (K_H and K_L) and percentage of high affinity sites for carbachol were determined from the binding data shown in Fig. 3 by nonlinear least squares regression analysis.

②γ線照射　γ線照射量に対して^{3}H-QNB結合量は指数関数的に減少し,標的論(12)によりmAChRのM.W.は約8万と推定された(Fig.4)。一方,CCh(10^{-6}M, 5×10^{-6}M)存在下におけるGpp(NH)p存在および非存在時の^{3}H-QNB結合量の差も指数関数的に減少し,Gpp(NH)pの効果に関与するM.W.は約18万と推定され,mAChRのM.W.より有意に大きかった(Fig.4)。これによりGpp(NH)pの効果にはreceptor subunitのみならず他のsubunitも関与していることが示唆された。また,照射量の増大に伴ってCChの^{3}H-QNB結合阻害曲線は右方に移動した(Fig.5)が,^{3}H-QNB結合のKdには有意の変化がみられなかった。照射量の増大に伴い,CCh(10^{-6}M, 5×10^{-6}M)存在時の^{3}H-QNB結合量はCChおよび100μM Gpp(NH)p存在時の結合量に接近し,線量8.7Mradにおいて殆ど一致した(Fig.5)。これらの結果からGpp(NH)pの結合するsubunitがγ線照射により破壊されると,Gpp(NH)pがこのsubunitに結合した場合と同じ効果をアゴニストのmAChRへの結合に対して及ぼすことが示唆された。

③ムスカリン様アゴニストのmAChRへの親和性に対するグアニンヌクレオチドの作用機構について

CChのmAChRへの親和性に対するGpp(NH)p, トリプシン処理およびγ線照射の効果が類似し,しかもnon-additiveであることにより,G-proteinへのGpp(NH)pの結合は

Fig.4. Radiation Inactivation of QNB-biding and the Effect of Gpp(NH)p on Inhibition of QNB-binding by Carbachol

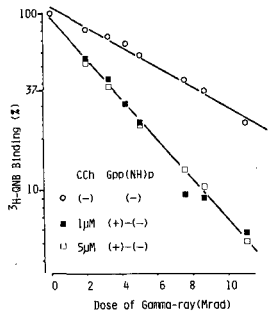
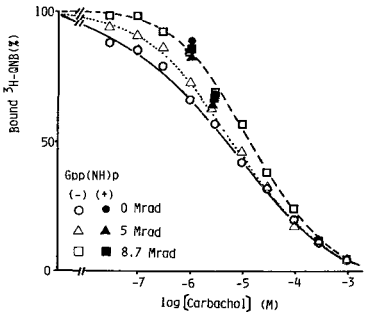
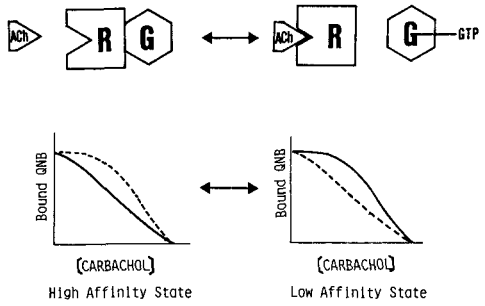


Fig.5. Effect of Gamma-ray Irradiation on the Inhibition of QNB-bindings by Carbachol



トリプシン処理およびγ線照射によるG-proteinの破壊と同様の効果をCChのmAChRへの親和性に対して及ぼすと考えられ，G-proteinへのGpp(NH)pの結合によってmAChRからのG-proteinの解離が生じることが示唆される。β-adrenergic receptorの場合(13)と同様にmAChRにおいても，G-proteinがmAChRと結合している時にはmAChRはアゴニストに対して高親和性を示しており，一方，GTPがG-proteinに結合すると，G-proteinがmAChRから解離し，アゴニストに対してmAChRが低親和性を示すようになると推察される(Fig.6)。ただし，mAChRの場合，G-proteinへのGTPの結合が生じるには，mAChRへのアゴニストの結合が先行する必要があるか否かについては未だ明らかにされておらず，この点に関して現在検討中である。生理的にはGTPのG-proteinへの結合は，mAChRにおいては，ムスカリン様アゴニストによるadenylate cyclase (ACase)活性の抑制，mAChRのshort term desensitization，mAChRからACase以外のeffectorへの情報伝達などに関与している可能性が考えられ，今後，これらの生理的意義との関連において研究を進める予定である。

Fig.6. A Model for the Effect of Guanine Nucleotide on Muscarinic ACh Receptor



なお，本研究の一部は第54回日本生化学会大会にて報告した。

[文献]

1. Williams L.T. and Lefkowitz R.J. (1977) J.Biol.Chem. 252, 7207-7213
2. U'Prichard D.C. and Snyder S.H. (1978) J.Biol.Chem. 253, 3444-3452
3. Creese I. and Snyder S.H. (1978) Eur.J.Pharmacol. 50, 459-461
4. Childers S.R. and Snyder S.H. (1978) Life Sci. 23, 759-762
5. Berrie C.P.,Birdsall N.J.M.,Burgen A.S.V. and Hulme E.C. (1979) Biochem.Biophys.Res. Commun. 87, 1000-1005
6. Rosenberger L.B.,Yamamura H.I. and Roeske W.R. (1980) J.Biol.Chem. 255, 820-823
7. Sokolovsky M.,Gurwitz D. and Galron R. (1980) Biochem.Biophys.Res.Commun. 94, 487-492
8. Wei J.W. and Sulakhe P.V. (1980) Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol. 314, 51-59
9. Aronstam R.S.,Abood L.G. and Hoss W. (1978) Mol.Pharmacol. 14, 575-586
10. Uchida S.,Takeyasu K.,Ichida S. and Yoshida H. (1978) Japan.J.Pharmacol. 28,853-862
11. Birdsall N.J.M.,Burgen A.S.V. and Hulme E.C. (1978) Mol.Pharmacol. 14, 723-736
12. Kempner E.C. and Schlegel W. (1979) Anal.Biochem. 92, 2-10
13. Sternweis P.C. and Gilman A.G. (1979) J.Biol.Chem. 254, 3333-3340

89 NG108-15細胞におけるプロスタグランディンD_2によるアセチルコリン遊離の促進

東田陽博・中川勇三・三木直正
（金大・がん研・薬理）

〔要　約〕

プロスタグランディン（PG）D_2のニューロブラストーマ×グリオーマ雑種NG108-15細胞の神経機能におよぼす影響を調べた。NG108-15細胞と筋細胞の同時培養により得られた神経筋シナプス結合部にPGD_2を滴下したところ、脱分極性自発終板電位（MEPPS）の頻度が3～4倍上昇した。シナプス反応の増加は1～3分持続した。PGD_2はNG108-15細胞の膜電位に対し、一過性の過分極につづく持続性の脱分極を誘起した。この脱分極反応の大きさは平均4.4mVで約80秒間持続し、シナプス反応促進の時間経過とよく一致した。NG108-15細胞の細胞内cAMP濃度はPGD_2でわずか2倍増加し、アデニレートサイクラーゼ活性は100μMで約3倍活性化された。一方細胞内cAMPを50倍以上増加させ、アデニレートサイクラーゼを7～10倍活性化させるPGE_1やPGI_2には膜電位やシナプス反応を変える効果はなかった。またPG$F_{2\alpha}$とPGE_2も膜を脱分極させ、シナプス伝達を促進する効果を有していた。

以上の結果は、PGD_2がシナプス伝達のモジュレーターとして作用し、その効果発現はNG108-15細胞のイオンチャンネルとカップルしたPGD_2受容体によると思われる。In vivoでのPGD_2の生理作用について考察した。

Key words :

PROSTAGLANDIN D_2 (PGD_2), NEUROBLASTOMA X GLIOMA NG108-15 HYBRID CELLS, SYNAPTIC TRANSMISSION

ヒト血小板での抗血栓作用[13]が注目されているプロスタグランディン（PG）D_2がラット脳に存在し[1]、その合成と分解酵素活性も神経組織に多いことから[2,11,14]、PGD_2が神経機能に重要な役割をはたしていると考えられた。清水らはニューロブラストーマNIE115細胞でPGD_2が特異的にcAMP合成を促進し[11]、ニューロブラストーマとグリオーマの雑種NG108-15細胞で蛍光色素によりPGD_2が膜の脱分極反応を生じることを見い出した[1]。しかしこれらは間接的な証拠で、PGD_2がニューロモジュレーターであると言うにはもっと直接的な証拠を示す必要がある。そこで今回我々は、培養条件下アセチルコリン（Ach）を伝達物質とするNG108-15細胞と筋細胞間のシナプス[3,8,9]でPGD_2がシナプス伝達におよぼす効果を観察した。PGD_2のNG108-15細胞の膜電位とアデニレート（A-）サイクラーゼと細胞内cAMP濃度に対する影響を調べ、NG108-15細胞に発現されているPGD_2受容体－反応系を明らかにした。他の数種のPGsの効果も調べ、PGD_2の作用と比較した。

〔実験方法〕

培養方法　NG108-15細胞は5%牛胎児血清とHATを含むDMEM液にて前報の通りに培養した[3,5,8]。シナプス形成実験はラット胎児後肢よりトリプシン処理して得た筋細胞を35mmの皿内で馬血清存在下で7日間培養した。自発性収縮の見られる筋線維上に約10万個のNG108-15を重層し、1mMジブチリールcAMPを添加しさらに2～4日間培養した[3,8]。

電気生理学的方法　3M KClをつめたガラス微小管をNG108-15細胞および筋線維に刺入し細胞内電位を誘導記録した[3,9]。記録に用いた同じガラス管より通電刺激し細胞

の膜抵抗および細胞膜の興奮性を検索した。機能的なシナプス入結合は筋線維の脱分極性自発終板電位(MEPPS)の存在により同定した[3,9]。PGD_2等の刺激は100%エチルアルコールにとかした保存液より150mM NaClで希釈し、その2μlをマイクロピペットで記録細胞の直上液面に滴下する方法で行った。

生化学的方法　10μM PG_Iと1mMテオフィリンと25mM HEPES (pH7.5)を含むDMEM液で細胞をインキュベートし、洗浄後TCA処理した細胞の上清中のcAMPをサクシニル化しRIAにて測定した。A-サイクラーゼはKeirnsらの原法[6]に基き行った[4]。20μlの反応液は、40mM Tris·HCl (pH7.6), 5mM $MgSO_4$, [PH]ATPを含む0.3mM ATP, 4単位のクレアチンホスホキナーゼ, 10mMクレアチンリン酸、0.5mM IBMX, 10mMテオフィリンと細胞ホモジネート(30-150μg)を含んだ。37°C 10分間インキュベートの後反応を止め、cAMPをPEIセルロース薄層クロマトにて分離測定した。

その他　PGD_2, $PGF_{2\alpha}$, PGE_1, PGI_2とトロンボキサン(TX)B_2は小野薬品より、PGE_2はアップジョン社より、PGI1はDr. MacDermotより供与された。

〔結果〕

PGD_2の効果　NG108-15細胞からのAch遊離に伴う筋細胞のシナプス反応, MEPPSを記録し、記録筋線維上に0.1mMのPGD_2を2μl滴下した。シナプス反応の頻度は平均3, 4倍増加し、頻度上昇は1-3分間持続した。典型的な1例を図1に示す。PGD_2によるAch遊離促進効果は17回の刺激例中12回(71%)で観察された(表1)。

PGD_2の滴下刺激がNG108-15細胞膜電位におよぼす作用を調べたところ、図2Aに示すように一過性の過分極がまず生じ、つづいて平均77秒間持続する脱分極が誘起された。過分極の大きさの平均は8.3mV (N=32)で脱分極の大きさは4.4mVであった(表2)。過分極中は膜抵抗の減少がみられ(図2, B.E)、脱分極時は回復した。細胞内通電により誘発される活動電位は過分極中抑えられたが、脱分極中はもとのように誘発された(E.F)。また脱分極中自発性スパイクの発生がみられた(F)。このことは脱分極相では細胞膜の興奮性が増加していることを示す。

PGD_2による二相性の反応は、同一細胞に対する2回目以後の刺激ではその反応性が著しく減少した。たとえ10分以上経過した後でも反応は小さかった。このことはPGD_2による膜電位変化の反応は脱感作されやすいことを示す。

培養中のNG108-15細胞を10μM PGD_2存在下でインキュベートし、各時点での

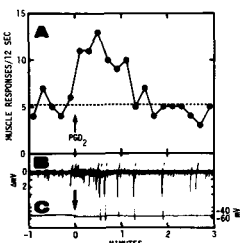


図1. PGD_2刺激による MEPPS頻度の上昇。
A. 12秒あたりのMEPPS反応の数。
筋細胞膜電位のAC高感度(B)とDC(C)記録。

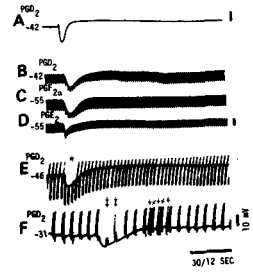


図2. PGD_2, $PGF_{2\alpha}$, PGE_2により誘発されたNG108-15細胞の膜電位変化。
B.C.D.E下方変化分は膜抵抗測定を示す。
E.Fの上方変化分は活動電位を示す。

表1.

Effect of prostaglandins on synaptic transmission

Additions	Number of application	Response		
		Number of cases with responses (%)	Mean fold of increase in MEPPS frequency	Mean duration (sec)
PGD_2	17	12 (71)	3.4±1.1	144±72
$PGF_{2\alpha}$	3	3 (100)	3.4±0.43	96±26
PGE_1	7	0	-	-
PGI_2	2	0	-	-

細胞内cAMP濃度変化を調べた。PGD_2によるcAMP濃度は10分後に約2倍にしか増加しなかった(図3)。細胞ホモジネートによるA-サイクラーゼ活性に対するPGD_2の効果も100μMの高濃度でようやく2-3倍活性化されたにすぎなかった(図4)。PGD_2によるA-サイクラーゼ活性化はインキュベーションや直線性を保ち(図4の挿入図)、20分以上にわたり脱感作されなかった。洗浄膜標品で測定したPGD_2によるA-サイクラーゼ活性化には10^{-6}M程度のGTPを必要とした(図5)。また表3に示すPGE_1やPGI_2との混合添加実験からPGD_2の活性化はPGE_1やPGI_2の活性化とは独立であった。このことは、NG108-15細胞には活性化の程度は小さくても、A-サイクラーゼとカップルしているPGD_2受容体も存在することを示す。

他のPGsの効果　PGE_1はNG108-15のシナプス伝達に一定の再現性ある変化を与えなかった(表1)。PGE_1とPGI_2はNG108-15細胞の膜電位変化を誘発しなかったが、A-サイクラーゼを7-10倍活性化し(図4)、細胞内cAMP濃度を30倍以上上昇させた(図3)。一方$PGF_{2\alpha}$はAchの遊離促進(表1)、二相性の膜電位変化(図2C)、A-サイクラーゼの2~3倍の活性化(図4)と、PGD_2とほぼ同質同等の作用を示した。PGE_2も膜電位変化(図2D)と2-3倍のA-サイクラーゼの活性化(図4)を示した。プロスタグランディンと反対の作用をもつ活性物質であるトロンボキサン$(TX)B_2$は膜電位(表2)やA-サイクラーゼ(図4)に無影響であった。NG108-15細胞にはTXB_2に対する機能的な受容体がないと考えられる。

〔考察〕

以上の結果はPGD_2がAchの遊離を促進することを示す。清水らにより提唱されたPGD_2が神経終末、ニューロモジュレーターとして作用するという仮説[1]を

表2.

Characteristics of the responses produced by various prostaglandins

Additions	Number of application	Number of responses which was elicited (%)	First hyperpolarization Amplitude (mV)	First hyperpolarization Duration (sec)	Second depolarization Amplitude (mV)	Second depolarization Duration (sec)
PGD_2	60	32 (53)	-8.3±4.8	9.1±4.6	+4.4±1.9	77±18
$PGF_{2\alpha}$	15	9 (60)	-10 ±8.4	11 ±4.7	+5.5±6.3	76±55
PGE_2	6	2 (33)	-4.0	4	+3.0	114
PGI_2	24	0 (0)	-	-	-	-
PGE_1	13	0 (0)	-	-	-	-
TXB_2	22	0 (0)	-	-	-	-

Assays were performed by application of one drop (2 ul) of prostaglandins (0.1 - 1 mM) solved in ethanol (0.1 - 1 %) and 150 mM NaCl on the surface of DMEM (2 ml) in 35-mm dishes.

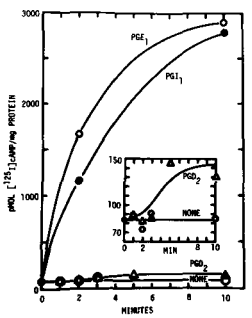


図3. 各プロスタグランディンによる細胞内cAMP濃度上昇の時間経過。
挿入図はPGD_2の変化を拡大して示す。
PGI_1はPGI_2の安定な類似物として使用した。

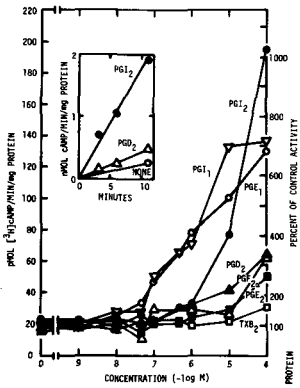


図4. 各プロスタグランディンのA-サイクラーゼ活性化におよぼす濃度反応曲線。
挿入図はPGI_2とPGD_2のA-サイクラーゼ活性化に対する時間経過。

表3.

Additivity of adenylate cyclase of NG10815 cells by PGI_2 plus PGD_2 or $PGF_{2\alpha}$

Additions	Adenylate cyclase (pMol cAMP/min/mg protein)	% of control	Δ%
None	17	100	-
$PGF_{2\alpha}$	55	322	-
PGD_2	50	293	0
PGD_2 + $PGF_{2\alpha}$	76	448	+155
PGE_1	132	781	-
PGI_2	134	790	0
PGI_2 + PGE_1	148	874	+84
PGI_2 + PGD_2	172	1019	+229
PGI_2 + $PGF_{2\alpha}$	156	922	+132

Hundred μM of reagents were used.

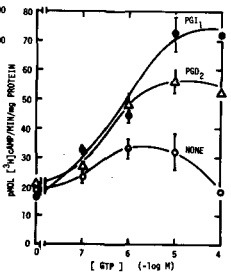


図5. PGD_2とPGI_1のA-サイクラーゼ活性化におけるGTP要求性。
洗浄膜酵素標品により測定した。

支持する。PGD_2が脳のどの部位で作用しているかは今後の課題であるが、多量のPGD_2や合成酵素活性の示された視床下部[2,11]等がその部位として考えられる。

PGD_2によるAchの遊離促進は平均で3.4倍しか上昇しなかった。この頻度変調の大きさはセロトニンによる10倍以上の増加[8]に比べ低かった。しかし、これはセロトニンによる脱分極が20mV以上にもおよんだのに対し、PGD_2による脱分極が平均5mVで約四分の1であったことによく一致する。またセロトニンによる遊離促進が10秒以内で終了したのに対しPGD_2による促進は2分以上続いた。この時間経過の差もセロトニンとPGD_2による膜脱分極の時間経過とよく対比できるものであった。このことから、Ach遊離促進はNG108-15細胞の脱分極反応により引きおこされたと考えられる。

PGD_2はNG108-15細胞の膜電位とA-サイクラーゼ両方に影響があることが明らかとなったが、脱感作の仕方において全く異っていたことから、両反応は、イオンチャンネルとサイクラーゼにカップルする相互に独立な別の2種類のPGD_2受容体により仲介されていると考えられる。このような2種類の異なる受容体を想定する考え方はNCB20神経細胞のセロトニン受容体で提案されている[8]。Achの遊離はイオンチャンネルとカップルしている受容体により引き起こされたと考えられる。NG108-15細胞のA-サイクラーゼとよくカップルしているPGE_1やPGI_2はイオンチャンネルとはカップルせず、したがってAchの遊離にも無影響であったと考えると理解しやすい。

N1E-115細胞で観察されたPGD_2だけのすばやいATPよりのcAMP産生[11]はNG108-15細胞には観察されなかったが、これは測定方法の差よりは細胞の差によるものであろう。NG108-15細胞で色素法[1]により膜脱分極の生じることが示されたPGE_1やPGI_2が電気生理学的方法による膜電位測定では無影響で、蛍光変化の観察されなかった$PGF_{2\alpha}$やPGE_2がPGD_2同様膜電位やシナプス伝達に影響を持っていた点は大きく異なる。我々の電位測定でも、PGE_1やPGI_2投与により脱分極したままもとへもどらない事もあり、そのような人工的な反応を見ていたのではないかと推測される。

ここで観察したような二相性の膜電位反応が脳下垂体腫瘍GH3細胞でTRHにより誘発されることが報告されている[10]。そこでは過分極はK^+イオンの透過性上昇により、脱分極はK^+イオンチャンネルの長時間の閉鎖により生じると説明されている。PGD_2による反応の機構も同様と思われるが、シナプス伝達促進の生じた脱分極中にCa^{++}の持続的流入があるのではないかとの考えの下に現在^{45}Caを用いてPGD_2依存性Caの細胞内取り込みを追求中である。

REFERENCE
1) Abdel-Halim, M.S. and Anggard, E. (1979) Prostaglandins 17, 411-418. 2) __, Hamberg, M., Sjoquist B. and Anggard, E. (1977) Prostaglandins 14, 633-643. 3) Higashida, H., Kato, T., Kano-Tanaka, K., Okuya, M., Miyake, A. and Tanaka, T. (1981) Brain Res. 214, 287-299. 4) __, Miki, N., Tanaka, T., Kato, K., Nakano, T., Nagatsu, T. and Kano-Tanaka, K. (1981) J. Cell. Physiol. 110, 印刷中. 5) Kato, K., Higashida, H., Umeda, Y., Suzuki, F. and Tanaka, T. (1981) Biochim. Biophys. Acta 660, 30-35. 6) Keirns, J.J., Wheeler, M.A. and Bitensky, M.W. (1974) Anal. Biochem. 61, 336-348. 7) Kondo, K., Shimizu, T. and Hayaishi, O. (1981) Biochem. Biophys. Res. Commun. 98, 648-655. 8) MacDermot, J., Higashida, H., Wilson, S.P., Matsuzawa, H., Minna, J. and Nirenberg, M. (1979) Proc. Natl. Acad. Sci. 76, 1135-1139. 9) Miki, N., Hayashi, Y. and Higashida, H. (1981) J. Neurochem. 37, 627-633. 10) Ozawa, S. and Kimura, N. (1979) Proc. Natl. Acad. Sci. 76, 6017-6020. 11) Shimizu, T., Mizuno, N., Amano, T. and Hayaishi, O. (1979) Proc. Natl. Acad. Sci. 76, 6231-6234. 12) __, Yamamoto, S. and Hayaishi, O. (1979) J. Biol. Chem. 254, 5222-5228. 13) Smith, J.B., Silver, M.J., Ingerman, C.M. and Kocsis, J.J. (1974) Thrombosis Res. 5, 291-299. 14) Watanabe, K., Shimizu, T., Iguchi, S., Wakatsuka, H., Hayashi, M. and Hayaishi, O. (1980) J. Biol. Chem. 255, 1779-1782.

90 培養牛副腎髄質クロマフィン細胞におけるアセチルコリンエステラーゼ(AchE)の生成とその放出：ニコチン刺激によるAchEとカテコールアミンの同時放出

溝部文夫, Bruce G. Livett
(The Montreal General Hospital and McGill University)

〔要　約〕

牛副腎髄質よりクロマフィン細胞を単離し、単層培養した。この培養細胞を使い、アセチルコリンエステラーゼ(AChE)の生成およびその放出について調べた。

(1) クロマフィン細胞のAChE活性は培養9-11日で6-7倍に増加した。

(2) 培養細胞のAChEは、ニコチン刺激によりカテコールアミン(CA)と並行して放出され、その放出にはCa^{2+}の存在が必須であった。

(3) 培養細胞は、ベラトリジンによる脱分極刺激により、Ca^{2+}の存在下でCAとAChEの両者を同時に放出した。さらに、56mMK^{+}による刺激にも反応し、CAとAChEの両者を並行して放出した。

(4) いずれの刺激によっても、AChEの放出量はCAの放出量と並行して増加し、両者には正の相関関係($r=0.849$)が見られた。

以上の実験結果から、クロマフィン細胞は、AChEを生成し、また刺激に反応して従来知られていたCAだけでなく、AChEも並行して放出することが明らかになった。また、すでに報告されている組織化学の結果と考え合わせると、AChEが小胞体から細胞外に直接放出されるという分泌様式の存在が考えられる。

Key words : Bovine adrenal chromaffin cells in culture, Acetylcholinesterase secretion, Nicotinic response.

牛副腎の組織化学的研究によれば、アセチルコリンエステラーゼ(AChE)活性は、クロマフィン細胞およびこれをコリン作働性神経支配している内臓神経の両者に見いだされる[12]。このクロマフィン細胞に存在するAChEの起源については、クロマフィン細胞自身による生成が第一に考えられるが、他に、内臓神経から放出されたAChEあるいは血液中のAChEが取り込まれた可能性も考えられる。そこで我々は、牛副腎髄質クロマフィン細胞の初代培養系を使って、AChEの起源について検討を加えた。この培養系は、非神経性細胞が存在しない、ほぼクロマフィン細胞のみよりなる均一な系であり[7]、さらに、内臓神経の影響がない条件下のものなので、AChEの存在と起源を生化学的に探る際には最適な対象である。また、最近牛の灌流副腎において、高濃度K^{+}による刺激によりAChEが放出されることが報告された。しかし、このAChEがクロマフィン細胞、内臓神経、どちらに由来するか結論が出ていない[1]。したがって、培養クロマフィン細胞からのAChE放出の可能性についても検討を加えてみた。

〔実験方法〕

<u>クロマフィン細胞の培養</u>　クロマフィン細胞を、コラゲナーゼ処理等により牛副腎髄質から単離し、DMEM-10%牛胎児血清培養液中で単層培養した[7]。なお、培養液には、非神経性細胞の分裂産生を抑えるため、5-フルオロデオキシウリジンとサイトシンアラビノサイドを加えた。

<u>培養細胞のAChE活性測定</u>　細胞のホモジェネートを使い、アセチルチオコリンを基質としてEllman's[2]の方法によりAChE活性を測定した[8]。その際、全コリンエス

テラーゼ（ChE）活性の内、5×10^{-6}M BW284C51により阻害される活性をAChE活性とした。

培養細胞からのカテコールアミン（CA）およびAChEの放出測定　培養細胞（培養開始後7-11日）をまずDMEMさらにKRH液[7]にてよく洗った後、KRH液に溶かした刺激薬（ニコチン、メタコリン、ベラトリジンあるいは56mM K^+）を作用させて、CAおよびAChEの放出実験を行なった。37°Cにて通常8分間作用させた後、KRH液を回収、遠心分離し、その上清分画中のCA量とAChE活性を測定した。自発的放出量（対照値）は、刺激薬を含まないKRH液で同様の実験を並行して行ない、求めた。細胞に残っているCA量とAChE活性についても測定した。CAは、Renziniら[9]の螢光法により定量、AChE活性は、^{3}H-AChを基質とするJohnsonら[5]の方法により測定した。一部の実験においては（図3,4）、刺激薬存在下における全放出量から、自発的放出量（対照値）を差し引き、刺激による放出量を求めて結果を表わした。また、表1の実験においては、放出実験後、上清分画中のAChE活性とラクテイトデヒドロゲナーゼ（LDH）活性[3]を測定した。

〔実験結果ならびに考察〕

培養クロマフィン細胞のAChE活性

牛副腎髄質より精製したクロマフィン細胞は、きわめて低いAChE活性を示した（図1）。（ただし、精製過程において髄質をコラゲナーゼ処理しているため、クロマフィン細胞膜表面に存在するAChE分子が消化されて遊離した可能性が充分あり、この活性値は生体内の実際の値よりかなり低いと思われる。）このAChE活性は培養中に6-7倍に増加した（培養9-11日後，図1）。この結果は、牛副腎髄質のクロマフィン細胞にAChEが存在し、かつAChEを自ら生成し得ることを示している。なお、培養細胞の全ChE活性は選択的AChE阻害剤であるBW284C51（5×10^{-6}M）により94%以上抑制され、かつ、選択的なBuChE阻害剤のiso-OMPAにより10^{-5}M以下の濃度ではまったく抑制されなかった。したがって、培養細胞のChE活性は実質上すべてAChEによるものと考えてさしつかえない。

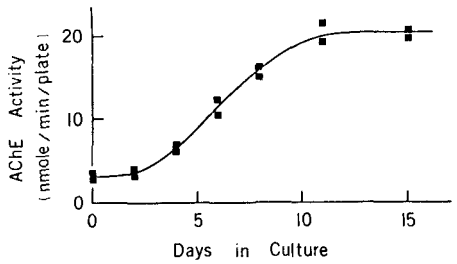


図1　培養クロマフィン細胞のAChE活性

培養細胞からの、刺激によるCAおよびAChEの同時放出

生体内では、副腎髄質において、内臓神経の神経終末から放出されたAChの刺激を受けて、クロマフィン細胞がCAを分泌する。同様の機構が牛副腎髄質から得た培養クロマフィン細胞においても働くことが分かっている。すなわち、培養細胞は、ニコチン性受容体の活性化に反応して外部から取り込んだ^{3}H-NEを放出する[7]。図2に示されるように、ニコ

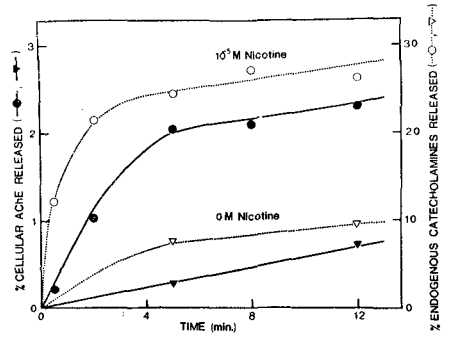


図2　ニコチン刺激による培養細胞からのCAおよびAChE放出の時間経過

10^{-5}Mニコチン刺激下での放出：CA,○；AChE,●．
自発的放出：CA,▽；AChE,▼．

チン刺激により培養細胞から内在性CAが急速に放出された。この時間経過は、ACh刺激による^{3}H-NE放出のそれとよく一致している[7]。ニコチン刺激により、AChEも同じく急速に放出された（図2）。CAとAChEのニコチン刺激による放出量は、薬物量の変化に対し並行して反応し、10^{-5}Mで共に最大増加が見られた（図3）。（なお、ニコチン（10^{-5}M）自身はAChE活性測定には影響を与えなかった。）ムスカリン様作用薬のメタコリンはCAおよびAChEのいずれの放出量も増加させなかった。これらの実験結果は、CAおよびAChEの放出が、ムスカリン性ではなくニコチン性受容体を介して起こることを示している。このニコチン刺激によるCAとAChEの放出にはCa^{2+}の存在が不可欠であった（図3）。

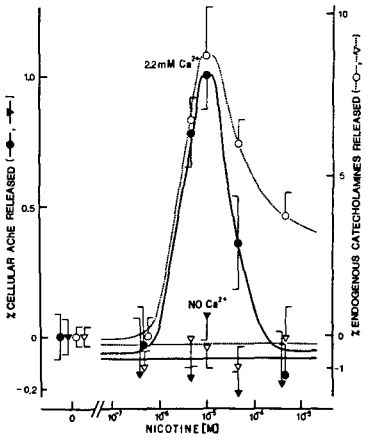


図3　ニコチン刺激による培養細胞からのCAおよびAChEの放出量ならびにそれへのCa^{2+}の影響

2.2mM Ca^{2+}存在下での放出増加量：CA,○；AChE,●。Ca^{2+}非存在下での放出増加量：CA,▽；AChE,▼。

培養細胞をベラトリジンにより脱分極刺激した時も、CAとAChEの放出増加が見られた（図4）。しかも、このベラトリジンによる放出増加にもCa^{2+}の存在が必須であった（表1）。また、56mM K^+による刺激によっても、CAとAChEの放出が並行して起こった（図4）。

これらの放出実験において、ニコチン、ベラトリジン、56mM K^+いずれの刺激によっても、AChEの放出増加はCAの放出増加と並行して起こり、両者には正の相関関係（$r=0.849$）が見られた（図4）。また、刺激によるAChE放出が、細胞損傷等非特異的なものでないことを確かめるために、細胞質酵素であるLDH放出についても検索した。その結果、AChE放出増加がみられる条件下でもLDH放出増加は起こらず、刺激によるAChE放出が非特異的なものでないことを確かめ得た（表1）。

以上の実験結果から、クロマフィン細胞を刺激することにより、従来知られていたCAの放出だけでなく、AChEの放出も並行して起こることが明らかになった。このこ

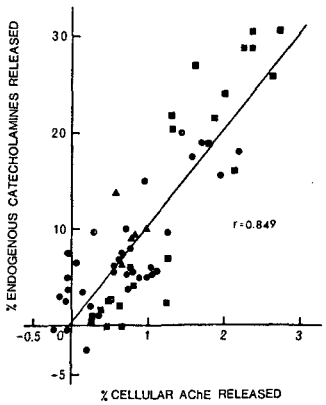


図4　刺激によるCA放出量とAChE放出量の相関

ニコチン（5×10^{-7}–5×10^{-4}M）：●
ベラトリジン（10^{-6}–2×10^{-4}M）：■
56mM K^+：▲

表1　培養細胞からのAChEおよびLDHの放出

Secretagogue	Addition	AChE released pmol/min/well	LDH released pmol/min/well
None	No Ca^{2+}	33.2 ± 0.6	802 ± 144
	2.2mM Ca^{2+}	31.9 ± 1.9	830 ± 90
10^{-5}M Nicotine	No Ca^{2+}	30.1 ± 1.6	977 ± 136
	2.2mM Ca^{2+}	53.9 ± 3.9	806 ± 56
10-4M Veratridine	No Ca^{2+}	27.9 ± 1.5	946 ± 98
	2.2mM Ca^{2+}	77.4 ± 2.9	814 ± 45

Mean ± SEM (n=3)　数値は、KRH液中に放出された酵素の活性値

とは、脱分極刺激した灌流副腎から放出されるAChE[1]の少なくとも一部はクロマフィン細胞に由来する可能性が強いことを示している。CAがクロマフィン小胞内に存在し、開口放出（exocytosis）により細胞外に分泌されることは一般に認められている。牛副腎髄質の組織化学的研究は、クロマフィン細胞においては、AChE活性がクロマフィン小胞内にはまったく観察されず、細胞膜および小胞体（endoplasmic reticulum）内に局在分布していることを明らかにしている[12]。したがって、刺激により放出されたAChEは、細胞膜表面から遊離された可能性は否定できないものの、Ca^{2+}が必須という実験結果を考慮すると、おそらく小胞体内から細胞外に直接分泌されたものと考えられる。事実、牛副腎において、クロマフィン細胞の小胞体内に存在するAChE活性が細胞外部の活性に直接連絡している組織化学的観察例が報告されている[12]。放出AChEの由来がいずれの部位にしろ、CA放出とAChE放出が並行して起こるという実験結果から、細胞刺激からAChE放出までの過程のうち、ある部分は、CAのそれと機構を共有していることは充分考えられる。

最近、中枢[4]および末梢[11]神経において、脱分極刺激によるAChE放出の増加が観察されている。また、神経細胞におけるAChEの分布についていえば、シナプス小胞内にその活性を認める報告はきわめて少なく、大部分は細胞膜表面と小胞体にその存在を報告している[10]。さらに、神経細胞の樹状突起および軸索内の小胞体に存在するAChE活性が細胞外部と連絡している観察例も報告されている[6,12]。したがって、本研究で得られた、クロマフィン細胞からの刺激によるAChE放出（それも、おそらくは小胞体からの放出）と同様の放出機構が広く神経細胞に存在することが考えられる。

〔文献〕

Chubb, I.W. & Smith, A.D. (1975) Proc. R. Soc. Lond. B. 191,263-269.

2) Ellman, G.L., Courney, K.D., Andres, V., Jr. & Featherstone, R.M. (1961) Biochem. Pharmacol. 7,88-95.

(3) Gay, R.J., McComb, R.B. & Bowers, G.N., Jr. (1968) Clin Chem. 14, 740-753.

(4) Greenfield, S., Cheramy, A., Leviel, V. & Glowinski, J. (1980) Nature 284, 355-357.

(5) Johnson, C.D. & Russell, R.L. (1975) Anal. Biochem. 64, 229-238.

(6) Kreutzberg, G.W. & Toth, L. (1974) Naturwissenshaften 61, 37.

(7) Mizobe, F., Kozousek, V., Dean, D.M. & Livett, B.G. (1979) Brain Res. 178, 555-566.

(8) Mizobe, F. & Livett, B.G. (1980) J. Neurochem. 35, 1469-1472

(9) Renzini, V., Brunori, C.A. & Valori, C. (1970) Clin. Chim. Acta 30, 587-594.

(10) Silver, A. (1974) The Biology of Cholinesterases, North-Holland, Amsterdam.

(11) Skau, K.A. & Brimijoin, S. (1978) Nature 275, 224-226.

(12) Somogyi, P., Chubb, I.W. & Smith, A.D. (1975) Proc. R. Soc. Lond. B. 191, 271-283.

91 ニワトリ網膜に存在するニューロブラストーマ×グリオーマ雑種細胞のコリンアセチルトランスフェラーゼ活性促進因子

高橋正身・天野武彦(三菱化成生命研)

〔要　約〕

ニワトリ胚神経組織抽出液を培地中に加えると　ニューロブラストーマ×グリオーマのハイブリッド細胞(NG108-15)のコリンアセチルトランスフェラーゼ(CAT)活性の上昇が　認められた。CAT活性が高い組織から得た抽出液に強い活性が認められ，調べた中では　神経性網膜の抽出液に最も強い活性が認められた。またこの活性は　ニワトリの発生段階によっても変化し　網膜組織自体のCAT活性が大きく上昇した　15日目胚の網膜から得た抽出液が　最も強い活性を示した。網膜抽出液はNG108-15のCAT活性を　量依存的に上昇させたが　細胞の成長や形態には　ほとんど変化を与えず　また高K^+依存性のCa^{2+}取り込み能も高めなかった。網膜抽出液によるCAT活性の上昇はdibutyryl cAMPによるCAT活性の上昇と相加的に起った。抽出液をトリプシン処理や熱処理をすると　その活性の多くが失われるが　透析によっては活性の多くが保持されることから　有効成分は蛋白質であると推察されるが　一部低分子性の因子の存在の可能性も残されている。

Key words :　neural retina, trophic factor, neuroblastoma x glioma hybrid cell

---

種々の神経が分化する際に　周囲の細胞や標的細胞からのtrophicな影響を大きく受けることが　明らかになってきている(1, 5, 6, 7)。自律神経系のコリン作動性ニューロンが分化する際にも　その標的組織に存在する因子が大きな役割をはたしており，心筋等のconditioned　medium中の因子が　盛んに研究されている。一方，中枢神経系のコリン作動性のニューロンの分化には　中枢神経組織中に存在する因子が重要な役割を担っている可能性が考えられるが，その存在は未だ明らかになっていない。そこで今回我々は　中枢神経組織中に　コリン作動性ニューロンの機能を高める因子が存在するか否かを調べた。このような因子の性質やその作用機構を調べる際，培養した正常神経細胞を用いることは　多くの利点を持つ反面　幾つかの困難が存在する。まずいわゆる生存因子(survival factors)との区別という問題がある。つまり培養下の正常ニューロンは徐々に死滅するため，ある因子の添加によって　ニューロン機能が発現維持されたとしても　それが生存のために必要であるのか，神経の分化や成熟のために必要な因子であるのかを区別して解析することが困難である。また培養した正常神経組織には　種々のニューロン，グリア，そのプロブラスト等が含まれており，かつ量として多量に扱えないため　どのような分子機構で　ニューロンの分化，成熟がおきているかを知るためには不適である。このためモデル系として　クローン化されたニューロブラストーマ細胞を用いることは一つの有力な手段であると考えられる。以上の観点から　我々はコリン作動性ニューロンに作用する因子の探索をシナプス形成能を持つハイブリッド細胞，NG108-15，を用いて行った。その結果発生途中のニワトリ胚の神経性網膜にハイブリッド細胞のコリンアセチルトランスフェラー

せ（CAT）活性を高める因子が存在することを見い出し　そのいくつかの性質を調べた。

＜実験方法＞

組織抽出液は　特に断りのない限りニワトリ15日胚の組織から得た。摘出した各組織をHanks液中でホモゲナイズした後　3,000g　ついで32,000gの遠心で上清を得、0.2　または0.4μmポアサイズのミリポアフィルターで濾過した後　-80°C　で保存した。

NG108-15細胞は　5%新生牛血清（三菱化成）を含むDMEMのHAT培地で培養した。実験に際しては　直径35mmの培養皿あたり8×10^4個の細胞をまき，翌日1mg/dishの組織抽出液を加え　4日間培養し　CAT活性，Ca^{2+}とりこみ能の測定に用いた。培地交換は毎日行った。培養した細胞及び各組織のCAT活性は　細胞を5mM Tris-HCl液（pH7.3）中に集めた後，超音波破砕し　Fonnum（2）の方法に従って測定した。

Ca^{2+}とりこみ能は　低K^+溶液及び高K^+溶液（5.4 及び51.4 mM KCl, 130mM NaCl, 1.8 mM $CaCl_2$, 0.8mM $MgSO_4$, 1mM NaH_2PO_4, 5.5mM glucose, 50mM HEPES pH7.3, 25°C）中で30秒間行い，両者の差を，脱分極依存性のCa^{2+}とりこみ量とした。蛋白量は牛血清アルブミンを基準とし　Lowryらの方法（4）で定量した。

＜結果と考察＞

NG108-15細胞のCAT活性は　15日ニワトリ胚の神経組織の抽出液を加えて培養すると増加した。1図は　種々の神経組織から得た抽出液を培地に加えた場合に起るNG-108-15のCAT活性上昇の度合（■）と　それぞれの持つCAT活性（□）とを併せて示したものである。高いCAT活性を持つ組織の抽出液の方がNG108-15細胞のCAT活性を高める作用がより強く　調べた中では神経性網膜の抽出液が　最も強い作用を示した。

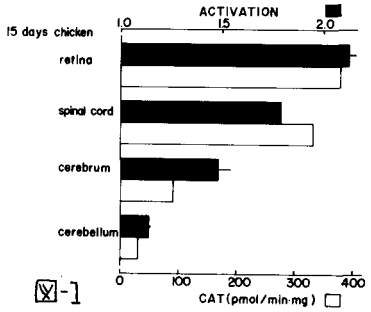


図-1

図2は様々な発生段階のニワトリ胚神経性網膜中のCAT活性（●）と，網膜抽出液を加えて培養した場合に起るNG108-15細胞のCAT活性増加の度合（▲）を網膜を得たニワトリの発生段階に従って示したものである。網膜中のCAT活性は孵化後7日頃より14日にかけて大きく増加した。抽出液を加えた場合のNG108-15のCAT活性も　6日，9日胚の抽出液より15日胚の抽出液を加えた方が　より大きな増加を示した。この様に発生途中のニワトリ神経組織中には　NG108-15のCAT活性を高める因子が存在しており　その作用は高いCAT活性を持つ組織の方がより強く示す事から　この因子が神経の分化，成熟に何らかの生理作用を果している事が考えられ　以下この因子の性質を調べた。

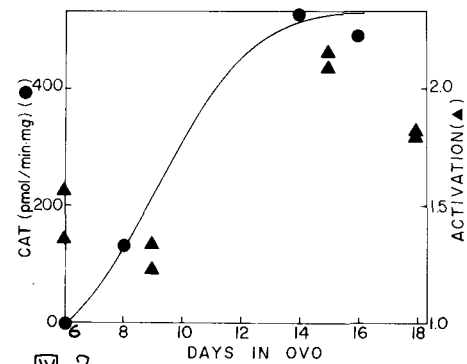


図-2

図3はNG108-15細胞の培地に　15日胚の神経性網膜の抽出液を加えた場合に起るCAT活性及び蛋白質量の変化を培養日数に従って示

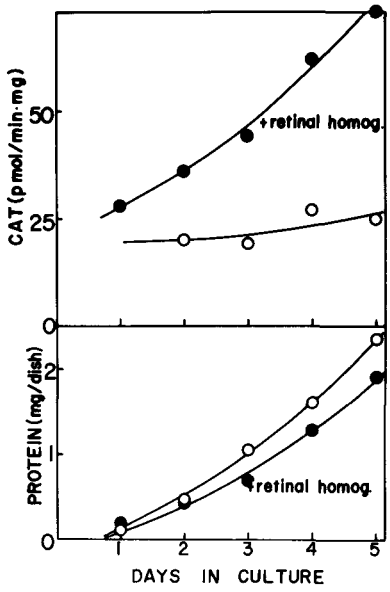


図-3　○ はコントロール

したものである。抽出液を加えて培養したNG108-15細胞のCAT活性は、培養日数に従って著しく増加し、添加後5日で加えていない場合の約3倍の値を示した。一方培養皿あたりの蛋白量と光学顕微鏡で観察した形態には、大きな差異は認められなかった。

図4は、種々の量の網膜抽出液を加え、4日間培養したNG108-15細胞のCAT活性及び培養皿あたりの蛋白量を示したものである。加える抽出液の量を増すに従い、CAT活性は増加した。しかし加えた抽出液量にかかわらず、総蛋白質量には、大きな差異は認められなかった。

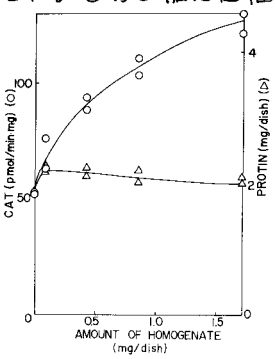


図-4

現在までに、ニューロブラストーマの分化を引き起す要因が、幾つか報告されている(3)。網膜抽出液の性質を、それらの要因と比較するため図らで、網膜抽出液を加える以外に、幾つかの条件下で培養したNG108-15細胞のCAT活性、及び脱分極依存性の Ca^{2+} 取りこみ能を比較してある。

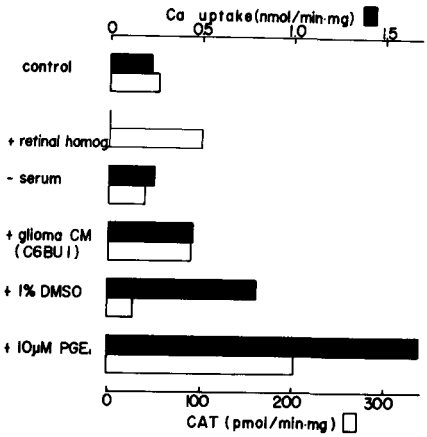


図-5　・-Serumは血清濃度を0.5%に下げたもの.
・controlは何も加えずに培養したもの。

網膜抽出液を加えるとCAT活性は約2倍に上昇するが Ca^{2+} とりこみは検出できなかった。血清濃度を0.5%に下げた場合には Ca^{2+} とりこみ能、CAT活性には大きな変化は見られなかった。

1% dimethylsulfoxide を加えて培養した場合 Ca^{2+} とりこみ能はコントロールの約4倍に増加したが、CAT活性は約半分に減少した。グリオーマ細胞(C6BU-1)のconditioned mediumを加えると Ca^{2+} とりこみ能、CAT活性の両方が約2倍に増加した。10μMのprostaglandin E_1 と1mM theophilline を同時に加えた場合、Ca^{2+} とりこみ能は7.6倍に、CAT活性は3.8倍に増加した。神経突起の伸長は程度の差はあるがコントロールと網膜抽出液を加えたもの以外の系ですべて認められた。以上の結果はニューロブラストーマを分化させる要因には、CAT活性のみを上る働きを持つもの(網膜抽出液)、Ca^{2+} とりこみ能を高めるもの(DMSO)、そしてそれら二つの機能を同時に高めるもの(PGE1、グリオーマconditioned medium)のさまざまなtypeがあることを示している。この事は神経の分化、成

熱に伴って変化する　これらの機能が生体内でも別々の因子によって制御されている可能性のあることを示唆している。

表1は　培地に1mMのdibutyryl cAMP(Bt$_2$cAMP)を加えた場合，網膜抽出液を加えた場合，両者を同時に加えた場合のNG108-15のCAT活性を示している。従来からの報告通り　Bt$_2$cAMPを加えるとCAT活性は増加した(約3.4倍)。抽出液を加えた場合は約3.2倍の増加を示し，両者を同時に加えた場合は　CAT活性はさらに高まり　約7.7倍と相加的な値を示した。先に示したように　網膜抽出液はPGE$_1$の場合と異り，神経突起の伸長やCa^{2+}とりこみ能の増加を起こさない。これらの結果から　網膜抽出液が作用してCAT活性を上昇させる際には　細胞内のcAMPレベルの上昇を伴わないと推察された。

TREATMENT	PROTEIN (mg/dish)	CAT (pmol/min.mg)	
control	2.09	40.1	(1.00)
1mM Bt$_2$cAMP	1.63	134.9	(3.36)
retinal extract	1.82	126.4	(3.15)
1mM Bt$_2$cAMP & retinal homogenate	0.98	310.4	(7.74)

表-1

TREATMENT	CAT (pmol/min.mg)	ACTIVATION
control	39.6 ± 1.8	1.00
retinal extract	76.0 ± 1.4	1.92
trypsin treated retinal extract	51.5 ± 1.7	1.30
heated (100°C 5min) retinal extract	48.5 ± 1.9	1.23
dialyzed retinal extract	64.5 ± 0.6	1.63

表-2

表2は様々な処理をした15日胚網膜抽出液を培地に加えた時に起る　NG108-15のCAT活性の変化を示したものである。無処理の抽出液を加えるとCAT活性は約1.9倍に増加するのに対して，トリプシン処理や，煮沸処理をした抽出液では活性の上昇は抑えられ，それぞれ約1.3倍，1.2倍の増加にとどまった。一方，一昼夜透析した抽出液ではCAT活性の上昇の度合は少し減るが，1.6倍の増加をひき起こした。この結果は，網膜抽出液中のCAT活性を上昇させる因子の多くが　蛋白質であることを示しているが，一部低分子性の物質の関与も示唆している。

以上，ニワトリ胚網膜中に存在するCAT活性を上昇させる因子の性質を調べてきたが，その因子の精製，同定，詳しい作用機構などは　今後の問題である。

<文献>

(1) Coughlin, M.D., Bloom, E.M., and Black, I.B. (1981) Develop. Biol. 82, 56-68
(2) Fonnum, F. (1975) J. Neurochem. 24, 407-409
(3) Hamprecht, B. (1977) Int. Rev. Cytol. 49, 99-170
(4) Lowry, O.H., Rosenbrough, N.J., Farr, A.L., and Randall, R.J. (1951) J. Biol. Chem. 193, 265-275
(5) Manthorpe, M., Skaper, S., Adler, R., Landa, K., and Varon, S. (1980) J. Neurochem. 34, 69-75
(6) Patterson, P.H. (1978) Ann. Rev. Neurosci. 1, 1-17
(7) Weber, M.J. (1981) J. Biol. Chem. 256, 3447-3453

92 An Antiserum Specific for Cholinergic Synaptic Vesicles
コリン性シナプス小胞の特異的抗血清について

Stadler, H.*・Walker, J.H.・Jones, T.R.
(Max-Planck 生物物理化学研究所・ *現 東大・医・脳研)

〔要　約〕

An antiserum has been raised against synaptic vesicles isolated from the electric organ of Torpedo marmorata. After absorption of the antiserum with fractions containing the unwanted antigens, it was demonstrated to be specific for cholinergic nerve terminals not only in the electric organ of Torpedo marmorata but in a variety of mammalian tissues including brain and diaphragm, as shown by immunofluorescence.

The nature of the antigen responsible for the specificity is likely to be of a non-protein origin, probably a glycosaminoglycan.

The antiserum provides a valuable marker for cholinergic nerve terminals. It may now be used to study the life cycle of synaptic vesicles in the cholinergic neuron, including their axonal transport.

Key words : antiserum, synaptic vesicles, cholinergic

From the electric organ of Torpedo marmorata, cholinergic synaptic vesicles (4) and synaptosomal plasma membranes (3) have been isolated in high purity. An antiserum raised in our laboratory against synaptosomal plasma membranes cross-reacts with cholinergic nerve terminals from mammalian tissue, and can be used as a valuable immunohistochemical reagent (1).

We have also raised an antiserum to synaptic vesicles and show that after appropriate absorption procedures it is capable of specifically labeling the cholinergic nerve terminals in the electric organ of Torpedo and in rat diaphragm. The specificity of the antiserum to stain exclusively cholinergic nerve terminals is obtained by means of absorption of the antiserum with fractions containing the unwanted antigens. The procedures are described.

MATERIALS AND METHODS

Synaptic vesicles from the electric organ of Torpedo marmorata were isolated as described (4). Rabbits were immunised four times with 200 μg of vesicle antigen solubilised in Triton X-100. Immunohistochemistry was performed as described previously (1), with 3-10 μm cryostat sections. In some cases, Rhodamine-labelled α-bungarotoxin was added to the first antiserum to stain the acetylcholine receptor.

Absorption of the antiserum was first carried out with a Torpedo liver membrane fract-

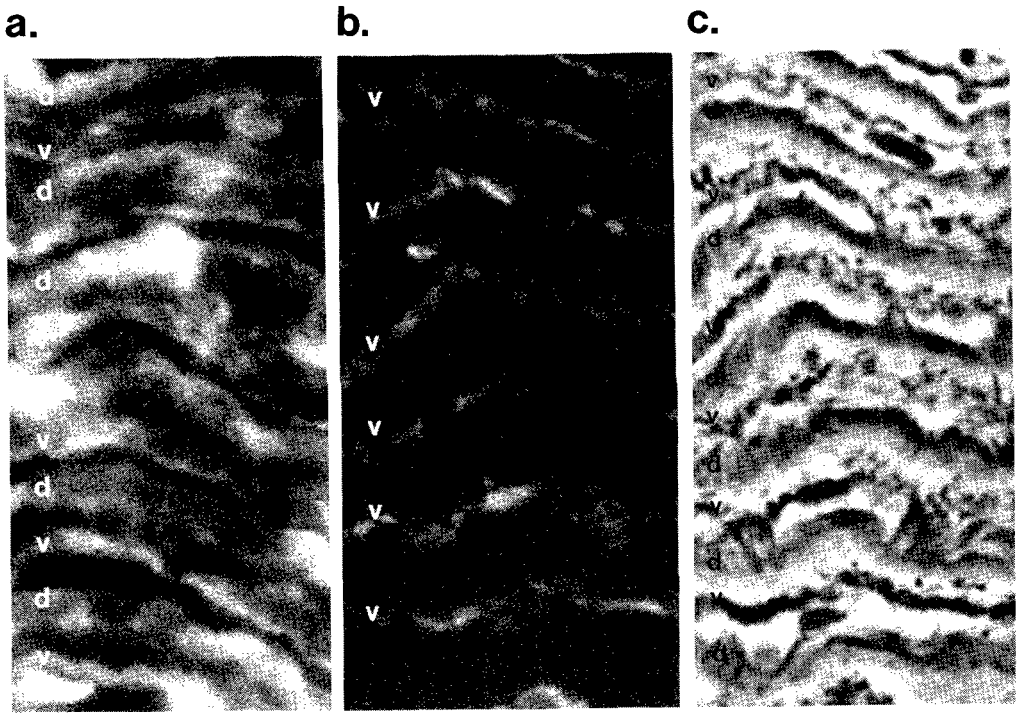


Fig. 1 : Immunohistochemistry of antiserum to synaptic vesicles on 5 um cryostat sections of Torpedo electric organ.
(a) Unabsorbed antiserum, (b) absorbed antiserum, and (c) phase contrast of the same section as shown in (b). Ventral (v) and dorsal (d) membranes are indicated.

ion obtained from the liver homogenate (in 0.15 M NaCl, 10 mM Tris/HCl, pH 7.4) by centrifuging it at 20,000 g for 30 min. One ml of antiserum was mixed with 20 mg protein. The second absorption step was carried out with a particle-free high speed supernatant (100,000 g, 2hrs) from the electric organ extract (fraction S_{12}, see ref. 4).

RESULTS AND DISCUSSION

The unabsorbed vesicle antiserum was tested by immunofluorescence on cryostat sections of electric organ tissue. From Fig. 1a it can be seen that both the ventral (innervated) and the dorsal (non-innervated) membranes are stained. Absorption of the antiserum with a liver membrane fraction and particle-free supernatant from the electric organ makes the antiserum specific for cholinergic nerve terminals, as can be seen from Fig. 1b.

Fig. 2 shows that the absorbed antiserum cross-reacts with mammalian tissue and stains

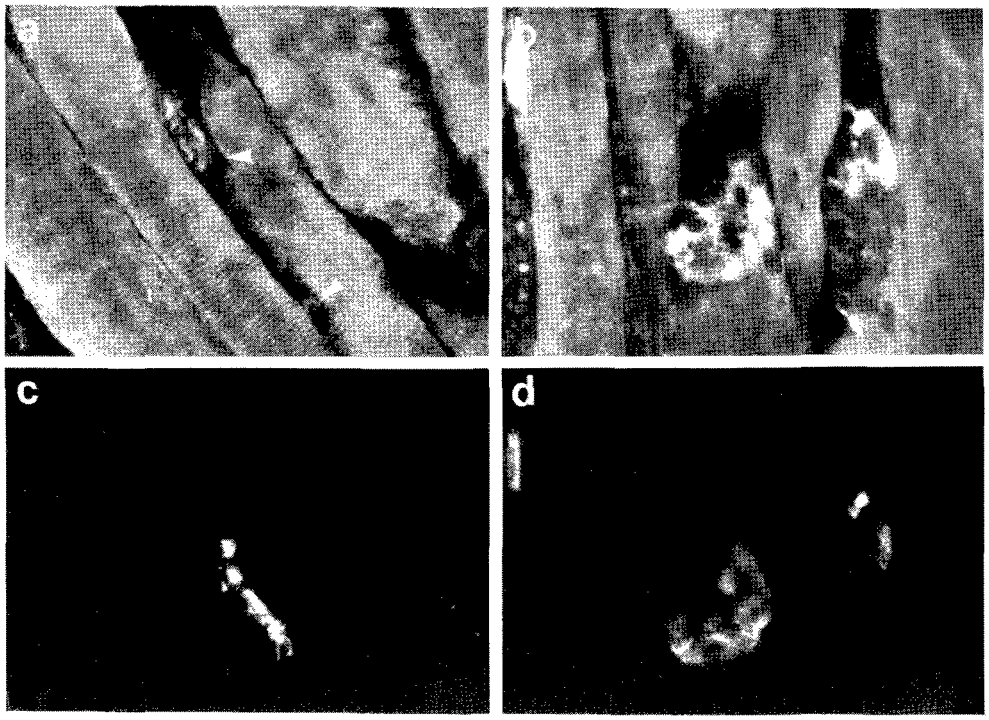


Fig. 2 : Immunohistochemical labelling of nerve endings in rat diaphragm. The tissue was stained with (a) control serum, (b) the antiserum raised to vesicles, (c) Rhodamine-labelled -bungarotoxin, and (d) the same as (c). The position of the terminal stained in (c) is marked by white arrowheads in (a).

the cholinergic nerve endings in rat diaphragm (Fig. 2b). No staining was observed with the control serum (Fig. 2a). Complementary staining as in Fig. 2b was obtained on the same section with Rhodamine-conjugated α-bungarotoxin which stains the acetylcholine receptor (Fig. 2d). The receptor was also localised with this technique in the section treated with the control serum (Fig. 2c).

The antiserum stains the cholinergic nerve endings in rat hippocampus as well (results not shown).

The cross-reactivity of the antiserum suggests that synaptic vesicles from the electric organ of Torpedo contain at least one antigen which is present in mammalian cholinergic nerve endings and has been conserved during evolution.

The fluorescence associated with cholinergic nerve terminals was decreased when the antiserum was further absorbed with the supernatant fraction of water-lysed vesicles

known to contain glycosaminoglycan (2). This suggests that the underlying antigen might be non-protein in nature, and might be identical to the glycosaminoglycan.

The vesicle antiserum may now be used in neuroanatomical studies to localise cholinergic nerve endings, and furthermore to study the biosynthesis and axonal transport of cholinergic synaptic vesicles which is essential to the understanding of the mechanism of transmitter release.

REFERENCES

1) Jones,R.T., Walker,J.H., Richardson,P.J., Fox,G.Q. & Whittaker,V.P. (1981) Cell Tissue Res., 218, 355-373
2) Stadler.H. & Whittaker,V.P. (1978) Brain Res., 153, 408-413
3) Stadler,H. & Tashiro,T. (1979) Eur. J. Biochem., 101, 171-178
4) Tashiro,T. & Stadler,H. (1978) Eur. J. Biochem., 90, 479-487

93 運動ニューロン疾患患者脊髄内アセチルコリン代謝系酵素活性の局所分布

永田　豊・奥谷正人(保健衛生大・医・生理)
本多慶夫・渡辺　良(横浜市民病院・神経内科)

〔要　約〕

運動ニューロン疾患(MND)と非神経疾患(control)で死亡・剖検した各5例の患者から摘出した脊髄凍結標本について Acetylcholine (ACh) 代謝系，muscarinic ACh receptor，および myeline 酵素の活性を測定し比較検討して，以下の結果を得た。

1. Choline acetyltransferase (ChAT) 活性は，control 脊髄横断標本で，頸・胸・腰髄共に，前角と前索部に局在して高く認められた。MND では特に前角と前索部の ChAT 活性が著明に低下しており，下位運動ニューロンの選択的変性・脱落の病理像と一致する。
2. Acetyl cholinesterase (AChE) は，前角および後角灰白質部に高い活性がみられたが，control に比べて MND では各部位の酵素活性の変動は著明ではなかった。しかし頸髄前角での AChE 活性は MND でかなり減少していた。
3. ^{3}H-QNB の特異的結合により調べた muscarinic cholinergic receptor は，脊髄前角と後角部に局在して認められた。MND では control に比して特に前角部での ^{3}H-QNB 結合能の低下が著明であり，これは MND の形態的変化とも関連する所見である。
4. ミエリン標識酵素 (CNPase) 活性の分布は，灰白質と白質，ならびに control と MND との間で著明な分布の差異がみられなかった。

Key words : Motor neuron disease, Choline acetyltransferase, Acetylcholinesterase.

筋萎縮性側索硬化症 (Amyotrophic lateral sclerosis; ALS) に代表される運動ニューロン疾患 (motor neuron disease; MND) の病理組織学的特徴は，脊髄前角部位における下位運動神経細胞体の選択的変性・脱落としてよく知られている。脊髄における下位運動ニューロンの伝達物質がアセチルコリン (ACh) であることは既に確定されており，その合成系酵素や分解系酵素の活性や後シナプス ACh 受容体部位は，MND 患者脊髄の前灰白質で特に減少していることが予測される。我々は，MND 患者および非MND患者 (control) の死後なるべく早期に，摘出し凍結した脊髄標本について，その横断切片を前索・前角・側索・後角・後索を含む小分画に分割した。そして，それぞれの組織小片について ACh 合成酵素 (Choline acetyl transferase; ChAT) 活性，ACh 分解酵素 (Acetylcholinesterase; AChE) 活性とムスカリン様 ACh 受容体ならびに中枢ミエリン標識酵素である 2'-3' cyclic nucleotide 3'-phosphohydrolase (CNPase) の活性を測定した。そして，MND 患者と control 患者それぞれ5例について，その生化学的分析結果を病理所見と比較検討した。

〈実験材料ならびに方法〉

実験材料：MND(ALS)および control (肺気腫など)患者それぞれ5例の脊髄は，横浜市民病院神経内科で死後，剖検時に摘出し，凍結保存したものを用いた。Table 1 に示すような条件で，患者の死後，これらの脊髄を摘出して −80°C に凍結保存し，生化学的分析に用いた。

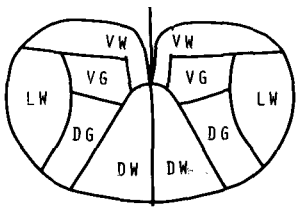
組織の分割：頸・胸・腰髄の凍結脊髄を各々厚さ 1〜3mm の横断切片を作り，CO_2 凍結切片作製装置上で組織の融解を防ぎながら，実体顕微鏡下で Fig. 1 に示すように10個の小区画に分割した。この小片を微小型ホモゲナイザーの中で緩衝液を加えて，摩砕して，各

Table 1 : SUMMARY OF THE CONDITIONS OF SPINAL CORD SPECIMENS OBTAINED FROM MOTOR NEURON DISEASE AND CONTROL PATIENTS

	MOTOR NEURON DISEASE	NON-MND CONTROL
SEX	2 MALES & 3 FEMALES	5 MALES
AGE (AVERAGE)	60 (48-79) YEARS OLD	56.4 (34-74) YEARS OLD
INTERVAL FROM DEATH TO REMOVAL & FREEZING THE SPINAL CORD (AVERAGE)	6.5 (2-12) HRS	6.9 (4-16) HRS
PERIOD OF COLD STORAGE (-80°) OF THE SPECIMEN (AVERAGE)	43 (19-91) DAYS	34 (4-57) DAYS
DURATION OF MND FROM ONSET TO DEATH	3 (0.8-6.5) YEARS	- - - - -

DIAGRAM OF DISSECTION OF THE SPINAL CORD TRANSECTION

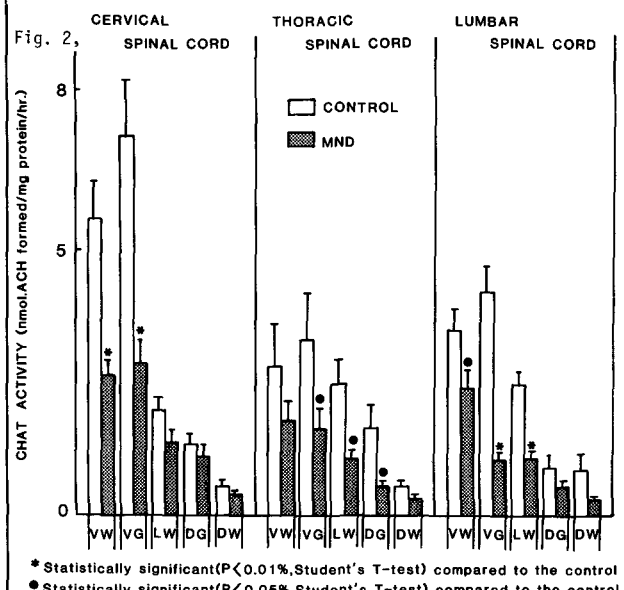
Fig. 1,



VW: Ventral White Matter, VG: Ventral Gray Matter
LW: Lateral White Matter, DG: Dosal Gray Matter
DW: Dorsal White Matter

REGIONAL DISTRIBUTION OF CHOLINE ACETYLTRANSFERASE ACTIVITY IN HUMAN SPINAL CORD TRANSECTION IN MOTOR NEURON DISEASE AND CONTROL

Fig. 2,



*Statistically significant(P<0.01%,Student's T-test) compared to the control
●Statistically significant(P<0.05%,Student's T-test) compared to the control

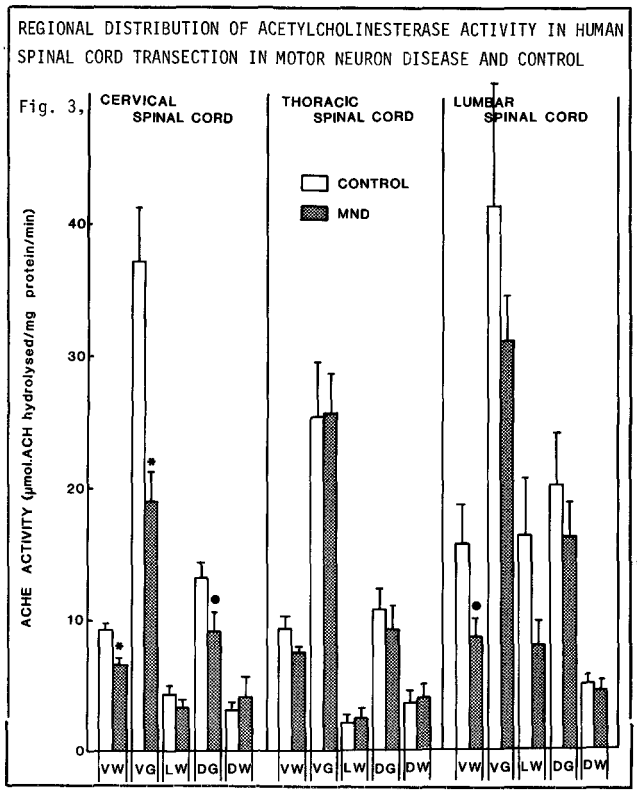
種酵素活性ならびに受容体結合の測定を行なった。

実験方法：ChATの活性は、Rossierらの方法[8]で，AChE活性は、Ellmanらの方法[2]で，CNPase活性は、Kurihara & Tsukadaの方法[5]で定量した。また，ムスカリン様ACh受容体は、^{3}H-quinuclidinyl benzilate (^{3}H-QNB) の特異的結合としてYamamura & Snyderの方法[10]で，組織のタンパク定量はLowryらの方法[6]でそれぞれ測定した。

〈実験成績および考察〉

1) ChAT活性の分布：ChAT活性は、神経組織内でコリン作動性ニューロンの局在と一致して見出される[3]。また、ChAT活性は、死後から摘出凍結までの時間中の減少は、24時間以内ならば、ほとんど認められず，また組織を-70°Cに保存した場合，酵素活性の減少は、3ヶ月間に20%以内に止ったと報告されている[17]。また、測定した酵素活性には、左右差は、ほとんど認められなかったので、両側の測定値を灰白質および白質の値としてまとめた。

Fig.2にみられるように、controlでは、頸・胸・腰髄ともに前索と前角部に高濃度のChAT活性が局在しているのが認められた。これは、Aquilonius らの報告[1]ともよく一致した成績である。前角部には、AChを伝達物質とする下位運動ニューロンの細胞体が局在しており、前索部は、これら細胞体からの軸索が通過して前根を形成する部分であるために、これらの部分では、当然，ChATの高活性が局在する。しかし，MND患者脊髄では，頸・胸・腰髄の前角・前索部でChAT



活性の著明な減少が示された。MNDの病理組織学的所見では，ニューロンの変性・脱落が前角で特徴的に認められており、その伝達物質であるAChの合成酵素も、また、減少がみられたことは、形態学的所見と生化学的分析成績とがよく一致している。これは、ALS患者脊髄でChAT活性が、前灰白質で減少したとする金沢の報告[4]と一致する。

2) AChE活性の分布：Fig.3にみられるように、AChE活性は、controlでは、細胞体が多数存在する前角および後角部に高濃度に見出された。MND患者脊髄では、control患者脊髄と比較して、AChE活性は、各部位で全般的に多少減少傾向がみられるものの有意差は認められなかった。ただし、頸髄灰白質部では、かなりのAChE活性の減少が認められた。AChE活性は、コリン作動性シナプスのみならず、赤血球などの非神経細胞にも広範囲に分布しており、AChの分布とは、必ずしも一致していないことがいわれている[9]。しかし、controlのみならずMND患者でも、前角・後角に、他の部位よりも高濃度のAChE活性が認められることから、ニューロン周囲のグリア細胞内にも、この酵素が存在しうるものと考えられる。

MND患者における、このようなChATおよびAChE活性の変動は、多少のばらつきはあるものの、患者の年令・性別・罹病期間・臨床症状・死因などとは、必ずしも平行関係を示さなかった。

3) ムスカリン様ACh受容体の分布：Fig.4に示すように、^{3}H-QNBの特異的結合として示されるムスカリン様ACh受容体は、controlでは、脊髄前角部において、非常に高濃度に分布し、次いで、後角部も他の部位より高値を示した。このように、^{3}H-QNB結合能の分布が、脊髄前角において特に高値が示されたことは、この部位に存在する運動ニューロンだけでなくRenshow細胞シナプスにもムスカリン様ACh受容体が存在する可能性を示している。しかし、シナプス分布がほとんどみられない白質部では、^{3}H-QNB結合能は極めて低値であった。一方、MND患者脊髄では、control患者脊髄と比較して、特に、前角部において、有意差のある^{3}H-QNB結合能の低下が認められた。これは、病理組織学的に前灰白質部にある運動ニューロンの選択的な変性・脱落する所見と平行した変化であり、また、皮質脊髄路中に、かなりのコリン作動性線維が含まれている可能性をも示唆している。

4) CNPase活性の分布：CNPaseは、中枢神経系ミエリンの標識酵素として知られている[5]が、

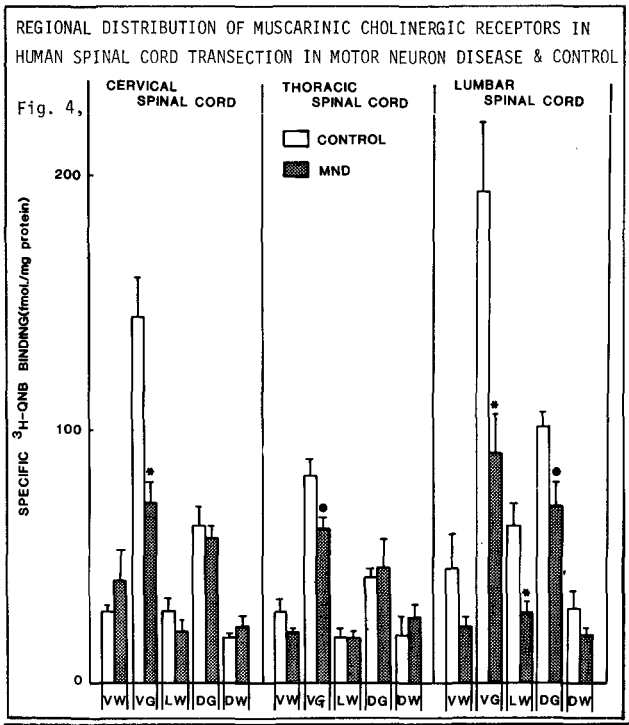
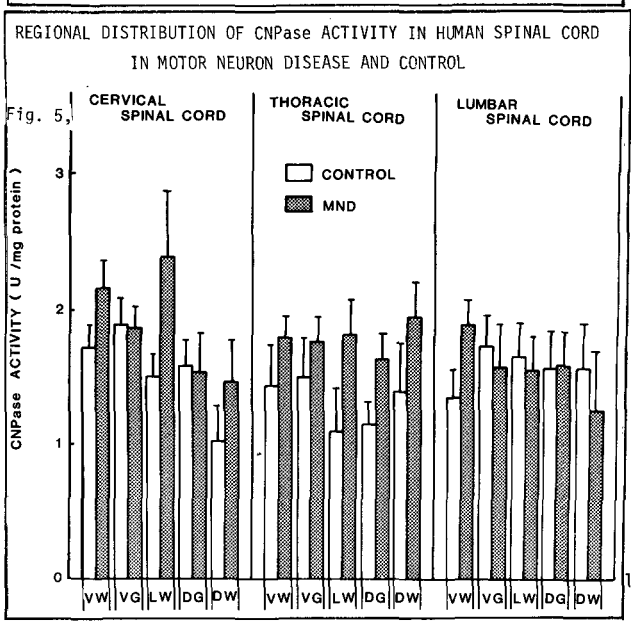


Fig.5に示すように、controlでは、灰白質でも白質でも部位による活性の差異は認められなかった。また、MND患者でも、やはり、部位別の差異は認められず、controlの分布と比較しても、その差はほとんど認められなかった。病理組織学的にMND(ALS)では、一般に、脱髄は少ないといわれているが、後側索の皮質脊髄路の染色性の減少がみられる(髄鞘染色による染色性の減少)にもかかわらず、ミエリン酵素の変動が見られない理由は不明で、今後、検討すべき課題であろう。



<参考文献>

1) AQUILONIUS, S.-M., ECKERNAS, S.-A., & GILLBERG, P.-G.(1981) Brain Res., 211: 329-340

2) ELLMAN, G.L., COURTNEY, D., ANDRES, Jr. V. & FEATHERSTONE, R.T. (1961) Biochem. Pharmacol., 7: 88-95

3) FONNUM, F. (1973) Brain Res., 62: 493-503

4) 金沢一郎, (1977) 日本臨床, 35 :4025-4027

5) KURIHARA, T. & TSUKADA, Y. (1967) J. Neurochem., 14: 1167-1174

6) LOWRY, O.H., ROSEBROUGH, N.J., FARR, A. L. & RANDALL, R.J. (1951) J. Biol. Chem. 193: 265-275

7) PUYMIRAT, J., JAVOY-AGID, F., GASPER, P., POLSKA, A., PROCHIANTZ, A. & AGID, Y. (1979) J. Neurochem., 32: 449-452

8) ROSSIER, J., BAUMAN, A. & BENDA, P. (1973) FEBS Lett., 32: 231-234

9) SILVER, A.(1967) Internatl. Rev. Neurol. 10: 57-109

10) YAMAMURA, H.I. & SNYDER, S.H. (1974) Proc. Natl. Acad. Sci. USA., 71: 1725-1729

94 高速液体クロマトグラフィーによるラット線条体およびヒト髄液中 p-hydroxyphenylacetic acid の測定

小林清史・小出やよい・庄盛敏廉
（岡大・医・脳研・病態生化）

〔要　約〕

Sephadex G-10カラムによる分離とボルタンメトリー検出器付高速液体クロマトグラフィー法による分析との組合わせにより，ラット脳線条体およびヒト髄液中の p-tyramine 代謝物 p-hydroxyphenylacetic acid（PHPA）濃度について検討した。microwave 照射固定後の対照群ラット脳線条体における PHPA 濃度は 1.16±0.22ng/mg protein であったが，L-DOPA 投与により 2.61±0.46ng/mg protein と有意に増加した。chlorpromazine，sulpiride や imipramine の前処置によっては，PHPA 濃度の有意な変化は認められなかった。一方，ヒト髄液中の PHPA 濃度は，種々の精神神経疾患患者46例で 7.06±0.53ng/ml であった。このうち，うつ病患者4例（4.02±0.50ng/ml）および分裂病患者6例（4.98±0.89ng/ml）の値は，神経疾患患者10例の値（8.77±0.92ng/ml）に比べて有意に低値を示した。髄液中 PHPA には，脳室から腰部クモ膜下腔にいたる濃度勾配が存在することを示唆する成績が得られ，さらに probenecid 負荷により著明な PHPA 濃度の上昇が認められた。今回用いた測定法は極めて感度が高く，再現性や回収率も良いことから，体液中の PHPA 濃度測定にすぐれた方法であり，さらに精神神経疾患と脳内微量アミンとの関係を追究する臨床的研究にも応用できるものと考えられる。

Key words： p-hydroxyphenylacetic acid, rat striatum, human cerebrospinal fluid.

ヒトを含む哺乳動物の脳には，神経伝達物質として注目されているカテコラミンやセロトニンの他に，微量芳香族アミンとして β-phenylethylamine，tryptamine や tyramine が存在することが知られている。これら微量アミンの脳機能に果す役割はまだ明らかでないが，神経伝達物質あるいは調節物質としての働らきが指摘されており(4)，またいくつかの精神神経疾患の病因との関連性に言及した報告も散見される(4,10)。微量アミンのうち p-tyramine については，Boulton らの一連の研究があり，脳内濃度の著明な部位差(11)，シナプトソーム画分への局在(2)，非常に早い代謝回転(12) や抗精神病薬投与による有意の減少(5) などの所見から，神経伝達に何らかの形で関与していることが想定されている。しかし，これに関する臨床生化学的研究はほとんどない。

今回私たちは，p-tyramine の代謝物である p-hydroxyphenylacetic acid（PHPA）の脳内および髄液内濃度を，高速液体クロマトグラフィー（HPLC）法により測定する方法を検討し，若干の知見を得たので報告する。

方　法

脳内 PHPA 濃度の測定には，Sprague-Dawley系雄ラット（体重150～200g）を用いた。動物は12時間毎の明暗周期の人工照明下に，温度24℃，湿度55％の恒温恒湿室で飼育し，午前11時に実験を開始した。薬物はすべて腹腔内投与し，投与量は chlorpromazine（CPZ，20mg/kg，生食水溶解），sulpiride（20mg/kg，0.05N HCl溶解），L-DOPA（100mg/kg，1％ carboxymethyl cellulose を含む生食水懸濁）および imipramine（20mg/kg，生食水溶解）として，対照群には生食水を投与した。CPZ群と対照群は投与2時間後に，他の薬物群は1時間後に microwave 照射（4kW，1.5秒）により脳を固定し，実体顕微鏡下で線条体

を切り出した。脳組織は0.4M perchloric acid 1mlを加えてPolytron®でホモゲナイズした後，KOH/formate液100μlを加え，4000g，20分間遠沈した。ついで上清をPasteurピペットに充填したSephadex G-10カラム（5×70mm）に流した後，1.5mlの0.005Mリン酸緩衝液（pH8.5）を用いてPHPAを溶出した。髄液は腰椎穿刺または手術時の側脳室穿刺により採取した4~5mlの内0.5mlを用い，formateでpH2~3に調整した後カラムに流した。得られた溶出液を真空乾固し，移動相50μlに溶解して，その10μlをHPLCに注入した。PHPAの分析には，柳本製ボルタンメトリー検出器（VMD-101型）付高速液体クロマトグラフ1030型を使用した。分析条件は従来の方法(9)を準用し，カラムはNucleosil 7C18を，移動相は6% methyl alcoholを含む0.05Mリン酸緩衝液（pH6.0）を用いた。また，カラム圧は70kg/cm²，流速は0.7ml/minとし，設定加電圧を+0.8V vs. Ag/AgCl₂とした。脳組織の蛋白量測定はLowryの方法(8)により，データの統計的処理はStudent's t-testによった。

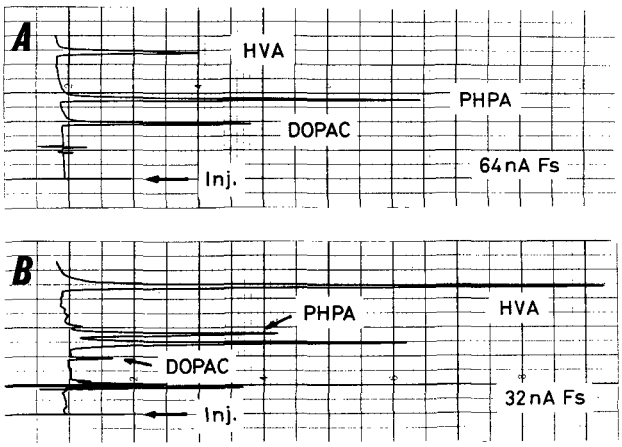


Fig. 1. Chromatograms of 10 ng standards(A) and human CSF(B) separated on a C18 reverse-phase HPLC column.

成　績

1. HPLC法によるPHPAの分析

上記の測定条件下では，Fig.1に示すごとくPHPAはDOPACとHVAピークの間で溶出時間約11分の位置によく分離されたピークとして検出された。カテコラミンはPHPAを含む溶出液中には溶出されず，m-およびo-hydroxyphenylacetic acid，3-methoxytyramine，normetanephrine，3.4-dihydroxymandelic acid，p-hydroxymandelic acid，VMA，MHPGやS-HIAAなど各代謝物やascorbic acid，uric acidのピークはPHPAのそれと重なることはないので，測定の妨害にはならないことを確認した。PHPA標準試料を注入した場合の注入量とピーク高との間の標準曲線は，100ngから0.39ngまでの間で完全な相関関係が認められた。なお，全操作を通じての回収率は，脳組織で約88%，髄液で約95%であった。したがって，この方法を用いることによって脳および髄液中のPHPA濃度を極めて高い精度で測定することが可能である。

2. ラット脳線条体のPHPA濃度と薬物の影響

Table 1にラット脳線条体におけるPHPA濃度とこれに対する薬物投与の影響を，同時に測定したDOPAC，HVA値とともに示した。対照群ラットの線条体PHPA濃度は，1.16±0.22 ng/mg proteinであった。これに対して，L-DOPA投与群ではPHPA濃度は有意に上昇し，約2倍の値となった。CPZやsulpirideの投与では，低値を示したものの有意差を呈するまでにいたらず，imipramine投与によっても変化は認められなかった。

TABLE 1. Effects of drugs on PHPA, DOPAC and HVA contents in rat striatum (ng/mg protein)

Treatment (dose)	PHPA	DOPAC	HVA
Control	1.16 ± 0.22 (9)	6.60 ± 0.45 (10)	5.76 ± 0.52 (10)
L-DOPA (100 mg/kg)	2.61 ± 0.46 (8)*	110.90 ±10.32 (8)**	77.68 ± 4.98 (8)**
CPZ (20 mg/kg)	0.95 ± 0.10 (12)	31.84 ± 2.75 (12)**	27.47 ± 2.22 (12)**
Sulpiride (20 mg/kg)	0.66 ± 0.05 (6)	6.12 ± 1.17 (6)	7.47 ± 0.54 (6)
Imipramine (20 mg/kg)	1.00 ± 0.11 (8)	9.56 ± 0.96 (8)*	12.18 ± 1.11 (8)**

Data given are mean values ± SE with the number of samples in parentheses.
*p<0.05, **p<0.001 compared with control

3. ヒト髄液中のPHPA濃度

種々の精神神経疾患患者の髄液中PHPA濃度をFig. 2に示した。図は各疾患の症例数がいまだ十分でないため，測定時の投薬の有無に関係なく腰部髄液の測定値をそのままプロットしたものである。現在までに測定し得た46症例でのPHPA濃度は，7.06 ± 0.53 ng/mlであった。正常対照群でのデータがまだないため厳密な比較は困難であるが，得られた成績を比較してみると，うつ病患者4例(4.02 ± 0.50 ng/ml)および分裂病患者6例(4.98 ± 0.89 ng/ml)の値は，神経疾患患者10例の値(8.77 ± 0.92 ng/ml)に比べて有意に低値を示した。てんかん患者15例でのPHPA濃度は7.07 ± 1.07 ng/ml (LennoxおよびWest症候群を除く11例では5.57 ± 0.67 ng/ml)，うつ病および分裂病を除く精神疾患患者9例のそれは8.09 ± 1.34 ng/mlであった。一方，小児てんかん患者3例の脳室髄液中PHPA濃度は，それぞれ12.5，26.0および17.7 ng/mlとかなり高い値を呈し，さらに腰椎穿刺により5mlずつの髄液を分画採取し得た1例では，8.5，13.4および15.9 ng/mlと明らかな濃度勾配が認められた。probenecid負荷を行った1例では，負荷前値の10.8 ng/mlに対して後値は41.3 ng/mlと著しい濃度上昇がみられている。

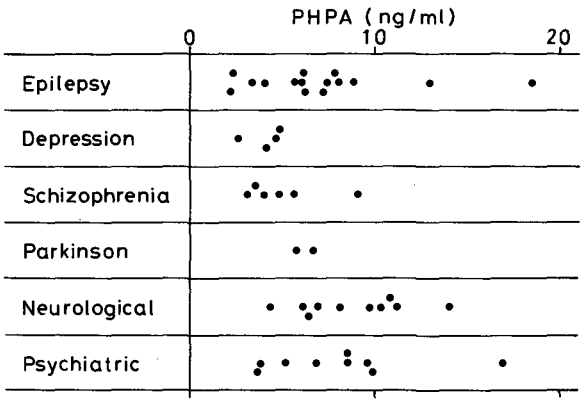


Fig. 2. Lumbar CSF concentrations of PHPA in patients with various neurological and psychiatric disorders.

考　察

本研究で用いたSephadex G-10による分離後にHPLCで分析する方法は，感度が極めて高く，さらに回収率や再現性も良いことから，脳組織および髄液中のPHPA濃度を測定する上で満足すべきものと考えられた。従来の研究では，ラット脳線条体には8 ng/g前後のp-tyramineが存在するとされているが(3)，PHPAについてはラット全脳で164 pmol/gであったとする報告程度しかない(6)。今回の分析では，ラット脳線条体には約1 ng/mg proteinのPHPAが存在する

ことがわかり，この値は同部位のHVAやDOPAC濃度の約1/5～1/6であった。PHPAはL-DOPA投与によって有意に増加したが，これはPHPAの前駆物質であるp-tyramineが，L-DOPAやdopamineのdehydroxylationによっても生成されるとする成績(1)を裏付けるものかも知れない。しかし，Boulton(4)はL-DOPA投与により線条体のp-tyramineは減少するとし，一般的に薬物投与後のdopamine代謝回転と線条体p-tyramine量との間には逆相関がみられると述べている。CPZ，sulpirideやimipramineの投与によるPHPAの変化からは，この成績を確認することはできなかった。

過去における髄液中PHPA濃度に関する報告は，私たちの知る限りではKaroumら(7)がマスフラグメントグラフィ一法で測定した成績しかない。それによると12例の無投薬分裂病患者で6.6±0.8ng/mlであったという。この値は今回の測定成績にほぼ匹敵するが，彼らの用いた髄液は最初から17ml目のものであることから，濃度勾配という点を考慮すれば実際にはもっと低いことが推定される。本研究では，PHPA濃度に脳室から腰部にいたる濃度勾配が認められ，腰部髄液中PHPAのかなりの部分が脳由来のものであることが推察された。さらに髄液中PHPAはHVAなどと同じくprobenecid sensitive transportにより髄液外に排出されることがわかった。これらのことから，いまだ少数例での分析ではあるが，うつ病および分裂病患者のPHPA濃度が低いことに興味がもたれる。微量芳香族アミンと精神神経疾患との関連については早くから注目されていたにもかかわらず，測定技術などの問題から臨床生化学的研究はほとんどなされていない。これまでのところ，これら両疾患を中心とした尿中排泄量の異常を指摘した報告がいくつかあるだけである。p-tyramineが脳機能に果す役割もいまだ明らかではないが，測定技術の進歩とともに各方面からの詳細な検討が必要であろう。

本研究の一部は，文部省科学研究費(No. 565704/3)によった。CPZおよびsulpirideは，それぞれ吉富製薬，藤沢薬品より恵与されたものである。実験に協力いただいた佐藤文子嬢に感謝する。

文　献

1. Boulton,A.A., and Quan,L. (1970) Can.J.Biochem. 48, 1287-1291
2. Boulton,A.A., and Baker,G.B. (1975) J.Neurochem. 25, 477-481
3. Boulton,A.A., Juorio,A.V., Philips,S.R., and Wu,P.H. (1977) Br.J.Pharmac. 59, 209-214
4. Boulton,A.A. (1980) Prog.Clin.Biol.Res. 39, 291-303
5. Juorio,A.V. (1977) Life Sci. 20, 1663-1668
6. Karoum,F., Wyatt,R.J., and Majchrowicz,E. (1976) Br.J.Pharmac. 56, 403-411
7. Karoum,F., Bunney,W.,Jr., Gillin,J.C., Jimerson,D., Van Kammen,D., and Wyatt,R.J. (1977) Biochem.Pharmacol. 26, 629-632
8. Lowry,O.H., Rosebrough,N.J., Farr,A.L., and Randall,R.J. (1951) J.Biol.Chem. 193, 265-275
9. 俣賀喜子，西川徹，仙波純一，高嶋瑞夫，鹿取通男 (1981) 医学のあゆみ 116, 216-210
10. 中河原通夫，渡辺明子，飯塚哲彦 (1981) 蛋白質核酸酵素 26, 1259-1265
11. Philips,S.R., Rozdilsky,B., and Boulton,A.A. (1978) Biol.Psychiat. 13, 51-57
12. Wu,P.H., and Boulton,A.A. (1974) Can.J.Biochem. 52, 374-381

95 松果体における Hydroxyindole O-methyltransferase (HIOMT) の種特異性について

中根正樹・横山(天野)恵美子・出口武夫
(都神経研・医化)

〔要　約〕

1. ウシおよびニワトリの松果体から Hydroxyindole O-Methyltransferase (HIOMT) をそれぞれほぼ単一にまで精製した。
2. ウシの HIOMT は、比活性 552 nmol/hr/mg 蛋白で、等電点は 5.4 であり、ニワトリの HIOMT は、比活性 12179 nmol/hr/mg 蛋白で、等電点は 4.8 であった。アクリルアミドゲル電気泳動では異なった泳動度を示したが SDS 電気泳動では、同一の分子量を示した。
3. 両者とも N-acetylserotonin を最もよい基質とし、至適濃度は約 1×10^{-4}M、Km は約 3×10^{-5}M であったが、ウシの酵素は butotenin, serotonin はほとんど基質にしないのに対し、ニワトリの酵素は、両者をある程度基質とした。
4. 両酵素に対する抗体をつくり、その交差性を調べたところ、ウシの HIOMT に対する抗体は、広く各動物種と交差したが、ニワトリの HIOMT に対する抗体は、鳥類以外とはあまり交差せず、HIOMT が生物進化に伴って変化していることを示唆した。

Key words : hydroxyindole O-methyltransferase(HIOMT), pineal gland, species heterogeneity,

---

Hydroxyindole O-metyltransferase (HIOMT) は、松果体におけるメラトニン合成の最終ステップを触媒する酵素であり、網膜にわずかに活性が認められる他は、松果体にのみ高い活性を有し、松果体特異蛋白であると考えられている(1,7)。松果体は、生物進化とともに、光受容器官から、メラトニンを合成分泌する内分泌器官として大きく変化していった興味ある器官である(10)。また松果体における メラトニン合成は顕著な日周期リズムを示すが、その調節酵素である Serotonin N-acetyltransferase (NAT) 活性の調節機構もまた、生物進化とともに大きく変化していることが最近示されている(3,4)。

また、Jackson ら(5)、Karahasanoğlu ら(6)、また最近では Kuwano & Takahashi (8)が抗体アフィニティーカラムを使った方法により ウシ松果体から HIOMT を精製し、その性質を明らかにしているが、他の種では単一にまで精製した報告はなく、HIOMT の種特異性についての詳細な検討は、いまだ行なわれていない。

我々は、松果体に特異的に存在する HIOMT が、松果体機能の変化とともに変わっていった可能性があると考え、ウシとニワトリの HIOMT を精製し、その比較を中心に、各種属の松果体 HIOMT の 免疫交差性を調べ、HIOMT が生物進化に伴って蛋白分子として変化していることを示す知見を得たので、ここに報告する。

〔実験方法〕

1. 松果体上清：松果体は 4倍量の 50mM Tris-HCl (pH 7.7) でホモジナイズし、17000×g, 20分遠心し、沈殿を再び4倍量のバッファーで洗って得た可溶性画分を上清として用いた。

2. 抗体の作製：ウシは、精製した HIOMT 650μg を同量の Freund's complete adjuvant で乳化させ、ウサギの皮下に2週間ごとに3回注射した。3回目の注射から14日目に大量採血を行ない、血清を分離し、硫安分画により IgG 分画を得て、−80°C にて保存した。
トリは 精製した HIOMT を 520μg ずつ同様に注射し、IgG 分画を得た。

3. HIOMT の assay：HIOMT 活性の測定は、Jacksonらの方法(5)を改変して行なった。通常、0.1mM N-acetylserotonin、0.2mM S-adenosyl-(methyl-^{14}C)-L-methionine (5.5×10^4 dpm) を基質とし、50mM リン酸バッファー (pH 7.9)、総量 50μl で 37°C、30分インキュベートし、0.5M ホウ酸バッファー (pH 10) を 0.2ml 加えて反応を止め、生成された ^{14}C-melatonin をトルエン−イソアミルアルコール (97:3) で抽出して放射活性を測定した。

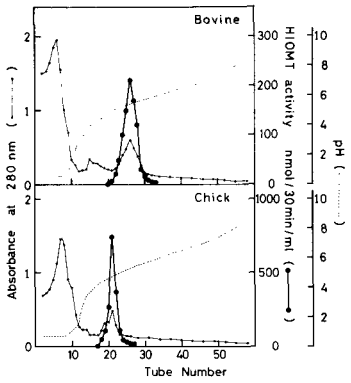


Fig. 1 Isoelectrofocusing of bovine and chick pineal HIOMT

4. 電気泳動：スラブゲル電気泳動は Williams らの方法(11)、SDS 電気泳動は Laemmli の方法(9)に従い行なった。

5. 抗体による HIOMT 活性の阻害：松果体上清と抗体を混合し一晩 4°C にてインキュベートした後、105,000×g 30分遠心し、上清に残った HIOMT 活性を測定した。

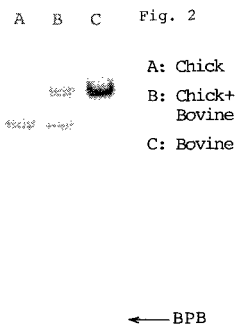


Fig. 2 Polyacrylamide gel electrophoresis of purified HIOMT

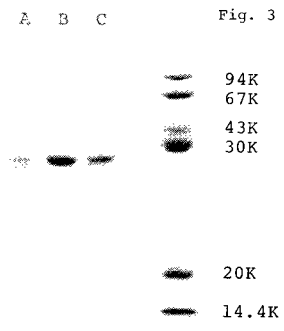


Fig. 3 SDS gel electrophoresis of purified HIOMT

〔実験結果〕

1 酵素の精製：

ウシの松果体 45g (約200個分) またはニワトリの松果体 17g (約2,000個分) を実験方法で述べたようにして上清を得て、Jackson と Lovenberg の方法(5)に従い、硫安分画、DEAE-Sephadex, Sephadex G-100, DEAE-Sephadex, 等電点分画, Sephadex G-100、電気泳動の各ステップにより精製した。2回目の DEAE-Sephadex のステップでは、ウシの場合は活性が A (メインピーク)、B (マイナーピーク) の2つのピークになったが、A ピークについてさらに精製を進めた。ニワトリの場合、このステップでピークが分かれることはなく、活性は1つのピークを示した。等電点分画において、ウシの HIOMT は pH 5.4 付近に活性を示したのに対し、ニワトリの HIOMT は、

pH 4.8 付近に活性を示した（図1）。最終標品は、ウシ、ニワトリとも、電気泳動的に単一のバンドを示したが、その泳動度は明らかに両者で異なった（図2）。最終標品の比活性は、ウシの場合、552 nmol/hr/mg蛋白、ニワトリの場合、12,179 nmol/hr/mg蛋白であり、ニワトリの方が約22倍も比活性が高かった。SDS電気泳動を行なうと、ウシ、トリともほぼ単一のバンドを示し、しかもその泳動度は一致し、サブユニットの分子量は、ウシ、トリともほぼ同一であることが明らかになった（図3）。

2. 基質特異性：

ウシとニワトリのHIOMTについて、その基質特異性を調べた（図4）。ウシの場合、N-acetylserotoninが最もよい基質であり、至適濃度は 1×10^{-4} M であり Kmは約 3×10^{-5} M であった。bufotenin と serotonin は、濃度を高くしてもほとんど基質とはならなかった。それに対し、ニワトリの場合は、やはりN-acetylserotoninが最もよい基質であり、至適濃度は 1×10^{-4} M、Kmは約 3×10^{-5} M であったが、ウシと異なり、高濃度にするとbufoteninもかなり基質として働き、serotoninもある程度基質となった。

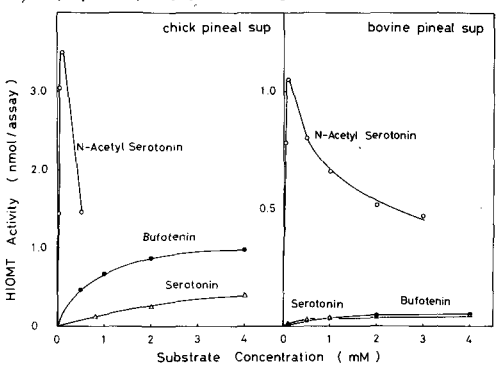


Fig. 4 Substrate specificity of bovine and chick pineal HIOMT

3. 抗体の性質：

精製したウシおよびニワトリのHIOMTを抗原として、それぞれの種のHIOMTに対する抗体を作製し、その性質を調べた。図5に示したようにウシのHIOMTに対する抗体は、ウシの酵素とニワトリの酵素に対してほぼ同様の阻害曲線を示し、この抗体がウシの酵素とニワトリの酵素の共通部位を認識していることを示唆した。それに対してニワトリのHIOMTに対する抗体は、ニワトリの酵素とはよく反応するのに対して、ウシの酵素とは弱い反応性しか示さず、ニワトリのHIOMTに特異的な部位に対する抗体を含んでいると考えられた。しかし高濃度に抗体を加えると、ウシの酵素もニワトリのHIOMTに対する抗体によって完全に阻害された。また、各種の動物の松果体上清中のHIOMT活性に対する、この2つの抗体の交差性を調べた（表1）。ニワトリのHIOMTに対する抗体は、ウズラの酵素とはよく反応したが、ラット、ブタ、ウシとは、ほとんど反応しなかった。しかし人間の酵素とはかなり反応性を示した。それに対しウシHIOMTに対する抗体は、ラット以外の種の酵素とは、かなりよい反応性を示し、各種のHIOMTに共通している部位を認識していることを示唆した。

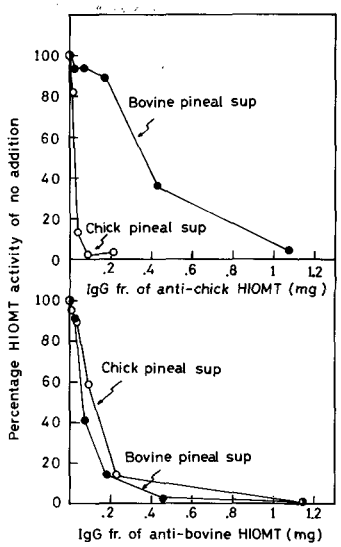


Fig. 5 Immunological cross-reactivity of bovine and chick pineal HIOMT

〔考察〕

松果体におけるメラトニン合成は、昼間はほとんど

起こらず、夜になると顕著に増大するという日周リズムを示し、それはメラトニン合成の中間反応を触媒するNAT活性が周期性を示すためであることがよく知られている。しかしNAT活性の調節機構は、種の進化と共に松果体が光受容器官から内分泌器官へと大きく変化したのに伴い、大きく変化していることが、ニワトリとラットの場合を比較して、明らかになっている(3,4)。ラットの場合には、NATは、視交叉上核から上頸部神経節を介した交感神経によって調節されているのに対し、ニワトリでは、松果体自身が光受容能と日周リズムの内在時計としての機能を持ち、自律的にNAT活性を調節していることがわかってきた。このことは松果体特異酵素であるHIOMTもまた、その性質、調節機構などが、種の進化とともに大きく変化してきた可能性を示すものである。

Table I Effect of antiserum on HIOMT activity of various species

pineal sup	% HIOMT activity of no addition			
	anti chick HIOMT		anti bovine HIOMT	
	22 μg	86 μg	73 μg	458 μg
chick	18	0	76	0
quail	90	0	75	3
rat	104	90	100	73
pig	101	72	33	3
bovine	104	91	45	0
human	82	13	85	13

ここに我々は、ウシのHIOMTとニワトリのHIOMTは、比活性、電気泳動度、等電点、基質特異性、抗原性など、様々な点で異なった蛋白であることを明らかにした。Axelrodらは、ウシとウズラのHIOMTを比較して、電気泳動度および熱安定性が異なると報告している(2)。また、ウシとニワトリだけでなく、表1に示した免疫交差性が動物種によって異なっていることから考えて、HIOMTが、松果体の機能の変化と共に変異していったであろうと考えられる。残念ながら、大量に松果体を得ることが困難なため、ウシとニワトリ以外は詳しい解析が行なえなかったが、将来各動物種のHIOMTの分子としての変化の過程が明らかになれば、生化学的に、松果体の生物進化の跡をたどることが可能であろう。また今後HIOMTの抗体を使った免疫組織化学によって、メラトニン合成機能を持つ部位、あるいは細胞を明らかにすることにより、メラトニン合成活性、生体時計機能、そして光受容機能の3者の関連を明らかにしたいと考えている。

この研究は一部文部省科学研究費補助金一般研究(No. 545121)および特定研究「動物行動の発現機構」の援助によって行なわれたものである。

REFERENCES

1. Axelrod, J., MacLean, P. D., Albers, R. W. and Weissbach, H. (1961) in Regional Neurochemistry edt. by Kety, S. S. and Elkes, J. pp. 307
2. Axelrod, J. and Vesell, E. S. (1970) Mol. Pharmacol. 6, 78-84
3. Deguchi, T. (1979) Science 203, 1245-1247
4. 出口武夫 (1980) 科学 50, 89-97
5. Jackson, R. L. and Lovenberg, W. (1971) J. Biol. Chem. 246, 4280-4285
6. Karahasanoğlu, A. M. and Özand, P. T. (1972) J. Neurochem. 19, 411-430
7. Kuwano, R. and Takahashi, Y. (1978) J. Neurochem. 31, 809-814
8. Kuwano, R., Yoshida, Y. and Takahashi, Y. (1978) J. Neurochem. 31, 815-824
9. Laemmli, U. K. (1970) Nature 227, 680-685
10. 森亘, 長谷川章雄 (1978) "脳の統御機能" (伊藤正男 編) 1, 81-99
11. Williams, D. E. and Reisfeld, R. A. (1964) Ann. New York Acad. Sci. 121, 373-381

96 結合 S-adenosylhomocysteine による hydroxyindole O-methyltransferase 活性調節機構について

桑野良三・高橋康夫
（新大・脳研・神経薬理）

〔要　約〕

Immunoadsorbent Chromatography, DEAE-Sephadex Chromatography で hydroxyindole O-methyltransferase（HIOMT, EC 2.1.1.4）を精製する時に 内在性 AdoHcy が同時に精製されることを観察した。 AdoHcy はメチル転移反応の生成物で HIOMT を含め殆んどのメチル転移酵素の拮抗阻害剤であるため 基質濃度の低いところでは（AdoMet, 1.7×10^{-6} M）、一緒に精製された AdoHcy によって HIOMT 活性は 約30％ 阻害された。

精製HIOMTは、添加した AdoHcy とも、in vitro 反応系で新しく生成された AdoHcy とも安定な複合体を形成し この結合は長時間の透析後も容易に解離しなかったが、AdoHcy hydrolase によって直接 Ado と Hcy に分解された。 Ado deaminase が存在すると Ado は更に代謝されて HIOMT に結合した AdoHcy の分解は一層促進し その阻害効果を失なって HIOMT活性の上昇がみられた。 HIOMTの少くとも一部は AdoHcy と安定な複合体として存在するが この複合体の形成と解離がメラトニン合成の調節に関与していると思われる。

Key words： Hydroxyindole O-methyltransferase, S-adenosylhomocysteine, S-adenosylhomocysteine hydrolase.

松果体における melatonin 合成のリズムについて多くの報告があるが、その本態については未だ不明である。 melatonin は 松果体に特異的に局在する hydroxyindole O-methyltransferase（EC 2.1.1.4, HIOMTと省略）によって S-adenosyl-methionine（AdoMet）から N-acetylserotonin へメチル基が転移されて合成される。 もう一つの生成物である S-adenosylhomocysteine（AdoHcy）は HIOMT を含め殆んど全てのメチル転移酵素に対して強い阻害剤として働き、その組織内での蓄積と分解はメチル転移反応を制御する Regulator として考えられている。[1,2]

本学会で[3] anti-HIOMT 抗体を利用した Immunoadsorbent Chromatography で HIOMTを単一な蛋白まで精製できたと報告したが、Immunoadsorbent column からの溶出液を三波長（A250nm, A260nm, A280nm）で記録している時に A260nmに最大吸収をもつ物質が HIOMTと同時に溶出してくることに気づいた。 この物質を分離・精製してUV吸収曲線、TLCで分析した結果 AdoHcy と同定された。[6] 又 他の精製方法（DEAE-Sephadex Chromatography 硫安分画）でも AdoHcy が HIOMTと同時に精製された。 そこで精製HIOMTと AdoHcy との結合性について調べたところ、非平衡条件下でも安定したHIOMT-AdoHcy複合体を形成して存在することがわかった。 このように強固に結合した AdoHcy が HIOMTの活性調節にどのように関与するか検討した。

実験方法

Immunoadsorbent Chromatography： 既報[3]に準じて行った。

Radioactive AdoHcyの調製： Cantoni S[7]の方法で部分精製した AdoHcy hydrolase（比活性、620nmol/mg/min）を用いて酵素的に合成した。〔8-^{14}C〕Ado（34nmole, 59mCi/mmol）, 100nmol Hcy, 0.5mg AdoHcy hydrolaseを125mMリン酸緩衝液 pH7.3, 2mM DTT, 1mMEDTA, 終量200μl中で37℃ 30分インキュベーションする。100℃ 5分熱処理後、低速遠心にて除蛋白を行う。合成〔8-^{14}C〕AdoHcyはTLCで精製と純度の検定を行った。

HIOMT活性測定： 〔methyl-^{14}C〕AdoMet, N-acetylserotoninを基質として pH7.9で 37℃ 10分反応後 toluene/isoamylalcohol (5:1)で生成〔^{14}C〕melatoninを抽出し液体シンチレーションカウンターにて測定した。

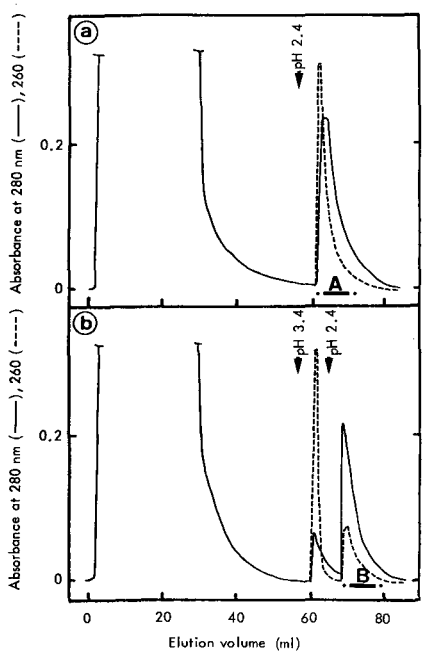
Binding Assay： 〔8-^{14}C〕AdoHcy, 精製HIOMT, 120μg BSAを50mMリン酸緩衝液 pH7.0 終量240μl中で4℃ 15分反応させ、一定量（200μl）を取り出し Sephadex G-25（medium, 0.8×19cm）で結合AdoHcyと遊離AdoHcyとを分離した。void volume 2ml（3.3-5.3ml）を直接 vialに集め ACSII 8mlを加えて液体シンチレーションカウンターにてHIOMT結合〔8-^{14}C〕AdoHcyを測定した。

実験結果と考察

牛松果体10万g上清画分を anti-HIOMT抗体Sepharose columnに吸着させ充分量の0.5MNaCl含有、リン酸緩衝液pH7.3で洗った後 0.5MNaCl含有 0.2M酢酸緩衝液pH2.4で溶出すれば、SDS-PAGEで単一な蛋白としてHIOMTが精製される。[3,4,5] この時酵素に一致してAdoHcyが溶出してくる（図1◎ 破線）が、溶出液のpHを変えることにより酵素（A280nm実線）から分離することが出来た（図1ⓑ）。AdoHcyを含んだ酵素標品（A）は、含まない標品（B）に比べて 基質（AdoMet）濃度の低いところでは、みかけの酵素活性が低く、これは同時に精製されたAdoHcyによる阻害効果のためと考えられた（表1）。

このように内在性AdoHcyがHIOMTと複合体を形成して精製されるが、反応中に生成されたAdoHcyは、HIOMTと結合することが出来るか 精製HIOMT標品（B）に基質として〔carboxyl-^{14}C〕AdoMet

1 Immunoadsorbent chromatography



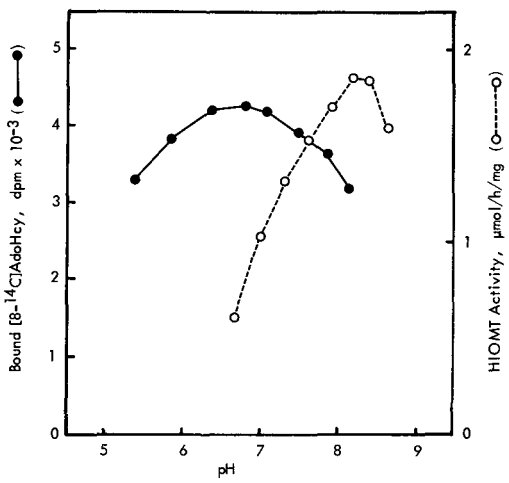
HIOMT activity at various concentrations of AdoMet

AdoMet	Specific activity (nmol/mg·h)		A/B
	Fraction A	Fraction B	(% specific activity)
3.4 x 10^{-4} M	2896	2945	98.3%
3.4 x 10^{-5}	1642	1860	88.3
3.4 x 10^{-6}	671	835	80.4
1.7 x 10^{-6}	440	605	72.7

と〔methyl-^{3}H〕AdoMetを加えてみた。脱メチル化されたAdoMet即ちAdoHcyは〔^{3}H〕放射能のない〔^{14}C〕放射能として表わされる。反応後Disc-PAGEショ糖密度勾配遠心法で分析した結果基質のN-acetylserotoninが存在しないと、AdoHcyは生成されず複合体は観察されなかったが、N-acetylserotoninの存在下ではメチル転移反応が起こり生成AdoHcyとHIOMTとの複合体の形成がみられた。

AdoHcyの結合の至適pHは6.5-7.0（図2）で温度、反応時間に殆んど依存しなかった。一方、HIOMTはpH8.2で最大の活性を示しAdoHcyの結合至適pHから偏位していることは意味のあることかもしれない。

2 The effect of pH on binding of [8-^{14}C]AdoHcy to HIOMT and the HIOMT activity



酵素活性測定反応液にAdoHcyを添加して阻害効果をみると、固定したAdoMet濃度（3.4×10^{-5}M）で50%阻害は6.7×10^{-6}M（酵素標品A）、5.7×10^{-6}M（酵素標品B）であった。AdoHcyの阻害は拮抗的であるが、そのKi値は7.7×10^{-7}M、Km値は、5.7×10^{-6}Mであった。多くのメチル転移酵素は、基質のAdoMetよりも阻害剤AdoHcyに対する親和性が高いことが知られているが、HIOMTとAdoHcyの結合を抑制するには高濃度のAdoMetが必要であることからも裏づけられた。このようにAdoHcyは、HIOMTに対して強い親和性を示すので HIOMTとAdoHcyは安定した複合体で存在しえるか透析法で調べた。外液にAdoHcyを含まない50mMリン酸緩衝液pH7.0で透析したところ、30時間後でも約60%の複合体が解離せずに存在しHIOMTとAdoHcyの結合は、強く安定したものであることがわかった。

出口ら[2]はAdoMet標品にAdoHcyが混在したり、反応中に生成されたAdoHcyによってみかけの酵素活性が阻害されるがAdoHcy hydrolaseを反応液に加えることによって、AdoHcyをAdoとHcyに分解しその阻害効果を失わせると発表した。これは反応液中の遊離AdoHcyが分解されてAdoHcy濃度が減少したため酵素からAdoHcyが解離して阻害効果がなくなるのか、強固に結合したAdoHcyに直接AdoHcy hydrolaseが働き分解し遊離することによるのか調べてみた。Binding Assayの方法に従ってHIOMTに結合した〔8-^{14}C〕AdoHcyをSephadex G-25で分解し、Amicon社製Centriflow CF25で濃縮してHIOMT

3 Hydrolysis of Bound [8-^{14}C]AdoHcy

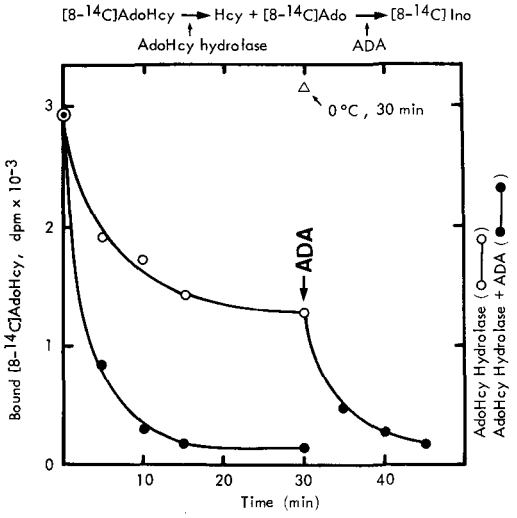
Potassium phosphate, pH 7.0	2.5 μmol
BSA	100 μg
EDTA	110 nmol
DTT	220 nmol
HIOMT-[8-^{14}C]AdoHcy	2000 - 3000 cpm
AdoHcy hydrolase	88 μg
H_2O	
(or adenosine deaminase, inhibitor)	

37°C, 30 min 110 μl
↓
100 μl
↓
Sephadex G25 (Medium) 9 ml
with 50 mM phosphate buffer, pH 7.0
↓
Collect void vol. (3.3 - 5.3 ml)
↓
ACSII (10 ml)
↓
Count

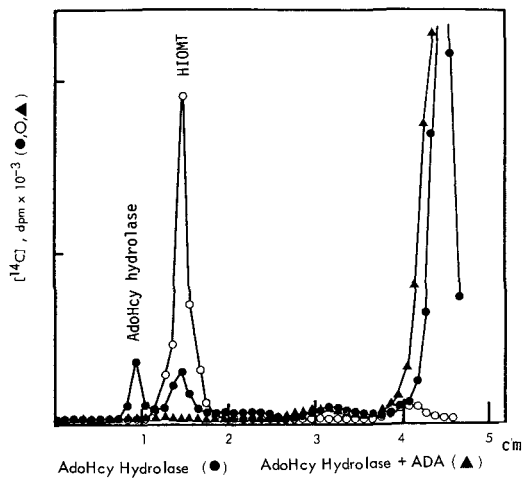
結合AdoHcyとした。図3に示す条件で反応し結合型[8-^{14}C]AdoHcyの残存量からAdoHcy hydrolaseの分解量とした(図4)。AdoHcy hydrolase単独では約60%が分解をうけるがAdo deaminaseを添加すれば生成されたAdoをInoに更に代謝されるので殆んどの結合[8-^{14}C]AdoHcyは分解された。蛋白分解酵素阻害剤AdoHcy hydrolase, Ado deaminaseの阻害剤を加えた実験からこの分解は非特異的反応でなく酵素の触媒作用によるものと思われた。SephadexG25のvoid volume(蛋白画分)を結合型[8-^{14}C]AdoHcyとしたがAdoHcy hydrolaseはAdo結合蛋白としても知られているので真のHIOMT結合[8-^{14}C]AdoHcy量をDisc-PAGEで調べた(図5)。

AdoHcy hydrolase存在下での酵素活性は精製HIOMT, 松果体10万g上清画分共に約1.2倍増加し更にAdo deaminaseを加えることによって1.5倍に増加した。酸性条件(図1)にするか熱処理すればHIOMTに結合したAdoHcyは解離するが、生理的な条件下では新しく生成されたAdoHcyも初めから混在するAdoHcyもHIOMTと強固に結合して存在して酵素活性を阻害していると思われる。この結合型AdoHcyはAdoHcy hydrolaseによって直接分解をうけ酵素に対する阻害効果を失いHIOMT活性が上昇しmelatoninの生合成が盛んになると考えられる。

4 Hydrolysis of bound [8-^{14}C]AdoHcy



5 Disc-PAGE



文献

1. Cantoni, G., Richards, H.H. & Chiang, P.K. (1979) Transmethylation. Usdin, et al. (ed) Elsevier, p 155. 2. Deguchi, T. & Barchas, J. (1971) J. Biol. Chem. 246, 3175. 3. 桑野, 高橋 (1977) 神経化学 16, 117. 4. Kuwano, R. & Takahashi, Y. (1978) J. Neurochem. 31, 809. 5. Kuwano, R., Yoshida, Y. & Takahashi, Y. (1978) J. Neurochem. 31, 815. 6. Kuwano, R. & Takahashi, Y. (1980) Life Sci. 27, 1321. 7. Richards, H.H., Chiang, P.K. & Cantoni, G. (1978) J. Biol. Chem. 253, 4476.

97 新しいタイプのミトコンドリアMAOの存在とその酵素化学的性質

杵鞭宏育・須藤みゆき・森川文雄
吉野守彦・上條一也
(昭和大・医・薬理)

〔要　約〕

従来の両タイプMAO(MAO-A, MAO-B)のいずれにも属さない新しいタイプのMAOが、魚類コイの脳、肝臓中に存在することを確認し、その基本的な性質について若干の検討を加えた。肝臓中の本酵素は主としてミトコンドリア中に存在し、比較的熱に対し不安定であるが、BSA添加によりこの失活は防止出来た。このBSAはKm値には無影響でまたclorgyline, deprenyl等のMAO阻害剤の本酵素に対する親和性にも影響しない。clorgyline, deprenylによる阻害作用を基質tyramine, 5-HT, PEAを用いて検討した結果、前2基質ではいずれも阻害剤曲線はシングルシグモイド型で、また基質による阻害作用の差違は認められなかった。基質PEAではこれら阻害剤により活性は完全には阻害されず、semicarbazideの共存により完全に阻害された。本MAO活性は上記阻害剤とpre-incubationを行うとcompetitiveからnon-competitiveな阻害作用へと変化した。このことは本酵素がFADを補酵素とすることを示唆している。

Key words : carp brain and liver
a new type of mitochondrial MAO
MAO-A and MAO-B

脳脳内ミトコンドリア Monoamine oxidase (MAO)(EC 1.4.3.4) はMAO阻害剤に対する感受性の相違からタイプA MAOとタイプB MAO (MAO-A, MAO-B)とに分類されている[5)6)]。しかし、両タイプMAOは本質的に異なった酵素蛋白であるのか、または単に同一酵素蛋白にミトコンドリア外膜成分、特に燐脂質の結合状態の相違または存在部位の相違等々から、見掛上異なった酵素蛋白として振舞う、すなわちallotopicな性質を示すのかは現在でも多くの論議の的となっている[4)~6)]。

今回、われわれはコイ(Cyprinus carpio)の脳、肝臓中にこれら両タイプMAOのいずれにも属さず、恐らくFADを補酵素とする新しいタイプのMAOが存在することを確認すると共にその基本的な酵素化学的性質を検討したのでその成績を報告する。尚、本研究の一部は8th International Congress of Pharmacology, July, 1981, Tokyoで発表した。

〔実験材料および実験方法〕

実験には体重900~1,200gのコイを使用した。

1) 酵素標品の作成

コイを致死させた後、素早く全脳を摘出し、0.25M sucrose + 0.01M phosphateを1:9の割合に加え10%ホモジネートを作成し、これを実験に使用した。肝臓の場合には脳と同様のsucrose溶液を1:5の割合に加え、16.6%のホモジネートを作成し、最初600×g, 10分間続いて8,500×g, 30分間冷却下で遠心分離を行ない得られたミトコンドリア分画を再度、懸濁、遠心分離をくり返し、得られた沈渣を酵素材料として実験に使用した。

2) MAO活性の測定

MAO活性の測定にはすでに報告した^{14}C-monoamine類を基質として使用しMAOによる

代謝産物を有機溶媒で抽出し、その radioactivity を計測する radiometric assay 法[4]で行なった。なお、specific activity の測定に際しては有機溶媒による抽出効率（extraction coefficiency）で補正を行なった[2]。

MAO阻害剤を使用した実験では38°Cで本文中に記載した時間だけ preincubation を行ない、その残存MAO活性を上記の方法で測定した。

〔実験成績〕

コイ肝臓MAOの細胞内分布を基質として、tyramine、5-HT および β-phenylethylamine (PEA)を使用して検討した。その結果、基質 tyramine を用いた場合、ミトコンドリア分画で最も高いMAOの specific activity（ホモジネートの約5倍）が認められ、さらに total activity もミトコンドリア分画ではいずれの基質の場合も最も高い活性が回収された（約54～75％）。この場合、用いた基質による回収率には著明な差違は認められなかった。

また、本酵素は熱に対して比較的不安定で例えば38°C、30分間の preincubation によりいずれの基質の場合も約30～45％のMAO活性の失活がみられたが、これにBSAを添加すると、preincubation によっても活性の低下はみられず、MAO活性の失活は防止することが出来た（Table 1）。

Table 1. Effect of BSA on decrease in MAO activity in carp liver.

BSA	Preincubation	MAO activity (%)		
		Tyramine	5-HT	PEA
(-)	(-)	100	100	100
	(+)	64.4	72.1	53.7
(+)	(-)	100	100	100
	(+)	109.6	115.2	93.6

MAOactivity was estimated without(-) or with preincubation(+) at 38°C for 30 min in the absence(-) or presence(+) of BSA(10mg/ml). Substrate concentration used: 0.15mM(tyramin), 0.05mM(5-HT and PEA)

Table 2.Substrate specificities of Carp brain and liver MAO

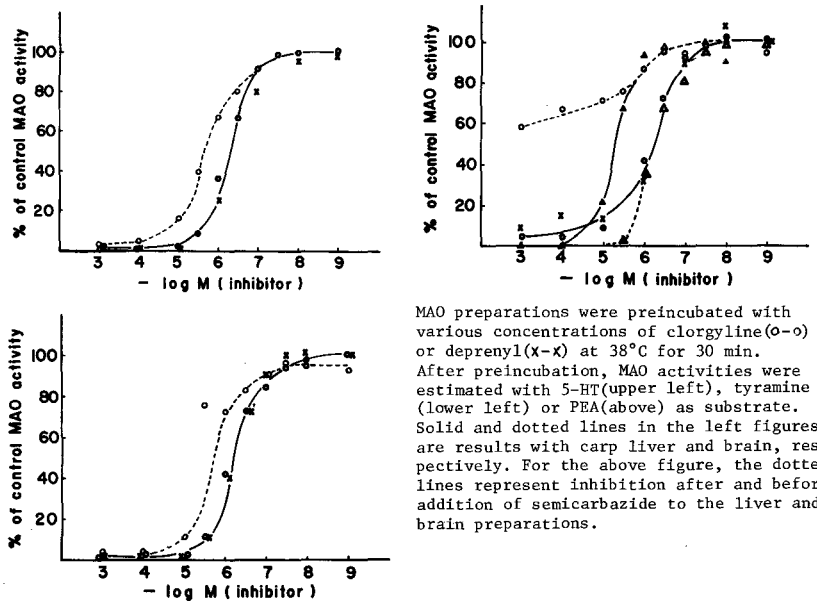
Substrate	Carp liver mitochondria		Carp brain homogenate
	Specific MAO activity		
sub.conc.(mM)	0.1	1.0	0.1
Tyramine	1.01 (100)	3.18 (100)	0.05 (100)
5-HT	0.48 (47.5)	3.12 (98.1)	0.18 (360)
PEA	0.17 (16.8)	1.61 (50.6)	0.07 (140)
Benzylamine	0.01 (0.9)	0.07 (2.2)	0.01 (20)
Dopamine	0.33 (32.7)	1.24 (39.0)	0.01 (20)

( ) are shown in parentheses as percentages of that with tyramine as substrate at a concentration of either 0.1 or 1.0 mM.

Table 2 には脳、肝臓両MAOの基質特異性を検討した成績を示してある（Table 2）。この結果、肝臓の場合基質濃度 1mM では 0.1 mM の場合に比し活性が低くこれは基質阻害によるものと思われる。一方、脳では 5-HT で最も高い活性が認められ、以下 PEA、tyramine の順であったが、肝臓では tyramine で最も高い活性、続いて 5-HT、PEA または dopamine の順で高い活性が認められた。

MAO-A の特異的阻害剤 clorgyline、MAO-B の特異的阻害剤 deprenyl による脳、肝臓 MAO の阻害作用を 38°C、30分間の preincubation を行ない検討した（Fig. 1）。その結果脳では基質 tyramine、5-HT を用いた場合、いずれの阻害剤によっても阻害曲線はいずれもシングルシグモイド型であり、かつその阻害率にはいずれの阻害剤の場合も基質による相違は認められなかった。一方、基質 PEA の場合は低濃度の阻害剤による阻害作用では前2基質の阻害曲線とほぼ同様であったが、この基質の場合にはいずれの阻害剤の場合も高濃度（10^{-3}M）にもかかわらず約50％の残存MAO活性が認められた。しかし、この残存活性は semicarbazide（10^{-3}M）添加により完全に阻害され、またこの semicarbazide 存在下での clorgyline、deprenyl による阻害曲線は基質 tyramine、5-HT の場合の結果とほぼ一致した（Fig. 1）。肝臓の場合にも脳の場合とほぼ同様の結果が得

Fig. 1. Inhibition of MAO activity by clorgyline and deprenyl in Carp brain and liver.



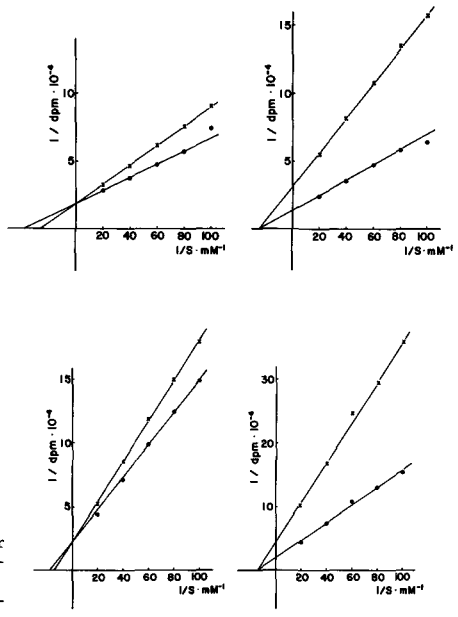
MAO preparations were preincubated with various concentrations of clorgyline(o-o) or deprenyl(x-x) at 38°C for 30 min. After preincubation, MAO activities were estimated with 5-HT(upper left), tyramine (lower left) or PEA(above) as substrate. Solid and dotted lines in the left figures are results with carp liver and brain, respectively. For the above figure, the dotted lines represent inhibition after and before addition of semicarbazide to the liver and brain preparations.

られた。すなわち、いずれの阻害剤の場合も、基質5-HTとtyramineでは阻害曲線はほぼ同一であり、両阻害剤($10^{-3}M$)により完全阻害が認められた。しかし、肝臓の場合、基質PEAを用いた際は脳の場合と同様で、両阻害剤に抵抗性を示し、semicarbazideで阻害される酵素活性が認められたが、この活性は割合の約5%程度であった。このいずれの基質を用いても阻害剤による阻害曲線が同一となる傾向はpreincubationを行なわない場合も、また60分間のpreincubationを行なった場合にも認められた。

肝臓ミトコンドリアMAO活性に対するclorgyline, deprenylによる阻害作用を38°C、30分間preincubationした場合、およびpreincubationを行なわない場合の両者について検討した(Fig. 2.)。その結果、基質5-HT、PEAいずれの場合もpreincubationを行なわない場合には基質に対してcompetitiveな阻害作用を示したが、preincubation後では、non-competitiveな阻害作用を示した。

基質tyramine、および肝臓ミトコンドリアを用いた場合の酸素濃度変化に伴うMAO活性変化をLineweaver-Burk plot法で測定した。その結果、酸素濃度の上昇に伴いMAO活性も上昇し、その際の直線群はいずれも平行となった。また、この際の酸素に対するKm値は66μM、tyramineに対するKm値は333μMであった。

Fig.2. Mode of inhibition of MAO activity in mitochondria of carp liver by clorgyline



Ordinate; 1/initial activity, abscissa; 1/mM 5-HT(upper) or 1/mM PEA(lower). For the right panel in the figures, mitochondria were preincubated with(x-x) or without(o-o) 10^{-6}M clorgyline. For the left panel, mitochondria were not preincubated.

肝臓MAO活性に対する各種化合物の阻害作用を検討した結果、本酵素活性は phenipazine, harmine, iproniazid などのMAO阻害剤により完全に阻害された。しかし 10^{-3}M isoniazide, semicarbazide, cupirison 等では5～20％の阻害作用しかみられなかった。

〔考　察〕

各種臓器内MAOは主としてミトコンドリア分画中に存在することが知られている[1,2]。本実験のコイ肝臓MAOのspecific および total activity はいずれもミトコンドリア分画に最も高い活性が認められたことから、主としてミトコンドリア中に存在するものと思われる。また、本MAOは比較的熱に不安定であるが反応液中にBSAを添加すると防止された。また添加したBSAはMAOに対するKm値に何ら影響を及ぼさずVmax値にのみ影響を与えた。一方、脳および肝臓MAOの基質特異性には若干の相違が認められたが、これは clorgyline, deprenyl 等で阻害されず、benzylamine, PEA などを酸化分解する "benzylamine oxidase" または "clorgyline-resistant amine oxidase" が存在し[7,8]、脳の場合にはこの活性の割合が高いための結果と考えられる。clorgyline, deprenyl による阻害作用を基質として5-HT, tyramine, PEA を用い検討した結果、前2基質ではいずれの阻害曲線もシングルシグモイド型を示し、また曲線は皆同一となった。このことは脳、肝臓いずれの場合もMAOは1種類で、それは従来のMAO-A, MAO-Bのいずれにも属さない新しいタイプのMAOと思われる。一方、基質PEAの場合には完全阻害はみられず残存活性が認められた(Fig. 1)。しかし、この残存活性は semicarbazide により完全に阻害されその阻害曲線は前2基質の場合とほぼ一致した。これらの成績はコイ脳、肝臓中には新しいタイプのミトコンドリアMAOとカルボニル試薬により阻害される amine oxidase が存在することを示唆している。clorgyline, deprenyl などの "suicide inhibitor" は初めは competitive かつ reversible に、続いて一定の preincubation 後にはMAOのFADと1:1の割合で結合し[9,10]、non-competitive で irreversible にMAOを阻害する[3,5,6,11]。本実験でもMAOは clorgyline と preincubation を行なわない場合には competitive な阻害作用を、38°C、30分間の preincubation 後には non-competitive な阻害作用へと変化した(Fig. 2)。これらの成績は間接的に本酵素がFADを補酵素とする酵素であることを示唆している。酸素濃度の変化に伴う本酵素活性の変化を検討した結果、得られたプロットは全て平行となったことから本MAO反応は "ping-pong" 機構で進行しているものと思われる。

以上の結果、本酵素は多くの臓器内に存在する両タイプMAOと類似の反応機構を持つ新しいタイプのMAOであることが明らかとなった。このMAOは既知の両タイプMAOのモデルとして有用な酵素材料と思われる。

〔謝辞〕本研究の一部は文部省科学研究費の援助によるものである。ここに深く感謝致します。また実験に協力された角南有美、増田睦美、内田則子、前田敏雄の諸氏に深謝いたします。

〔Refferences〕
1) Fowler,C.J., Ekstedt, B., Egashira,T., Kinemuchi, H. and Oreland,L. (1979) Biochem. Pharmacol. 28 3063-3068
2) Fowler,C.J. and Oreland,L.(1980) *ibid.* 29 2225-2233
3) Fowler,C.J., Oreland,L., Marcusson,J. andWinblad, B. (1980) Naunyn-Schmiedebergs' Arch. Pharmacol.311 263-272
4) Houslay,M.D., Tipton,K.F. and Youdim,M.B.H.(1976) Life Sci. 19 467-478
5) Kinemuchi,H. and Kamijo,K.(1980) Protein, Nucleic Acid and Enzyme 25 1069-1086
6) Kinemuchi,H. and Kamijo,K.(1981) *ibid.* 26 1425-1437
7) Kinemuchi,H., Morikawa,F., Tajima,H. and Kamijo,K. (1981) Monoamine oxidase:basic and clinical frontiers (Eds.Kamijo,K., Usdin,E. and Nagatsu,T.) in press. Excerpta Medica, Amsterdam
8) Lyles,G.A. and Callingham,B.A.(1975) J.Pharm.Pharacol. 27 682-691
9) Oreland,L., Kinemuchi,H. and Yoo,B.Y.(1973) Life Sci. 14 1533-1541
10) Oreland,L., Kinemuchi,H, and Stigbrand (1973) Arch. Biochem. Biophys. 159 854-860
11) Rando, R.R.(1974) Science 186 320-324

98 ビオプテリン補酵素量の短時間調節機構
— チロシン負荷あるいは nomifensine, γ-butyrolactone 投与によるビオプテリン量の変化

山口時男・永津俊治(東工大・生命化学)
小島秀樹(久留米大・医・脳研)・飯塚礼二(順天堂大・医・精神)
近藤智善・楢林博太郎(同・神経)

〔要　約〕

Parkinson病患者及びParkinson症候群患者に対するL-チロシン(L-tyrosine, Tyr)負荷時における血中総ビオプテリン(biopterin, BP)量の変動，及びnomifensine, γ-butyrolacton (GBL)投与によるラットあるいはマウス脳内における総BP量への影響を調べた。Parkinson病患者ではTyr負荷による総BP量の変動はめずかであったが，ドーパミン(dopamine, DA)欠亡がないと推定されるParkinson症候群患者2例では投与後2時間で投与前の6~7倍の値を示した。マウスに対するTyr投与により総BP量が約3倍に増加した。Parkinson病患者では全身性のBP生合成能低下があると考えられ，またTyrにより BP生合成が誘導されることが示された。nomifensine投与により線条体でBP量及びDA量の減少が，視床下部ではBP量及びノルエピネフリン(norepinephrine, NE)量の減少が見られ，DA量，NE量の減少は各部位におけるBP量の減少を反映していると考えられる。また，GBL投与により　マウス線条体で著しいBP量の増加が見られた。これらの結果より，カテコールアミン生合成系はチロシン水酸化酵素(Tyrosine hydroxylase, TH)活性を調節する補酵素BP量により調節され，BP生合成の調節はpresynaptic autoreceptorを介して行なわれている可能性が示唆された。

Key words：　Biopterin　Tyrosine　Nomifensine

我々は先にParkinson病患者脳の尾状核において，TH活性低下と平行して総BP量が減少していることを報告した(1)。還元型BPはTHの補酵素でありチロシンからドーパへの反応に必須であることからParkinson病患者のDA量欠亡がTH活性の低下とともにBP量の低下による可能性を示唆した。また，神経細胞内のBP濃度が極めて低いことからカテコールアミン生合成の調節因子のひとつと考えられる。BPはGTPから生合成されるが最近，Viverosら(2)は，レセルピンなどにより ラット副腎でBP生合成系酵素が誘導されることを示し，BPがカテコールアミン生合成系の調節因子である可能性を強めた。我々はBPのカテコールアミン生合成調節への関与あるいはその調節機序について研究を進めているが，今回，BPによるTHの短時間調節の可能性を検討する目的でTyr負荷実験及び種々の薬物投与実験を行なったのでその結果を報告する。

〈実験材料及び方法〉

Tyr負荷：　ヒトに対するTyr負荷はParkinson病患者及びParkinson症候群患者について行なった。午前8時30分にTyr 7gを経口投与し，その後1時間毎に採血した。マウスはDDY系雄性マウス(体重30g)を用い　0.2% CMC液に懸濁したTyrを1g/kg体重腹腔内に注射し1時間後に断頭した。　Nomifensine投与：　動物はSprague-Dawly系雄性ラット270gを用い，生理的食塩水に溶かしたnomifensineを腹腔内に　40mg/kg体重を投与した。投与後2時間で断頭し脳各部位を摘出した。　GBL投与：　DDY系雄性マウス(体重30g)を用い　GBL 400mg/kg体重を腹腔内投与後30分で断頭，線条体を摘出した。

試料の調製：　ヒト血液については Nagatsuら(3)の方法によった。また，ラット及びマウスの脳試料の調製は 10倍量 0.05 M Tris-acetate buffer, pH 7.4 でホモジェナイズした後

BP量及び各種酵素活性，カテコールアミン量の測定のための試料とした。BPはラジオイムノアッセイ法により Nagatsuら(3)の方法で測定した。また，TH(4)，トリプトファン水酸化酵素（Tryptophan Hydroxylase, TrpH）(5) 及びカテコールアミン類はそれぞれ HPLC 法により測定した。

〈結果〉

1. Tyr負荷： Figure 1. に示したように投与前の血中総BP量に個体差があるが，患者A（32才，Parkinson症候群）及びB（46才，Parkinson症候群）がTyr負荷により顕著なBP量の上昇が見られた。患者C（76才，Parkinson病），D(68才，Parkinson病）は，ほとんど上昇が見られなかった。また，患者E（44才）は，脳性マヒにParkinson症候群を併発したものだが，BP量の増加は見られなかった。Tyr投与後の血中Tyr量も同時に測定したが特に吸収の悪い患者は見られず投与後の血中Tyr量及びBP量のピークは投与後2～3時間でほぼ一致した。

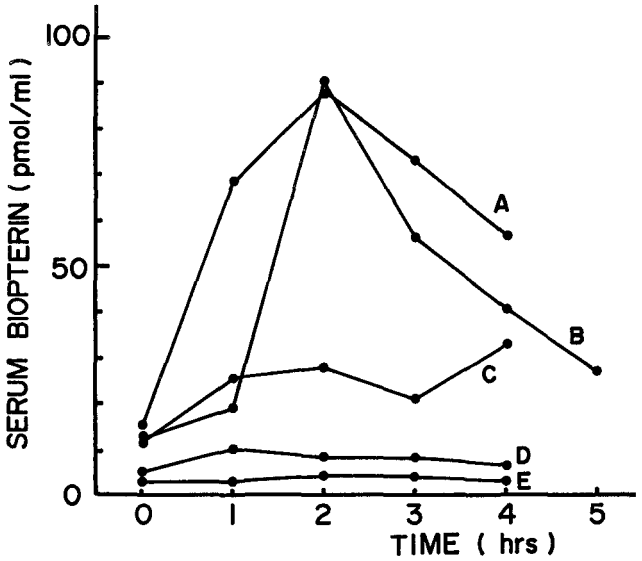


Figure 1. Serum biopterin levels in Parkinsonian patients after a tyrosine administration

マウスに対する投与実験では Figure 2. に示すように尾状核において投与後1時間における総BP量は対照が 1.07 ± 0.24 pmol/mg tissue（Mean ± S.D.）であるのに対し Tyr負荷マウスは 3.17 ± 0.35 pmol/mg tissue と約3倍の値を示した。しかし中脳においては，対照及びTyr負荷マウスはそれぞれ 0.85 ± 0.15，0.70 ± 0.17 pmol/mg tissue の値を示し有意な差は認められなかった。

2. Nomifensine投与実験： 結果はTable1. に示した。総BP量は中脳を除いて尾状核，橋，視床下部で減少し，特に，尾状核及び視床下部においてその差が著しい。TH活性は橋でわずかな減少を見たが他の部位ではほとんど変化が見られなかった。TrpH活性は中脳で増加し，橋及び視床下部で減少した。NE量は橋及び視床下部で減少し，またDA量は橋，尾状核で減少を示したが他の部位では変化が見られなかった。

3. GBL投与実験： GBL投与後30分で対照群は 0.38 ± 0.04 pmol/mg tissue

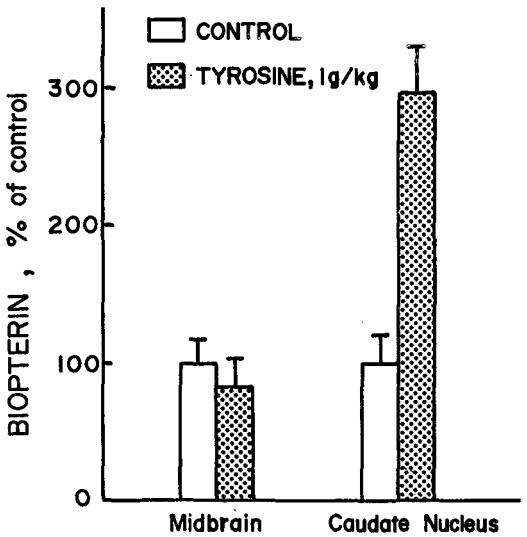


Figure 2. Biopterin levels in mouse brain after a tyrosine administration

Table 1. Effects of nomifensin on biopterin levels, tyrosine hydroxylase activity, tryptophan hydroxylase activity and catecholamine levels in the several regions of rat brain.

	Dose mg/kg	Biopterin pmol/mg tissue	Tyr OHase pmol/min/mg tissue	Trp OHase pmol/min/mg tissue	NE nmol/g tissue	DA nmol/g tissue
Midbrain	0	1.06±0.19	0.83±0.07	1.77±0.20	3.22±0.32	1.48±0.29
	40	0.95±0.37	0.81±0.08	2.37±0.28**	2.96±0.58	1.12±0.20
Caudate N.	0	1.13±0.10	5.44±0.19	0.64±0.06	0.89±0.14	58.6±4.0
	40	0.49±0.18***	5.69±0.41	0.63±0.05	0.91±0.26	46.9±2.0**
Pons medulla	0	0.44±0.06	0.35±0.04	2.31±0.44	2.89±0.25	0.32±0.06
	40	0.34±0.02**	0.25±0.07**	1.80±0.09*	1.97±0.13***	0.24±0.04*
Hypothalamus	0	1.45±0.09	0.81±0.13	2.97±0.25	10.14±0.97	0.58±0.07
	40	0.88±0.16***	0.74±0.11	2.07±0.05***	5.65±0.28***	0.55±0.02

Values are expressed as mean±S.D.

* $p<0.1$ ** $p<0.05$ *** $p<0.001$

(Mean ± S.D.), GBL 投与群は 1.09 ± 0.12 pmol/mg tissue の総 BP 量の値を示した。対照群の値を 100% として 結果を Figure 3. に示した。

〈考察〉

フェニルアラニン負荷で血中 BP 量が増加することを Kaufman ら (6) が示したが，本研究の Tyr 負荷実験により Parkinson 病患者及び Parkinson 症候群患者において血中総 BP 量の変動に著しい差のあることが明らかとなった。我々は先に Parkinson 病患者脳の線条体において総 BP 量が減少していることを報告したが (1)，これは DA ニューロンの変性消失により BP 生合成能が低下するためと考えられる。血中の BP の由来は明らかではないが，全身性に広がる交感神経終末からと考えられ，Parkinson 病患者では脳内のみでなく，全身性にカテコールアミンニューロンにおける BP 生合成の能力が低下しており，ドーパミン欠乏をもたらしていると考えられる。今回，Tyr 負荷した Parkinson 症候群患者が著しい BP 量の増加を示したこと，これらの患者にドーパミン欠乏がないと推定されること，また Parkinson 病患者の多くに自律神経機能の低下が見られることなどから Parkinson 病患者では全身性にカテコールアミンニューロンでの BP 生合成能が低下していると考えられる。また，マウスの Tyr 負荷実験で 大過剰の Tyr により線条体で BP 生合成が誘導されることが明らかとなった。DA ニューロンにおいて基質 Tyr が BP 生合成系を活性化し，生成した補酵素の量により DA 生合成系が調節されている可能性が示唆された。

Nomifensine は抗うつ剤として数多くの臨床報告がなされており NE 及び DA の神経終末への再とりこみを強く阻害することが知られている (7,8)。

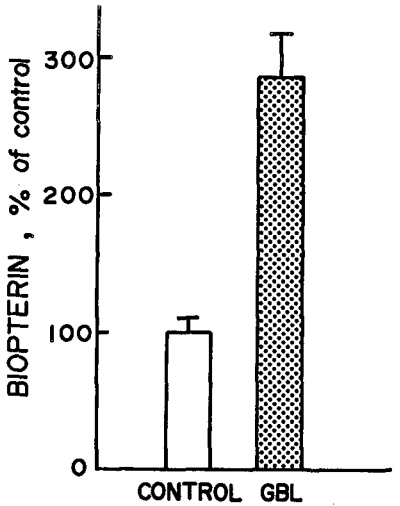


Figure 3. Biopterin levels in mouse caudate nucleus after GBL treatment

本研究で，線条体では DA量 及び BP量の減少，また 視床下部では NE量及び BP量の減少が nomifensine 投与で示されたが TH活性にはとんど 変化が見られないことから 線条体 及び 視床下部における DA量，NE量の減少は，各部位における BP量の減少に由来すると考えられる。nomifensine の作用機序から ニューロン内の総BP量の減少は Presynaptic autoreceptor を介して GTPからの還元型 BP 生合成系が抑制を受けている可能性が考えられる。

GBLは 黒質－線条体系ニューロンの発火を阻害する薬物として知られているが，本研究で GBL投与により マウス線条体で 総BP量が著しく増加することが認められた。GBL投与により 線条体における ドーパの生合成量が著しく増加することを Walters ら（9）は報告しているが，この増加は BP量の増加と一致する。この BP量増加は nomifensine 投与実験の結果と合わせて考察すると，GBL投与により，神経終末での DAの放出がなくなることから presynaptic autoreceptor を介した BP生合成の抑制がはずれることによる機序と考えられる。また，GBL 処理による BP量増加が 投与後 30分で 見られることから Viveros ら（2）が考察したように BP 生合成酵素の誘導と考えるよりも，Tyr あるいは nomifensine，GBL 投与により BP 生合成系が活性化されたか，あるいは 何らかの抑制因子が除去されたと考える方が妥当と思われる。

本研究で カテコールアミン生合成系の調節機構のひとつとして TH あるいは TrpH の補酵素の BP量の短時間調節が 重要な位置を占めている可能性が示唆された。現在，Tyr 負荷実験については 正常対照者 及び 多数の症例について，また，薬物投与実験では Haloperidol，Apomorphine などの DA agonist 及び antagonist による脳内 BP量の変動を検討中である。

＜謝辞＞

TH 及び TrpH 活性の測定，またカテコールアミン量の測定に協力していただいた越谷和雄氏，平田洋子氏，沢田誠氏（東工大・総理工・生命化学）に感謝します。

＜参考文献＞

1. Nagatsu, T. et al. (1981) Clinica Chimica Acta 109, 305
2. Viveros, O.H. et al. (1981) Science 213, 349
3. Nagatsu, T. et al. (1980) Analytical Biochemistry 110, 182
4. Nagatsu, T. (1973) Biochemistry of Catecholamines, 158
5. Yamaguchi, T. et al. (1981) Biochemistry International 2, 295
6. Kaufman, S. et al. (1978) The New England Journal of Medicine 299, 673
7. Schacht, U. et al. (1974) Biochemical Pharmacology 23, 3413
8. Hunt, P. et al. (1974) J. Pharm. Pharmacol. 26, 370
9. Walters, J.R. et al. (1976) Biochemical Pharmacology 25, 649

99 マウス脳内ヒスタミンの存在様式とその代謝回転

前山一隆・渡辺建彦・大和谷 厚
田口吉孝・和田 博
(阪大・医・II薬理)

〔要 約〕

ヒスタミンはmast cell とnon-mast cell の2つのプールに存在し脳においては代謝回転速度の早いnon-mast cell ヒスタミンが神経伝達物質として働いていることが示唆されてきた。ここではmast cellを欠損しているW/W^{v}突然変異マウスを用いて以下のことを明らかにした。W/W^{v}マウスの脳において ヒスタミンは正常型+/+マウスの70%存在し、しかもヒスチジン脱炭酸酵素(HDC)には両者に差が認められないことから、non-mast cell ヒスタミンとして存在することが明らかになった。またKollonitsch等により合成されたHDCのsuicide inhibitorである α-フルオロメチルヒスチジン(α-FMH) をddY系マウスに投与するとHDCは10分以内に10%以下に抑えられたが ヒスタミン含量は50%以下の低下がみられず α-FMH によって減少するプールと残存するプールの2つの代謝回転速度の異なるヒスタミンプールが存在することが明らかになった。

α-FMH をW/W^{v}マウスに投与すると6時間後 ヒスタミンは完全に消失した。以上より α-FMH により減少するヒスタミンはnon-mast cellに由来し α-FMH により減少しないヒスタミンはmast cellに由来すると考えられる。non-mast cellのヒスタミン、すなわち神経伝達物質として作用するヒスタミンの半減期は56分と算定された。

Key words :

Histamine, α-fluoromethylhistidine, W/W^{v}mice

脳においてヒスタミンが神経伝達物質として作用していることがいわれており、脳内ヒスタミンの生合成, 代謝に関して多くの研究が行なわれてきた。ヒスタミンの合成酵素であるヒスチジン脱炭酸酵素(HDC)とヒスタミンの脳内分布からヒスタミン神経線維の存在が示唆されているが、組織螢光法, 組織螢光抗体法によるヒスタミン線維の直接の証明がなされていない現在、まだヒスタミンの神経伝達物質としての作用は確実さを欠いている。脳内ヒスタミンを研究する上で 1)脳内ヒスタミン含量が他のアミンに比べて少ないこと. 2)脳内ヒスタミンの動態をみる場合mast cell,non-mast cell の2つのヒスタミン貯蔵プールを考慮する必要がある. といった困難があった。我々は高速液体クロマトグラフィーを用いる微量ヒスタミンの定量法を開発し、又新しく合成されたHDC阻害剤 α-フルオロメチルヒスチジン(α-FMH)と,mast cellを欠損する突然変異マウス W/W^v マウス を用いて脳内ヒスタミンの存在様式とその代謝回転を調べた。

〈実験方法〉

1) 動物：ddY系マウス(20-25 g) ,WBB6F(WB/ReJ-W/+ xC57BL/6J-W^v/+)-(W/W^v +/+) (20-25g, Jackson Lab. より購入) に α-フルオロメチルヒスチジン(α-FMH)を腹腔内投与して脳のヒスタミン含量とHDC活性に及ぼす影響を検討した。

2) ヒスタミンの測定

マウス脳を5倍量の冷3%過塩素酸でホモゲナイズし、10,000 x g, 20分間遠心した後その上清を0.2Mリン酸ナトリウム緩衝液 pH 6.5で平衡化したAG 50 (内径4 mm x 長さ5 cm)にかけ 5 ml のH_2O, 10 ml の2M HClで洗浄した後 6 ml の 3M HClでヒスタミン

を溶出し減圧乾固した後 0.05M HCl に溶解し その一部を高速液体クロマトグラフィーにかけた。高速液体クロマトグラフィーの流路図を図1に示した。固定相には東洋曹達工業の IEX-510 sp (粒子径 5μm, 内径 6 mm x 長さ 150 mm), 移動相には 0.5M NaCl, 5mM EDTA Na_2, および 20 % メタノールを含む pH 4.0 0.2M プロピオン酸ナトリウム緩衝液を用い分離したヒスタミンを Shore (1)の o-フタルアルデハイド縮合法(OPT 法)を自動化して螢光体に変換し励起波長 360 nm, 螢光波長 450 nm で自動測定した。分析感度は S/N 比で 5 p moles であった。図2にマウス脳の測定チャートを示した。(2)

3) ヒスチジン脱炭酸酵素の測定

マウス脳を 0.01 mM ピリドキサールリン酸, 0.2mM ジチオスライトール, 1% ポリエチレングリコールを含む 0.1M リン酸カリウム緩衝液 pH 6.8 1.5 ml でホモゲナイズし 10,000 x g 20分間遠心した後 上清を一昼夜 100 倍量の緩衝液で透析する。酵素液に 0.25 mM L-ヒスチジンを基質として加え 37 °C でインキュベートした後生成されたヒスタミンを CG 50 で分離し Shore の OPT 法で測定した。(3) 蛋白定量は Lowry 法を用いた。(4)

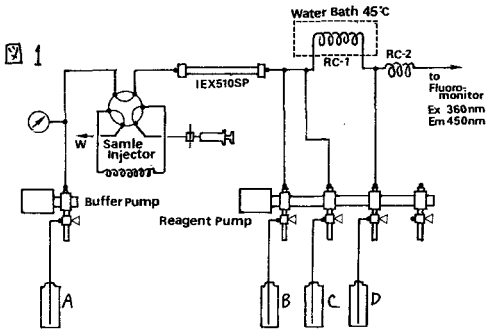


図1

A 溶出用緩衝液
B OPT 試薬
C 1M NaOH
D 4% H_2SO_4

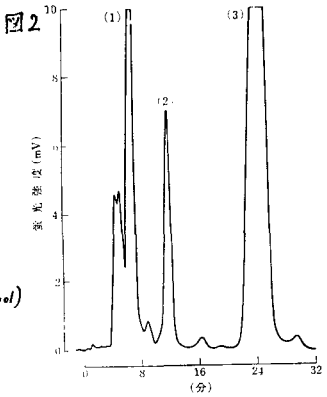


図2

(1) アンモニア
(2) ヒスタミン (36.9 p-mol)
(3) スペルミジン

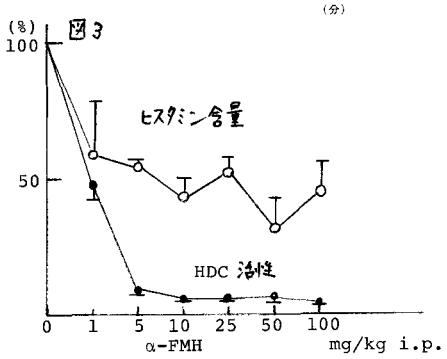


図3

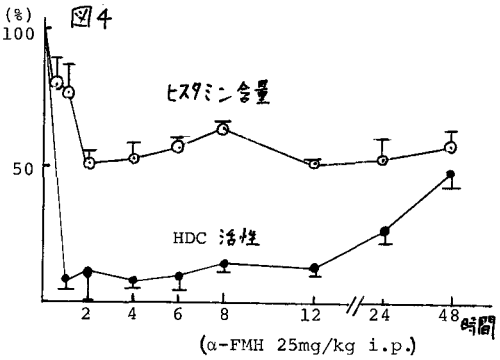


図4

〈結果〉

1) α-FMH が脳内ヒスタミン及び HDC 活性に及ぼす影響 (図 3, 4)

ddY 系マウスに α-FMH 1-100 mg/kg 腹腔内投与を行ない 4 時間後に断頭し脳を分離した。HDC 活性は 1-10 mg/kg で用量依存的に減少し 25 mg/kg 以上では非投与群の 10% まで抑制された。ヒスタミン含量は 10 mg/kg で 40 % に低下し、さらに投与量を増加してもヒスタミンは 30% 残存した。α-FMH 25 mg/kg 腹腔内投与後の時間経過をみると HDC 活性は 1 時間後 10% に低下し以後 12 時間まで低値が続き 24 時間より回復がみられた。一方ヒスタミン含量は HDC 活性に比べて徐々に減少し 2 時間で 50% に達し以後 48 時間まで

ほぼこの値が持続した。HDC活性の時間経過の変化はGarbarg等の報告(5)とほぼ同様であった。

2) W/W^{w} マウスの脳内ヒスタミンとHDC活性

第5染色体に突然変異遺伝子Wをもつ W/W マウスはmast cellを完全に欠損しているが生後数日で死亡するため実験には不適である。しかしW遺伝子をもつ W/W^{v} マウスにはmast cellが正常型 +/+ マウスの1%以下しか存在せずしかも一年以上生存し得ることが明らかにされている(6)。W/W^{v} と +/+ マウスの脳内ヒスタミンとHDC活性を表1に示す。HDC活性には有意差は認められず、ヒスタミン含量は W/W^{v} では +/+ の70%であった。

表1

	Histamine 含量 (n mol/g)	HDC 活性 (p mol/min/mg pt)
+/+	0.345±0.057	0.130±0.026 (5)
W/W	0.246±0.022 $p<0.001$	0.121±0.029 (4) N.S.

means± S.D.

3) α-FMH の W/W^{v} マウス脳内ヒスタミン及びHDC活性に及ぼす影響

W/W^{v} , +/+ マウスに α-FMH 25 mg/kg 腹腔内投与を行ないヒスタミン含量, HDC活性の時間的変化をみた。HDC活性はddY系マウスの時と同様に W/W^{v}, +/+ マウスともに30分後に10%まで抑制され12時間後まで低値を示し24時間後より回復がみられた。(図5) ヒスタミン含量は +/+ マウスはddY系マウスと同様の変化を示し2時間で40%に減少した後12時間後までこの値が持続しHDC活性の回復に伴ない24時間後より回復がみられた。一方 W/W^{v} マウスでは徐々に減少し、6時間で完全に消失し24時間後まで低値が続いた後48時間で40%に回復した。(図6)

図5 HDC活性

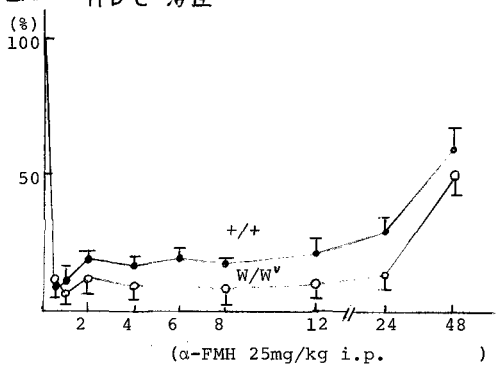
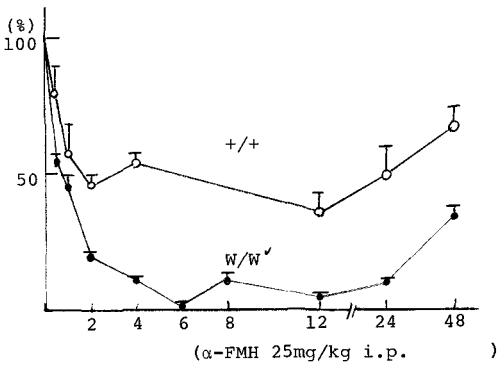


図6 ヒスタミン含量



〈考察〉

ヒスタミンはHDCにより一段階で生成される。従って脳内ヒスタミンの代謝回転の研究に種々のHDC阻害剤が用いられてきたが選択性, 効力に問題があった。1978年 Kollonitsch 等により合成されたα-FMHがラット胎児より抽出したHDCを特異的かつ有効に,非可逆的に阻害するためこの薬剤がヒスタミンの研究に有効であることが示唆された。α-FMHをddY系マウスに投与した時のHDC活性の阻害をみるとブロクレシン, α-ヒドラジノヒスチジンといった従来のHDC阻害剤に比べて少量で有効であることが明らかになった。(図3) α-FMH投与によりHDC活性が抑えられたにもかかわら

ずヒスタミン含量は40%までしか減少しなかった。(図3,4) 脳内ヒスタミンの存在様式として代謝回転の速いプールと遅いプールの2つのプールが存在することが知られている。従来より脳にmast cellが存在することが組織学的に確認されており、上の2つのプールはそれぞれnon-mast cell, mast cellに存在するヒスタミンに相当するものであることが提唱されてきた。特にラット新生児の脳(8)や、モルモット脳の毛細血管に富んだ分画(9)では低いHDC活性にもかかわらずヒスタミン含量が高いことからこれらはmast cellに由来することが示唆されてきた。我々はこれらの点を明確にするためmast cellを欠損しているW/W^{v}マウスを用いてnon-mast cellヒスタミンが存在することを明らかにした。(表1) HDC活性はW/W^{v}と+/+マウス間で有意差が認められずヒスタミン含量はW/W^{v}は+/+の70%存在することが明らかとなった。従って30%はmast cellに由来する。mast cellのHDC活性は低いため+/+マウスの脳HDC活性はnon-mast cellに由来しているものと考えられる。我々は2つの代謝回転速度の異なるヒスタミンプールが存在することを確認するためα-FMHをW/W^v, +/+マウスに投与してヒスタミン含量の変化を比較した。+/+マウスではα-FMH投与により減少する部分と残存する2つのプールが存在しているがW/W^{v}マウスではα-FMH投与6時間後完全にヒスタミンは消失した。W/W^{v}マウスのヒスタミン含量の減少はpseudo-first orderであり その半減期は56分であった。Verdiere (10)はアイソトープ法により半減期が36-42分と報告しており我々の結果とほぼ一致している。一方Dismukes等(11)は半減期が1分という非常に早い伝達物質であると報告しているが彼らの実験方法では1分という短い半減期を測定することは非常に困難である。今回の我々の実験では、マウス脳全体の代謝回転をみており、方法的に早い代謝回転を把握できない可能性は残っている。

〈謝辞〉

本研究に用いたα-FMHを提供していただいたDr.Kollonitsch(Merck Sharp&Dohme,USA)に感謝する。

(本研究の一部は第54回日本薬理学会総会,及び第8回国際薬理学会で報告した。)

〈文献〉

(1) Shore P.A.et al.(1959) J.Pharmacol.Exp.Ther. 27 182-186
(2) Yamatodani A.et al. (1981) Biochem.Pharmacol. (in press)
(3) Watanabe T. et al. (1979) Biochem.Pharmacol. 28 1149-1155
(4) Lowry O.H. et al. (1951) J.Biol.Chem . 193 265-275
(5) Garbarg M. et al. (1980) J.Neurochem. 35 1045-1052
(6) Kitamura Y. et al. (1978) Blood 52 447-452
(7) Kollonitsch J. et al. (1978) Nature 274 906-908
(8) Martres M.P.et al. (1975) Brain Res. 83 261-275
(9) Karnushina I.L. (1980) J.Neurochem. 34 1201-1208
(10)Verdiere M. (1977) Brain Res. 129 107-119
(11)Dismukes K.et al.(1974) Brain Res. 78 467-481

100 摂食制限がラット脳神経核レベルにおけるモノアミン酸化酵素活性の日内変動におよぼす影響

国元憲文・挾間秀文・釜瀬春隆・水川六郎
(鳥取大・医・神経精神)

〔要　約〕

8時間ごとの明暗サイクル条件下に2週間飼育した雄成熟ラットを，一群は引き続き自由摂食 (uncontrolled feeding)，他群は午前10時から12時までの2時間のみの制限摂食 (controlled feeding) 下でさらに2週間飼育し，摂食制限がモノアミン酸化酵素 (MAO) 活性の日内リズムに与える影響について検討した。検討部位は N. suprachiasmaticus (SCN), N. supraopticus (SON), N. ventromedialis (VMH), A. lateralis (LH), stratum griseum superficiale colliculi superioris (SGS), pineal gland (PG) など神経核単位の脳部位で，serotonin (5-HT), β-phenylethylamine (PEA) を基質としたA型およびB型MAOについて検討した。その結果，controlled feeding群では摂食時間以外の運動量の減少とVMHでの1～2峰性の変化が見られたが，LHでは日内変動は見出し得なかった。SCN, SON, SGS, PGでは両群とも同様の日内変動が認められた。

VMHでのMAO活性日内変動の出現が特に興味深く，この部位では摂食の制限によって何らかの神経伝達物質の変化が生じ，それに依存してMAO活性の変化を生じたものと推定され，脳内アミンおよびアミン関連酵素との関係を含めて考察を加えた。

Key words : diurnal variation of monoamine oxidase , controlled feeding
nucleus ventromedialis

〔はじめに〕

従来動物の内因性日内リズムのペースメーカーの脳局在に関する研究は，神経生理学的破壊法や放電活動の記録のほか，大まかな脳部位を対象とした神経化学的測定が行なわれてきており，充分な結論は得られていない。最近になって，脳微細部位・神経核単位でのMAO活性の日内リズムが明らかにされている[2]。

今回われわれは，このMAO活性の日内リズムを基礎に，摂食時間を制限した場合このリズムにどのような影響があるかについて検討を加えたので報告する。

〔実験方法〕

12週令のWistar系雄性ラットを群居飼育したものを用いた。動物は恒温恒湿の飼育室で外部と隔離され，午前8時点灯，午後8時消灯の12時間サイクルの明暗条件下で2週間飼育され，この間摂食・摂水は自由とした。その後2群に分け，対照群では摂食は従来通り自由摂食 (uncontrolled feeding) とし，制限摂食 (controlled feeding) 群では午前10時から12時の2時間に限って摂食できるようにされ，引き続き2週間飼育された。その後22時 (D_2), 2時 (D_6), 6時 (D_{10}), 10時 (L_2), 14時 (L_6), 18時 (L_{10}) の6時点でそれぞれ6匹ずつ断頭した。摘出した脳は大まかな部位に切断後液体窒素にて固定，クリオスタット内で60μmの連続切片として凍結乾燥した。この切片から神経核を切り出し重量測定後MAO活性を測定した。試料重量は1.0～7.0μgの範囲にあった。MAO活性の測定はMcCamanらの方法[7]を一部改変して[2][5]行なった。

type A MAOの基質としては ^{14}C-5-HTを，type B MAOの基質としては ^{14}C-PEAをそれぞれ用いた。PEAについては，基質濃度とMAO型別特異性に関する指摘[11]に基づき，

最終濃度10.78 μmoleと低濃度として用いた。ラットの行動量は，断頭前3日間にわたってオートメックスを用い，1時間毎の運動量として測定した。

〔結果〕

(1) 行動量の日内リズム：uncontrolled feedingの場合，すでに報告したように[2]暗期に一致した著明な運動量の亢進と，明期での低下を示している。controlled feeding群ではこれに反して，明期に設定された摂食時間に一致した著しい運動亢進を認めるが，暗期になっても運動量の増加が見られず，uncontrolled feeding群の明期と同程度の低レベルにとどまっている(Fig. 1)。

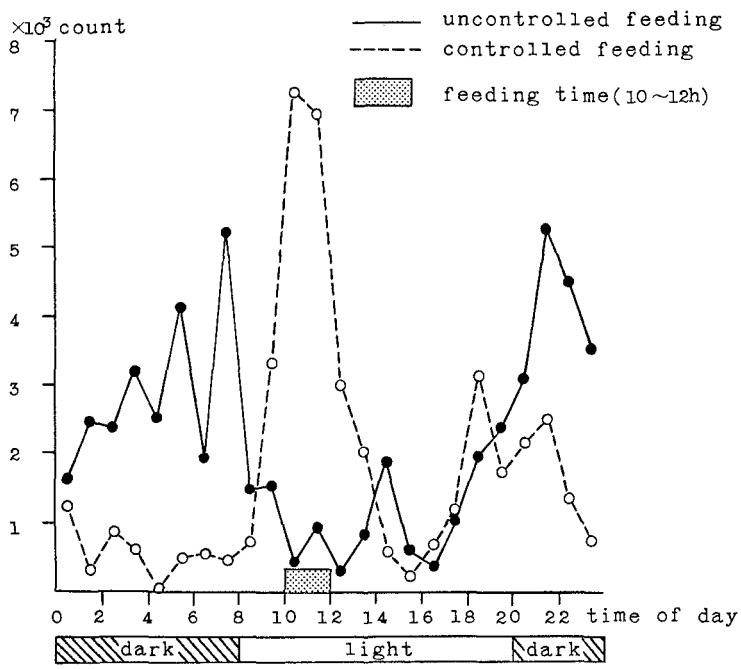


Fig. 1 The diurnal variations of motor activity

(2) A型MAO活性の日内リズム：uncontrolled feeding群の場合は，先に報告したように[2]SCN, SONでのMAO活性が暗期に比して明期に有意に増加する日内リズムを示し，中脳上丘のSGSでも明期に一過性の活性上昇が認められている($P<0.01\sim0.05$)。VMH, LH, PGではMAO活性には特に日内リズムが認められていない。

controlled feeding群では，SCN, SON, SGSでの日内変化はuncontrolled feeding群とほぼ同様であり，いっぽうLH, PG, Cでも対照群と同様に日内リズムは認められなかった。しかしVMHにおいては，暗期に高く明期に低いかなり著明な変化が出現している($P<0.001$)(Fig. 2)。

(3) B型MAO活性の日内リズム：uncontrolled feeding群では，A型MAOの場合とは逆に，明期に比し暗期に高い活性がSCN, SONに認められ，SGSではA型MAOの場合と同様の一過性上昇が明期に認められている($P<0.001\sim0.05$)。またPGでは明期に著しい活性増加を認め($P<0.001\sim0.01$)るが，VMH, LHでは変化がなかった[2]。

controlled feeding群では，SONの日内リズムが明らかでないものの，SCN, PG, SGSではuncontrolled feeding群と同様のリズムを示している($P<0.001\sim0.05$)。また，VMHでは暗期(D_6)と明期($L_2\sim L_6$)に活性が上昇する2峰性の日内リズムが存在していることが確認された($P<0.001$)(Fig. 3)。

〔考察〕

uncontrolled feedingの場合のMAO活性日内リズムについては，既報にて詳細に検討

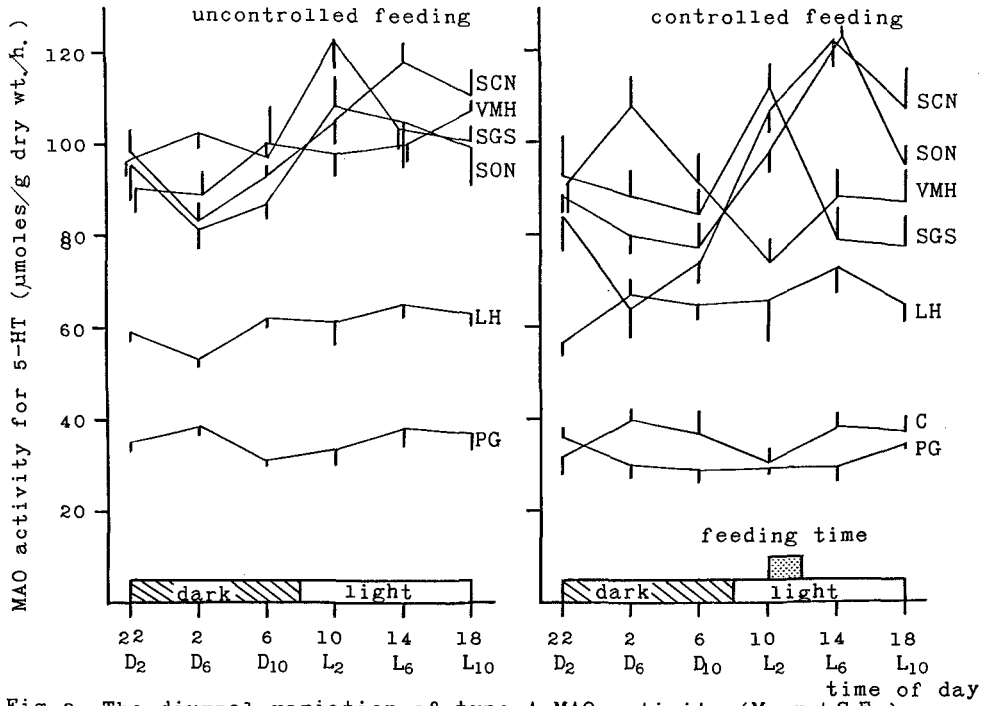


Fig. 2 The diurnal variation of type A MAO activity (Mean ± S.E.)

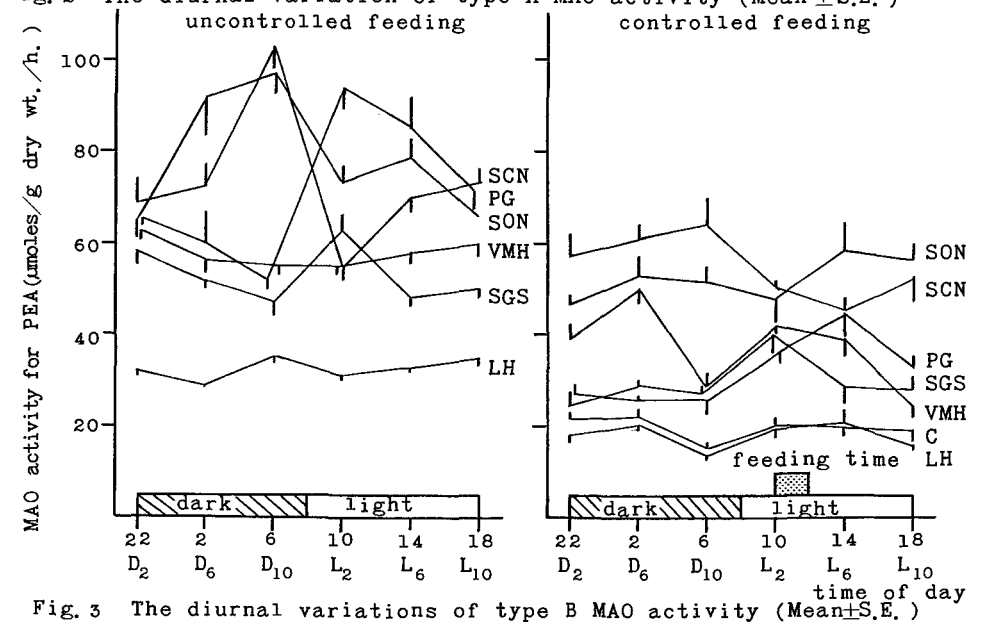


Fig. 3 The diurnal variations of type B MAO activity (Mean ± S.E.)

SCN: N. suprachiasmaticus, SON: N. supraopticus, VMH: N. ventromedialis, LH: A. lateralis, SGS: stratum griseum superficiale colliculi superioris, PG: pineal gland, C: parietal cortex

を加えた[2]。今回の摂食制限について影響をみると，まず行動量のパターンが著明な変化を示し，摂食時間以外の行動量が極度に減少していることがあげられる。しかしながら，行動量の減少自体が脳内アミンおよびアミン関連酵素に直接大きな影響を与えているようには思えない。これは，VMH以外でのA型・B型MAO活性の日内リズムが摂食制限をしてもほとんど変化することなく，自由摂食の時のまま保たれているところから推測される。

次に摂食制限の影響として考えられる所見は，VMHにおけるMAO活性の変化である。A型MAOでは1峰性，B型MAOでは2峰性の変化が摂食制限の結果として出現している。VMH破壊で摂食行動のリズムが消失するとされ[1]，またVMHにSCNとは別の体内時計機構の存在も指摘されている[4]。VMHは以前より満腹中枢と考えられているが，この部位で摂食制限を行なうことではじめてMAO活性の日内変動が出現することは，きわめて興味深い所見である。

VMHでは他の視床下部神経核に比しnoradrenaline(NA)は中等量，5-HT・dopamine(DA)は少量が存在しているとされている[9][12]が，VMHにおいてこれら活性アミンの何らかの変化が摂食時間制限によって生じているものと考えられる。LHでは，摂食行動と関連してglycogen synthesizing enzymeがコントロールされているとなされているが，今回の実験ではA型・B型MAOともに摂食制限によっても何ら変化を示さなかった。脳内アミンと生体の時計機構との関連では脳の大まかな部位についてこれまで検索がなされてきているが，視床下部では5-HTは明期に高値をとり[8]，NAは逆位相を示すとされている[6]が，DAについては一定の報告がなされていない。なお，仙波ら[10]はSCNにおいて明期にNAが増加するとの所見を報告している。PGでのメラトニン合成系酵素の日内変動については古くから知られている事実である。またグルタミン酸脱炭酸酵素はVMH，LHで比較的高活性を示すが，uncontrolled feedingでは日内変動が認められておらず[3]，controlled feedingの場合に日内変動が出現するか否か同一サンプルを用いて検討の予定である。VMHは満腹中枢，LHは摂食中枢という概念上の一応の区別はなされているものの，VMHではMAO活性の日内変動が出現し，LHでは出現しないという理由は今回の実験でははっきりしない。controlled feeding群においても摂水は自由としたこと，摂食時間を2時間という短時間に限定したことなど，実験条件上の問題も考慮される。今回得られた行動量変化とVMHでのMAO活性日内変動出現については，脳内アミンや他のアミン関連酵素との関連を含めて，広い視野にたって詳細な検討を要する。

［文献］

(1) Becker,E.E. and Kissileff,H.R.(1974) Am J Physiol,226,383. (2) Kamase,H.(1980) Folia Psychiat Neurol Jpn,34,481. (3) Kawahara,R.,Hazama,H.,Kamase,H.,Takeshita,H.,Kunimoto,N. and Kayano,M.(1980) Folia Psychiat Neurol Jpn,34,473. (4) Krieger,D.T.,Hauser,H. and Krey,L.C.(1977) Science,197,398. (5) Kunimoto,N.,Hazama,H. and Kamase,H.(1979) Brain Res,176,175. (6) Manshardt,J. and Wurtman,R.J.(1968) Nature,212,574. (7) McCaman,R.E.,McCaman,M.W.,Hunt,J.M. and Smith,M.S.(1965) J Neurochem,12,15. (8) Quay,W.B.(1968) Am J Physiol,215,1448. (9) Saavedra,J.M.,Palkovits,M.,Brownstein,M. and Axelrod,J.(1974) Brain Res,77,157. (10) 仙波純一,保賀宣子,渋谷治男,融道男(1979) 日本睡眠学会第4回定期学術集会抄録集,9. (11) Suzuki,O.,Katsumata,Y. and Oya,M.(1981) J Neurochem,36,1298. (13) Versteeg,D.H.G.,Gugten,J.V.D.,Jong,W.D. and Palkovits,M.(1976) Brain Res,113,563.

101 YM-09151-2及びSulpiride投与のドパミン代謝回転に対する作用の比較

盛政忠臣・三宅好子・吉野公博・金行孝雄
三船和史・森久博司・庄盛敏廉
（岡大・医・脳研・病態生化）

〔要　約〕

脳内ドパミン（ＤＡ）受容体の多様性に着目して、ＹＭ－０９１５１－２（Ｄ１遮断剤）および、Sulpiride（Ｄ２遮断剤）のアミン代謝回転に対する作用を、薬剤を急性投与したラット線条体を用いて比較検討した。

ＤＡ量は、いずれの薬剤投与群においても減少の傾向を示したが有意の低下は認められなかった。チロシン水酸化酵素活性およびノルエピネフリン（ＮＥ）量には変化が認められなかった。それに反して、ＤＯＰＡＣならびにＨＶＡは、両薬剤において、それぞれ投与量依存的に有意の増加を示した。これらのことから、Ｄ１受容体の遮断は、Ｄ２を遮断した場合と類似したＤＡ代謝回転の促進をすることが示された。また、アミン代謝回転に対する作用に限って言えば、実験に用いた薬量が、両薬剤の等価量であり、ＹＭの方が10^{n}倍程度強力な薬剤であることが示された。

両薬物を併用投与した群では、ＤＯＰＡＣ、ＨＶＡいずれにおいても、それぞれの薬物独自による変化量を単純加算した量に非常に一致した。このことから、両薬物は、ＤＡ代謝回転に対して互に独立したプロセスを介して作用した可能性が示唆されたが、この点に関しては、実験を追加して検討中である。

Key words : YM-09151-2, Sulpiride, dopamine turnover

クロルプロマジン、ハロペリドールなどの抗精神病薬が、脳内ＤＡ代謝回転を促進させることは、既によく知られている事実であり、このことは、これらの薬物がＤＡ受容体を遮断したことによる間接的な証拠とされて来た。一方、近年、ＤＡ受容体の多様性が種々の知見によって示唆され、そのサブグループに、Ｄ１，Ｄ２，Ｄ３，Ｄ４の名称が与えられた(13)。また、従来の上記抗精神病薬は、Ｄ１およびＤ２受容体に対してほぼ同等の遮断効果を有することが多くの実験によって示されて来た(13)。しかしながら、Ｄ１受容体に対する遮断剤のＤＡ代謝回転に対する作用機序は明らかでない（13）。

Sulpiride（Sulp.）がＤ２受容体の選択的な遮断剤であることはよく知られている(4)が、新しい薬剤ＹＭ－０９１５１－２（ＹＭ）は、行動薬理ならびに *in vitro* における receptor assay により、Ｄ１受容体に対して選択的に抑制作用を有することが報告された（9，15）。

本研究では、これらＹＭ（Ｄ１受容体遮断剤）および Sulp.（Ｄ２受容体遮断剤）を、ラットに急性投与し、線条体のカテコラミンとその代謝産物、チロシン水酸化酵素活性を測定することによって、それぞれの受容体のカテコラミン代謝に対する関与の相異に検討を加え、若干の知見を得たので報告する。

〔実験方法〕

Sprague-Dawley 系雄ラット（７週令，実験時）を用いた。ラットは、実験までの３週間、12時間毎の明暗周期、恒温（24℃）、恒湿（55％）の一定の条件下で飼育順化して用いた。

TABLE 1. The Effects of Sulpiride and YM-09151-2 on the Rat Striatal Catecholamine Metabolisms.

Treatment	dose mg/kg	n	NE	DA	DOPAC	HVA	TH
Saline	-	6	0.87 ± 0.29	37.3 ± 4.7	9.9 ± 0.8	6.0 ± 0.7	0.94 ± 0.20
YM-09151-2	0.005	6	0.77 ± 0.17	31.1 ± 8.3	14.3 ± 2.1**	10.5 ± 2.3***	1.01 ± 0.24
YM-09151-2	0.01	6	0.84 ± 0.10	31.1 ± 4.9	18.7 ± 4.8***	14.4 ± 5.9*	0.98 ± 0.33
Sulpiride	50	6	0.82 ± 0.23	37.7 ± 10.1	13.1 ± 2.1*	9.2 ± 1.1***	0.93 ± 0.20
Sulpiride	150	6	0.77 ± 0.10	33.0 ± 8.4	17.7 ± 1.4***	13.6 ± 2.9***	1.09 ± 0.19
YM-09151-2 +Sulpiride	0.005 50	6	0.84 ± 0.12	29.8 ± 9.1	17.9 ± 2.9***	13.6 ± 4.0***	0.97 ± 0.10

THE values of catecholamines and the metabolites were represented by ug / mg protein and the activity of tyrosine hydroxylase by n mol formed dopa / mg protein / hr, both in mean ± S.D.. The statistical differences to the saline control : *,$p < 0.05$; **,$p < 0.01$; ***,$p < 0.005$.

Sulp は注射薬を生理食塩水で希釈し、50または150 mg/kg（薬量／体重：1群6匹、以下同じ）を腹腔内に投与した。YMは、山之内製薬株式会社，中央研究所より慶与されたものを希塩酸で溶解、中和したものを、0.005または0.01 mg/kg 皮下に投与した。また、両薬剤の低い薬量を同時併用投与したものを1群とした。対照群には、生理食塩水を腹腔内に投与した。溶液は、一回の投与量が0.5－1.0 mlとなるように希釈した。以上6群について、投与時刻は頭期10時間目とし、投与90分後に、ラットは Takahashi and Aprison の Near-freezing Method に従い液体窒素中に冷却し、断頭後、速やかに氷上で線条体部分を摘出し(2,12)、測定まで－80°Cで凍結保存した。

各線条体は、9倍容量の0.9% KCl に対して Polytron で示モゲナイズし、その一部を用いて以下の測定を行なった。NEおよびDAは、微量のアルミナで精製濃縮した(16)。DOPACおよびHVAは、有機溶媒により精製濃縮(14)した。チロシン水酸化酵素活性は、Coyle(1)の方法を応用し(8)、反応成生物 dopa を微量のアルミナを用いて精製濃縮した(8,16)。

精製濃縮された全てのアミン類は、高速液体クロマトグラフィー・電気化学的検出器（医理化工業）・ODSシリカゲルカラム（Lichrosorb C18）を用いて測定した(8,16)。溶出溶媒は、既報(8,16)に準じ、アミンの種類によってアセトニトリル（3.5%以下）、イオンペアー試薬オクタンスルホネートを追加した。

〔結果と考察〕

DA受容体、D1，D2に対する選択的遮断剤とされる2種類の薬物、それぞれYMおよびSulp を急性投与したラット線条体のアミン類の含量とチロシン水酸化酵素活性をTABLE 1に示す。

薬物投与によって有意な変化を示したの

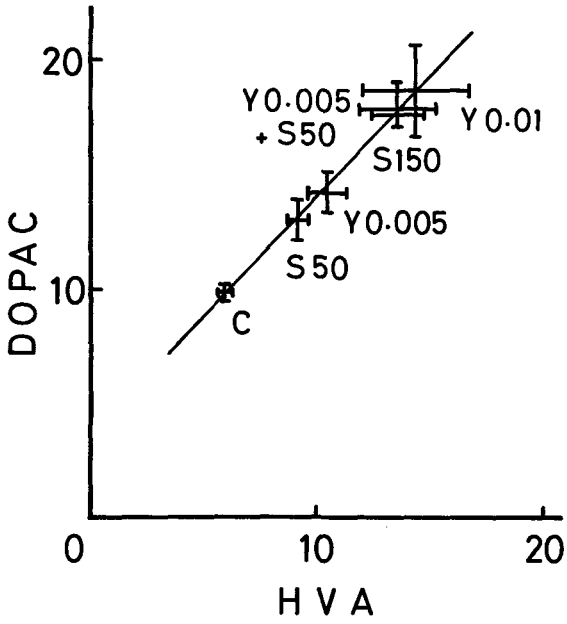


Fig. 1.
Correlation between HVA and DOPAC contents after YM-09151-2 (Y0.005, Y0.01: representing the dose, refer to the text) and Sulpiride (S50, S150) administration. Figures are represented by mean ± S.E.M. (μg / mg protein).

はDAの代謝産物、DOPACとHVAだけである。どちらの薬物に対しても両者は、投与量依存的に有意の増加を示した。一方、それぞれの薬物の少ない方の投与量を併用投与した群では、変化量がDOPACで8.0μg/mg protein, HVAで7.6 μg/mg protein と有意な増加を示した。ここでそれぞれ個別に投与した際の変化量を単純加算すると、DOPACが7.6μg/mg protein, HVAが7.7μg/mg protein となり、上述の両薬物併用投与時の変化量と非常によく一致した。以上のことから、両薬物は、いずれもDA代謝回転に対して促進的な作用を有することが示され、かつ、その促進効果は、両薬物でそれぞれ異なったプロセスによった可能性が示唆された。

実験に用いた両薬物の投与量で、DOPAC, HVAに対してそれぞれ同程度の有意な変化を与えたことから、この投薬量が、DA代謝に対する作用としては等価量と言える。また、投薬量を比較すると、YMの方が約10^4倍強い作用を有することが示された。

DOPACとHVAの増加の関係をFig.1に示す。それぞれの平均値は、生理食塩水投与の対照群(C)を通る直線にほぼ乗っており、平均値を用いた相関係数は0.9992と極めて高い相関関係のあることが示された。このことから、DA分解酵素であるMAOとCOMTがよく連動した活性を示すものと考えられた。

DA量について、両薬物投与群において低下の傾向は認められたが、有意な変化はなく、ただYMの多量投与の場合においてのみ、その変化に有意傾向($p < 0.1$)が認められた。いずれにしても、このようなDA量の変化は、代謝産物で認められた代謝回転の促進に伴うものと考えられた。

ＮＥ量は、いずれの薬物によっても変動を示さなかった。Ｄ１、Ｄ２に対する選択性の低い従来の抗精神病薬は、ＮＥ代謝回転に対して作用しないとされており、今回の結果は、これに一致するものと考えられた。

チロシン水酸化酵素活性は、薬物投与による変化を示さなかった。渡辺ら（17）は、クロルプロマジン投与によって、脳の一定部位でのみ活性の上昇を認めている。この酵素に変化が認められなかったので、ＤＡ代謝回転の促進は、酵素活性が変動しない範囲での現象であるか、または、この酵素以外の影響によるものであろう。

ラット線条体には、Ｄ１、Ｄ２の両受容体の存在していることが知られている(6)。従って、それぞれに対する選択的な遮断剤によって類似したＤＡ代謝回転の促進が認められたのは当然な結果であるが、先に推測した「独立したプロセス」によるものかどうかについてはさらに検討を加える必要があると考えられる。

分裂病患者死後脳において、Ｄ２受容体が増加していることは既に報告されている（5, 7, 10）。しかしながら、抗精神病薬長期投与にもとづく受容体の supersensitivity（受容体の増加）の出現は、動物実験においても臨床的にもよく知られているところであり、分裂病患者脳における受容体の増加が、薬物投与によって生じたものか、分裂病の病因と直接関係するものかは、現在のところ断定し得ない。Ｄ１受容体に関しては、クロルプロマジンなどの非選択的な遮断剤を用いた実験では supersensitivity が生じるという報告（3）とそれを否定する報告（11）がある。前者は、Ｄ１以外の受容体を介した可能性も否定できない。以上のような問題点に関しては、本実験で用いた選択性の高い遮断剤による検討が必要であると考えられる。

〔文献〕

(1) Coyle, J. T. (1972) Biochem. Pharmacol. 21, 1935-1944
(2) Glowinski, J., and Iversen, L. L. (1966) J. Neurochem. 13, 655-669
(3) Kaneko, S., Watanabe, S., Toru, M., and Shimazono, Y. (1978) Brain Res. 152,396-400
(4) Kebabian, J.W., and Calne,D.B. (1979) Nature 277, 93-96
(5) Lee, T., Seeman, P., Tourtellotte, W.W., Farlay, I.J., and Hornykiewicz,O. (1978) Nature 274, 897-900
(6) Lew, J.Y., Baba, Y., and Goldstein, M. (1978) Fed. Proc. 37, 735
(7) Mackay, A.V.P., Doble, A., Bird, E.D., Spokes, E.G., Guik, M., and Iversen, L.L. (1978) Life Sci. 23, 527-532
(8) 三宅好子, 盛政忠臣, 三船和史, 吉野公博, 庄盛敏廉 (1981) 脳研究会会誌 7, 40-41
(9) Nishikori, K., Noshiro, O., Sano, K., Maeno, H. (1980) J. Biol. Chem. 255, 10909-10915
(10) Owen, F., Crow, T.J., Poulter, M., Gross, A.J., Longden, A., and Riley, G.J. (1978) Lancet 2, 223-226
(11) Rotrosen, J., Friedman, E., and Gershon, S. (1975) Life Sci. 17, 563-568
(12) Schubert, J.,and Sedvall, G. (1972) Eur. J. Pharmacol. 17, 75-80
(13) Seeman, P. (1981) Pharmacol. Rev. 32, 229-313
(14) 島高, 新谷元章, 成実重彦, 永井康雄, 堀正剛 (1980) 第2回液体クロマトグラフ研究会抄録集
(15) Usuda, S., Nishikori, K., Noshiro, O., and Maeno, H. (1981) Psychopharmacology 73, 103-109
(16) 吉野公博, 盛政忠臣, 三宅好子, 三船和史, 庄盛敏廉 (1981) 脳研究会会誌 7, 52-53
(17) 渡辺恒三, 融道雄, 金野滋, 波谷治男, 島薗安雄 (1976) 神経化学 15, 56-59

102 神経刺激によるカテコールアミン分泌機構
— ATPおよび関連物質による抑制作用 —

熊倉鴻之助・笹川展幸・菊野正隆（上智大・生命研）
小林和夫・大泉信行・黒田洋一郎（都神経研）

〔要　約〕

副腎髄質を支配する内臓神経には、刺激伝達物質であるAcetylcholine (Ach)の他に、ATPあるいはopioid peptides等の物質が共存し、Achと共に放出される事が示唆されている。また副腎髄質細胞にもこれらの物質がcatecholamines (CA)と共に貯蔵され放出される事も知られているが、これら共存物質が副腎髄質よりのCA遊離に与える影響については知見は少ない。本研究では、牛副腎髄質より調整したクロマフィン初代培養細胞を用いて、Cell bed closed perfusion systemによりCA遊離実験を行い、ATPがCA遊離に対して抑制作用を示し、ATP除去後も抑制作用が持続する事を観察した。この持続性の抑制作用は、還流液中にパルス的に与えたAchによるCA遊離、またはKClおよびA23187によるCA遊離のいづれに対しても見られた。一方、adenosine receptorのagonistである2-Cl-adenosineも同様の作用を示し、かつantagonistである2'-deoxyadenosineの存在下ではATPの作用は認められなかった。2-Cl-adenosineを作用させた後の細胞へのAch依存性Ca^{++}-influxは、Control群細胞へのそれと比較して有意の差が見られず、この持続性のある抑制作用は、CA遊離機構のうち、Ca^{++}の細胞内流入の後に作動する細胞内過程に関与する事が推察された。

Key words : adrenal chromaffin cells, catecholamine release, ATP

副腎髄質は、いわゆる"stimulus-secretion coupling"[3]の機構に関する研究に最も適当な実験系とされ、また中枢神経系における神経伝達機構の実験モデル系として、多くの研究が行なわれている。副腎髄質では、Achが内臓神経から放出される刺激伝達物質である事は良く知られている。このAchによって誘起されるCAの遊離には、二つの機構が含まれる。即ち、内臓神経終末より放出されたAchがクロマフィン細胞上に存在するAch-receptors (nicotinic)に結合して、膜のイオン透過性を変化させる[2]。次いでCa^{++}の存在下で、CAはexocytosisにより クロマフィン細胞から遊離される[8]。内臓神経終末には、Achと共に神経伝達物質と考えられる他の物質が含まれる事が示唆されており、ATP[17]あるいはエンケファリン様物質[1,16]は、Achと共に神経終末より放出されると考えられる。同時にこれらの物質は、クロマフィン顆粒中にもCAと共に存在し、CA遊離に伴なって遊離される[14,18]。副腎髄質からのCA遊離におけるAchの作用機構は良く研究されている反面、これら共存物質の作用については未知の点が多い。本実験では、牛副腎髄質より調整したクロマフィン細胞の初代培養系を用いて、Cell Bed Closed Perfusion SystemによりCA遊離を測定し、特にその神経分泌機能の制御機構を検討する事を目的とした。既に副腎髄質クロマフィン細胞では、エンケファリン様物質がAch-receptorを修飾する事が報告されている[7]。また、adenosineがcAMP含量の上昇を介して、CA合成酵素であるTyrosine hydroxylase活性の調節に関与する可能性を、第23回本会で報告しており[11]、今回は、ATPおよび関連物質がクロマフィン細胞からのCA遊離機能の制御に関与する可能性を検討した。

〔実験方法〕

クロマフィン初代培養細胞：　クロマフィン初代培養細胞は、Waymireらの方法[19]に従って

牛副腎髄質より調整し、培養3～10日目の細胞を実験に用いた。

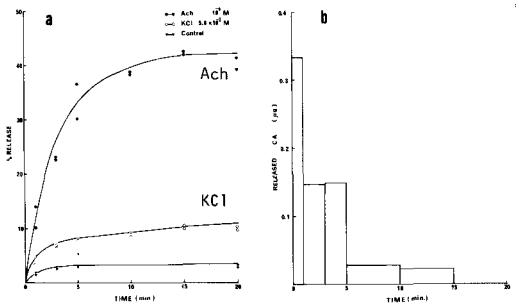
CA遊離測定： クロマフィン細胞を、2.2 mM $CaCl_2$ を含む Krebs-Ringer Bicarbonate Glucose 溶液中で 25°C で incubate し、薬物による刺激を与えた後に経時的に溶液中に遊離された CA を抽出後、蛍光法[10,15]の方法により蛍光測定し定量した。

^{45}Ca-influx の測定： クロマフィン細胞を浮遊させた Krebs-Ringer 溶液に薬物を添加し 25°C 5分間 incubate した後、遠心により同溶液で細胞を2回洗った。この細胞を再び同溶液に浮遊させ、25°C で30分間 Preincubate した後に ^{45}Ca を添加し、15秒及び30秒後に細胞内に取り込まれた放射活性を測定した。

〔結果及び考察〕

I. 初代培養細胞よりの CA遊離； クロマフィン初代培養細胞を約 10^6 cells, 小試験管内の Krebs-Ringer 溶液に浮遊させ 25°C で incubate し、10^{-4} M Ach を添加後、経時的に溶液中に遊離された CA を測定すると、約10分後には細胞内 CA 含量の 40% に相当する CA が遊離された。(Fig-1) Fig.1-a に示した CA遊離は、いわゆる cumulative frequency distribution に相当するので、これを Fig.1-b に示す如く frequency distribution で表わすと、実質的な CA遊離は5分以内に終っている事がわかる。牛副腎髄質から調整したクロマフィン細胞より Ach あるいは Nicotine によって引き起こされる CA遊離量は、およそ 2～15 nmol/10^6 cells[7,9,13,14] である。このような浮遊系では、CA と共に他のクロマフィン顆粒内物質が溶液中に遊離される。例えば ATP は、およそ ATP/CA = 1/4 の割合で含まれ、また遊離される事が知られている[5]。この値から換算すると 10^6 cells/ml の細胞を用いた遊離実験においては、溶液中の ATP およびその代謝物の濃度は 0.5～4 μM に達する事が推測される。これらの共存物質が CA遊離機構に何らかの作用をする事は考えられる。

Fig.1 Ach- and KCl-induced CA release from isolated chromaffin cells



II. Cell bed closed perfusion system； CA と共にクロマフィン細胞より遊離される物質が溶液中に蓄積する事を防ぐ目的で、Fig.2 に示す cell bed closed perfusion system を用いて CA遊離を測定した。この system では、およそ 10^8 cells を2枚の membrane filter (3μ pore) にはさまれた 1.5 ml の space に保持し、cell bed を 1.5 ml/min の流速で還流し、還流液は1分毎に fraction collector で分取した。還流 Krebs-Ringer 液中にパルス的に加えた薬物刺激により遊離された CA を各 fraction 毎に定量した。Fig.3 に示すように、この System ではパルス的に与える 10^{-4} M Ach による刺激に応答してクロマフィン細胞

Fig.2 Cell Bed Closed Perfusion System

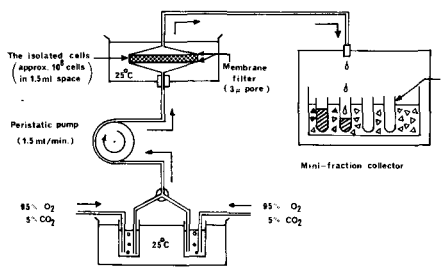
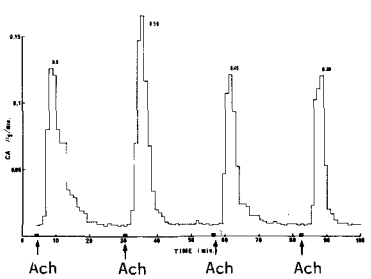


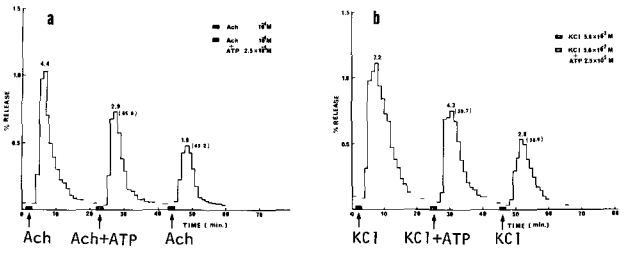
Fig.3 CA release in responces to the repeated stimulation by Ach



からCAがパルス的に遊離される。刺激を4回から6回繰り返し与えた場合も、それぞれの刺激に応答してほぼ同量のCAが繰り返し遊離され、Fig.1-bに見られたRefractorinessは観察されなかった。またAch添加にHexamethonium(10^{-5}M)を加える事により、CA遊離はほぼ完全に阻害された。

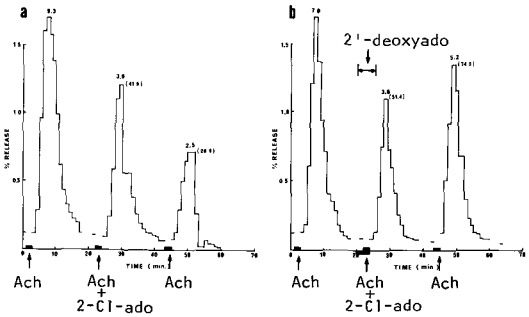
III. ATPおよび関連物質による遊離抑制作用；　10^{-4}M Achを含む溶液で2分間cell bedを還流することにより、細胞内CA含量の6.0±0.45%に相当する量のCAが遊離された。Achで1回刺激を与え、15分間Krebs-Ringer溶液で還流を続けた後に、2.5×10^{-5}M ATPをAchに加えて2分間刺激を与えたところ、遊離されるCAはAchのみによって引き起こされた遊離量の65.5±1.43%と顕著に減少した(Fig.4-a)。更にKrebs-Ringer溶液で15分間還流してATPを洗い流した後、再び10^{-4}M Achのみで刺激を与えてCA遊離を引き起こすと、CA遊離量は更に減少し、初回の遊離量の約40%であった。このATP除去後に見られる細胞のRefractorinessは、Achで1回刺激した後、ATPのみを2分間添加し15分洗浄した後のAch刺激に対しても同様に見られた。

Fig.4 Effects of ATP on Ach-induced and KCl-induced CA release



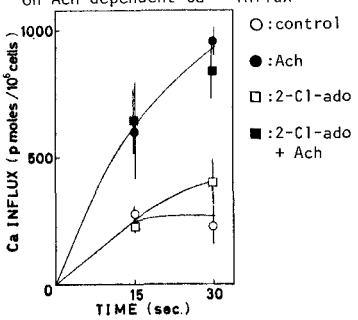
一方、56mM KCl溶液を2分間還流液に添加すると、Achで刺激を与えた場合と同様にパルス的なCA遊離が引き起こされた。次いで、KClと共に2.5×10^{-5}M ATPを加えると、CA遊離はKClのみで引き起こされた遊離に比して40%の減少を示した。更に引き続き15分間Krebs-Ringer液で還流した後、再び56mM KClのみを添加した場合も、Achの場合と同様CA遊離に更に減少が見られ、初回のKClによる遊離量の約60%の減少を示した(Fig.4-b)。また、このsystemを用いて細胞に10^{-5}M A23187(Ca^{++}-ionophore)で30分間刺激を与えると、持続的なCA遊離が引き起こされた。ATPを還流した後に、A23187を30分間与えると、A23187依存のCA遊離量は約50%減少された。即ち、ATPをAchと共に添加し洗浄除去した後に見られるCA遊離抑制作用は、Ach receptorあるいはCa^{++}-channelのいわゆる脱感作によるものではなく、他の細胞内反応の結果引き起こされた持続性のあるRefractorinessと推察される。ATPは神経終末あるいはクロマフィン細胞から遊離された後、synaptic cleftあるいは副腎髄質中で速かに代謝され、adenosineその他の代謝物となる事が知られている。クロマフィン初代培養細胞よりのCA遊離においても、ATPは速かにadenine nucleotidesあるいはadenosine等に代謝されると思われる[12]。Adenosineおよび関連物質は、クロマフィン細胞で細胞内cAMP含量の上昇を引き起こすので、receptorの存在が考えられる[11]。そこで、adenosine receptorのagonistである2-Cl-adenosine 2.5×10^{-5}Mを還流液に添加したところ、ATPと同じく洗浄後与えたAchによるCA遊離を抑制した(Fig.5-a)。しかし、

Fig.5 Effects of 2-Cl-adenosine (2-Cl-ado) on Ach-induced CA release (a), and antagonism by 2'-deoxyadenosine (2'-deoxyado)(b)



adenosine receptorのantagonistである2'-deoxyadenosine 10^{-4} Mの存在下で2-Cl-adenosineを与えても、この抑制作用は全く見られなかった(Fig.5-b)事から、adenosine receptorの関与が示唆される。最近、中枢神経系でadenosine receptorの存在が報告され[2]、caffeinあるいはtheophyllineがantagonistとして作用する事が知られた。内臓神経からのAchあるいはクロマフィン細胞からのCAと共に放出されるATPが、adenosine receptorを介してCA遊離の制御に関与する可能性を仮定すると、caffeinあるいはtheophyllineによって副腎髄質からのCA遊離が促進されるという報告[6]は極めて興味深い。副腎髄質からのCA遊離においては、Ca^{++}が遊離機構を調節する重要な因子である事は良く知られているが、Ca^{++}の細胞内流入からexocytosisに至る過程の細胞内機構については、充分には明らかではない。2.5×10^{-5} M 2-Cl-adenosineを作用させた後のクロマフィン細胞へのAch依存性Ca^{++}-influxは、Control群と比較して有意の差を示さなかった(Fig.6)。即ち、今回観察されたATPおよび2-Cl-adenosineによる持続性のある抑制作用は、CA遊離機構のうち、Ca^{++}の細胞内流入の後に作動する過程への影響によると推察される。この抑制作用がどのような機構によるものかを今後明らかにし、その生理的意義を検討して行きたい。

Fig.6 Effects of 2-Cl-adenosine on Ach-dependent Ca^{++}-influx



本研究の一部は、第3回国際薬理学会Satellite Symposium, "Synthesis, Storage and Secretion of Adrenal Catecholamines" (1981年7月箱根)で発表した。

References

1. Costa,E.,DiGiulio,A.M.,Kumakura,K.& Yang,H-Y.T.(1979) Fed.Proc.Fed.Am.Soc.Exp.Biol.,38,1129
2. Daly,J.W.,Bruns,R.F. & Snyder,S.H.(1981) Life Sciences,28,2083-2097
3. Douglas,W.W.(1968) Br.J.Pharmacol.,34,451-474
4. Douglas,W.W. and Poisner,A.M.(1962) J.Physiol.,162,385-392
5. Douglas,W.W.,Poisner,A.M. & Rubin,R.P.(1966) J.Physiol.,183,236-248
6. Izumi,F.,Oka,M. & Kashimoto,T.(1971) Med.J.of Osaka Univ.,24,241-249
7. Kilpatrick,D.L.,Ledbetter,F.H.,Carson,K.A.,Kirshner,A.G.,Slepetis,R. & Kirshner,N.(1980) J.Neurochem.,35,679-692
8. Kirshner,N. and Viveros,O.H.(1972) Pharmacol.Rev.,24,385-398
9. Kumakura,K.,Karoum,F.,Guidotti,A. & Costa,E.(1980) Nature,283,489-492
10. Kumakura,K.,Guidotti,A. & Costa,E.(1979) Mol.Pharmacol.,16,865-876
11. 里田洋一郎,小林和夫,熊倉鵬之助,(1980)神経化学,19,74-77.
12. Kuroda,Y.,Yoshioka,M.,Kumakura,K.,Kobayashi,K. & Nakajima,T.(1980) Proc.Japan Acad.,56-B,660-664
13. Lemaire,S.,Livett,B.,Tseng,R.,Mercier,P. & Lemaire,I.(1981) J.Neurochem.,36,886-892
14. Livett,B.G.,Dean,D.M.,Whelan,L.G.,Udenfriend,S. & Rossier,J.(1981) Nature,289,317-319
15. Neff,N.H.,Spano,P.F.,Gropetti,A.,Wang,C.T. & Costa,E.(1971) J.Pharmacol.Exp.Ther.,176,701-710
16. Schultzberg,M.,Lundberg,J.M.,Hokfelt,T.,Terenius,L.,Brandt,J.,Elde,R.P. & Goldstein,M.(1978) Neuroscience,3,1169-1186
17. Silinsky,E.M.(1975) J.Physiol.,247,145-162
18. Viveros,O.H.,Diliberto,E.J.,Hazum,E. & Chang,K.J.(1979) Mol.Pharmacol.,16,1101-1108
19. Waymire,J.C.,Waymire,K.G.,Boehme,R.,Noritake,D. & Waedell,J. in Structure and Function of Monoamine Enzymes (eds. Usdin,E.,Weiner,N. & Youdim,M.B.H.)(1977) Dekker,New York,327-363

103 ラット脳神経終末細胞質分画中で合成された ^{14}C-ドーパミンのシナプス小胞への移行について

都築紀宏(名市大・医・生化)

〔要　約〕

ラット脳神経終末細胞質分画中で合成されたドーパミン(DA)が、その場で速やかにシナプス小胞(SV)へ移行し貯蔵されるか否かに就て検討した。

(1), P_2 分画を高圧窒素ガス細胞破砕器を用いて等張下で破壊し 34,000g, 30分遠心後の上清を終末細胞質分画とした。この分画に含まれるSVは *osmotically sensitive* であった。ドーパ脱炭酸酵素はこの分画の可溶性分画に含まれ, L-(^{14}C)-ドーパよりDAを生成したが、この新しく合成されたDAのSVへの移行は、30°C, 20分間には認められなかった。又、従来の方法(3)で得たSVを用いても移行は認められなかった。

(2), この分画に含まれる可溶性蛋白はDAと結合する性質を示したので、これが速やかな移行を抑制していると思われた。この蛋白に結合したDAは、Ca^{2+} 存在下で蛋白より遊離してきた。DEAEセルロースに吸着する分画ではDA結合量は6-7倍に増大し酸性蛋白の関与が示唆された。又、これらの蛋白はPAS染色された。

(3), これらの結果から、細胞内で合成されたDAは先ず蛋白と結合して細胞質プールを形成し、その後SVへ移行する。脱分極後流入した Ca^{2+} はこの蛋白に作用しDAを *entirely free* にする結果、DA放出の *trigger* となる、と考えられる。

Key words : Cytoplasmic pool of dopamine, Dopamine binding glycoprotein(s), Synaptic vesicles prepared isotonically.

アセチルコリンの神経終末内分布に就ては細胞質内と顆粒(シナプス小胞)内プールの、少くとも2種の存在様式が区別されている。中枢神経系の伝達物質ドーパミン(DA)に就いても同様で、細胞質内で合成後、顆粒内へ移行すると言われているので、刺戟によってどちらのプールから放出されるかが問題となっている。*Exocytosis* によって顆粒の内容物が直接外部へ放出されるというのが顆粒説で、この場合 Ca^{2+} は顆粒と形質膜との融合を促進すると考えられている。一方、細胞質プール説では終末の形質膜にDA-担体を考え、これを介して細胞質プールのDAが放出されると仮定しているが Ca^{2+} の役割についてのモデルはない。我々は今まで単離したシナプス小胞(SV)についてその性質を調べてきたが(6-9)、顆粒説を支持するに足る結果は得られていない。もし顆粒説が有力とするならば、細胞内で合成されたDAは速やかにSV内へ移行した方が、放出に都合がよいであろう、という考えの基に今回表記の実験を試みた。

その結果、神経終末細胞質分画にはDAを結合する酸性糖蛋白が含まれ、DAのSVへの速やかな取り込みを抑制する可能性のあること, Ca^{2+} 添加によってこの結合しているDAは、蛋白から遊離してくることを見出したので報告する。

材料と方法

P_2, 及びシナプトソーム分画は *Whittaker* ら(12)の方法に従がって *rat whole brain* から調製した。シナプトソームは P_2 を更に 0.8-1.2M 蔗糖密度勾配分画したもの使用。

神経終末細胞質分画。 P_2 又はシナプトソームを 0.32M 蔗糖に懸濁し、高圧 N_2-ガス細胞破砕器(イエダプレス)を用いて 120 気圧に加圧後、常圧下に放出し形質膜を破裂させた。34,000g, 30分遠心し膜成分を除去すると乳白色の細胞質分画が得られた。

終末細胞質分画よりシナプス小胞の分離。 Whittaker ら(12)の方法に従がって、上述の細胞質分画を更に蔗糖密度勾配遠心すると図1に示したごとくSVは0.4M層に回収され、可溶性分画と分離した。シナプトソーム分画を加圧破砕後、膜成分を除去(34,000g, 30min遠心)せずに密度勾配遠心すると0.6-0.8M蔗糖層間に神経終末形質膜が小胞状に回収された。SVは従来の方法(3)でも調製した。

ドーパ脱炭酸酵素活性測定。は Davis-Awapara(2), Laduron-Belpaire(4)法を併用した。標準反応液(1.0ml): 0.2M Na-phosphate, pH 6.9; 1mM L-DopA; 15μM ^{14}C-DopA (0.1μCi); 0.2mM B_6; 0.1mM pargyline; 0.1% TritonX-100 と酵素蛋白を含む。生成したDAはAmberlite CG-50 H^+, 又は n-butanol 抽出で分離後、液シン測定した。

ノルアドレナリンの測定 は Lund(5), von Euler-Floding(11)法に順じた。試料より0.4N過塩素酸抽出。pHを8.0にしアルミナに吸着したカテコラミンを酢酸抽出しTH工化後、蛍光測定した。395nm → 505nm。

その他の実験方法, 酵素活性測定はほぼ既報(6-9)通りに行なった。PAS染色法は Zacharius ら(13)の方法に従がった。

結果と考察

等張下で調製したシナプス小胞の性質。高圧窒素ガス細胞破砕法で調製した細胞質分画を図1の如く密度勾配分画すると、0.4M層に直径約450Åのシナプス小胞が回収される。殆どのシナプス小胞(SV)は顆粒を持たないが、同層下部からは内部に顆粒を持ったSV様小胞が観察された。このSV分画は Na^+,K^+-ATPase, NADPH → cyt.c還元酵素活性を少し示すのでミクロソームの混入が少量ある。MAO活性は殆どなかった。この分画のノルアドレナリン含量は5.6-8.4 ng/mg SV·protein であった。

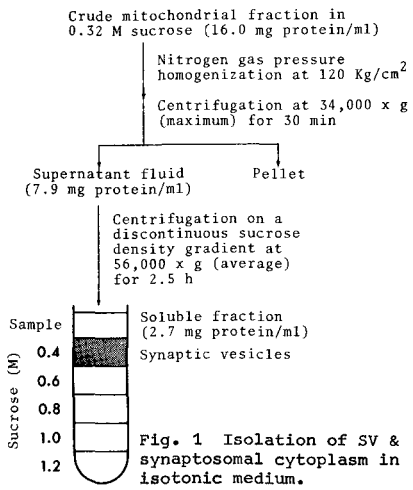


Fig. 1 Isolation of SV & synaptosomal cytoplasm in isotonic medium.

図2に示す様に、このSV分画は可溶性分画成分を含まない反応液中では ^{3}H·ドーパミンを、ATP-Mg^{2+}存在下で一過的に取り込む。この現象は牛脳SVと同様(9)で、牛脳の場合は約13倍に ^{3}H DAが濃縮された。この結果は高圧 N_2 ガス破砕器で得たSVは osmotically sensitive でDAを取り込む能力をまだ持っていることを示している。又、P_2の代りにシナプトソームを高圧破砕し膜成分を除去せずに密度勾配分画すると0.6-0.8M層間に神経終末形質膜胞が回収されることより、この方法はかなり mild に神経終末を破裂し得ると思われる。

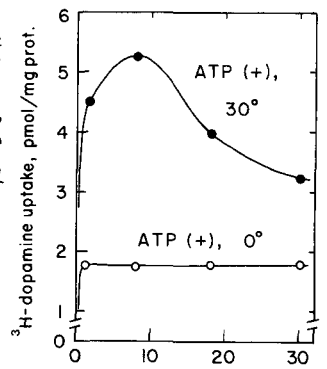


図2. 等張下で調製したSVによる ^{3}H·ドーパミンの取り込み。pH 7.0; 0.63mg 蛋白; 0.18μM DA; 0.25M 蔗糖

ドーパ脱炭酸酵素の分布。 神経終末細胞質分画は表Iの様にドーパ脱炭酸酵素活性を示しL-^{14}C·Dopa をL-^{14}C·DA に変えた。この細胞質分画を図1に従がって可溶性分画とSV分画に分離後、それ

それの酵素活性を調べると、前者に67%回収され、SVには2%であった。この酵素がcytosol酵素であることは既に認められている。又、カテコラミン顆粒より、ゆっくり軸索輸送されることも知られている。

Table I. Subcellular distribution of DOPA-decarboxylase

Fraction	Specific activity	Total activity	Recovery (%)
Synaptosomal cytoplasm	25.2 (40.5)	719 (1155.1)	100 (100)
Soluble cytosol	39.0 (53.0)	484 (657.2)	67 (57)
Synaptic vesicles	2.9 (8.0)	14.5 (40.0)	2 (3.5)

Values in the parentheses were obtained by n-butanol extraction (see Materials & Methods). Activity unit: Specific, nmol dopamine formed/mg protein/h; Total, specific x total protein.

新しく合成されたドーパミンのシナプス小胞への取り込み。

終末細胞質分画中でDAを合成(30°C, 20 min)後、上述の様に可溶性分画とSV分画とに分離した場合、新しく合成されたDAはSV分画中に回収されるだろうか？ 表IIに示した様に殆どのDAは可溶性分画に回収され、SV分画への取り込みは、3mM ATP-Mg^{2+}存在下でも認められなかった。表IIIの様に従来の方法(3)で調製したSV分画を上記細胞質分画に加え同様にDA合成後SV分画を分離しても、SV分画へのDA取り込みは認められなかった。単離精製したSVでDAの顆粒内への貯留・保持が認められなかったのは(9)、必須因子が精製中に除去されたとも考えられたが、今回の実験でその可能性は少なくなったと思われる。

Table II. Subcellular distribution of the newly formed dopamine

Fraction	Addition	Radioactivity (cpm/0.2 ml)*
Synaptosomal cytoplasm	ATP (-)	185
	ATP (+)	222
Soluble cytosol	ATP (-)	153
	ATP (+)	208
Synaptic vesicles	ATP (-)	22
	ATP (+)	17

* Values include the background radioactivity of about 16.0 cpm.

神経終末可溶性蛋白と^{3}H-ドーパミンの結合。

Table III. Uptake of the newly formed dopamine by synaptic vesicles

Fraction	Sample (cpm/0.2 ml)*	Sample (nmol DA)**	Blank (cpm/0.2 ml)*	Blank (nmol DA)**
Soluble cytosol	2630	132.0	1860	94.0
Synaptic vesicles	105	4.0	136	5.0

* Total volume of the extract was 1.2 ml. The values include the background radioactivity of 24-26 cpm.
** Dopamine (DA) formed under the experimental conditions.

新しく合成されたDAのSVへの速やかな移行が見られない原因として、可溶性分画成分とDAの結合が考えられるので、その可能性を検討した。図3に示した様に、SV成分分離後の可溶性分画(図1)を^{3}H-ドーパミンと反応後(0°C, 40 min) Sephadex G-25 カラムに通すと、この分画はSV分画に匹敵する量のDAを結合することが知られた(-●-)。又、5mM $CaCl_2$ (+3mM ATP)存在下では、この分画に結合しているDAは遊離することが知られた(-△-)。この可溶性分画のDEAEセルロース吸着成分ではDA結合量が6倍増大し(3.4 pmol ^{3}H-DA/mg prot. → 20 pmol/mg protein)、酸性蛋白の関与が考えられる。このDEAEセルロース吸着成分をpH 8.6でアクリルアミドゲル電気泳動(SDS含まず)すると、図4上図に示した様に

a,b 2本の主蛋白成分が観察された。しかし Bromophenol blue (dye) の位置にはカルモジュリンや S-100蛋白に相当する成分は見られなかった。又、成分 a,b,c は PAS 染色陽性であった(図5)。図4下図は DEAE 吸着成分の SDS-PAGEを示す。a,b両成分をそれぞれ単離し SDS-PAGE に掛けると各々図5 a,b が得られる。b は分子量 2.8～3.0 万前後の2成分からなると思われる。又、終末可溶性分画の 0～40%硫安飽和塩析分画には b 成分は含まれなかった。

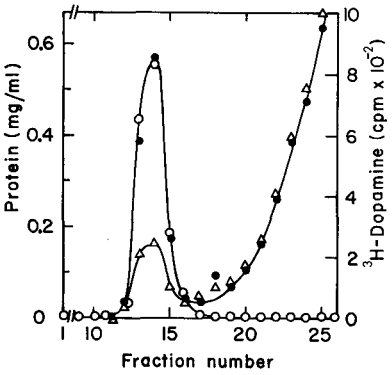


図3. ^{3}H-ドーパミンと可溶性分画の結合。

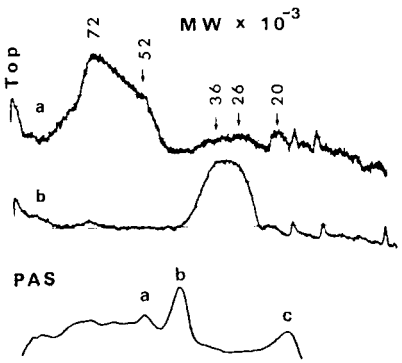


図5。a,b 成分の SDS-PAGE と PAS 染色。

これらの結果から神経終末細胞質には糖を含む酸性蛋白質が存在し、DAなどと結合しその細胞質プールを形成していると思われる。又、可溶性分画には顆粒から伝達物質を遊離する作用があると多数報告されているが、もしこの種の蛋白の作用を観ているとするならば、顆粒-伝達物質の結合より、蛋白-伝達物質間の結合の方が強いことになり、新しく合成されたDAは細胞質プールの飽和後に顆粒内へ取込まれると思われる。脱分極後に流入した Ca^{2+} はこの蛋白に作用し、結合型DAを遊離型に変えることによって、細胞質プールからのDAの放出を促進するのであろう。この点において伝達物質放出の Ca^{2+} 依存性があらわれると思われる。アセチルコリンの場合もカテコラミンの場合も、その受容体への結合はすべて Ca^{2+} イオンで抑制されることが知られているので、上述の現象自体は普遍的の様であり、コリン作働性神経についても充てはまるかも知れない。この仮説では"新しく合成されたDA が優先的に放出される"という結果 (1) を、顆粒説でよりもうまく説明できるようである (10)。

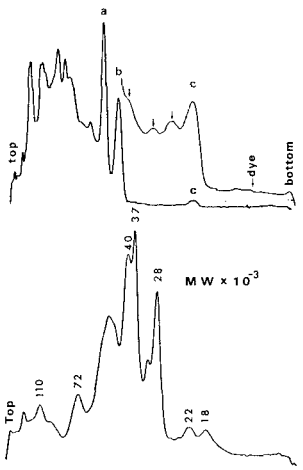


図4。DEAE成分の電気泳動

1) Besson, M.J., Cheramy, A., Feltz, P., & Glowinski, J. (1969) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S. 62, / 741-748
2) Davis, V.E. & Awapara, J. (1960) J. Biol. Chem. 235, 124-127
3) Kadota, K. & Kadota, T. (1973) J. Cell Biol. 58, 135-151
4) Laduron, P. & Belpaire, F. (1968) Anal. Biochem. 26, 210-218
5) Lund, A. (1949) Acta Pharmacol. 5, 231-247
6) Tsudzuki, T., Fujii, T., (1977) J. Biochem. 82, 709-717
7) Tsudzuki, T. (1979) J. Biochem. 85, 567-574
8) Tsudzuki, T. (1979) J. Biochem. 86, 777-782
9) Tsudzuki, T. (1981) J. Biochem. 89, 61-69
10) Tsudzuki, T. (1981) J. Biochem., in press
11) von Euler, U.S. & Floding, I. (1955) Acta Physiol. Scand., 33, Suppl. 118, 45-56
12) Whittaker, V.P., Michaelson, I.A., & Kirkland, R.J.A. (1964) Biochem. J. 90, 293-303
13) Zacharius, R.M., Zell, T.E., Morrison, J.H., & Woodlock, J.J. (1969) Anal. Biochem. 30, 148-152

104 大脳皮質除去ラットの脳幹部カテコールアミンの変動

野村正彦・大辻正高(保健衛生大・医・生理)
安達一真・神野哲夫(同・脳外)

〔要　約〕

頭部外傷や脳血管障害等によりひき起こされた重篤な脳障害は臨床的に予後が不良であるばかりでなく、生死にも関与する非常に複雑な問題が併い、脳の機能を考える上で重要であるが難解な課題である。そこで我々はラットに脳損傷のモデルを作製し、受傷後時間経過に伴う脳組織の生化学的変化と形態学的変化を検索した。脳損傷後に起こる脳実質の変化を経時的に追究する為に、ラットに大脳皮質除去術を行い、残された大脳基底核及び脳幹部の神経活動状態を知る1つの指標として、アミン作動性神経系の生化学的並びに形態学的変化を検索した。即ち大脳皮質除去後各週ごとに脳内ノルアドレナリン(NA)及びドーパミン(DA)を測定した。NA含有量は手術後 Diencephalon (D) 部では第1週でやや増加した。Mesencephalon(M)部では3・4週目で手術直後の対照の150%の値を示した。PonsとMedulla oblongata (P)部では減少の傾向を示した。一方 DA含有量はD部で3週目以降急激に増加し、対照の250%以上にも達した。M及びP部は全経過を通じて減少傾向を示した。

形態的にはカテコールアミン作動神経の螢光染色を行い、手術後のアミン作動神経の増減を検索して、アミンの含有量変化と比較検討した。

Key words : Decorticated brain, Noradrenaline & Dopamine.

重篤な脳損傷を来たした人の脳機能障害の本態を把握することは非常な困難が伴う。我々は実験動物に大脳皮質除去術を行うことにより脳損傷の1つのモデルを作製し、残された脳組織の生化学的並びに形態学的変化を、時間の経過に従って観察して、脳損傷後の機能喪失と回復の変化を検索した。脳機能の1つの指標としてカテコールアミン含有量の変化を、実際に脳組織を用いて定量し、またカテコールアミンニューロンの螢光染色により、アミン物質の局在並びに変動を顕微鏡下で検索した。

〔方法〕

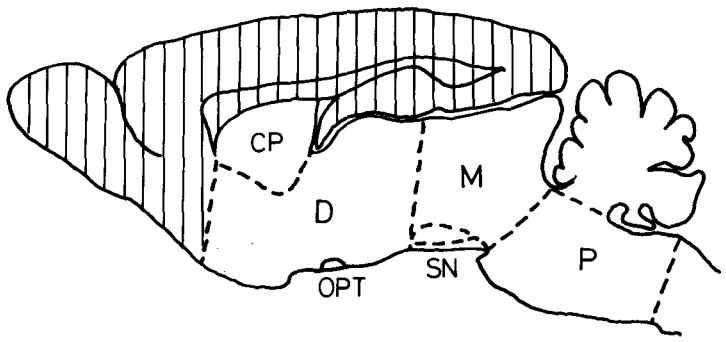
1. 実験動物：体重350g前後のWistarラットを使用した。ネンブタール麻酔下に、歯科用ドリルで頭蓋骨を切開し、手術用顕微鏡を用いて図1及び図2の如く、斜線の部分に示した両側大脳皮質の大部分をアスピレーターで吸引除去した。大脳皮質除去術を行ったラットは自発的に食餌摂取はしない為、経管を胃内へ挿管して、経管流動食であるハイネックスーRを溶解させたものを投与した。それぞれのラットは手術後最高6週令まで生存させて、各週ごとに脳を剔出して使用した。

2. 大脳皮質除去ラットの脳幹部カテコールアミンの定量：大脳皮質除去後1週毎にラットの脳を剔出し、氷上で大脳基底核及び脳幹部を3部位に分けた。

1) 中脳の上丘吻側端より吻側で Nucleus Caudatus-Putamen を含むD部
2) 中脳上丘吻側端と下丘尾側端までの部位で、四丘体及び中脳被蓋を含むM部
3) 下丘尾側端から延髄下部までの部位で、橋及び延髄を含むP部とした。

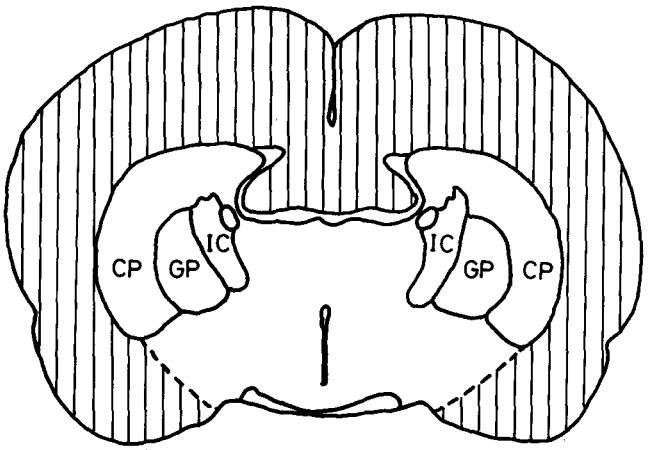
以上の3部位に分けた脳組織は10倍の過塩素酸でホモゲナイズ後遠心分離し、Dowex 50W カラムに吸着させ、Laverty & Taylor[2]の方法に準じてNA及びDA分画を分離

（図１）



L : 0.2mm
D : Dien cephalon
M : Mesen cephalon
P : Pons + Medulla oblongata
CP : Nucleus caudatus putamen
SN : Substantia nigra
OPT : Chiasma opticum

（図２）



A : 5.6mm
CP : Nucleus caudatus putamen
GP : Globus pallidus
IC : Capsula interna

した。各分画は螢光比色法によりそれぞれ定量した。大脳皮質除去術直後に断頭したラットの脳内ＮＡ及びＤＡ量を対照として、手術後各週経過後の値を比較した。

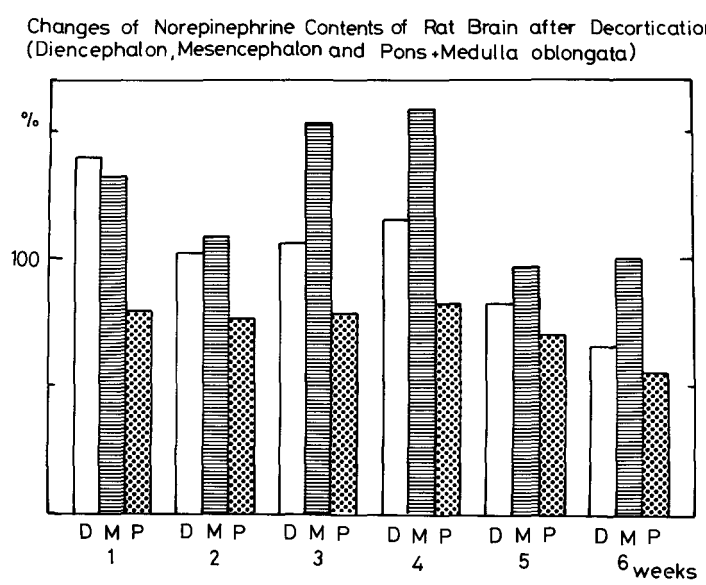
３．カテコールアミンニューロンの螢光染色法：大脳皮質除去術後３週間経過ラットを氷冷下グリオキシール酸で灌流[3]した後液体窒素下で凍結固定してカテコールアミンニューロンの螢光染色法を行った。そして減圧条件下で螢光顕微鏡で螢光強度を観察した。

〔結果〕

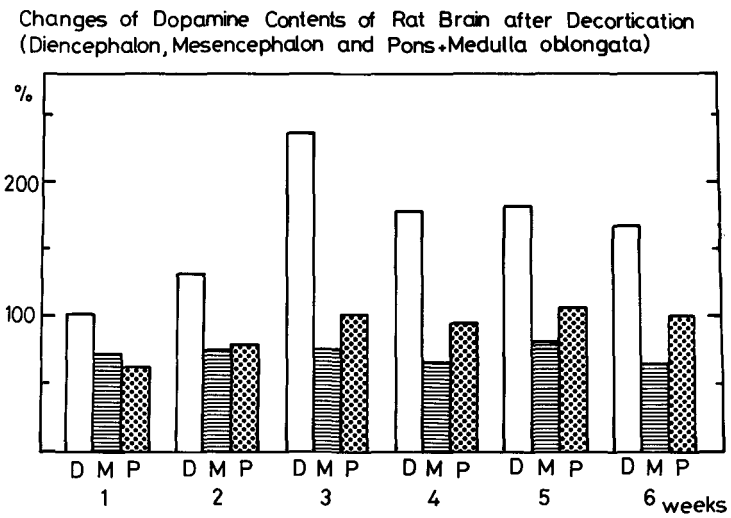
１．大脳皮質除去後の脳幹部カテコールアミン含有量の変化：

脳各部位の大脳皮質除去術後の各部位のＮＡの変動は図３の如く、Ｄ部では第１週目で増加を示したが、第２週目以降対照と同程度であり、第５週目以降減少を示した。次に、

（図3）



（図4）



M部では第1週目で増加を示したが、第3・第4週では著明な増加を示し、対照の150%値を示し、第5週目以後再び対照値にもどった。またP部では対照と比較して全経過中いずれも低値を示し、増加現象は認められなかった。

これに対して、DAは図4の如く、D部では第1週目では対照とほゞ同程度であったが、第2週目より増加の傾向を示し、第3週目では対照の250%値と最も高値を示し、第6週目まで高値のまゝ持続した。次にM部はいずれの期間でも低値を示したのに対し、P部では第1週、第2週目と低値を示したが、第3週目以降、ほゞ対照値と等しいという興味ある動向を示した。

2. 大脳皮質除去後の脳幹部カテコールアミンニューロンの螢光染色：

特に脳幹部カテコールアミンの変

動の大きかった第3週目をグリオキシール酸-ホルマリン法で固定後、カテコールアミンニューロンを螢光染色して見ると、青斑核のレベルではA5の螢光が正常の無処置群に比較して、増強していることが認められた。青斑核主部の螢光の増強は認められなかったが、青斑下核の螢光は増強している傾向を認めた。更に青斑核吻側端附近では外側傍腕核の螢光が増強を示していた。背側被蓋束の螢光の増強は認められなかった。

次に中脳のレベルでは上丘の表層に螢光の増強が認められ、下丘では広汎に繊細な螢光の増強を認めた。

間脳のレベルでは視床室傍核にも螢光の増強が認められた。

〔考察〕

重篤な脳損傷を来たした症例の神経伝達物質を測定する試みは今迄にもみられるが、臨床例では脳実質内の神経伝達物質を測定することが不可能であり、脳脊髄液中の伝達物質やその代謝産物を測定する程度にとどまる。我々は動物に脳損傷のモデルを作製し、その脳実質組織内の神経伝達物質を測定する実験系を作った。

カテコールアミンニューロンの軸索が損傷された場合切断された軸索の近位断端にカテコールアミンの蓄積が認められることがよく知られている。今回我々の実験例で認められたNA及びDA増量は上行性NA線維の終末であるD部及び黒質線状体DA系の終末であるD部で認められることはこの事実と関連している可能性がある。またM部におけるNAの増量もD部と同様の機序で説明され得るかは今後更に検討を要する問題である。

損傷を受けた後のカテコールアミンの軸索内貯溜は、損傷後早期に始まり、ほぼ12日間前後持続し、以後徐々に減少していくと言われている。一方Katzman等[1]はSprouting へのカテコールアミンの蓄積が損傷後4日で認められ、1週目後から3週間前後まで最も著明に認められ、以後7週でほぼ消退するとされている[4]。我々の認めたカテコールアミンの変動は前者の軸索内貯溜によるものなのか、また後者のSproutingによる変化なのかは尚詳細な検討が必要であるが、いずれにしろ損傷後のカテコールアミン変動は、神経機能の回復過程に何らかの関連性があることが考えられる。尚組織化学による螢光染色顕微鏡写真は当日供覧する。

謝辞：螢光染色始め、貴重な御助言をいただいた名古屋保健衛生大学・医学部・解剖学教室　清水信夫教授・磯村源蔵講師・兼松素子医師に感謝します。

文　献

1. Katzman,R. & Björklund,A. (1971) Brain Research, 25, 579.
2. Laverty,R. & Taylor,K.M. (1968) Analytical Biochemistry, 22, 269.
3. 前田敏博，清水信夫　(1978) 脳神経　30, 235.
4. Schett,L.S., Benardo,L. & Cotman,C. (1977) Science, 197, 795.

105 ラット脳各ドーパミン・ニューロン系のHVAへのhaloperidol慢性投与の影響

松本　孝・内村英幸・平野　誠・金　長寿・斉藤　雅
横尾秀康・下村　学(国立肥前療養所)・中原辰雄(九大・理)
大曲　清(佐医大・精神)・井上　桂(三重大・医・精神)

〔要　約〕

Haloperidol（0.2 mg/kg，1日2回，皮下注）の慢性投与によるラット脳内DAニューロンへの影響を，中枢各DAニューロン系を分離しHVAを指標にして検討した。中脳－辺縁系各DAニューロン系（側坐核，嗅結節，中隔，扁桃核），黒質－線条体DAニューロン系および膝上（supragenual）DAニューロン系（前部帯状回）には耐性が生じた。特に扁桃核のDAニューロン系には完全に耐性が生じることが見い出された。前頭前野の前内側（anteromedial）と嗅上（suprarhinal）DAニューロン系と視床下部のA14 DAニューロン系には耐性は生じなかった。他方，A12とA13 DAニューロン系のHVAは慢性投与にも全く反応しなかった。これらの結果から，抗精神病薬の抗精神病作用部位としての前頭前野，抗精神病薬による性腺機能異常とA14 DAニューロン系の関連，視床下部のA12, A13, A14 DAニューロンの制御機構の相異さらに分裂病者のストレスに対する過敏性は一部抗精神病薬により作り出されている可能性などについて論じた。

Key words : Homovanillic acid, tolerance, haloperidol

前々回，haloperidolの急性投与の影響をdopamine（DA）の代謝産物であるhomovanillic acid（HVA）レベルを指標にして，中枢各DAニューロン系で検討した。臨床的に、錐体外路症状などの副作用は、黒質－線条体DAニューロン系のDA代謝の変化に帰因していると考えられている。これらの副作用は、抗精神病薬の慢性投与により減衰するが，抗精神病薬の抗精神病作用およびプロラクチンなどのホルモン分泌への作用には耐性が生じない。これらのことから，中枢各DAニューロン系への抗精神病薬の作用の相異が存在する可能性が考えられる。しかし，各DAニューロン系を分離しては検討されていないので，HVAの微量定量法を用いて，各DAニューロン系へのhaloperidolの慢性投与（4週あるいは10週）の影響をHVAレベルを指標にして検討を加えた。

［実験方法］　Wistar-King雄性ラット（体重300-350g，生後2ヶ月）を用いた。Haloperidol投与群は，haloperidol（0.2 mg/kg）を1日2回（a.m.,p.m. 10:00）皮下注射したラットで4週間投与群と10週間投与群とに分けた。急性投与群は、salineを同様に1日2回投与し，最終投与時にhaloperidol（0.2 mg/kg, s.c.）を1回投与した。対照にはsalineのみ投与。最終投与2時間後に断頭した（p.m. 1:00～1:30）。断頭後すばやく脳を摘出し，-80°Cで1時間凍結後，クリオスタット（-12°C）で300μmの連続切片を作った。-20°C上のplate上におき，実体顕微鏡下で冷却したmicroknifeを用い，König & Klippel (9) およびLindvall ら(11)のアトラスによって，FCP：前頭前野極部（A12800-A11800），FCM：前頭前野内側部（A11300-A9800），FCL：前頭前野外側部(A11300-A9800)，ACC：前部帯状回皮質（A8920-A7890），AC：側坐核(A9410-A8620)，TO：嗅結節(A9820-A7890)，SP：中隔（A7890-A7470），AM：扁桃核(A4890

-A4110), CP：尾状核-被殻（A7690), Preo-A（A_{14} DAニューロン系，A7020－A5340), DM（A_{13} DAニューロン系，A4890－A4110), ARC-ME（A_{12} DAニューロン系，A4890－A4110）を切り出した（Fig. 1）。各試料は、－45°Cに冷却したmicrohomogenizerに入れ融解を完全に防いだ。各部位の蛋白量は、Lowryら(12)の方法で測定した。脳内HVAレベルは、mass fragmentography法により測定した(14)。

［結果及び考察］ 急性及び慢性haloperidol投与によるラット脳内各DAニューロン系におけるHVAレベルを測定した結果をTable 1に示した。Salineのみを投与したcontrolラット群及び最後の1回のみhaloperidolを投与した急性haloperidol投与群（中隔を除く）の各DAニューロン系のHVAレベルは、4週投与群と10週投与群の間に有意な違いはなかった。急性投与群のFCP (+145%), FCM (+161%), FCL (+208%), ACC (+171%), AC (+230%), TO (+179%), SP (+296%), AM (+171%), CP (+234%), Preo-A (+144%) においてHVAの増加がみられた。4週haloperidol投与群のACC (+85%), AC (+171%), TO (+89%), SP (+96%), AM (+79%), CP (+126%) のHVA増加率は、急性投与群よりも小さかった。さらに、10週投与群のACC, AC, TO及びCPのHVA増加率は，4週投与群よりも小さかった（順に，+55%, +62%, +68%, +111%）。特に，AM (+13%) のHVAレベルはcontrol値と有意な差はなかった。前頭前野の3部位（FCP, FCM, FCL）及びPreo－AにおけるHVAレベルは，急性投与群及び慢性投与群（4週及び10週間）との間に有意な差はなかった。DMとARC-MEのHVA増加は急性及び慢性投与群（4週及び10週間）でみられなかった。これらの結果から，前頭前野の3部位（FCP, FCM, FCL）及びPreo-Aには耐性が起こらないことがわかった。

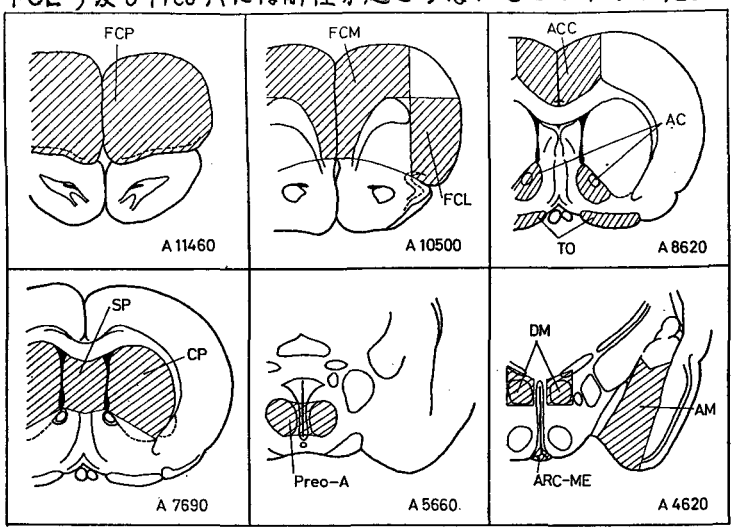


Fig. 1. Schematic drawings of the dissected areas. Frontal sections through mesocortical, mesolimbic, nigrostriatal dopaminergic terminals and incerto-hypothalamic dopaminergic neurons with the coordinates (in μm) after the atlas of König and Klippel (1963). The hatched areas represent the dissected areas. Abbreviations used: FCP, prefrontal cortex polar field; FCM, prefrontal cortex medial field; FCL, prefrontal cortex lateral field; ACC, anterior cingulate cortex; AC, nucleus accumbens, TO, tuberculum olfactorium; SP, septum; CP, nucleus caudatus putamen; Preo-A, anterior part of nucleus periventricularis, nucleus preoptic medialis + nucleus anterior; DM, medial zona incerta + nucleus dorsomedialis; ARC-ME, nucleus arcuatus + median eminence.

他方，haloperidol慢性投与で，ACC, AC, TO, SP, AM及びCPの部位のDAニューロンには耐性が生じることがわかった。黒質－線条体や一部の辺縁系DAニューロン系において，haloperidol慢性投与で同様な報告がされている(15,16)。ところが，Bacopoulosら(2)は、HVAを指標にしてサルを用いたhaloperidol慢性実験で，前部帯状回皮質（ACC）では耐性が生じないと報告している。実験に用いた動物の違いなどによるものであろう。

Haloperidol慢性投与によって，前頭前野では

Table 1. Effects of acute and chronic administrations of haloperidol on the HVA levels in the individual dopaminergic neuron systems of rat brain

Areas	Saline control	Haloperidol (0.2 mg/kg, twice daily, s.c.) Acute	Haloperidol (0.2 mg/kg, twice daily, s.c.) Chronic (4 weeks)	Saline control	Haloperidol (0.2 mg/kg, twice daily, s.c.) Acute	Haloperidol (0.2 mg/kg, twice daily, s.c.) Chronic (10 weeks)
A. Mesocortical dopaminergic terminals						
1. FCP	0.333 ± 0.004 (6)	0.846 ± 0.034 (7)[1]	0.824 ± 0.063 (6)[1]	0.355 ± 0.014 (6)	0.839 ± 0.015 (6)[3]	0.834 ± 0.009 (6)[3]
2. FCM	0.574 ± 0.042 (4)	1.487 ± 0.051 (6)[1]	1.347 ± 0.024 (6)[1]	0.521 ± 0.023 (6)	1.365 ± 0.025 (6)[3]	1.326 ± 0.039 (6)[3]
3. FCL	0.836 ± 0.016 (5)	2.568 ± 0.112 (8)[1]	2.406 ± 0.118 (8)[1]	0.809 ± 0.028 (12)	2.493 ± 0.066 (8)[3]	2.386 ± 0.063 (6)[3]
4. ACC	0.354 ± 0.011 (4)	0.913 ± 0.034 (8)[1]	0.654 ± 0.022 (8)[1,2]	0.359 ± 0.017 (4)	1.018 ± 0.080 (4)[3]	0.557 ± 0.027 (4)[3,4,5]
B. Mesolimbic dopaminergic terminals						
1. AC	5.903 ± 0.255 (4)	19.548 ± 0.408 (6)[1]	15.985 ± 0.157 (6)[1,2]	5.981 ± 0.048 (6)	19.693 ± 0.806 (5)[3]	9.695 ± 0.192 (5)[3,4,5]
2. TO	3.830 ± 0.033 (4)	10.360 ± 0.358 (6)[1]	7.223 ± 0.194 (6)[1,2]	3.854 ± 0.175 (6)	11.038 ± 0.840 (5)[3]	6.443 ± 0.196 (6)[3,4,5]
3. SP	1.097 ± 0.073 (5)	3.484 ± 0.075 (12)[1]	2.152 ± 0.046 (6)[1,2]	0.924 ± 0.023 (4)	4.190 ± 0.130 (10)[3]	2.350 ± 0.081 (6)[3,4]
4. AM	0.465 ± 0.021 (4)	1.212 ± 0.057 (8)[1]	0.833 ± 0.018 (7)[1,2]	0.474 ± 0.010 (4)	1.334 ± 0.123 (4)[3]	0.526 ± 0.033 (5)[4,5]
C. Nigrostriatal dopaminergic terminals						
1. CP	9.985 ± 0.094 (4)	33.064 ± 0.879 (6)[1]	22.545 ± 0.342 (6)[1,2]	9.816 ± 0.127 (4)	32.955 ± 0.653 (5)[3]	20.748 ± 0.340 (8)[3,4,5]
D. Incertohypothalamic dopaminergic neurons						
1. Preo-A	0.443 ± 0.035 (4)	1.086 ± 0.099 (10)[1]	1.003 ± 0.012 (4)[1]	0.421 ± 0.035 (4)	1.021 ± 0.048 (10)[3]	1.091 ± 0.091 (6)[3]
2. DM	1.003 ± 0.068 (4)	0.938 ± 0.015 (4)	0.940 ± 0.062 (4)	1.018 ± 0.039 (4)	0.988 ± 0.044 (4)	0.980 ± 0.024 (5)
3. ARC-ME	2.035 ± 0.087 (4)	2.006 ± 0.091 (4)	2.133 ± 0.101 (4)	2.024 ± 0.139 (4)	2.099 ± 0.132 (4)	2.024 ± 0.119 (4)

The results were expressed as the mean ± S.E.M. ng/mg protein (number of determinations). For abbreviations, see Fig.1. Statistical significance: [1]$p < 0.005$ compared to saline control (4 weeks). [2]$p < 0.005$ compared to acute haloperidol (4 weeks). [3]$p < 0.005$ compared to saline control (10 weeks). [4]$p < 0.005$ compared to acute haloperidol (10 weeks). [5]$p < 0.025$ compared to chronic haloperidol (4 weeks).

haloperidolの影響に対して耐性が生じないことはよく知られているが(1,8,10)，前頭前野の各DAニューロン系を区別して検討されていない。そこで，前頭前野のanteromedial (FCP, FCM)及びsuprarhinal (FCL) DAニューロン系へのhaloperidol慢性投与の影響を検討した結果，前頭前野(FCP, FCM, FCL)の両DAニューロン系ともに耐性が生じなかった。著者ら(13)は，ラットの前頭前野(anteromedialとsuprarhinal DAニューロン系)は，情動ストレスに最も関与しており，この領域が精神障害の病因に最も関与する部位である可能性を示唆した。さらに今回の結果から，前頭前野のDAニューロン系が，投精神病薬の主な作用部位であると考えられる。

視床下部不確帯DAニューロン系のPreo-A (A14 DAニューロン系)には，LH-RH (Luteinizing hormone-Releasing hormone)が存在し，性ホルモンなどのホルモン分泌に関与していると考えられている(7)。この部位でもhaloperidol慢性投与によって耐性が生じないことを見いだした。これは，抗精神病薬によって生じる無月経などの性腺機能異常と関連しているかもしれない。ARC-ME (A12 DAニューロン系)のHVAレベルは，haloperidolの急性及び慢性投与で影響を受けなかった。Feketeら(4)は，3,4-dihydroxyphenylacetic acid (DOPAC)レベルを指標にしてhaloperidol (0.5 mg/kg, i.p.)の影響を検討した結果，median eminence, nucleus arcuatus及びnucleus dorsomedialisではDOPACレベルには変化はなかったと報告している。他方，Gudelsky & Moore(5)は，α-methyl-p-tyrosineを用いてDA turnover rateを検討した結果，A12 DAニューロン系はhaloperidol (2.5 mg/kg)投与2時間目では変化なく，16時間目にDA turnoverが高まるため，中脳-辺縁系，黒質-線条体DAニューロン系に存在するneuronal

feedback loopとは異なり，ゆっくりしたhormonal neuronal feedback loopが存在すると報告している。最近，Gudelsky & Porter(6)は，haloperidol及びプロラクチン投与により，隆起－漏斗DAニューロン系から直接門脈にDA放出が促進され，プロラクチンはこのニューロン系からのDA放出を部分的に制禦していると報告している。A_{12} DAニューロン系では，DAは直接門脈に放出されると考えられるため，HVAはこのニューロン系でのDA代謝の変化を反映してないのかもしれない。DM（A_{13} DAニューロン系）でもHVAは変化しなかった。このメカニズムはわからないが，feedback loopが存在しないかもしれない。このように視床下部不確帯DAニューロン系のA_{12}，A_{13}及びA_{14} DAニューロン系の制禦機構はそれぞれ異なっていることが示唆される。

Haloperidol慢性投与によって最も耐性が生じやすいのは扁桃核（AM）であることを見い出した（10週間haloperidol投与ラットのHVAレベルは，control値とは有意な差はない。）。耐性は，DA受容体の数の増加によるもので(3)，受容体の過感受性の形成と関連していると考えられている(7)。著者らは，長期隔離飼育ラットを用いて，扁桃核のDAニューロンが心理的ストレスに敏感に反応することを前回報告した(13)。それで，抗精神病薬によって扁桃核のDA受容体の過感受性を作り出すとすれば，ストレスに過敏に反応することが考えられる。もしそうなら，臨床でみられる分裂病者のストレスに対する過敏性の一部は抗精神病薬によって作り出されたものかもしれない。

[文献]

1) Argiolas, A., Fadda, F., Melis, M.R., Serra, G. & Gessa, G.L. (1979) Brain Res. 175, 178.
2) Bacopoulos, N.G., Bustos, G., Redmond, D.E., Baulu, J. & Roth, R.H. (1978) Brain Res. 157, 396.
3) Burt, D.R., Creese, I. & Snyder, S.H. (1977) Science 196, 326.
4) Fekete, M.I.K., Herman, J.P., Kanyicska, B. & Palkovits, M. (1979) J. Neural Transmission 45, 207.
5) Gudelsky, G.A. & Moore, K.E. (1977) J. Pharmacol. Exp. Ther. 202, 149.
6) Gudelsky, G.A. & Porter, J.C. (1980) Endocrinology 106, 526.
7) Hynes, M.D., Valentino, D. & Lal, H. (1978) Neuropharmacology 17, 507.
8) Julou, L., Scatton, B. & Glowinski, J. (1977) Advan. Biochem. Psychopharmacol., vol. 16, eds. E. Costa & G.L. Gessa (Raven Press, New York) p. 617.
9) König, J.F.R. & Klippel, R.A. (1963) The rat brain, Williams & Wilkins Co., Bartimore.
10) Laduron, P., De Bie, K. & Leysen, J. (1977) Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol. 296, 183.
11) Lindvall, O., Bjorklund, A. & Divac, I. (1978) Brain Res. 142, 1.
12) Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L. & Randall, R.J. (1951) J. Biol. Chem. 193, 265.
13) 松本孝，内村英幸，平野誠，金長寿，斉藤雅 & 中原辰雄(1980) 神経化学 19, 390.
14) Matsumoto, T., Uchimura, H., Hirano, M., Kim, J.S., Nakahara, T. & Tanaka, K. (1981) J. Neurochem. (in press)
15) Nicolaou, N.M. (1980) Europ. J. Pharmacol. 64, 123.
16) Scatton, B. (1980) Advan. Biochem. Psychopharmacol. vol. 24, eds. F. Cattabeni, G. Racagni, P.F. Spano & E. Costa (Raven Press, New York) p. 31.
17) Wheaton, J.E., Krulich, L. & Mccann, S.M. (1975) Endocrinology, 97, 30.

106 メトアンフェタミンのドパミン作動性ニューロン終末に及ぼす影響

富樫俊二・和知　学・奥田正英
沢　政一(新大・医・精神,脳研神経化学)

〔要　約〕

メトアンフェタミン(MAP)のドパミン(DA)作動性ニューロン前シナプス部に及ぼす影響をみる目的で、ラット腹腔内にMAP 10 mg/kg/day を期間を変え投与し、DAニューロン終末の豊富な尾状核-淡蒼球(C-P)，辺縁系前脳部(L-F)，大脳皮質(Cortex)の3部位で、[^{3}H]-DA uptake 実験と[^{3}H] DA release 実験を行ない、比較検討し、次のような結果を得た。

(1) [^{3}H]-DA uptake sites は、対照群脳各部位で性状を異にし、Km は L-F > C-P > Cortex，Vmax は C-P > L-F > Cortex の順であった。(2) MAP急性投与の[^{3}H]-DA uptakeに及ぼす影響をみると、C-P，Cortex で Km，Vmax，の増大を惹き起こす。(3) MAP慢性投与の影響をみると、7日間投与では、脳各部位で変化が見られないが、21日間投与では、L-F で Km が増大し、C-P で Km, Vmax両値の増大を惹き起こす。(4) [^{3}H]-DA releaseは、対照群脳各部位で高K^+刺激放出で量的な差異を示し、MAP 急性投与では、対照群との間に[^{3}H]-DA自然放出及び高K^+刺激放出に差は認められなかった。

以上のように，MAPは、DAニューロン終末部の DA uptake sites に対して、部位により異なる反応を惹き起こすことが明らかとなった。

Key words : Methamphetamine, [^{3}H]-Dopamine uptake, [^{3}H]-Dopamine release

---

前回[5]我々はメトアンフェタミン(MAP)のDAニューロンシナプスレベルに及ぼす影響をみる為に、MAP 10 mg/kg/day を期間を変えて投与し、常動行動の評価を行ない、さらに[^{3}H]-spiperone radioreceptor assay を用いて neuroleptic receptorの変化について比較検討し報告した。今回は同じ条件下で、DA作動性前シナプスの変化をみる目的で、DAニューロン投射系終末を含む尾状核-淡蒼球(C-P)，辺縁系前脳部(L-F)，大脳皮質(Cortex)の3部位について、[^{3}H]-DA uptake と[^{3}H]-DA release実験を行ない，比較検討した。

〈実験方法〉

既に報告したように[5]，対象として Wistar系雄ラットを用い，MAP急性投与群と慢性投与群の2群に分けた。前者には、MAP 10 mg/kgを1回だけ腹腔内投与し、その1時間後に断頭した。後者には、同量のMAP 1日1回腹腔内に7日間，及び21日間投与し最終注射後それぞれ3日目に断頭した。対照群には、生食を同容量腹腔内に投与した。室温は約22°C とし、6時から18時を明期とする明暗条件下で飼育したラットを用いた。脳各部位の切り出しは、前回[5]の如く行ない，3部位に分けた。

① [^{3}H]-DA uptake 実験

取り込み実験は主に Koideらの方法[4]を参考にして行なった。切り出した各脳部位を20倍容の 0.32M蔗糖液内でテフロングラスホモゲナイザーを用いてホモゲナイズし、1000g，10分間遠心した。その上清を17000g，15分間遠心し、得られた沈渣を再度20倍容の 0.32M蔗糖液で懸濁し、同様条件で遠心し沈渣を得た。この沈渣を 0.32M蔗糖液で懸濁し、2 mg/mlのタンパク量になるように調整し、P_2分画とした。この P_2分画 50μlに 350μl の Krebs-Ringer(K-R) 液を加え、10分間プレインキュベーションを行ない

その後、50μlの 1.25×10^{-3} M Pargyline と 50μlの[^{3}H]-DA（最終濃度 0.015～0.3 μM）を加えた。反応は37℃或いは0℃で3分間インキュベーションして行ない、直ちに5mlの氷冷K-R液を加えて反応を止め、ワットマンGF/Fフィルター上で吸引沪過し、5mlの氷冷K-R液で2回洗浄した。フィルターの放射能を測定し、[^{3}H]-DAのactive uptakeは、37℃と0℃との差とした。

②[^{3}H]-DA release 実験

P_2分画50μl，K-R液450μl，[^{3}H]-DA（最終濃度 0.1μM）10μlを加え、37℃、15分間インキュベーションして[^{3}H]-DAを取り込ませ、4ml氷冷K-R液を加え反応を止め、20000g、15分間遠心し、その沈渣をK-R液で懸濁し、releaseの実験に用いた。1mlの注射器外筒の先端部にGF/Fフィルターを取り付けて作製したsuperfusion chamberに、[^{3}H]-DAを取り込ませた上記P_2分画懸だく液100μlを乗せ、37℃のK-R液をペリスタルティクポンプを用いて0.5 ml/min で灌流した。[^{3}H]-DAの自然放出を17分間みたのち、50 mMの高K^+溶液（等モルのNaClを減量）を用いて、高K^+による刺激放出を観察した。灌流液は、0.5ml/vial/minの割合でシンチラントの入ったバイアルに直接集めて分画した。各分画の放射能を合計したものと、フィルターに残った放射能を合わせたものをtotalの放射能活性とし、各分画をtotalに対する比率として表わした。

＜結果＞

①[^{3}H]-DA uptake 実験

a)[^{3}H]-DA uptakeの脳各部位における Kinetics

対照群のCortex，L-F，C-P，における[^{3}H]-DA uptakeをLineweaver-Burk plotして比較すると、図1に示すように、最大速度（Vmax）は、Cortexで小さく、L-F, C-Pの順に大きくなり、ミカエリス定数（Km）は、Cortexで小さく、C-P，L-Fの順に大きくなり、DA-uptakeの性状は、脳各部位において明らかな相違が認められた。

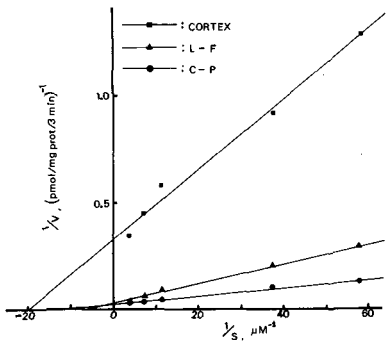


図1．対照群の脳各部位における[^{3}H]-DA uptakeのLineweaver-Burk plot

	Vmax (pmol/mg prot/3min)	Km (μM)
Cortex (n=9)	3.74±0.49	0.059±0.020
L-F (n=9)	22.3 ±3.1	0.124±0.010
C-P (n=9)	41.5 ±3.4	0.091±0.023

b) MAP 急性投与

MAP 10mg/kg 1回投与後1時間の影響をみると、図2のように、Cortex及びC-Pの両部位でKm，Vmaxの両値が有意に増加しており、一方L-Fにおいては、両値共に増加の傾向はあるが有意差はなかった。

c) MAP 慢性投与

MAP 10 mg/kgを7日間及び21日間投与し、最終投与3日後の影響をみると、図3に示すように、7日間投与群においては、脳各部位でKm，Vmaxの両値に有意な差は認められなかった。しかし、21日間投与群では、C-PでKm，Vmaxの両値が有意に増大し，L-Fでは、Vmaxに変化ないが、Kmが有意に増大していた。一方Cortexでは、両値共に有意な差は認められなかったが、Vmaxが減少傾向にあ

った。

2. [³H]-DA release 実験

対照群の Cortex, L-F C-P の3部位における [³H]-DA release をみてみると、図4に示すように、[³H]-DA の自然放出には脳各部位で差は認められないが、高 K⁺刺激に対する [³H]-DA の放出には量的に差が認められ、C-P で大きく、L-F, Cortex の順に小さくなる。

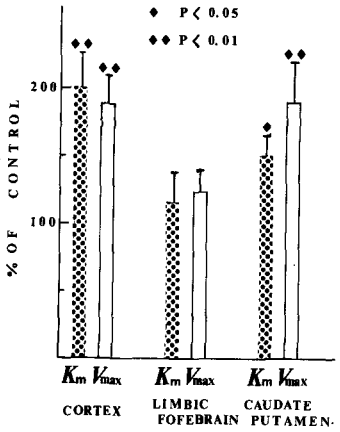


図2. MAP急性投与群の脳各部位における Km 及び Vmax (% of control で示す。)

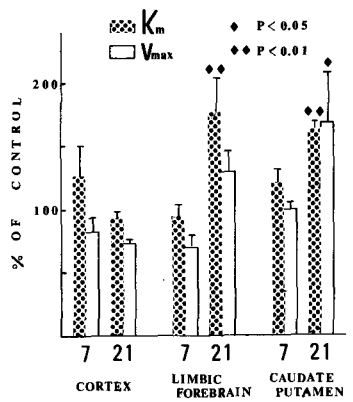


図3. MAP慢性投与群の脳各部位における Km 及び Vmax (% of control で示す。)

MAP 10 mg/kg 1回投与後1時間の [³H]-DA release に及ぼす影響をみると、図4に示す如く、自然放出及び高 K⁺刺激では、対照群との間に差は認められなかった。尚、MAP の慢性投与については、現在検討中である。

〈考察〉

[³H]-DA uptake 及び release に関して、in vitro における覚醒アミンの影響を調べたものは多くみられる[1,3,6,7]。しかし、MAP の反復投与による DA ニューロン終末での変化を調べたものは少ない。

さて、今回の [³H]-DA を用いた uptake の実験結果をみると、正常ラット脳各部位で、Vmax は C-P > L-F > Cortex の順となり、一方 Km は L-F > C-P > Cortex の順で部位間に差が認められた。Vmax は DA の取り込み部位数、即ち DA ニューロン終末の分布密度を示し、Km は DA 取り込みに対する親和性を示すとされるので、脳各部位によって DA 取り込みの性状が異っていると考えられる。Snyder ら[8]も、ラット脳各部位での [³H]-DA uptake を調べ、線条体の Km, Vmax は視床下部、大脳皮質などのそれよりも大きいことを報告している。又、Horn ら[2]も正常ラットを用い、in vitro で [³H] DA uptake に対する d, l-Amphetamine の阻害を調べ、IC_{50} が線条体、側坐核、嗅結節で異なることを報告している。

次に、MAP の [³H]-DA uptake に及ぼす作用を考えてみると、図2のように MAP 10 mg/kg 1回投与後1時間で既に C-P, Cortex で Km の増大を起こして DA に対する親和

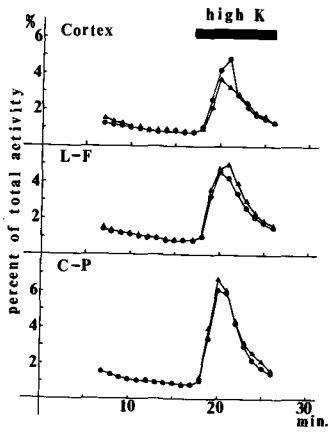


図4. 対照群及び MAP 投与群の脳各部位における [³H]-DA release
● : MAP投与群
▲ : 対照群

性を低下させる一方，Vmaxを増大させて uptake site を増加させている。これは一種の代償的な機構が働いているものと推測される。MAPを慢性に投与した場合をみると，MAP 7日間投与では，いづれの部位においても目立った変化は認められなかった。しかし，21日間 MAPを投与した時には，L-Fにおいて Km の増大が起こっている。これは，DA 取り込みに対する親和性を低下させ，その結果，DAシナプス間隙のDA量を増加させているのではないかと解釈される。C-P では，Kmと共にVmaxも増大しており，この部位では一種の代償的なメカニズムが働いているものと思われた。このように，MAP を反復投与した場合も，部位間にMAP反応性の相違が存在する。Wagnerら[9]は MAP 12.5 mg/kg/day 4日間投与では，Vmax，Km に変化があらわれないが，50 mg/kg/day 以上4日間投与で C-P の Vmax が減少することを報告している。我々の場合は，10 mg/kg/日 7日間投与で Vmax，Kmに変化はあらわれないが，21日間の長期になると結果にみられるような変化があらわれてきた。これはMAPの投与期間の相違にもとづくものと思われる。又，Wagner らの結果はMAP投与後 2~3週経過した時のもので，drug-free の期間の長さも影響していると考えられた。

一方，[3H]-DA release についてみると，図4のように，50mM 高K刺激に対する [3H]-DA release は，部位間で量的な差が認められた。又 MAP の [3H]-DA release に及ぼす影響を対照群と比較してみると，図4の如く，MAP 10 mg/kg 1回投与後1時間の時点では，対照群との間に差が認められなかった。

以上のように，MAP は，DAニューロン終末部の DA uptake site に対して，部位により異なる反応を惹き起こすことが明らかとなった。

おわりに本研究を御指導下さった新潟大学脳研究所神経化学の佐武明教授に深謝いたします。

〈文献〉

(1) Harris, J.E. and Baldessarini, R.J. (1973) Neuropharmacology 12, 669-679

(2) Horn, A.S., Cuello, A.C. and Miller, R.J. (1974) J. Neurochem. 22, 265-270

(3) Hunt, P., Raynaud, J.-P., Leven, M. and Schacht, U. (1979) Biochem. Pharmacol. 28, 2011-2016

(4) Koide, T. and Uyemura, K. (1980) Eur. J. Pharmac. 62, 147-155

(5) 奥田正英，和知学，富樫俊二，沢政一(1980) 神経化学 19, 370-373

(6) Raiteri, M., Cerrito, F., Cervoni, A.M., Carmine, R., Ribera, M.T. and Levi, G. (1978) Advances in Biochemical Psychopharmacology (Roberts, P.J., Woodruff, G.N. and Iversen, L.L., eds.) Vol. 19, pp. 35-56, Raven Press, New York

(7) Schwarz, R.D., Uretsky, N.J. and Bianchine, J.R. (1980) J. Neurochem. 35, 1120-1127

(8) Snyder, S.H. and Coyle, J.T. (1969) J. Pharmacol. Exp. Ther. 165, 78-86

(9) Wagner, G.C., Ricaurte, G.A., Seiden, L.S., Schuster, C.R., Miller, R.J. and Westley, J. (1980) Brain Research 181, 151-160

107 コイ網膜インドールアミン蓄積細胞の役割について

加藤　聖・根岸晃六
（金大・医・神経情報研・伝達）

〔要　約〕

コイ網膜ドーパミン作働性ニューロンとインドールアミン蓄積細胞とを、flat-mount標本にて蛍光顕微鏡下で観察し、全網膜野に亘り、両者の細胞密度を測定したところ、両種の細胞はいずれの部位においてもほぼ同数即ち、1：1に存在していた。この事実が単なる偶然なのか、あるいは、両者の間に、何か機能的連関があるのかを調べるため、[^{3}H]-DA及び[^{3}H]-5-HTの放出を指標に、相互の関連を検索したところ、[^{3}H]-DAの放出が5-HT (5×10^{-4} M) により約200%促進され（5-HTの最小有効濃度は10^{-7} Mのオーダーであった）、一方[^{3}H]-5-HTの放出にはDAは何ら効果がなかった。この5-HTによる[^{3}H]-DA放出の促進効果は、5-HTのagonistsである、5-MTやN,N-DMTにより更に促進的(220～240%)であった。また前駆物質である5-HTPや代謝産物である5-HIAAでは無効であった。しかしながら、この5-HTによるDA放出の促進は、antagonistsであるmetergoline、methysergid、spiperon (10^{-7}～10^{-4} M) の共存下でも拮抗されなかった。これらの実験結果より網膜内での5-HT (IA-cells)の役割について考察を加えたい。

Key words：　fish retina、DA-cells、IA-cells、DA、5-HT

網膜内モノアミン作働性ニューロンとして、ドーパミン性ニューロン (DA-cells) の存在はよく知られているが (3、4)、インドールアミン作働性ニューロンの存在は蛍光組織学的には報告されていない。その理由として網膜5-HT含量が甚だ少ないためであろうと考えられている。しかし、近年Ehingerらにより、ある種の脊椎動物網膜（サル、ウサギ、ハト、金魚etc.）では、外来性に与えたインドールアミン類を特異的に取り込むindoleamine-accumulating cells (IA-cells) の存在が指摘され、彼らによればDA-cellsとIA-cellsは共にアマクリン細胞層に局在するも、明らかに異なる形態学的特徴を有することが報告されている (1、2)。その後網膜内5-HT含量の測定 (11) や、高親和性取り込みや高k^+刺激による遊離放出といった神経化学的研究 (9、12) が報告され、網膜内での5-HTの神経伝達物質としての可能性が示唆され現在にいたっているも、その機能的役割については不明の点が多い。そこで今回我々はコイ網膜でのDA-cellsとIA-cellsとの形態学的観察と相互の[^{3}H]ラベルの放出に及ぼす影響とを合わせ比較検討したので報告する。

（実験方法）

1．蛍光組織化学

成熟コイ (600～800 g) を用い、5 μgのDAと5,6-DHT混合液を眼球内に注射し、2時間後に網膜を摘出し、ホルムアルデヒド溶液に一昼夜固定後、網膜伸展標本、云わゆるflat-mount (6)を作り、DA-cellsとIA-cellsを全網膜野に亘り細胞密度を調べた。また時に15～20 μの凍結切片を作製し観察に供した。

2．[^{3}H]-DA及び5-HTの遊離放出

既報(4)に従い網膜標本を作製し、[^{3}H]-DA及び5-HTのpreloadを行なった。コイ網膜を0.3 Mショ糖溶液にホモゲナイズした後、150 xg 5分間遠心後、その上清を15000 xg 15分間遠心、その沈査をfish Ringerでよく洗いsuspendし再び遠心、この操作を2回繰り返し、その沈査をretinal fraction(タンパク濃度は約250 μgに調整)として使用した。最終濃度0.1 μMの[^{3}H]-DA及び5-HTを22°C, 20分間取り込ませ、反応を冷Ringerにて停止させ、ミリポアフィルター上に展開し、superfusion法により、4分間のintervalでvacuumにより吸引しバイアルビンに集め、その放射活性をカウントした。なおメディウムは、すべて22°C、97% O_2 + 3% CO_2 のガス通気を行なった。

Table I

Regions	"c"	"i"	"p"	"m"
DA-cells	43 ± 4	43 ± 6	76 ± 11	125 ± 12
IA-cells	43 ± 6	41 ± 5	80 ± 11	131 ± 18

mean ± SD (n = 7)

略語：DA, dopamine ; 5,6-DHT, 5,6-dihydroxytryptamine ; 5,7-DHT, 5,7-dihydroxytryptamine ; 5-HT, 5-hydroxytryptamine ; 5-HTP, 5-hydroxytryptophan ; 5-HIAA, 5-hydroxyindole acetic acid ; 5-MT, 5-methoxy-tryptamine ; N,N-DMT, 5-methoxy-N,N-dimetyltryptamine ; 6-OHDA, 6-hydroxydopamine.

(結　果)

1. DA-cellsとIA-cellsの網膜内分布

DA-cellsは緑色の蛍光を発しかつ大型の胞体を有し、IA-cellsは黄色の蛍光を発しDA-cellsに比し小型の胞体を有していた。またDA-cellsとIA-cellsはそれぞれ、特異的なneurotoxinである6-OHDAや5,7-DHTにより容易に選択的に破壊された(7)。Table Iに示す通り、両者の細胞数は、網膜の中心(optic disc)より周辺に行くに従い、次第にその数を増したが、いずれの部位においても常に両者の細胞数はほぼ同数であった。両者の機能的連関を調べるため、[^{3}H]ラベルDA及び5-HTの放出に及ぼす影響を以下検索した。

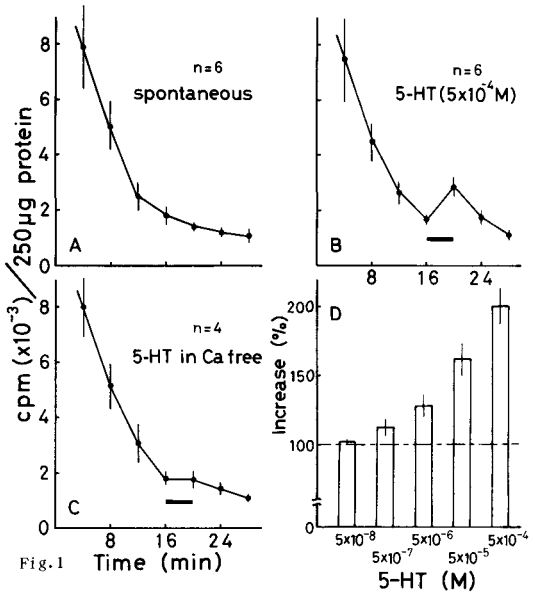


Fig.1

2. [^{3}H]-DA遊離放出

Fig. 1Aはfish Ringerによる[^{3}H]-DAのpassive effluxを示したもので、明らかにrapid phaseとslow phaseとが見られた。そこで以下薬物の影響は、すべて16～20分目のslow phase下で調べた。5-HT (5×10^{-4} M)を表面灌流すると、[^{3}H]-DAの放出は約200%に上昇し(Fig. 1B)、これにはCa^{2+}を必要とした(Fig. 1C)。また、5-HTの促進効果の最小有効濃度は10^{-7} Mオーダーであり、5-HTの濃度が増すにつれ、ほぼ直線的に[^{3}H]-DA放出の増大を来たした(Fig. 1D)。次いで5-HTの代表的agonistである5-MT、N,N-DMT、Tryptamine (5×10^{-4} M)では[^{3}H]-DA放出は約220～240%増大し、

5-HT それ自身よりも効果的であった (Fig. 2A)。 更に antagonist の metergoline、methysergid、cyproheptadine、spiperon の共存下に 5-HT の影響を見たところ、cyproheptadine を除きいずれも 5-HT の促進効果を抑制しなかった (10^{-7}～10^{-4} M, Fig. 2B)。 一方 cyproheptadine はそれ単独で著しい DA 放出を引きおこした。また IA-cells の特異的な neurotoxin である 5,6-DHT や 5,7-DHT は殆ど無効であり (Fig. 2C)、また 5-HT の前駆物質である tryptophan や 5-HTP は全く無効であり、網膜 5-HT の主な代謝産物である 5-HIAA はわずかに遊離を促進したにすぎなかった (Fig. 2D)。

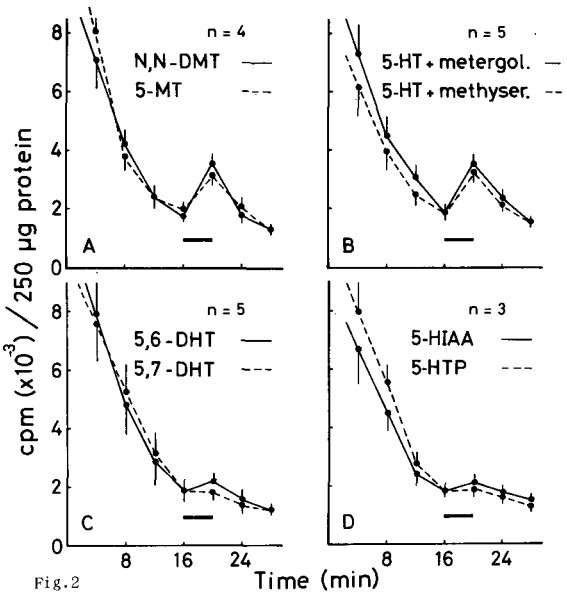


Fig.2

3. [^{3}H]-5-HT 遊離放出

[^{3}H]-DA と同様な実験を [^{3}H]-5-HT を用いて行なったが、DA (10^{-7}～5×10^{-4} M) は何らその放出に影響を及ぼさなかった (Fig. 3)。

(考 察)

DA-cells と IA-cells との網膜内での分布が常に 1 : 1 であることより、両者の相互連関を想定し、両者の [^{3}H] ラベルの放出に及ぼす影響を検索したところ、5-HT により [^{3}H]-DA の放出が約 2 倍に促進されることを見いだした。Ca^{2+} の依存性のあること、その最小有効濃度が 10^{-7} と低いこと、及び 5-HT agonist でより促進的であること、また組織化学的には、高濃度の 5,6-DHT は容易に DA-cells に取り込まれるも (8)、[^{3}H]-DA 遊離に対して、5,6-DHT は殆ど無効であることより、この 5-HT の [^{3}H]-DA 放出の促進効果は単なる exchange の現象ではなく、receptor を介した mechanism によるものと考えられる。しかしながら、今回用いた antagonist が全て、5-HT の効果を抑えなかったことについては、網膜における 5-HT の antagonist としては、これらはいずれも不適当なのか、あるいは Snyder ら (10) の云うところの 5-HT receptor の multiplicity (5-HT_1、5-HT_2) のためによるものなのか、あるいは他の原因によるものなのか現在のところ不明である。

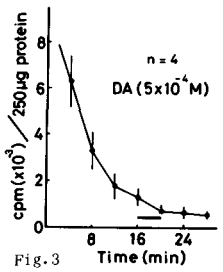


Fig.3

この研究の一部は、文部省科学研究費の援助のもとに行なった。

(参考文献)

1. Ehinger, B., and Floren, I. (1976) Cell Tiss. Res. 175 : 37～48.

2. Ehinger, B., and Floren, I. (1980) Neurochemistry 1 : 209～229.

3. Häggendal, J., and Marmfors, T. (1965) Acta physiol. scand. 64 : 58～66.

4. Kato, S., Kuriyama, K., Ito, Y., Teranishi, T., and Negishi, K. (1981) Vision Res. 21 : 1189～1192.

5. Kato, S., Nakamura, T., and Negishi, K. (1980) J. Comp. Neurol. 191 : 227～236.

6. Negishi, K., Drujan, B., and Laufer, M. (1980) J. Neurosci. Res. 5 : 621～635.

7. Negishi, K., Kato, S., and Teranishi, T. (1981) Neurosci. Lett. 25 : 1～5.

8. Negishi, K., Teranishi, T., and Kato, S. (1981) Acta histochem. cytochem. (in press).

9. Osborne, N. N. (1980) Brain Res. 184 : 283～297.

10. Peroutka, S. J., and Snyder, S. H. (1979) Molec. Pharmacol. 16 : 687～699.

11. Suzuki, O., Noguchi, E., Miyake, S., and Yagi, K. (1977) Experientia 33 : 927～928.

12. Thomas, T. N., and Redburn, D. A. (1979) Exp. Eye Res. 28 : 55～61.

108 急性ストレス下のラット脳内ノルアドレナリン含量維持に対する下垂体副腎皮質系の役割

中川良一・田中正敏・河野康子・井田能成
飯盛健一郎・帆秋善生・長崎信行
（久留米大・医・薬理）

〔要　約〕

急性ストレス下の脳内noradrenaline(NA)含量維持に下垂体副腎皮質系が果す役割を検討するために、拘束下でラットの尾に電撃を負荷するというストレス状況下での脳内NA含量とその主要代謝産物である3-methoxy-4-hydroxyphenylethyleneglycol sulfate (MHPG-SO4)含量の変化を指標として次の結果を得た。視床下部，扁桃核，基底核，中脳のストレスによるMHPG-SO4含量の増加は副腎摘除ラットで抑められたが、corticosteroneの補充的な投与によりその増加は抑制された。このようなMHPG-SO4含量の変化に対応したストレスによるNA含量減少の副腎摘除による増強とcorticosterone投与による抑制は視床下部でのみみとめられた。一方、視床ではストレスによるNA含量減少とMHPG-SO4含量増加はともに副腎摘除により増強されたが、corticosterone投与はNA含量のみを抑制した。また橋延髄ではストレスによるNA含量減少は副腎摘除により増強したが、MHPG-SO4含量増加は変化をうけなかった。以上の結果より、下垂体副腎皮質系を介して分泌された糖質コルチコイドが急性ストレス状況下におけるNA含量維持機構のひとつとしてNA放出の抑制を介して働いている可能性がまず考えられるが、それとは別の、多分NA合成の促進を介した作用も有しているものと推察される。

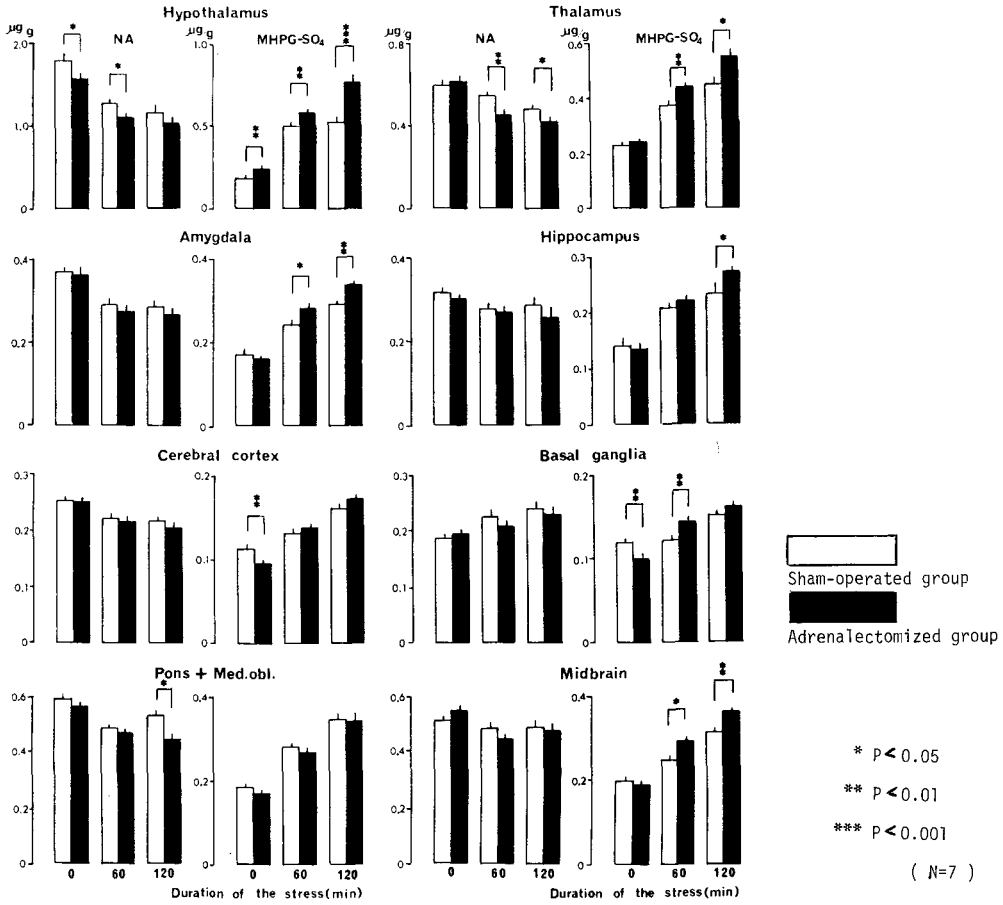
Key words : Brain noradrenergic neurons　Pituitary-adrenocortical system
Acute combined stress

種々のストレスが脳内noradrenaline(NA)系ニューロンの活動性を高めることはよく知られている[9]。演者らは拘束下ラットに電撃を負荷するというストレス状況下で脳内各部位のNA含量とその主要代謝産物で、ラット脳のNA放出を反映しているといわれる3-methoxy-4-hydroxyphenylethyleneglycol sulfate(MHPG-SO4)含量の経時的変化を観察した[7]。その結果、視床下部，扁桃核において持続的なNA放出の亢進を示すMHPG-SO4含量の増加が生じたにもかかわらず、NA含量はある一定の減少後維持された。このようなNA含量維持の調節機構として、ストレスに対する内分泌反応として知られる下垂体副腎皮質系が何らかの役割を演じている可能性が考えられる。今回この点を明確にするために、以上のストレス状況下での脳内各部位のNAおよびMHPG-SO4含量の変化に対する副腎摘除とこれに糖質コルチコイドを補充的に投与した場合の影響を検討した。

＜実験方法＞

Wistar系雄性ラットをsham-operationをうけた群、副腎摘除をうけた群、副腎摘除下でcorticosteroneを投与された群の3群に分けた。Sham-operationと副腎摘除は実験の10日前に施行し、摘後副腎摘除をうけたラットには0.9%食塩水を与えた。体重が250-300gとなったものにcorticosterone (Sigma.Co.)をolive oilに懸濁して100mg/kg皮下投与し、その他にはvehicleを投与した。2時間後，各ラットを3×3mmの網目の金網で拘束固定し、その尾に電極を装着し、それより15Vの電撃を5秒間，30秒間隔で負荷した。ストレスの持続時間は各々60，120分間とし、解放後ただちに断頭した。その後すみやかに脳をとり出し、Gispenらの方法[5]にもとづいて氷上にて視床下部，

Fig.1 Effect of adrenalectomy on contents of NA and MHPG-SO4 in eight brain regions of the rat during acute combined stress.

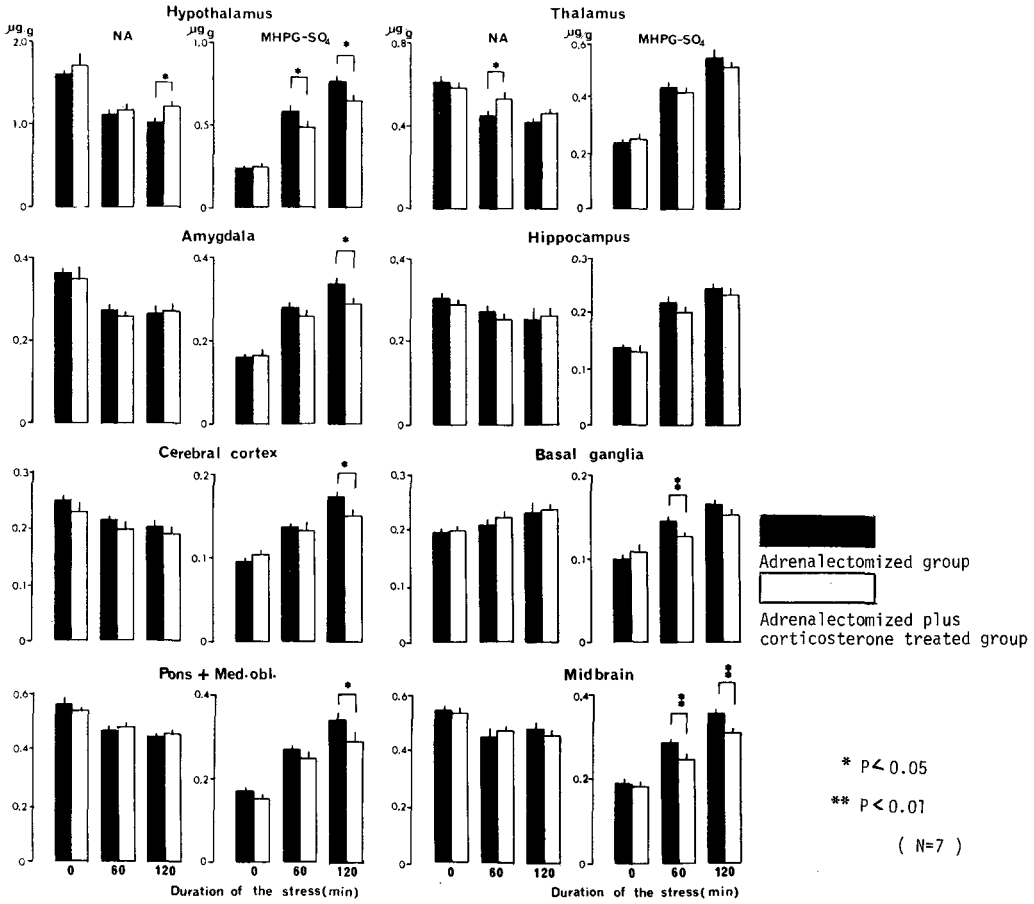


視床，扁桃核，海馬，大脳皮質，基底核，橋延髄，中脳の8部位に分割し −40°C で凍結保存した。脳内各部位のNAおよびMHPG-SO4含量の測定は Kohno らの方法[6]により2個のサンプルを pool して行った。統計学的処理は Student の t-test（両側検定）を適用した。

< 実験結果 >

ストレスによるNA含量の減少は副腎摘除により視床下部で60分に、視床で60, 120分に有意に強められ、同時にこれらの部位ではMHPG-SO4含量の増加も有意に増強された（Fig.1）。一方 corticosterone 投与により、このようなNA含量の変化は視床下部で120分、視床で60分に有意差をもって抑制されたが、視床下部ではMHPG-SO4含量増加の有意な抑制をともなうのに対し視床ではその含量は影響されなかった（Fig.2）。その他の部位では、ストレスによるMHPG-SO4含量の増加が副腎摘除により扁桃核，中脳で60, 120分に、基底核で60分に、海馬で120分に有意に増強し（Fig.1）、corticosterone 投与に

Fig.2 Effect of corticosterone treatment on contents of NA and MHPG-SO4 in eight brain regions of adrenalectomized rats during acute combined stress.



よりこれらの変化は中脳で60,120分に、基底核で60分に、扁桃核で120分に有意に抑制された(Fig.2)。これに対して、以上の各部位でのNA含量の変化はMHPG-SO4含量の変化に対応せず副腎摘除による増強もcorticosterone投与による抑制もうけなかった。ただ橋延髄では副腎摘除によりストレス負荷120分でのNA含量減少が有意に増強されたが、この時MHPG-SO4含量は影響されなかった(Fig.1)。

<考　察>

今回の実験で視床下部において副腎摘除によりNA含量の減少とMHPG-SO4含量の増加がともに増強され、corticosteroneの投与によりこのようなNAおよびMHPG-SO4含量の変化に対する副腎摘除の影響は抑制された。この所見は下垂体副腎皮質系を介して分泌された糖質コルチコイドが視床下部でのNA放出を抑制し、その結果ストレスによるNA含量の減少を阻害した可能性を示唆している。また扁桃核,基底核,中脳でも副腎摘除により増強されたMHPG-SO4含量の増加がcorticosteroneの投与により抑制された。

このようにストレス下での副腎摘除による脳内NA放出の亢進が糖質コルチコイドにより抑制されることは Endröczi らの報告[2]でも示されているが、その作用機序に関しては一定の見解は得られていない。多分、脳内NA代謝回転を促進させ、ラットの情動反応の中で恐怖を高めるといわれるACTHを介する作用[3,11]、ストレス下のACTH分泌に対して抑制的に働くといわれる視床下部や中脳を中心とするNA系ニューロンの反応の結果[4]から説明されるかも知れない。

一方、視床では副腎摘除によるNA含量減少の増強がcorticosterone投与により抑制されたが、この時視床下部とは異なりMHPG-SO4含量の増加は抑制されなかった。この事実は、この部位でのストレスによるNA含量減少に対して糖質コルチコイドがNA放出の抑制以外に別の作用をもって阻害的に働いている可能性を示唆しているのかも知れない。また橋延髄で副腎摘除によるNA含量減少の増強がMHPG-SO4含量増加への影響をともなわずに生じた所見からも以上の可能性は支持される。一般に脳内NA含量はその放出と合成のバランスで規定されており、ストレスにより共に亢進することが示されている。特にThierry ら[10]によると急性ストレス下では新しく合成されたNAが選択的に利用されて放出によって減少したNA含量を補充するという。下垂体副腎皮質系のこのようなNAの合成過程への影響に関しては、その合成酵素であるtyrosine hydroxylase[1]やdopamine-β-hydroxylase活性[8]に対する糖質コルチコイドの促進的効果を示す報告がみとめられている。

以上より、下垂体副腎皮質系を介する糖質コルチコイド分泌は、急性ストレス下の脳内NA含量維持に対してNA放出を抑制することにより働いているものと考えられるが、それとは別の作用も有しているものと推察され、可能性としてNA合成の促進を生じるのかも知れない。

*本研究は 8th International Congress of pharmacology (Tokyo) にて発表した。

<文 献>

1. Dunn,A.J.,Gildersleeve,N.B.and Gray,H.E.(1978) J.Neurochem. 31,977-982
2. Endröczi,E.,Hraschek,A.,Nyakas,Cs and Szabó,G.(1976) Endokrinologie 68,51-59
3. Fuxe,K.,Hökfelt,T.,Jonsson,G.,Lindbrink,P. and Lofström,A.(1973) Brain-Pituitary-Adrenal Interrelationships(Bradish,A.and Regdate,E.S.,eds) pp.239-269 Karger,Basel
4. Ganong,W.F.(1977) Ann.N.Y.Acad.Sci. 297,509-517
5. Gispen,W.H.,Schotman,P.and de Kloet,E.R.(1972) Neuroendocrinology 9,285-296
6. Kohno,Y.,Matsuo,K.,Tanaka,M.and Nagasaki,N.(1979) Analyt.Biochem. 97,352-358
7. Nakagawa,R.,Tanaka,M.,Kohno,Y.,Noda,Y.and Nagasaki,N.(1981) Pharmac.Biochem.Behav. 14,729-732
8. Shen,J.T.and Ganong,W.F.(1976) Neuroendocrinology 20,311-318
9. Stone,E.A.(1975) Catecholamines and Behavior(Friedhoff,A.J.,ed) pp.31-72,Plunum Press New York
10. Thierry,A.M.,Blanc,G.and Glowinski,J.(1971) J.Neurochem. 18,449-461
11. Weiss,J.M.,McEwen,B.S.,Teresa,M.,Silva,A.and Kalkut,M.F.(1969) Science 163,197-199

109　ストレスによるラット脳内 noradrenaline turnover 亢進に及ぼす naloxone の影響

田中正敏・河野康子・中川良一・井田能成
飯盛健一郎・帆秋善生・長崎信行
（久留米大・医・薬理）

〔要　約〕

ストレス状況下でラット脳内各部位の noradrenaline(NA) turnover が亢進することはよく知られている。今回はこれらストレスによるNA turnover亢進に及ぼす内在性opioid peptidesの役割りを，その拮抗薬であるnaloxoneを用い，脳内各部位のNAおよびその主要代謝産物である3-methoxy-4-hydroxyphenylethyleneglycol sulfate(MHPG-SO4)含量を定量し検討した。Naloxoneはsalineに溶解し，1mg/kg，5mg/kgを皮下投与し，ストレスとして金網による拘束を1時間負荷した。その結果，ストレス負荷のみにより視床下部，扁桃核，視床，橋＋延髄で有意なNA含量の減少とMHPG-SO4含量の増加が，海馬と大脳皮質では有意なMHPG-SO4の増加がみられた。Naloxone 5mg/kg処置のみで検討した7部位中5部位でNA含量が有意に減少した。それにもかかわらず，ストレスによるMHPG-SO4含量の増加は，naloxone 前処置により視床下部，扁桃核，視床で有意に増強された。海馬，大脳皮質，橋＋延髄では，ストレスによる有意なMHPG-SO4の増加はみられたが，これらの変化に対してnaloxone 前処置は全く影響しなかった。これらの結果から，ストレス時に生じる視床下部，扁桃核，視床などの脳部位のNA turnover亢進を部分的に抑制もしくは減弱するような作用を内在性opioid peptides が有していることが示唆された。

Key words： immobilization stress, rat brain noradrenaline metabolism, naloxone

---

ラットの拘束や拘束下で尾に電撃を加えるストレスにより，視床下部，扁桃核，視床，海馬，橋＋延髄，大脳皮質のnoradrenaline(NA)のturnoverが亢進すること，これらの変化には経時的部位特性があることを報告した(15,21,22)。このように，急性ストレス状況下で脳内各部位のNA turnoverが亢進することはよく知られているが(20)，その意義については未だ不明な点が多い。一方，脳内に存在するopioid peptidesの構造が明らかにされ(19)，その生理的意義が論議されている。今回は，これらpeptidesの阻害薬である(14)naloxone 前処置のストレスによる脳内各部位のNA turnover亢進に及ぼす影響を検討することにより，内在性opioid peptidesとストレスによるNA turnover亢進との関連性について検討を加えた。

〔方法〕

体重170-190 g の Wistar 系雄性ラットを対象とし，以下の6群（各群のラット数は8匹）を設定した。saline 投与群；naloxone 1mg/kg投与群；naloxone 5mg/kg 投与群；saline 投与後ストレス負荷群；naloxone 1mg/kg 投与後ストレス負荷群；naloxone 5mg/kg 投与後ストレス負荷群。Naloxone はsalineに溶解し，断頭10分前に皮下投与した。ストレスとしてはラットを金網に入れ周囲を針金で60分間に亘り拘束固定する拘束ストレスを選んだ。各操作終了後断頭し採血するとともに，速かに脳を摘出しGrispenらの方法(6)で，図2，3に示す各部位に分割し，測定まで−45℃で保存した。各部位のNAならびにその主要代謝産物である3-methoxy-4-hydroxyphenylethyleneglycol sulfate(MHPG-SO4)含量をKohnoらの方法(10)で螢光法により同時定量した。血液は血漿に分離後corticosterone含量をvan der Viesの変法(24)により定量した。統計的解析はStudentの t-test（両側）を適用した。

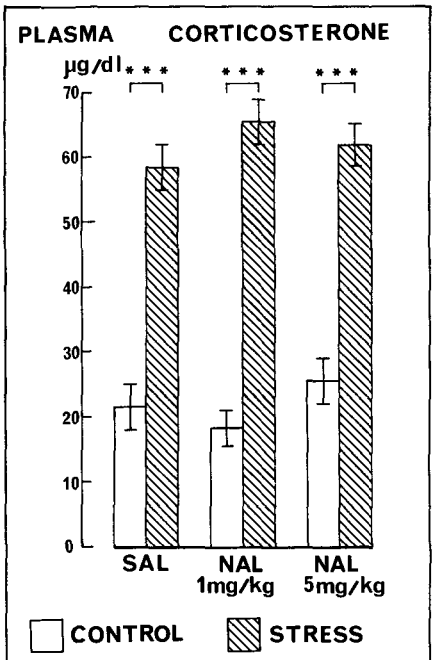


Fig. 1. Changes in plasma corticosterone levels. *** P < 0.01

[結果]

血漿corticosterone含量はそれぞれの対照群にくらべてストレス負荷時に有意な増加を示し，naloxone前処置による影響はみられなかった(図1)。図2に示すように脳内各部位のNA含量は，naloxone 5 mg/kg投与のみで視床下部，視床，海馬，大脳皮質，基底核で有意な減少を示し，扁桃核でも減少の傾向($P<0.10$)がみられた。Saline処置群では，ストレス負荷により視床下部，扁桃核，視床，橋＋延髄のNA含量が有意に減少した。このようなストレス負荷時のNA含量の有意な減少は，naloxone 1 mg/kg 前処置した際の視床下部，扁桃核，視床，橋＋延髄で，naloxone 5 mg/kg前処置した際の視床下部，扁桃核，橋＋延髄でもみられた。ストレスによるNA含量の減少は視床下部ではsaline 前処置にくらべて，naloxone 5 mg/kg 前処置の方が有意に大きかった。

MHPG-SO_4含量は図3に示すように，基底核を除くすべての部位で，saline，naloxone 1 mg/kg，5 mg/kg 前処置群のすべての群で，ストレス負荷時に

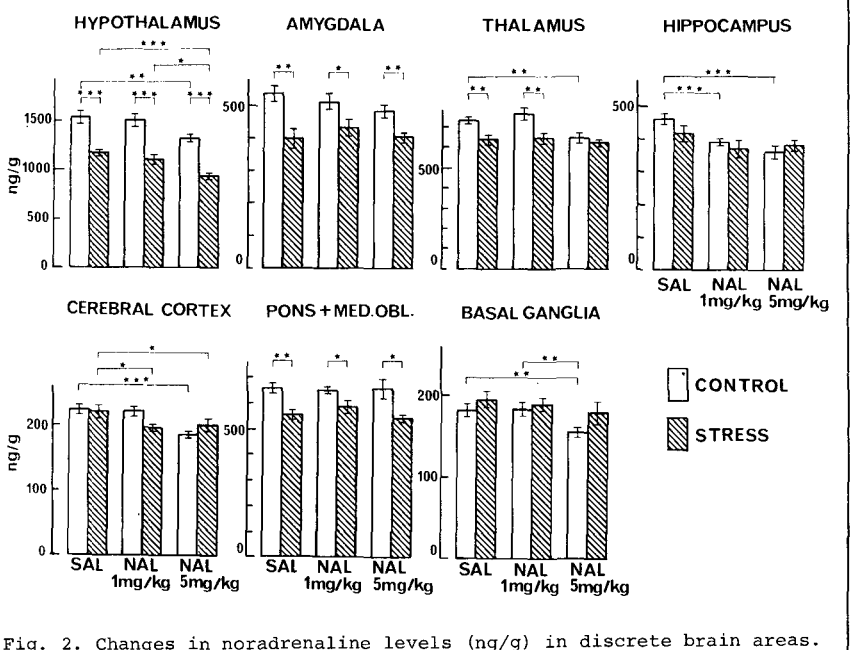


Fig. 2. Changes in noradrenaline levels (ng/g) in discrete brain areas.
* P < 0.05, ** P < 0.01, *** P < 0.001

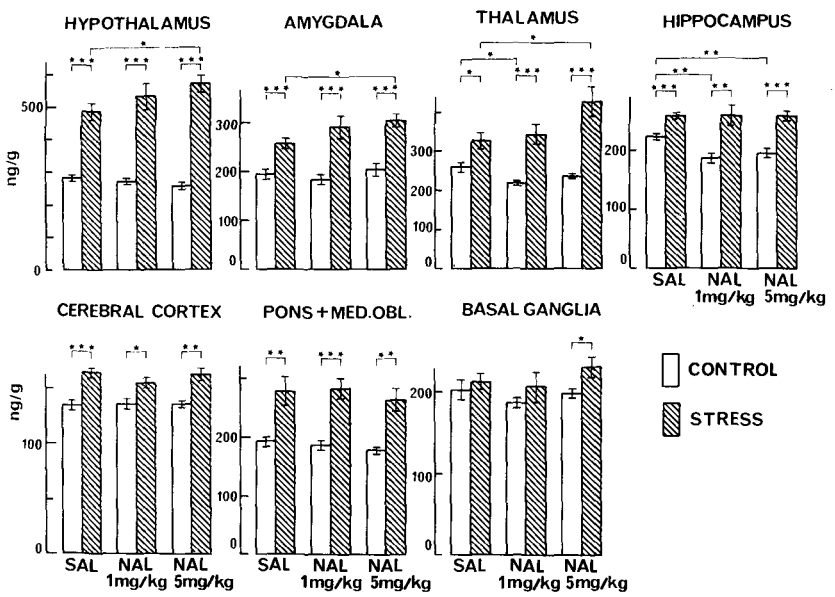


Fig. 3. Changes in MHPG-SO_4 levels (ng/g) in discrete brain areas.
* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$

それぞれの対照群にくらべて有意な増加を示した。これらストレスによるMHPG-SO_4 含量の増加は，naloxone 5 mg/kg 前処置することにより，視床下部，扁桃核，視床の3部位で有意に増強されたが，海馬，大脳皮質，橋＋延髄では，このような現象はみられなかった。基底核ではnaloxone 5 mg/kg前処置時のみに，ストレス負荷による有意なMHPG-SO_4含量の増加がみられた。Naloxone 処置そのものでは，視床(1 mg/kg)，海馬(1mg/kg, 5 mg/kg)でMHPG-SO_4含量が有意に減少した。

〔考案〕

拘束ストレスにより視床下部，扁桃核，視床，橋＋延髄ではNA含量の有意な減少とMHPG-SO_4含量の有意な増加がみられ，海馬と大脳皮質ではMHPG-SO_4が有意に増加し，ストレス状況下でこれらの部位のNA放出亢進を示唆する結果が得られたが，これは従来の報告(15,21,22)とほぼ一致した。ストレス負荷時に血漿corticosterone 含量は有意に増加したが，naloxone 前処置はこれらの増加に影響を与えなかった。

Naloxoneそのものは，今回検討した7部位のうち5部位でNA含量を減少させ(そのような傾向は扁桃核でもみられた)，海馬と視床のMHPG-SO_4含量を有意に減少させた。このことはGarcia-Sevillaら(5)のいうnaloxoneのcatecholamine合成抑制作用に由来しているものと考えられる。このように，naloxoneそのものがcatecholamine合成抑制作用を有しているにもかかわらず，naloxone 5 mg/kg 前処置することにより，視床下部，扁桃核，視床のストレスによるMHPG-SO_4含量増加はむしろ有意に増強された。このことはnaloxone前処置したことによりストレスによるこれらの部位のNA放出亢進が更に促進されたものと考えられる。このような作用は視床下部，扁桃核，視床で特異的にみられ，海馬，橋＋

延髄，大脳皮質のMHPG-SO4含量はストレスで有意に増加するにもかかわらず，naloxone前処置による影響は全くみられなかった。Naloxoneによりストレスによる MHPG-SO4含量増加が増強された部位はopiate receptorsが多く(2,3)，enkephalinsの含量も高い(9)。ストレス負荷時に血中にopioid peptidesが増加すること(8,17)，拘束ストレスで鎮痛作用が出現しそれがnaloxoneで拮抗されたり(1)，^{3}Hで標識されたnaloxone(13)やetorphine(4)のラット脳へのbindingがストレスで変化するという報告もある。これらの報告を考慮に入れると，今回の視床下部，扁桃核，視床における，ストレスによるNA放出亢進のnaloxoneによる増強作用は，naloxoneによるこれら内在性opioid peptides のreceptorに対する拮抗作用に由来する可能性が大きいものと考えられる。

視床下部，扁桃核，視床は比較的NAならびにMHPG-SO4含量も多く(11)，これらの部位でnoradrenergic systemとopioid peptide systemが何らかの相互作用を及ぼしあっている可能性が示唆される。さらに，これら3部位は情動と関連性の深い部位であり，naloxone処置でヒトで緊張や不安が惹起されること(7)や，ラットの情動性が高まること(16)も報告されている。これらのことを考え合わせると，内在性opioid peptidesが部分的にはNA放出を抑制するような形で，ストレス状況という不快刺激に対処するような関与をしていることも示唆される。

最近，神経組織にopiate receptorsのsubtypeの存在がいわれており(12,23)，またopiate receptorを介さないnaloxoneの薬理作用も指摘されている(18)ので，今回の結果から，視床下部，扁桃核，視床などの脳の特定の部位のNA turnover亢進を抑制することで，脳内のopioid peptidesがストレス状況に関与していることが示唆されたが更に検討の必要があろう。（本報告の要旨はEighth International Congress of Pharmacology, July 19-24, Tokyo, 1981 で発表した）。

謝辞：実験に終始協力をいただいた本教室武田シゲ子さん，塩酸naloxoneを提供していただいた三共株式会社に心から感謝します。

［引用文献］

1. Amir,S. and Amit,Z.(1978) Life Sci., 23:1143-1152
2. Atweh,S.F. and Kuhar,M.J.(1977) Brain Res., 129:1-12
3. Atweh,S.F. and Kuhar,M.J.(1977) Brain Res., 134:393-405
4. Chance,W.T., White,A.C., Krynock,G.M. and Rosecrans,J.A.(1977) Europ. J. Pharmacol., 44:283-284
5. Garcia-Sevilla,J.A., Ahtee,L., Magnusson,T. and Carlsson,A.(1978) J. Pharm. Pharmacol., 30:613-621
6. Gispen,W.H., Schotman,P. and de Kloet,E.R.(1972) Neuroendocrinology, 9:285-296
7. Grevert,P. and Goldstein,A.(1977) Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A., 74:1291-1294
8. Guillemin,R., Vargo,T., Rossier,J., Minick,S., Ling,N., Rivier,C., Vale,W. and Bloom,F.E.(1977) Science, 197:1367-1369
9. Kobayashi,R.M., Palkovits,M., Miller,R.J., Chang,K-J. and Cuatrecasa,P.(1978) Life Sci., 22:527-530
10. Kohno,Y., Matsuo,K., Tanaka,M., Furukawa,T. and Nagasaki,N.(1979) Anal. Biochem., 97:352-358
11. Kohno,Y., Tanaka,M., Nakagawa,R., Toshima,N. and Nagasaki,N.(1981) J. Neurochem., 36:286-289
12. Lord,J.A.H., Waterfield,A.A., Hughes,J. and Kosteritz,H.W.(1977) Nature, 267:495-499
13. Madden,J.IV., Akil,H., Patrick,R.L. and Barchas,J.A.(1977) Nature, 265:358-360
14. Martin,W.R.(1967) Pharmacol. Rev., 19:463-496
15. Nakagawa,R., Tanaka,M., Kohno,Y., Noda,Y. and Nagasaki,N.(1981) Pharmacol. Biochem. Behav., 14:729-732
16. Rodgers,R.J. and Deacon,R.M.J.(1979) Psychopharmacology, 65:103-105
17. Rossier,J., French,E.D., Rivier,C., Ling,N., Guillemin,R. and Bloom,F.E.(1977) Nature, 270:618-620
18. Sawynok,J., Pinsky,C. and Labella,F.S.(1979) Life Sci., 25:1621-1632
19. Simantov,R. and Snyder,S.H.(1976) Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A., 73:2515-2519
20. Stone,E.A.(1975) In Catecholamines and Behavior(edit. by A.J.Friedhoff), pp.31-72, Plenum Press, N.Y.
21. Tanaka,M., Kohno,Y., Nakagawa,R., Toshima,N. and Nagasaki,N.(1981) Neurochem. Res., 6:106
22. 田中正敏，河野康子，中川良一，戸島信夫，井田能成，長崎信行，野田幸孝（1980）精神薬療基金年報，12：45-53
23. Trenius,L.(1977) Psychoneuroendocrinology, 2:53-58
24. Van der Vies,J.(1961) Acta Endocrinol., 38:399-406

110 長期拘束ストレスによる中枢神経諸核の (tyrosine hydroxylase) 活性の変化

井上　桂・鳩谷　龍(三重大・医・精神)
内村英幸(国立肥前療養所)
中原辰雄(九大・理・化学)

〔要　約〕

ラットに反復拘束ストレスを負荷し，特定の脳部位における tyrosine hydroxylase (TH)活性の変化を，急性期（5日間）と慢性期（6週間）で比較した。拘束は毎日18時間金網で包みこむ方法である。同時に，拘束群と同じ時間水と餌を奪った同時絶食群，および正常対照群についてもTH活性を測定した。すべてのラットの体重を毎日測定した結果，拘束群のみが著明な体重減少を示した。TH活性を測定した脳部位の中で変化の認められた部位は，青斑核，弓状核，中央隆起の3カ所であった。青斑核では，5日間と6週間の拘束群でともにTH活性が増加している。弓状核では，5日間の拘束群でTH活性が増加しているが6週間の拘束群になると有意の変化が認められない。それに反して中央隆起では，5日間の拘束群に有意の変化がなく，むしろ6週間の拘束群にTH活性の増加が著明である。即ち，反復拘束ストレスに対して，青斑核では急性期・慢性期ともにTH活性が増加し，隆起漏斗路では，まず弓状核のTH活性が増加するが，慢性期になると中央隆起においてTH活性の増加が著明になるという事を明らかにした。以上の結果は，ストレスが何らかの病態発生に関与する時，下部脳幹と視床下部の特定 catecholaminergic neurons の機能異常を介する可能性を示唆している。

Key words： stress ・ tyrosine hydroxylase ・ catecholaminergic neurons

---

精神障害の誘因としてストレスが関与していることは，臨床的に周知の事であるが，脳機能との関連はなお明らかではない。そこで，実験動物に特定のストレスを急性と慢性に負荷し，神経伝達物質の関連酵素を指標として，中枢神経諸核について生化学検索を行なった。酵素はカテコールアミン律速酵素である tyrosine hydroxylase (TH) を選び，中枢神経核は，ノルアドレナリンとドーパミンの作動性ニューロンから，主な部位7カ所を選んだ。これによって，ストレスによる中枢神経諸核のTH活性に対する影響が，継時的に明らかになり，殊に急性ストレスと慢性ストレスに対する中枢神経の反応の様相が明らかにされる可能性がある。

〔方　法〕

1）実験動物および飼育条件：Wistar-King 雄性ラットを離乳直後より5匹ずつのグループとして，室温（22±2℃）と照明（明：6時－18時，暗：18－6時）を調節し飼育した。生後12週から実験を開始した。体重は350～450g であった。　2）拘束ストレス：ラットを拘束群，同時絶食群，正常対照群の3群に分け，5匹ずつ1ケージで飼育した。拘束群は午後5時から翌日午前11時まで18時間金網で包んで動きを封じた。同時絶食群は，拘束群と同じ18時間，同じ時間帯に水と餌を奪った。すべてのラットは毎日午後5時に体重を測定した。拘束実験の期間は，3群とも5日間と6週間の2種類である。但し一部は2週間の拘束も行なった。3）脳の凍結標本の作製：拘束解除後25時間を経て断頭し直ちに脳を取り出し，氷上で乳頭体を境にして前後に分割し－80℃で急速冷凍した。4）諸核の切り出しと遠心分離：脳は cryostat で 300 μm の連続切片にし，実体顕微鏡下でマイクロナイフと中空針を用い，König & Klippel[7] と Jacobowitz & Palkowits[6] のアトラスを

参考にして諸核を切り出した。切り出した諸核は20μlのhomogenate medium (50mM Tris-acetate-0.2%TritonX)を加えて氷冷しながら300rpm, 5strokesでホモジナイズし，2μlを蛋白定量用に取り，残りを10,000g 15分間冷却遠心分離して上澄を2μlずつTH測定用に取った。5）蛋白定量：Lowry[8]の方法を一部変更し，bovine serum albuminを標準物質として蛋白量を測定した。6）TH活性の測定：Nagatsuら[9] Coyle[3]の方法を一部変更した^{14}C-L-DOPA product法によった。Incubation mediumは143mM sodium phosphate buffer (pH 6.0), 0.7mM Fe SO_4, 3000Units/μl catalase, 4.6mM 6MPH_4, 200μM L-〔^{14}C-(U)〕tyrosine (Specific activity 218mCi/mmole)であった。30℃ 15分incubateした後2.5μM L-DOPA, 100μM L-tyrosine, 35mM EDTA, 25mM NaH SO_4, 50mM KH_2 PO_4 (PH 8.9)を含む溶液を加えて反応を止めた。反応溶液は，microalumina columnを通して，0.2N acetic acidでL-DOPAを溶出し，液体シンチレーションカウンターで測定した。

〔結　果〕

1）体重の変化：拘束群のみがすべての期間で，体重減少を示した。最初の1週間は急激に体重が減少し，その後は約3週間あまり変化がみられず，4週間を過ぎると6週間まで又僅かに減少している。それに反して正常対照群と同時絶食群は，ほぼ同様のゆるやかな体重増加を示した。即ち，体重の変化に関しては，拘束の影響のみが著明であり，同時絶食の影響は認められない。2）TH活性の変化：(TABLE 1, 2) 7カ所の中枢神経諸核のなかでTH活性の変化が認められたのは，青斑核，弓状核，中央隆起の3カ所のみである。青斑核では5日間と6週間の両方で拘束群にTH活性の増加が認められる。弓状核では5日間の拘束群にTH活性の増加がみられるが，6週間の拘束群には有意の変化がない。逆に中央隆起では5日間の拘束群に変化がなく，むしろ6週間の拘束群にTH活性の著明な増加が認められる。いずれの群でもTH活性の減少した部位はない。また6週間の時点では，いずれの部位でも同時絶食群は，拘束群と同様のTH活性の変化を示している。

〔考　察〕

1）ストレスの種類：ストレスを加えた後に脳の各部位の酵素活性を測定する試みは数多くなされている。ストレスの種類もさまざまで，レセルピン，ホルマリン[11]，メトアンフェタミンの注射や，寒冷[11]，拘束[4][11]，長期隔離[12]，去勢，甲状腺摘出，等がある。なかでも拘束ストレスは比較的多く用いられるが，その持続時間が一般に短く数時間から数日のものが殆どである。毎日150分6週間拘束してTH以外の酵素を測定した報告[4]はあるが，我々のように，毎日18時間6週間拘束して継時的にTH活性を比較した例は見当らない。2）拘束ストレスと体重：拘束ストレスの開始後約1週間は急激に体重が減少するが，その後は死亡することも回復することもなく，あまり大きな体重の変化はみられない。この事は拘束状況に対して慢性期には適応能力が働いていると考えられる。しかし，同時絶食群では，体重減少が全くみられていない。3）拘束ストレスとTH活性：TH活性の日内変動に関する報告[10]があるので，ラットはすべて同時刻に断頭した。また脳部位によって至適pHやcofactorの量などの測定条件が異なるという報告[1]もあるが，我々のような同一条件下の比較実験では，この問題は考慮する必要がないであろう。さて，TH活性の変化をみると，拘束ストレスに対して，青斑核は急性でも慢性でも一貫してTH活性が増加し，隆起漏斗路においては急性では弓状核の，慢性では中央隆起のTH活性が増加している。弓状核の所見は，毎日3時間5日間拘束した

TABLE 1

TYROSINE HYDROXYLASE ACTIVITIES IN RAT BRAIN REGIONS (5 DAYS IMMOBILIZATION)

Nucleus and area	Control	Food deprivation	Immobilization
Frontal cortex (medial field)	1.14 ± 0.11 (10)	1.26 ± 0.09 (8)	1.04 ± 0.05 (10)
Nucleus accumbens	18.73 ± 0.94 (10)	21.36 ± 1.36 (8)	20.65 ± 0.73 (10)
Nucleus caudatus putamen	37.38 ± 1.27 (10)	37.24 ± 2.56 (8)	39.65 ± 1.63 (10)
Nucleus paraventricularis	3.55 ± 0.25 (10)	3.23 ± 0.16 (8)	3.16 ± 0.24 (9)
Nucleus arcuatus: A_{12}	6.78 ± 0.97 (8)	7.17 ± 0.37 (8)	9.04 ± 0.52 (10)*
Median eminence	24.26 ± 1.25 (8)	27.67 ± 1.31 (6)	28.08 ± 4.94 (6)
Locus coeruleus: A_6	21.69 ± 1.58 (10)	26.75 ± 0.99 (6)*	45.61 ± 8.56 (10)**

The results are expressed as mean values ± S.E.M. (number of individual determinations): n moles L-DOPA formed/mg protein/hr. *p<0.05, **p<0.025

TABLE 2

TYROSINE HYDROXYLASE ACTIVITIES IN RAT BRAIN REGIONS (6 WEEKS IMMOBILIZATION)

Nucleus and area	Control	Food deprivation	Immobilization
Frontal cortex (medial field)	1.22 ± 0.11 (7)	1.30 ± 0.09 (8)	1.14 ± 0.07 (10)
Nucleus accumbens	22.86 ± 0.91 (6)	25.17 ± 1.04 (8)	25.98 ± 1.15 (8)
Nucleus caudatus putamen	41.77 ± 0.94 (8)	44.58 ± 1.98 (8)	45.98 ± 2.53 (10)
Nucleus paraventricularis	4.09 ± 0.11 (8)	4.35 ± 0.27 (8)	4.04 ± 0.35 (10)
Nucleus arcuatus: A_{12}	11.23 ± 1.03 (8)	11.59 ± 0.78 (8)	13.33 ± 0.74 (7)
Median eminence	26.02 ± 1.59 (6)	40.33 ± 2.33 (6)****	44.21 ± 5.15 (6)***
Locus coeruleus: A_6	18.66 ± 1.35 (6)	24.11 ± 1.01 (8)***	29.83 ± 3.36 (8)**

The results are expressed as mean values ± S.E.M. (number of individual determinations): n moles L-DOPA formed/mg protein/hr. **p<0.025, ***p<0.01, ****p<0.005

Palkovits ら[11] の結果と一致している。また中央隆起の所見は拘束実験では初めての所見であるが，斎藤ら[12] の報告した長期隔離ストレスによる中央隆起のTH活性の増加と同様の結果を示している。このように，隆起漏斗路のTH活性の増加は，慢性になるにつれて弓状核から中央隆起に重点が移っており，新しく生合成されたTHのaxonal flowによる時間経過を示している。ちなみに，2週間拘束の時点では弓状核と中央隆起の両方にTH活性の増加が認められるのである。ところで，ともに慢性反復ストレスである拘束ストレスと無拘束絶食ストレスとの間には，体重の変化が異なるにもかかわらず，TH活性の変化に相異がないという所見は注目に値すると思われる。この反面，正常対照群の弓状核のTH活性は5日目と6週間目の間で有意に増加している。正常対照群も毎日体重測定を行なっているため，handlingや環境変化の影響で軽いストレスが加わり，これによって弓状核のTH活性が増加している可能性がある。4）ストレスと脳機能：上記の結果から，ストレスに反応して重要な役割を果す神経回路として，青斑核を中心とするノルアドレナリン系と隆起漏斗路のドーパミン系が考えられる。青斑核をはじめとする下部脳幹の諸核は，上行性ノルアドレナリン系としてその神経終末を視床下部，辺縁系および新皮質に投射していることはよく知られている。これらの脳部位が情動，生命欲求，自発性，更に睡眠や意識機能といった基本的精神機能を支えていることも明らかにされている。そのうえD.G. Amaral ら[2] は，青斑核は脳全体を標的器官とする抑制的なストレス緩和作用（stress damping role）を有すると考え，極端なストレスによってその破綻を来たした時，行動ならびに神経—内分泌系の異常が出現すると考察している。興味深いことに，ストレスの種類が異なる我々[5] のうつ病モデルでも，上記と同様の部位において組織化学的にカテコールアミンの異常を認めている。従って，本法による生化学的検索が期待されよう。なお，視床下部の隆起漏斗路の変化は，内分泌系と密接に対応することは言うまでもない。それゆえ上述の所見は，ストレスが生体のホメオスタシスの破綻を引き起すような場合には，下部脳幹と視床下部の特定のカテコールアミン作働性ニューロンの機能異常を介して病態発生に至る可能性を示唆している。

〔文　献〕

(1) Acheson, A. L., Kapatos, G. and Zigmond, M. J.（1980）Life Sciences 28, 1407−1420 (2) Amaral, D. G. and Sinnamon, H. M.（1977）Progress in Neurobiology 9, 147−196 (3) Coyle, J. T.（1972）Biochem. Pharmacology 21, 1935−1944 (4) Gottesfeld, Z., Kvetnansky, R., Kopin, I. J. and Jacobowitz, D. M.（1978）Brain Research 152, 374−378 (5) Hatotani, N., Nomura, J., Inoue, K. and Kitayama, I.（1979）Psychoneuroendocrinology 4, 155—172 (6) Jacobowitz, D. M. and Palkowits, M.（1974）J. Comp. Neur. 157, 13−42 (7) König, J. F. R. and Klippel, R. A.（1963）The Rat Brain, Williams & Wilkins Co., Baltimore (8) Lowry, O. H., Rosenbrough, N. J., Farr, A. L. and Randall, R. J.（1951）J. Biol. Chem. 193, 265−275 (9) Nagatsu, T., Sudo, Y. and Nagatsu, I.（1971）J. Neurochem. 18, 2179−2189 (10) Natali, J. P., Mcrae−Degueurce, A, Keane, P., Debilly, G. and Pujol, J. F.（1980）Brain Research 191, 205−213 (11) Palkowits, M., Kobayashi, R. M., Kizer, J. S., Jacobowitz, D. M. and Kopin, I. J.（1975）Neuroendocrinology 18, 144−153 (12) 斎藤　雅・平野　誠・内村　英幸・中原　辰雄・伊藤　正敏（1976）神経化学　15，64−67

111 牛脳より分離したCoated vesiclesの性状と性質について

宇佐美 美穂子 ・ 高 橋　章 ・ 門 田　健
（都精神研・神経化学）

〔要　約〕

牛脳より分離したCoated vesicles（CV）の性質について検討した。

1. CVはMg^{2+}とATPの存在下、時間に依存して^{45}Caを取り込む。この反応は約5分で飽和に達する。ATP以外のnucleotide, nucleosideではADPでATPの約30%の効果がみられるのみで、ATPに特異的であると思われる。またATPの最も有効な濃度は1−2 mMである。反応液中にNaFを添加すると約20%の取り込みの増加がみられる。

2. CVはMg^{2+}の存在下、[γ-P]ATPとincubateすると、30秒以内にhalf-maximumとなり約2分で飽和に達するという速い反応で燐酸化される。ここにCa^{2+}を存在させても、速度及びmaximumのレベルには変化がない。燐酸化はNaFを添加すると、50%ほど増加する。燐酸化を行ったCVをSDS電気泳動にかけた後、autoradiographyを行うとM.W.約150,000, 120,000, 68,000, 55,000のバンドが燐酸化されている。Clathlinに相当するM.W. 180,000のバンドは蛋白の主成分であるが、ほとんど燐酸化されない。また、最も強く燐酸化を受けるのはM.W. 55,000のバンドである。NaFを添加すると150,000のバンドがより強く燐酸化されるように思われる。C-AMP、カルモジュリンなどでは燐酸化が著明に進むことはないようである。

Key words : Coated Vesicles　Ca-uptake　Phosphorylation

Coated vesicles（CV）は表面に網状の構造をもつ小胞の総称であり、最初、特殊な蛋白のtransportに関連して、RothとPoterによって同定された。(10) その後、これらは受容体を介するendocytic processに関係していることが見出された。(3) また、神経組織においては、シナプス伝達後の膜の再循環にCVが関与していると言われている。(2, 4.) Coated vesiclesは様々な組織から分離、精製され(5, 9, 13) その生化学的性質及び機能が研究されてきている。(1, 6, 8, 9, 12, 13, 14) しかし、その役割の全容についてはまだ不明な点が多い。

私たちは今回CVについて以下の実験を行い、若干の知見を得たので、追究の途上ではあるが、ここに発表する。

〔実験方法〕

CVの精製　Pearseの方法(8)を一部修正して使用した。即ち、ホモジナイズした牛脳を20,000g、30分遠心し、得た上清を55,000g、60分遠心して沈殿画分を採取する。これを10%庶糖入りのBufferにsuspendして100,000g 60分遠心して得た沈殿を30〜50%（50,000g 16時間）、5〜30%（100,000g 60分）の2度の庶糖密度勾配遠心分離を経て精製した。

Ca uptake測定　Blitzらの方法(1)によった。100μlの反応液中には、20mM imidazole (PH 7.0), 0.13M KCl, 2mM $MgCl_2$, 0.2mM EGTA, 2mM ATPとCV fraction (50-100μg)を含む。また場合によっては10mM NaFを添加した。反応は0.2mM $^{45}CaCl_2$ (約10^6cpm)を添加することにより開始し、25°C、10分間、行った。反応の停止は、20mM imidazole (PH7.0), 0.13M KCl液で稀釈することにより行い、直ちにmillipore

filter を通し free の $CaCl_2$ を除いた。

燐酸化の測定　反応は20mM imidazole (PH7.0), 0.13M KCl, 0.2mM EGTA中CV (50-100μg) に2-10μM [^{32}P] ATPを添加することによって開始した。反応液には必要に応じて、$MgCl_2$ 2mM, NaF 10mM, $CaCl_2$ 0.2mMを加えた。反応停止はCa uptake と同様に行った。
またSDS電気泳動を行う場合は、反応の停止はSDSを添加して行った。

SDSポリアクリルアミドゲル電気泳動　0.1% SDS存在下、6%アクリルアミドゲルを用いて行った。

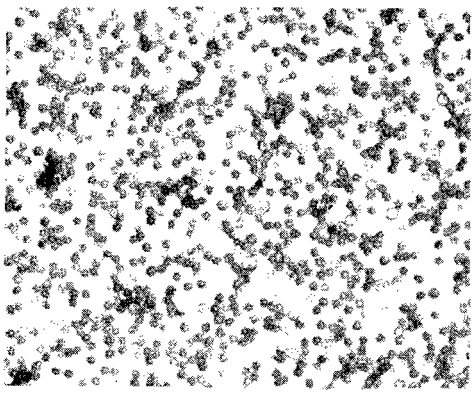


Fig-1　Electron micrograph of coated vesicles from Bovine brain

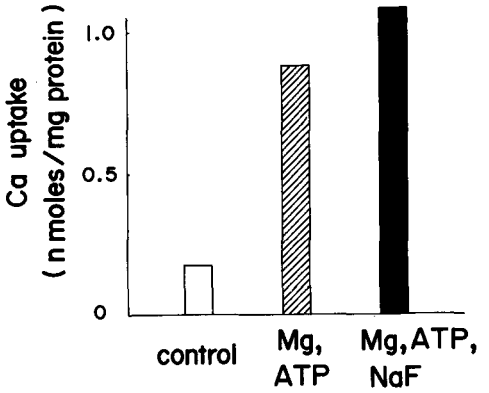


Fig-2　Ca-uptake of coated vesicles

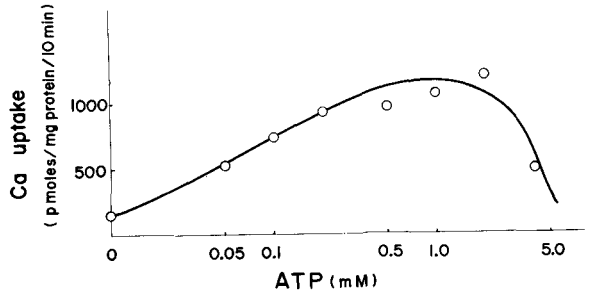


Fig-3　ATP dependency of the Ca-uptake of coated vesicle

Control	93
A T P	1215
A D P	432
A M P	16
Adenosine	65
G T P	39
G D P	4
G M P	0
Guanosine	59
I T P	56
I D P	36
I M P	0
Inosine	32
U D P	95
U M P	71
Uridine	212
C M P	204
Cytidine	196

(p moles/mg protein/10 min)

Table 1 Effects of nucleotides on Ca-uptake

蛋白量の測定　Lowryら(7)の方法によった。

電子顕微鏡　酢酸ウランの陰染色標本及びエポン包埋の切片で、分離したCVを観察した。

〔実験結果〕

私達が牛脳より調製したCVは電顕写真に示されるように表面が5角形と6角形の網目状のShellをかぶった小胞である。このfractionにはシナプス小胞は見られず、膜の混入も少ない。　このCVは Mg^{2+} 存在下にATPに依存してCaのuptakeを著しく

増加させること（図1.）、さらにphosphataseの阻害剤であるNaFの添加によって、この活性は一層高められることがわかった。図2.はCa uptakeのATPに対する濃度依存性を示している。ATP濃度が高まるに従いCa uptakeも増加するが高濃度のATPでは、逆に減少した。最も有効な濃度は1-2mMであった(図3)。次に、このCa uptakeの亢進がATPに特異的であるか否かを知るため、種々のnucleotide、nucleosideの影響を調べた(表1)。ADPはATP効果の約30%の活性があったが、他は、効果がみられなかった。図4.はMg^{2+}, ATP存在下でのCa-uptakeのtime courseである。反応は約2分までほぼ直線的に増加し、5分でplateauに達した。Ca uptakeにMg^{2+}とATPが必須であることから、燐酸化が関与しているのではないかと思われた。そこで[γ-^{32}P]ATPを用いて検討した。Mg^{2+}の添加により、CVの燐酸化は約6倍に達する。しかしCa^{2+}を更に投与しても変化しなかった。NaFを添加すると50%増加した(図5)。図6.は燐酸化のtime courseである。30秒以内にhalf-maximumとなり、約2分後にmaximumに達するきわめて速い反応であることがわかった。図5.の結果と同じく、Ca^{2+}の共存によって速度及び最高レベルに変化はなかった。次に、CVのどの構成蛋白が燐酸化されているかを知るため、SDS電気泳動にかけた後、autoradiographyを行った。図7は、泳動後クマッシーブルーで蛋白の染色をしたものである。主たるバンドは、分子量180,000のclathrinに相当するものを初めとして120,000, 55,000, 35,000にみられ、150,000, 140,000, 112,000, 100,000 90,000, 68,000にもminor成分がみられる。これらのバンドのうち燐酸化を受

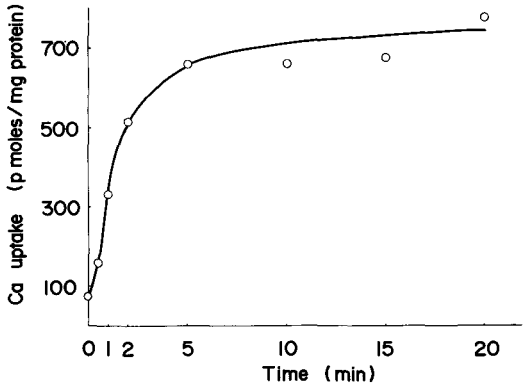


Fig-4 Time course of the Ca-uptake of coated vesicles

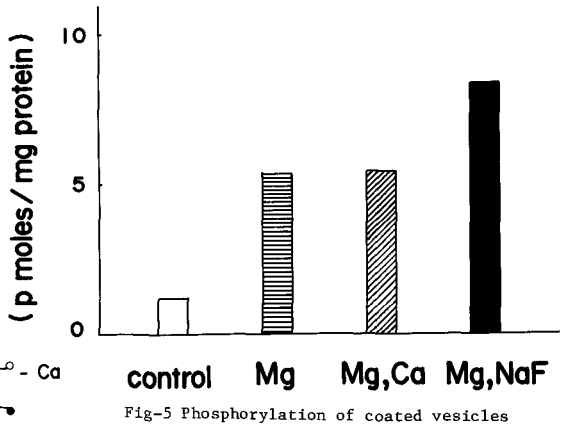
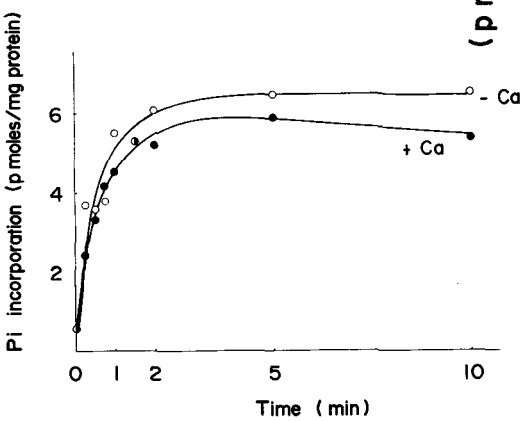


Fig-5 Phosphorylation of coated vesicles

Fig.6 Time course of the phosphorytion of coated vesicles.



けるのは分子量 150,000, 120,000, 68,000, 55,000 のバンドであった。最も強く燐酸化されるのは55,000の蛋白であった。また 180,000 の clathlin はほとんど燐酸化を受けなかった。NaFを添加すると 150,000のバンドが特に燐酸化が増加するように思われた(図8,9)。cAMPを添加しても(図8)燐酸化が増強されることはなく、Ca^{2+}, Ca^{2+}-calmodulin の添加によって変化するようには思われなかった。

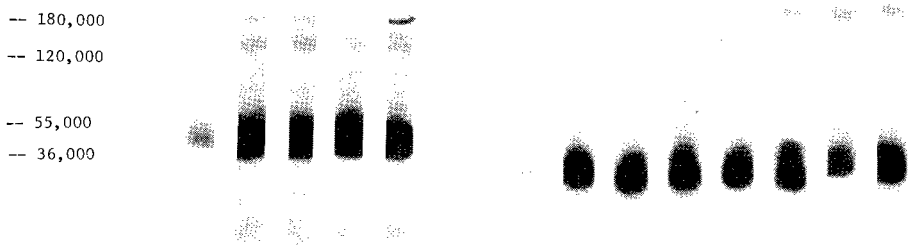


Fig-7

Protein bands of coated vesicles

1 2 3 4 5

Fig-8 Autoradiography of coated vesicles protein after phosphorylation 1) -Mg 2) +Mg 3) +Mg,Ca 4) +Mg,c-AMP 5) +Mg,NaF

1 2 3 4 5 6 7 8

Fig-9 Autoradiography of coated vesicles protein 1) -Mg 2) +Mg 3) +Mg,Ca 4) +Mg, calmodulin 5) +Mg,Ca,calmodulin 6) +Mg,NaF 7) +Mg,NaF,calmodulin 8) +Mg,Ca,NaF,calmodulin

〔考察〕

Blitzらは「CVはMg^{2+}, ATP存在下で構成成分である Ca-ATPase が燐酸化されることにより Ca uptake を増加させる」としている。(1) しかし私達は Ca-ATPaseの活性を見い出し得なかった。最近、Rubensteinら(11)は agarose gel を用いて高度に精製したCVでは ATPase活性が検出されないと報告している。CV の autoradiography の結果からも、Blitzらの云う分子量100,000 のバンドの燐酸化は弱いものであることがわかる。NaF の添加により Ca uptake 及び燐酸化が共に増加すること、また燐酸化が、Ca uptake に先行して生じることなどから両者の間に何らかの関連があることが示唆される。cAMP 添加により燐酸化が影響を受けないことからCV の燐酸化は cAMP independent に生じると考えられる。またカルモジュリンによっても顕著な変化はみられていない。

1) Blitz,A.L., Fine,R.E. & Toselli,P.A. (1977) J.Cell.Biol. 75 , 135-147
2) Douglas,W.W., Nagasawa,J. & Schultz,R.A. (1971) Nature 232 , 340-341
3) Goldstein,J.L., Anderson,R.G.W. & Brown,M.S. (1979) Nature 279 , 679-685
4) Heuser,J.E. & Reese,T.S. (1973) J.Cell.Biol. 57 , 315-344
5) Kaneseki,T. & Kadota,K. (1969) J.Cell.Biol. 42 , 202-220
6) Keen,J.H., Willingham,M.C. & Pastan,I.H. (1979) Cell 16 , 303-312
7) Lowry,O.H., Rosebrough,N.J., Farr,A.L. & Randall,R.J. (1951) J.Biol.Chem. 193 , 265-275
8) Pearse,B.M.F. (1975) J.Mol.Biol. 97 , 93-98
9) Pearse,B.M.F. (1976) Proc.Natl.Acad.Sci.USA. 73 , 1255-1259
10) Roth,T.F. & Porter,K.R. (1964) J.Cell.Biol. 20 , 313-332
11) Rubenstein,J.L.R., Fine,R.E., Luskey,B.D. & Rothman,J.E. (1981) J.Cell.Biol. 89 , 357-361
12) Shook,W., Puszkin,S., Bloom,W., Ores,C. & Kochwa,S. (1979) Proc.Natl.Acad.Sci.USA. 76 , 116-120
13) Woods,J.W., Woodward,M.P. & Roth,T.F. (1978) J.Cell.Sci. 30 , 87-97
14) Woodward,M.P. & Roth,T.F. (1978) Proc.Natl.Acad.Sci.USA. 75 , 4394-4398

112 ウサギ脊髄神経節における substance P の生合成とその遊離

井上敦子・仲田義啓・瀬川富朗
（広島大・医・薬効解析）

〔要　約〕

Substance P(SP)は一次知覚神経の神経伝達物質と考えられているが，その合成分解機構については明らかでない。今回われわれは in vitro で ^{35}S メチオニンをウサギ脊髄神経節と incubate し C_4 ゲルを通して予備精製をした後，生成した ^{35}S-Met^{11}-SP を高速液体クロマトグラフィー(HPLC)で同定しようと試みた。その結果，複数の放射活性ピークが観察されたが，その中の1ピークの溶出位置は合成SPと完全に一致した。^{35}S-Met^{11}-SP合成量を経時的に調べると，8時間で最大となり12時間まで持続した後徐々に減少した。^{35}S-Met^{11}-SP合成は0.1 mM Cycloheximide(CHX)でおさえられ，リボゾーム系での合成であることが示唆された。また合成は 20 μM p-Chloromercuribenzoic Acid(PCMB)や 2 μM SPC末heptapeptide(5-11)SPでもおさえられた。しかし ^{35}S メチオニンの脊髄神経節へのとりこみは CHX 以外の薬物ではおさえられなかった。次に ^{35}S メチオニンと 37℃で 8 時間 incubate した脊髄神経節を 10 μM Capsaicin，あるいは 50 mM KCl で刺激し，遊離液について同様の同定を行った。この場合も複数の放射活性ピークが観察されたが，合成SPと(5-11)SPの溶出位置に一致するピークがみとめられた。以上の実験結果はSPが脊髄神経節で合成され，SPと(5-11)SPが Capsaicin や高濃度 KCl によって遊離されうることを示唆している。しかしながら，SPのみが遊離され，その後細胞外で(5-11)SPに加水分解されるという可能性も考えられる。

Key words：　Substance P－Biosynthesis－Release

Substance P(SP)は11個のアミノ酸組成からなるペプチドで一次知覚神経[1]をはじめ中枢および末梢のいくつかの神経系で神経伝達物質あるいは神経調節物質として機能していると考えられている[3,9]。しかしその合成機構についてはまだあまり明らかになっていない。1978年にHARKINSら[5]が培養したマウス neuroblastoma とラット glioma cell で SP が生合成されることを報告し，1981年に HATANAKA ら[7]はこの2つの細胞の hybrid cell で SP 様免疫活性物質が生合成されることを報告している。また，1980年には HARMAR ら[6]がラット脊髄背根神経節で ^{35}S メチオニンより ^{35}S ラベルの SP 様免疫活性物質が生合成されることを報告している。しかし，免疫抗体反応による検出では SP 抗血清の SP 以外の SP fragments との交叉反応が非常に低いため SP fragments を見出すのはむずかしい。しかも，SP fragments にはその生理活性を考えると見落されてはならないものがある。そこでわれわれは，ウサギ脊髄神経節を使って同様に ^{35}S メチオニンから ^{35}S-Met^{11}-SP を生合成させ，免疫沈降は行わず，シリカゲルにブチル基をくっつけた C_4 ゲルに適用して予備精製を行った後 HPLC で同定した。さらに SP 合成機構解明の一助として，薬物の SP 合成に対する影響を検討した。また ^{35}S メチオニンと incubate した神経節を Capsaicin，あるいは高濃度 KCl で刺激し，遊離物についても同定を行った。以上の実験結果に基づいて SP 生合成機構の一端について考察を行ったので報告する。

〔実験方法〕

SPの生合成　体重 2.0～2.7 kg の雌ウサギを放血死させた後脊髄神経節(L1～S1)を取りだした。取りだした神経節は，膜をはく離した後 37℃ 30 分間 preincubation を行い，内在するアミノ酸やペプチドを放出させた。Incubation medium は NaCl 118 mM，KCl 4.7 mM，$CaCl_2$ 1.9 mM，

$MgSO_4$ 0.5mM, $NaHCO_3$ 2.5mM, D-glucose 11.1mM を含み、これにペプチドの酵素による分解を防ぐため Trasylol 0.5unit/ml と Bacitracin 300μg/ml を加え、使用前10分間95%O_2-5%CO_2混合ガスを通じた。Preincubation 終了後、脊髄神経節を100μCiの^{35}Sメチオニンを含むincubation medium に移し、37°Cで酸素存在下に振とうしながらincubate を行った。一定時間incubate した後、神経節を取りだし、冷した生理食塩水で洗い、0.1 N HClでhomogenizeした。このhomogenate を900×g 20分間遠心して得られた上清をC_4ゲルを充填したミニカラムに適用した。C_4ゲルはシリカゲルにジメチルジクロロシランを使ってブチル基をくっつけたもので、アミノ酸とペプチドを分離することができる。C_4ゲルはサンプルを負荷したあと水とメタノールで充分洗い、2% Trifluoroacetic Acid を含むメタノールでペプチド画分を溶出した。溶出液はN_2ガスをふきつけ乾枯した後、0.1 Nの酢酸に可溶化させてHPLCに適用した。

^{35}Sメチオニンのウサギ脊髄神経節へのとりこみ　生合成実験と同様に摘出しpreincubate したウサギ脊髄神経を1μCiの^{35}Sメチオニンと37°Cで一定時間incubate した。Incubate終了後神経節を取りだし、冷たい生理食塩水で3度洗った後アルカリで可溶化し、Bray's溶液を10ml加えて放射活性を液体シンチレーションカウンターで測定した。

遊離実験　ウサギ脊髄神経節は、^{35}Sメチオニンと37°C酸素存在下8時間振とうしながらincubate した後、冷した生理食塩水で3度洗った。その後バッチ法で小試験管を用いて遊離実験を行った。まず神経節を37°C 10分間incubation medium中でincubate し、もう1度新しいmediumで10分間incubateした。次に50mM KCl、又は10μM Capsaicin を含むmediumで10分間incubateし、再び新しいmediumで10分間incubateした。2回目からのincubation medium(遊離液)をC_4ゲルカラムに適用した後HPLCで分析した。

ペプチド同定　ODS-silica(TSK-GEL LS410 東洋曹達)を充填したカラム(300×4 mm i.d.)に U 6K injector(Waters Associates, Milford, Mass)を通じて試料を注入し、流速1ml/min 65°Cで展開した。移動相にはMeOH: H_2O: Trifluoroacetic Acid(400:600:1)を使用した。ペプチドはSPD-1 spectrophotometric detector(島津製作所)を使用し210nm紫外部吸収で検出した。放射活性は溶出液を60滴(約0.5ml)ずつfraction collectorで分取し、Bray's溶液を加えて液体scintillation counterで計測した。

アミノ酸分析　アミノ酸の定量はHLC-805(東洋曹達)でオルトフタルアルデヒド法を用いて行った。

〔結果〕

ペプチドの分析　合成SPとSP fragmentsのC_4ゲルによる回収率は約40~60%で、メチオニン、グリシン、フェニルアラニンの回収率は約1~5%であったことから、C_4ゲルによりペプチドとアミノ酸がよく分離できることがわかった。また、合成SPとSP fragmentsはHPLCで完全に分離して溶出された。210nm紫外部吸収で検出されたSPと(5-11)SPのピークを分取してアミノ酸分析することにより、SP, (5-11)SPそのもののピークであることを確かめた。

SP生合成とその経時変化　ウサギ脊髄神経節を100μCiの^{35}Sメチオニンと37°Cで4時間から24時間incubate した後C_4ゲル-HPLCで分析した。この系では複数の放射活性ピークがみとめられたが、そのうち合成SPと溶出位置が一致するものの溶出液を分取し、再度HPLC(recycle)とTLCで同定した。TLCでは、合成SPと共にHPTLC Fertigplatten Kieselgel 60にスポットし、n-butylalcohol: pyridine: 酢酸: 水(30:20:6:24)で展開した。展開終了後、シリカゲルは10個のフラクションに分けてかきとり、各々の放射活性を測定した。図1に

示すとおり、HPLCでもTLCでも放射活性ピークは1つだけみとめられ、HPLCでは合成SPと溶出位置が一致し、TLCではFluorescamine噴霧による合成SPの螢光とRf値が一致した。SPの生合成は8時間で最大となり、12時間まで持続した後徐々に減少していった(図2)。

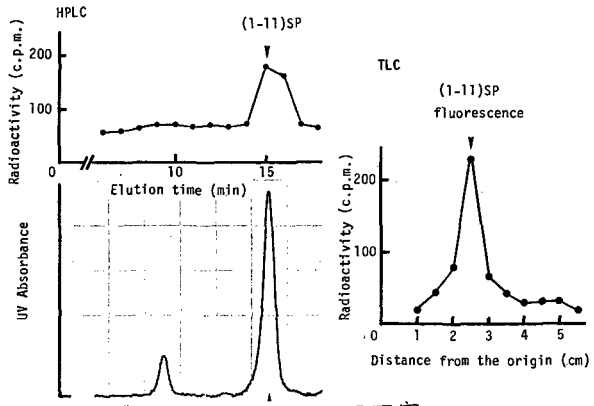


図1. ^{35}S-Met^{11}-SPのHPLCとTLCによる同定

SP生合成に対する薬物の影響

^{35}Sメチオニンと8時間incubateした時のSP生成量CHX, pCMB, (5-11)SPによって有意に減少した(図3)。すなわち、CHX (0.1mM)と(5-11)SP(2μM)はSP合成量をcontrolの約30%に減少し、PCMB(20μM)はcontrolの約65%に減少した。これに対し、PCMBと(5-11)SPは^{35}Sメチオニンのウサギ脊髄神経節へのとりこみを抑制しなかったが、CHXはメチオニンのとりこみをcontrolの約80%に抑制した(図4)。

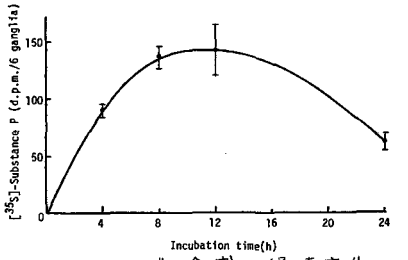


図2. ^{35}S-Met^{11}-SP合成の経時変化

ウサギ脊髄神経節からの遊離実験　^{35}Sメチオニンと8時間incubateしたウサギ脊髄神経節を高濃度K$^+$あるいは脊髄よりImmunoreactive SP(I-SP)を放出させる作用を持つCapsaicin[4]で刺激した後遊離物について分析を行った。遊離した放射活性ピークには合成SPと(5-11)SPに一致するピークがみとめられ、その他未同定のピークもいくつかみられた(図5)。自然遊離に対してCapsaicin 10μMによる刺激で約2倍、K$^+$ 50mMによる刺激では約5倍のSP遊離量増加が観察された(図6)。

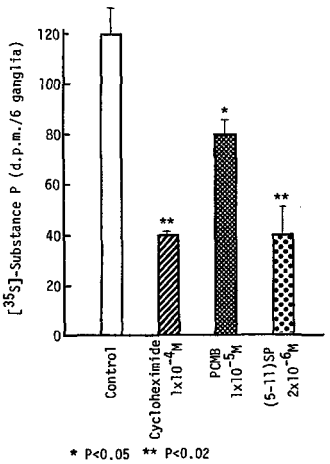


図3. ^{35}S-Met^{11}-SP生合成に対する薬物の影響

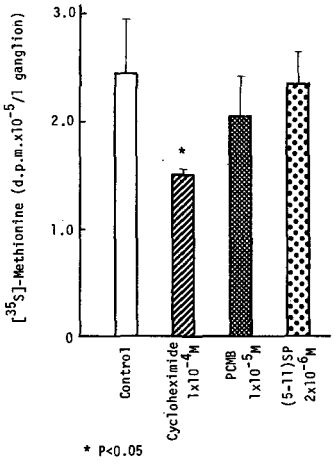


図4. ^{35}S-Metのとりこみに対する薬物の影響

【考察】

HARMAR5[6]はラット脊髄神経節で^{35}SメチオニンのSPへのとりこみを免疫沈降を行ってHPLCで分析したが、今回われわれはウサギ脊髄神経節で同様に生成した^{35}S-Met^{11}-SPの同定をC$_4$ゲル予備精製後HPLCによりまったく化学的技法を用いて行った。^{35}S-Met^{11}-SP生合成と^{35}Sメチオニンの神経節へのとりこみがCHXで阻害された。このことは、CHXがメチオニンの膜キャリア蛋白機能を阻害し、又リボゾームでの蛋白合成を阻害した結果であるかもしれない。これに対しPCMBと(5-11)SPはSP生合成を有意に抑制したが、^{35}Sメチ

オニンの神経節へのとりこみには無影響であった。このことから、これらの薬物はCHXとは異なるメカニズムでSP生合成を抑制するものと考えられる。より高分子のSP前駆体がまず存在し、そこからSPが生成されている可能性が示唆されているが[6,7]、PCMBはこの過程に働く酵素を阻害しているのかもしれない。一方、(5-11)SPは中枢神経系へ能動的にとりこまれることが我々の研究で知られている[10]ので、脊髄神経節にとりこまれた(5-11)SPが、negative feedback機構を介してSPの生成をおさえている可能性が考えられる。次に^{35}Sメチオニンとincubateしたウサギ脊髄神経節からの遊離物をC_4ゲル予備精製の後HPLCで分析した。すでに、中枢神経系からI-SPが遊離されるという報告はある[11]が、われわれの実験方法ではSPばかりでなく他の未同定の放射活性ピークも観察された。その中には合成(5-11)SPと同じ溶出時間を持つものもあった。最近SPの4位Proと5位Glnの間を開裂して(5-11)SPを生成するpost proline cleaving enzymeが牛の脳でみつかり[2]、ラット脳にも存在することがわかった[8]。したがって(5-11)SP自身が遊離されているのか、SPが遊離された後酵素によって(5-11)SPに加水分解されているのかは明らかではない。今後さらに検討を必要とする。

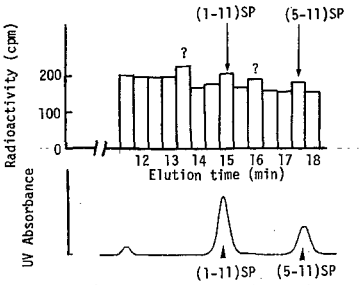


図5. 遊離物のHPLCによる分析

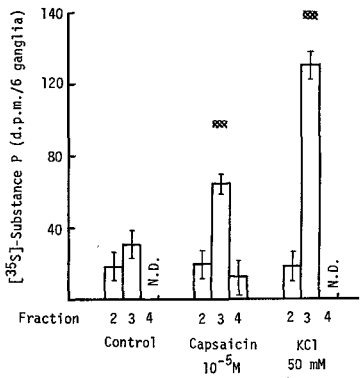


図6. 神経節からの^{35}Met-SPの遊離

【謝辞】

アミノ酸分析に御協力いただいた東京医科歯科大学　安原義先生に深く感謝する。

【文献】

1. Akagi,H., Otsuka,M., and Yanagisawa,M. (1980) Neurosci. Lett., 20, 259-263
2. Blumberg,S., Teichberg,V.I., Charli,J.L., Hersh,L.B., and Mckelvy,J.F. (1980) Brain Res., 192, 477-486
3. Cuello,A.C. et al. (1978) in Centrally Acting Peptides (Hughes,J., ed) pp. 135-155, Macmillan, London
4. Gamse,R., Molnar,A., and Lembeck,F. (1979) Life Sci., 25, 629-636
5. Harkins,J., Roper,M., Ham,R.G., and Stewart,J.M. (1978) Brain Res., 147, 405-409
6. Harmar,A., Schofield,J.G., and Keen,P (1980) Nature, 284, 267-269
7. Hatanaka,H., and Amano,T. (1981) Brain Res., 215, 305-316
8. Kato,T., Nakano,T., Kojima,K., Nagatsu,T., and Sakakibara,S. (1980) J. Neurochem., 35, 527-535
9. Konishi,S., Tsunoo,A., Yanaihara,N., and Otsuka,M. (1980) Biomed. Res., 1, 528-536
10. Nakata,Y., Kusaka,Y., Yajima,H., and Segawa,T. (1981) J. Neurochem., in press
11. Otsuka,M., and Konishi,S. (1976) Cold Spr. Harb. Symp. quant. Biol., 40, 135-143

113 培養神経細胞の生産する Substance P 及び Leu-Enkephalin-like Immunoreactivity

天野武彦・工藤佳久
（三菱化成生命研）

〔要　約〕

我々はさきにマウスニューロブラストーマとラットグリオーマのハイブリッド細胞のNG115-401細胞でSubstance P-like Immunoreactivity（SPLI）を有し分子量26,000の高分子部分にのみ見出されることを報告した。（Hatanaka, H and Amano, T., Brain Res 215（1981）305-316）

1）我々は今回この細胞が高分子成分と共に分子量約1300に一致する位置にカラムクロマトグラフでSPLIを再現性よく見出すことに成功した。このことはこの高分子成分がSubstance Pの Precursor であることをつよく示唆する。

2）PC12細胞（Greene, L.A. and Tischler, A.S.）においても同様に高分子成分とSPに一致するSPLIを見出した。

3）この抽出液はモルモット回腸標本を收縮させた。

4）さらにLeucine-Enkephalin-like Immunoreactivity のこれらの細胞に存在する可能性を提示した。

Key words：　Substance P, Neuroblastoma X Glioma Hybrid, PC12

近年中枢神経系に多くのペプチドが見出され，さらに今まで神経伝達物質としてみとめられているアセチルコリン，セロトニン，ノルエピネフリンとの共存も報告されている。(3-6) 特にその機能との関係で古典的な伝達物質とModulatorの概念が提出された。培養神経細胞はこの10年来クローン細胞の樹立により伝達物質の合成，レセプターの分子レベルでの研究等に極めてすぐれたモデルとして用いうることが明らかとなり世界的に広く用いられるようになっている。(1,2) しかし神経ペプチドを産生する細胞は殆んどなく，その樹立が待たれていた。我々は1979年ニューロブラストーマとグリオーマのハイブリッド細胞NG115-401細胞に高分子のSubstance P-like Immunoreactivity（SPLI）の産生を報告し，さらにPC12細胞にもSPLIがあることを報告した。(5) さらにこの高分子は分子量26,000の蛋白質であることもわかった。(5) 我々はこのSPLIがカラムクロマトグラフィーにより今まで報告した高分子

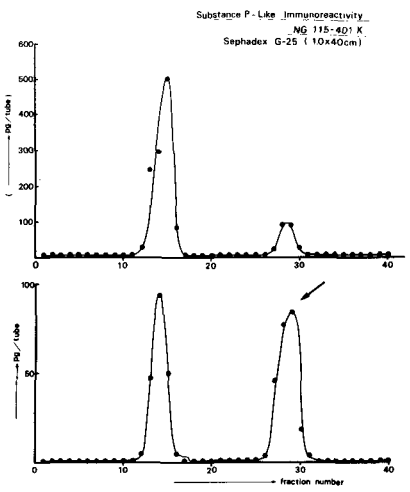


図1．SPLIのSephadex G-25による溶出パターン（NG115-401K）
上図．0.1M-酢酸抽出液
下図．同じ抽出液の凍結乾燥したもの
矢印はSPの位置

量のものと同時に含る量1347の溶出位置に一致するSPLIを見出し、高分子のSPLIは恐らくPrecursorであろうと思われる結果を得たので報告する。

〔実験方法〕

NG115-401細胞Bがそのサブクローン401K細胞5%新生牛血清(三菱化成)を含むDME培地にHATを加えて培養した。PC12細胞は5%新生牛血清5%馬血清(Gibco)を含むDME培地に培養した。(4).

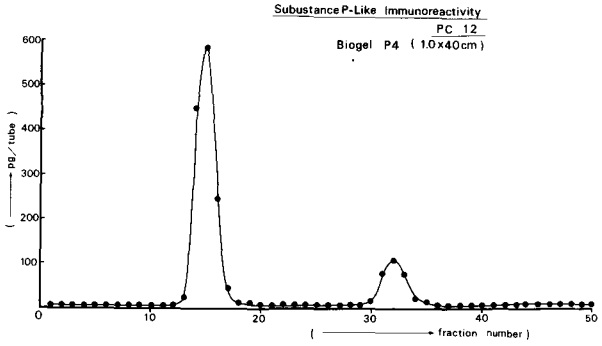


図2. PC12細胞のSPLIのBiogel P4による溶出パターン

細胞よりペプチドの抽出は0.1M酢酸で行い超音波破砕后15,000 r.p.m. 15分の遠心上清を凍結乾燥するかまたは1M-トリスでpH 7.4に調整后イムノアッセイに供した。ラヂオイムノアッセイは100 μlのウサギ抗血清(R4, 40,000-80,000倍希釈)および50 μlの^{125}I-SP(10,000~15,000 CPM) NEN ^{125}I-substance P(8-L-tyrosine)を含むすでに報告した方法を用いた。(8)

Leu-Enkephalinのラヂオイムノアッセイはsubstance Pに準じて行ったが、抗血清はMiles社のAnti-Leu-Enkephalin ^{125}I-Leu-EnkephalinはNENのEnkephalin(5-L-Leucine)を用いた。

Substance Pの生物学的検定

モルモット(約300 g)の回腸を摘出し95% O_2 + 5% CO_2混合ガスを通気したKrebs-Ringer液(pH 7.6±0.2, 30±1°C)を満したマグヌス管(20 ml)に懸垂した摘出回腸の1端は管底に固定し他端をisotonic transducer (Ugo Basile 7006)に連結しその出力をレコーダー(Technicorder Type 3047 横河)で記録した。

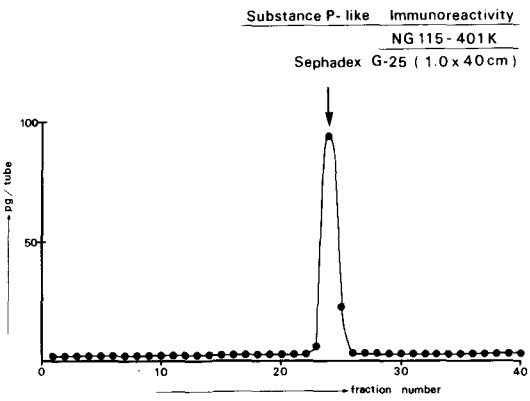


図3. NG115-401K細胞のアセトン/酢酸抽出液のSephadex G-25による溶出パターン
矢印はSPの位置

〔実験結果〕

NG115-401K細胞の0.1M酢酸抽出液を1M-TrisでpH 7.4に調整したものをSephadex G-25カラム(1.0×40 cm)にかけて0.9 ml/tube溶出したものをラヂオイムノアッセイしたものが図1上である。分子量約1300のSP12-

致してSPLIのピークがみられた。同じサンプルを凍結乾燥したのちRIA-Buffer(0.14M NaCl, 5mM EDTA, および1mg/ml牛血清アルブミンを含む10mM燐酸緩衝液 pH 7.4)にとかしたものをカラムにかけたものが図1.下である。高分子成分のSPLIが溶けないで減少している。Biogel P4カラムでも同様な2つのピークを見出している。

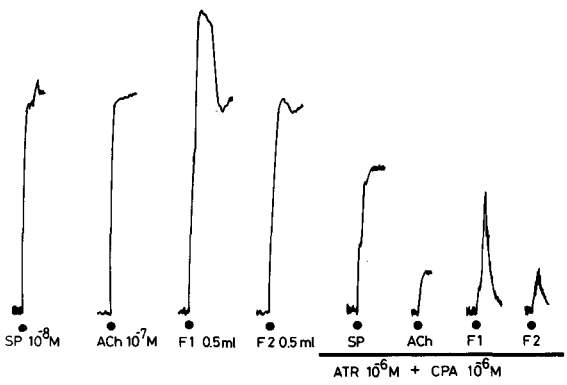


図4。 NG115-401K細胞の抽出液のモルモット回腸標本による生物学的検定

図2はPC12細胞の抽出液をBiogel P4カラムにかけたもので高分子成分とSPに一致するSPLIを同じく見出すことができた。即ちNG115-401細胞もPC12細胞もSubstance Pと考えられるSPLIを産生しており且同時に検出される高分子成分のSPLIはSPのPrecursorの可能性が極めて高い。

細胞をアセトン/0.1M酢酸(10:1)で抽出しダイエチルエーテルで脂質を除いた後凍結乾燥したものをRIA-BufferにとかしてカラムにかけるとSPの位置にのみピークが出現する。このような標準的なペプチドの抽出方法ではmatureな恐らく神経細胞のdense core vesicle内に存在するペプチドのみを抽出すると思われる。(図3)

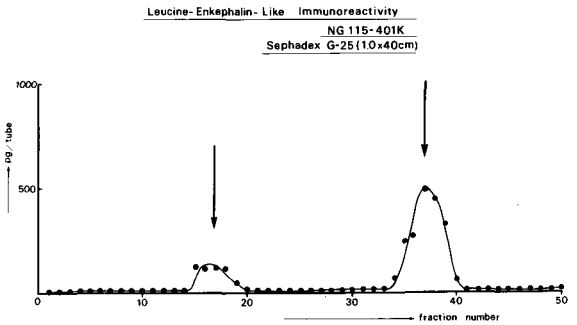


図5. NG115-401K細胞抽出液のSephadex G-25による溶出パターン(LELI)

この抽出液を用いてモルモット回腸を用いて收縮試験を行うとアトロピン(10^{-6}M)クロールプロニラミン(10^{-6}M)でアセチルコリンの作用を除いた標本に於ても細胞抽出液による收縮がみられた。(図4, F1, F2) このことは抽出液中にSP様物質を含むことを示唆する。

同じSephadex G-25カラムのフラクションでLeu-Enkephalinのラヂオイムノアッセイを行ってみると2回に1回位サンプルによって変動はみられるがLeu-Enkephalinの溶出位置に一致してLeu-Enkephalin-like Immunoreactivity (LELI)がみられる。(図5) ラヂオイムノアッセイでもPC12細胞でもLELIがかなりの量で検出できた。他のC1300ニューロブラストーマ, ニューロブラストーマ×グリオーマハイブ

リッド細胞では検出できていない。Leu-Enkephalinの抗血清(Miles)は特異性及び抗体価が低くSPに比較して% bound B/B$_0$の50%の値が100pg/tubeであること、及びかならずしも常にカラムで検出できないので現在ラジオレセプターアッセイその他の検出方法を検討中である。

	Substance P-like Immunoreactivity (pg/mg)	Leu-Enkephalin-like Immunoreactivity (pg/mg)
NG115 401K	1200	680
PC 12	960	454
Sensory neuron	+	?
Enkephalin neuron	?	+

表1. 2つの細胞のSPLIとLELIの共存の可能性

[考察]

我々はさきにNG115-401細胞が高分子のSPLIを産生していることを報告したが今回高分子成分と同時にSPに一致してSPLIを見出すことができ、この高分子成分は恐らくSPのPrecursorであることを強く示唆する結果を得た。さらにこのようなSP細胞と正常神経細胞を比較するため他のペプチド,エンケファリンのラジオイムノアッセイも行った。正常脊髄神経節あるいは尾角にはSP,以外にAngiotensin II, Somatostatin VIP, Gastrin, Neurotensin, Enkephalinの存在が報告されており、SPとEnkephalinの共存の可能性がクローン細胞の未分化を示すものかあるいは正常神経細胞の性質と対応するものかは今後の実験の課題である。

[文献]

1) Amano,T., Richelson, E., and Nirenberg, M. (1972) Proc. Nat. Acad. Sci. 69, 258-263
2) Amano,T., Hamprecht, B., and Kemper, W. (1974) Exp. Cell Res. 339-408
3) Chang, M.M and Leeman, S.E. (1970) J. Biol. Chem. 245, 4748-4790
4) Greene, L.A. and Tischler, A.S. (1976) Proc. Nat. Acad. Sci. 73, 2424-2428
5) Hatanaka, H. and Amano, T. (1981) Brain Res. 215, 305-316
6) Hokfelt, T., Johansson, O., Ljungdahl, A., Kundberg, J.M. and Schultzberg, (1980) Nature. 284, 515-521
7) Otsuka, M. and Konishi, S. (1976) Cold Spring Harbor Symp. 40, 135-143
8) Yanaihara, C. Sato,H., Hirohashi, M., Sakagami, M., Yamamoto, K., Hashimoto, T., Yanaihara, M., Abe,K., and Kaneko, T. (1976) Endocrinol. Jap. 23, 457-463

114 シナプトゾームよりのGABA放出とCaイオン

朝倉　正・星野道雄・小林孝彰
松田　誠(慈恵医大・医化)

〔要　約〕

Synaptosome(Syn)をCa^{2+}存在下で脱分極させることにより神経伝達物質であるγ-アミノ酪酸(GABA)が放出されることは知られている。このGABA放出が脱分極によるのかあるいはCa^{2+}のinfluxによるのかを調べるためにCa^{2+}-ionophore A23187を用いて検討した。またこのGABA放出にcalmodulinが関与しているかどうかを知るためにcalmodulinの阻害剤であるtrifluoperazineを用いてGABA放出に対する影響を調べた。(1)高K^+, Ca^{2+}-freeにおけるSynよりのGABA放出量は高K^+, Ca^{2+}存在下におけるそれの約1/4に減少した。(2)しかし高K^+, Ca^{2+}-freeでもSynは高K^+, Ca^{2+}共存下と同程度脱分極していた。(3)Synをあらかじめ A23187で処理するとCa^{2+}の添加のみでGABAを放出しその際脱分極はみられなかった。(4)Synをcalmodulinの阻害剤·trifluoperazineで処理するとある程度のGABA放出の阻害がみられたが同時にA23187を作用させるとGABA放出量は完全に回復した。

以上のことからSynよりのGABA放出にはCa^{2+}のinfluxが必要な条件であり脱分極はむしろCa^{2+}をinfluxさせるための条件にすぎないと考えられる。またtrifluoperazineによるGABA放出の阻害はcalmodulinに対する直接作用よりむしろCa^{2+}チャンネルないし脱分極機構の抑制に由来するCa^{2+}のinfluxの阻害によるように思われる。

Key words : GABA release, Ca ion, calmodulin

SynをCa^{2+}存在下で脱分極させると神経伝達物質を放出することはよく知られており、このことは抑制性伝達物質GABAについても報告されている(3,5)。しかしこの伝達物質放出の条件としてのCa^{2+}と脱分極との関係は充分明らかではなく，特に脱分極が単にCa^{2+}influxのための条件にすぎないのか，脱分極とCa^{2+}は共に必須な条件なのかは重要な問題である。またもしCa^{2+}influxだけが伝達物質放出の必須条件であるにしてもこのCa^{2+}はcalmodulinが関与する生化学反応を付随しているのかどうかも興味ある問題である。われわれはSynよりのGABA放出についてこれらの問題を明らかにするためにionophore A23187ならびにtrifluoperazineを用いて検討した。すでにA23187は細胞膜のCa^{2+}-influxを増大させるcarrierであることは知られているし(7)，またtrifluoperazineはcalmodulinの作用をかなり特異的に阻害する薬物であることが示されているからである(4)。

〈実験方法〉

Synはマウス(DD系,雄,5週齢)脳からSellströnらの方法(9)に準じて調製した。得られたSyn pelletは1mM EGTAを含むCa^{2+}-free Krebs-Ringer bicarbonate(pH 7.4)にsuspendし200mg brain/mlとした。SynをA23187あるいはtrifluoperazineで処理する時はこのsuspensionを37℃で本文ないし図に示す濃度・時間でこれら薬物とincubateした。

Perfusion装置のmilipore filter(pore diameter 0.45μm)上にこれらSyn suspension 1mlをのせてSyn bedを作製した。はじめCa^{2+}-free Krebs-Ringer bicarbonate液(Ca^{2+}-free KRB液)pH 7.4を一定時間流した後，次の3種の溶液で4分間灌流しその間に放出されたGABA量を測定した。①56mM KClを含みCaCl₂を含まない液(高K^+, Ca^{2+}-free KRB液)，②2.5mM CaCl₂を

含む液(KRB液), ③56mM KCl, 2.5mM $CaCl_2$ を含む液(高K^+ KRB液)。放出GABA量の測定はSchmidら(1,8)のECD gas chromatograph法によった。またCa^{2+}-free KRB液でそのまま灌流しつづけても同時間内に一定のGABAの放出(自発放出)がみられるが, 前記3液におけるGABA放出量はこの値を差引いて表現した。

Synの膜電位を測定するには次のような方法で行なった(2,6)。無処理ないし薬物処理したSynをCa^{2+}-free KRB液にsuspendし300mg brain/mlとした。次いで螢光色素3,3'-diethyloxadicarbocyanine iodideを加えて3μMにした後 K^+ないしCa^{2+}濃度を56mMないし2.5mMにしたときの螢光強度の変化を測定した。励起波長574nm, 螢光波長595nmであり測定温度は37℃である。また脱分極の程度はCa^{2+}-free KRB液での螢光強度を100としたときの増大分を%で示した。

<結果と考察>

Synの GABA放出と脱分極に対するCa^{2+}の影響

無処理Syn bedをCa^{2+}-free KRB液で灌流して洗った後 高K^+, Ca^{2+}-free KRB液, KRB液あるいは高K^+KRB液で灌流した時放出されるGABAを測定した。図1に示すように高K^+KRB液つまり高K^+, Ca^{2+}の共存時にのみ多量のGABAが放出され, 高K^+だけでもCa^{2+}共存だけでもGABAの放出はみられなかった(自発放出GABA量は14.55n mol/g brain)。図1はまた同じ条件での膜電位を示している。高K^+, Ca^{2+}-free KRB液でも高K^+KRB液でも脱分極したがKRB液では脱分極しなかった。つまり高K^+だけではSyn膜電位を脱分極してもGABAを放出することはできず, GABA放出のためには脱分極とCa^{2+}の共存が必要のようにみえる。しかしこの実験結果は『脱分極は単にCa^{2+} influxの条件でありGABA放出はただCa^{2+} influxによる』という可能性をも示しているように思われる。

A23187で処理したSynのGABA放出とCa^{2+}

Ca^{2+}-ionophoreであるA23187でSynを処理(30μM, 37℃ 10分)した後, GABA放出におけるCa^{2+}の意義を検討した。このA23187処理Synを種々のKRB液で灌流し放出されるGABAを測定すると, 図2に示すようにKRB液で多量のGABA放出が認められ 高K^+KRB液とほぼ同程度であった(自発放出GABA量は16.0n mol/g brain)。つまりA23187の処理によってSyn

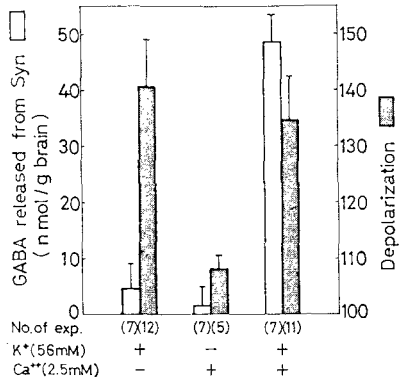


図1. 無処理SynのGABA放出, 膜電位に対する種々のKRB液の作用

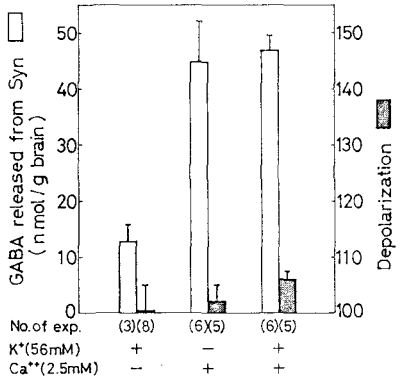


図2. A23187処理SynのGABA放出, 膜電位に対する種々のKRB液の作用

はCa^{2+}の添加だけで充分量のGABAを放出するように変化していた。高K^+, Ca^{2+}-free KRB液でもある程度GABA放出は認められたがこれは高K^+による脱分極操作でSyn膜結合性のCa^{2+}が作用したためと思われる。なぜなら再度高K^+, Ca^{2+}-free KRB液で刺激した場合にはGABAの放出が全く認められないからである。A23187処理Synのもう1つの特徴は高K^+

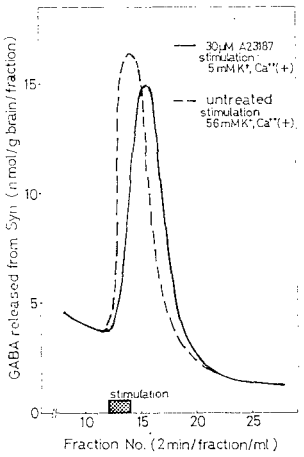


図3. 無処理Synおよび A23187処理Synに対するそれぞれ高K^+ KRB液およびKRB液のGABA放出作用

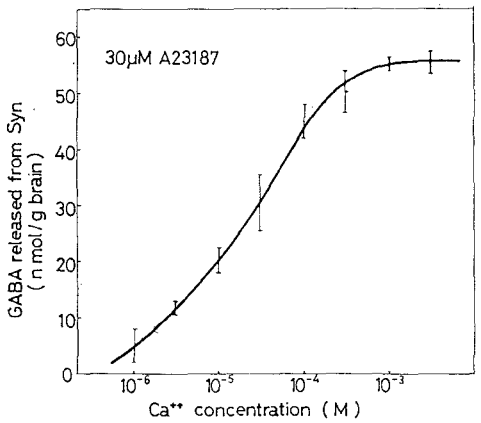


図4. A23187処理SynよりのGABA放出とCa^{2+}濃度の関係

によってほとんど脱分極しないように変化していることである(図2)。その機構は不明であるが，ひょっとしたらA23187がSyn膜のK^+チャンネルを抑制しているのかも知れない。いずれにしろA23187処理SynはKRB液に含まれているCa^{2+}で脱分極とは無関係に多量のGABAを放出させるように変化したわけである。A23187はCa^{2+}-ionophoreとして知られているので，この事実は無処理のSynよりのGABA放出においてもCa^{2+}のinfluxが最も重要な要因であり，脱分極はCa^{2+}-influxのための準備段階と考えることができる。またA23187処理SynのCa^{2+}によるGABA放出はその時間経過において無処理Synの高K^++Ca^{2+}によるGABA放出と異なるところはなかった(図3)ので同じ機構で放出されるものと考えられる。GABA放出に必要なCa^{2+}濃度はかなり低いものであり3×10^{-6}Mでも有意にGABAを放出させた(図4)。

<u>Trifluoperazine処理SynよりのGABA放出</u>

Ca^{2+}がinfluxした後いくつかの連鎖反応の結果GABAが放出されることが想像されるが，この間にCa^{2+}結合蛋白calmodulinが関与しているかどうかは興味ある問題である。そこでcalmodulinの作用を抑制する薬物として知られているtrifluoperazine (TFP)でSynを処理した後，高K^+KRB液で放出さ

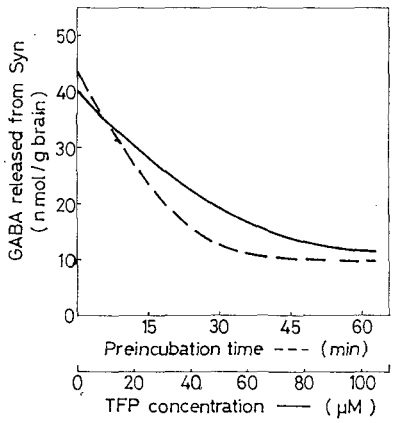


図5. SynのGABA放出能に対するTFP前処理の抑制作用——その濃度依存性ならびに経時的変化

れるGABA量を検討してみた。Synを100μM TFPで37℃各時間preincubateした後Synをisolateし上と同様にして高K^+KRB液でのGABA放出を測定した。図5に示すようにGABA放出量はpreincubation timeとともに減少するが，ほぼ30分で一定値に達した。また各濃度のTFPと30分間preincubateしたSynからのGABA放出は濃度の増大とともに減少したが，約100μMで一定値に達した(図5)。そこでSynのTFP処理は100μM TFP, 37℃ 30分という条件とし，このSynおよびA23187処理Synさらに TFPと同時にA23187で処理したSynについて高K^+KRB液におけるGABA放出を調べてみた。図6はその結果を示している。TFP処理でGABA放出は約30%に減少するが TFP+A23187処理SynとA23187処理Synとの間には全く差はみられなかった。つまりTFPによって抑制されたGABA放出はA23187処理によって完全に回復することが示された。従ってTFPによるGABA放出の抑制は，TFPがcalmodulin作用を阻害したためというよりCa^{2+}チャンネル(ないしK^+チャンネル)の抑制によるのではないかと考えられる。もしcalmodulin作用を抑制しているのであればA23187で回復すること，つまりCa^{2+}-influxによって回復することは説明しにくいからである。K^+チャンネルの抑制は高K^+による脱分極の程度を測定すればよいはずであるが測定が困難であり現在検討中である。

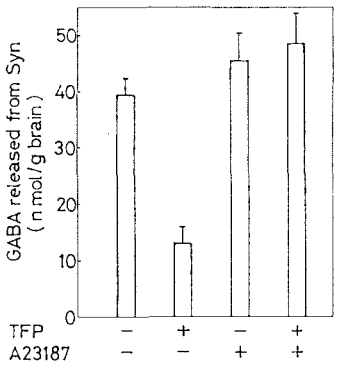


図6. 高K^+KRB液によるGABA放出に対するTFP, A23187前処理の影響

以上の実験事実からいくつかの問題点を含みながら次のように結論できるかも知れない。(1)高K^+KRB液でSynから多量のGABAが放出されるが，高K^+による脱分極はCa^{2+}のinfluxの条件作りに必要である。(2)influxされたCa^{2+}はSynの構造的変化をおこしてGABAを放出させるのであろうが，この際calmodulinは関与していないように思われる。

< 文 献 >

1. Asakura, T. & Matsuda, M. (1980), Jikeikai Med. J., 27, 63-69.
2. Blaustein, M.P. & Goldring, J.M. (1975), J. Physiol., 247, 589-615.
3. Bradford, H.F. (1970), Brain Res., 19, 239-247.
4. Hidaka, H. (1981),蛋白質 核酸 酵素, 26, 977-993.
5. Hoshino, M., Asakura, T. & Matsuda, M. (1979), J. Nutr. Sci. Vitaminol., 25, 367-374.
6. Kobayashi, T., & Matsuda, M. (1981), 生化学, 53, 628.
7. Reed, P.W. & Lardy, H.A. (1972), J. Biol. Chem., 247, 6970-6977.
8. Schmid, R. & Karobath, M. (1977), J. Chromatogr., 139, 101-109.
9. Sellström, Å., Sjöberg, L.-B. & Hamberger, A. (1975), J. Neurochem., 25, 393-398.

115 GABA release に対する Taurine の作用：Presynaptic GABA-autoreceptors について

波間美佐子・岡本浩一・酒井　豊
（防衛医大・薬理）

〔要　約〕

Taurine が小脳の stellate cell の neurotransmitter として機能している可能性は高いと考えられるが、taurine の neuromodulator としての作用も一概には否定出来ない。今回は、taurine の modulator としての作用に焦点をあてゝ検討した。1）モルモット小脳切片からの ^{3}H-GABA の Ca^{2+} 依存性放出は muscimol によつて抑制された。2）taurine も同様に ^{3}H-GABA の Ca^{2+} 依存性放出を抑制した。3）muscimol の作用は bicuculline, picrotoxin および strychnine で遮断されたが、taurine の作用は bicuculline だけが遮断した。4）Glycine は ^{3}H-GABA の放出に影響を与えなかつた。5）^{3}H-L-glutamate の Ca^{2+} 依存性放出は taurine によつて抑制されなかつた。6）小脳 P_2 分画により $^{45}Ca^{2+}$ の取り込みは、taurine により特異的に抑制された。以上の結果から、モルモット小脳には GABA の presynaptic autoreceptor が存在しており、taurine はこの receptor に作用して、GABA の synaptic release を調整している可能性が示唆された。更に、$^{45}Ca^{2+}$ の P_2 分画への取り込みを taurine が抑えたことから、presynaptic autoreceptor における taurine の GABA 放出抑制作用が、synaptic terminal への Ca^{2+} の流入を抑えることによる可能性が考えられる。

Key words：GABA autoreceptor, Taurine, Ca-ions.

Taurine が小脳の Stellate Cell において neurotransmitter として機能している可能性は、神経化学的（3,5）および電気生理学的検討結果（3,6）からみてかなり高いと考えられるが、興奮性膜における Ca^{2+} と taurine の相互作用(1)から考えると、taurine がいわゆる neuronal modulator としての作用をもつている可能性も一概には否定出来ない。今回は、taurine の neuromodulator としての作用に焦点をあて、他の neurotransmitter amino acids（GABA, glutamate）のモルモット小脳切片からの放出が taurine によつて影響されるかどうか、更に Ca^{2+} の小脳 P_2 分画への取り込みに対する taurine の作用はどうか、という点を主として検討した。

〔実験方法〕

モルモット（♂、250～300g）の小脳を、正中線に平行に切つて作成した切片（厚さ約 0.4～0.5 mm, 重さ 25～30mg）を以下の実験に使用した。

標識アミノ酸の小脳切片からの放出：小脳切片を Krebs-Ringer bicarbonate (pH 7.4) 中で 15分間好気的に preincubation した后、10 μCi、最終濃度 3.4×10^{-8} M の ^{3}H-GABA（29.3 Ci/m mole, NEN）又は 10 μCi、最終濃度 2.3×10^{-8} M の ^{3}H-glutamate（43.3 Ci/m mole, NEN）を加え、37℃で30分間好気的に incubation し、^{3}H-アミノ酸を小脳切片内に取り込ませた。^{3}H-GABA を取り込ませた際には、aminoxyacetic acid を最終濃度 10 μM になるように加えた。^{3}H-アミノ酸を取り込ませた切片を灌流槽（dead space = 0.5 ml）中に入れ、Ca^{2+} を含まない Krebs-Ringer（37℃）で 2ml/min の流速で30分間灌流し、灌流液を1分毎に採取した。この際放出された ^{3}H-アミノ酸量を spontaneous release とした。

高 K^{+} 刺激による ^{3}H-アミノ酸の放出は、次のように行つた。^{3}H-アミノ酸を取り込ませた切片を灌流槽に入れ、12分間 Ca^{2+}-free Krebs-Ringer（37℃）で灌流後、50 mM KCl を含む Krebs-

Ringer（Ca^{2+} 2mM 存在又は非存在）に切り換え、18分間更に灌流した。灌流液は全て1分毎に採取した。灌流后の切片は Protosol（NEN）で溶解し残存 ^{3}H を計数した。^{3}H-アミノ酸の放出は各分画中に放出された ^{3}H の計数を、切片中に取り込まれていた ^{3}H の計数で除し%表示した。Taurine又は glycine 作用は 10^{-3}M 又は 2.5×10^{-2}M を 50 mM-KCl と同時に与えることにより検討した。Ca^{2+} の小脳 P_2 分画による取り込みに対する taurine の作用は次のようにして検討した。Whittaker の方法(7)に準じて調製した小脳 P_2 分画を 0.8－0.9 *ml* の Krebs-Ringer 中に分散させ（約 0.7 *mg* protein/*ml*）、5分間 37℃ で pre-incubation 後、$^{45}CaCl_2$, 2 μCi, 0.1 *ml* を加えて5分間 incubation し、1分間隔で 0.3 *ml* をとり出し、Millipore filter（0.45 μm）で濾過。Filter を冷食塩水 5 *ml* で2回洗い、シンチレーターに溶解させ常法により計数した。10^{-3} 又は 2.5×10^{-2}M の taurine, GABA 又は glutamate を $^{45}CaCl_2$ と同時に添加して、これらのアミノ酸の作用を検討した。^{45}Ca の取り込み量は *mg* protein 当り（Lowry 法(2)により測定）の cpm で表示した。

〔実験結果〕と〔考察〕

^{3}H-アミノ酸を取り込ませた小脳切片を Ca^{2+}-free Krebs-Ringer で30分間灌流した場合、^{3}H-GABA は 14.7%が、^{3}H-glutamate は 12.5%が自然放出されたが、^{3}H-GABA の放出は12分后に定常状態に達するのに対し、^{3}H-L-glutamate は連続的に放出が減少し一定値には達しなかつた。Ca^{2+} 非存在下での 50 mM KCl 刺激によつて ^{3}H-GABA の放出は 4.3%、^{3}H-L-glutamate の放出は約 2%増加した。2 mM Ca^{2+} 共存下では放出の増加は各々 23.6%、4%となり両アミノ酸とも Ca^{2+} に依存していることがわかる。この Ca^{2+} 依存性放出を指標として以下の検討を行つた。まず ^{3}H-GABA の小脳切片からの放出が、大脳の場合(4)と同様に、presynaptic autoreceptor により制御されているかどうかをみるため、GABA の agonist である musumol（10^{-7}M）を加えてみると、Fig 1 に示したように、^{3}H-GABA の Ca^{2+} 依存性放出は著るしく減少した。一方アミノ酸に対する

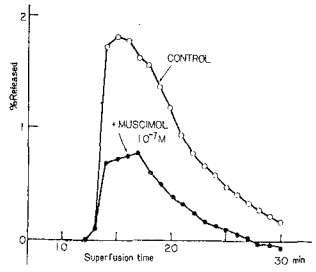


Fig.1. Effect of muscimol(10^{-7}M) on high-K evoked Ca-dependent release of ^{3}H-GABA from guinea-pig cerebellar slices.

antogonist である bicuculline、picrotoxin および Strychnine（各 10^{-6}M）については Fig. 2 に示したように、bicuculline と Strychnine は ^{3}H-GABA の Ca^{2+} 依存性放出を増加させる傾向があり、picrotoxin は減少させる傾向を示した。これらの事実から、小脳においても GABA の presynaptic autoreceptor が存在しており、GABA の synaptic release が制御されていることが示唆される。Taurine（10^{-3}M 又は 2.5×10^{-2}M）も、muscimol と同様に ^{3}H-GABA の Ca^{2+} 依存性放出を著明に低下させた（Fig. 3）。この taurine の抑制作用が muscimol のように

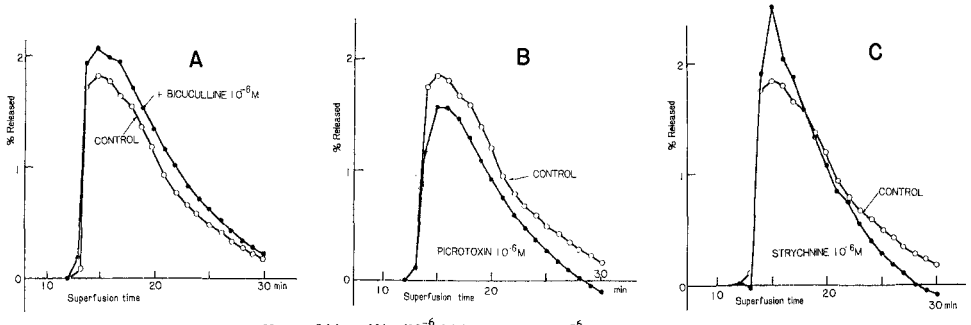


Fig. 2. Effects of bicuculline(10^{-6}M)(A), picrotoxin(10^{-6}M)(B) and strychnine(10^{-6}M)(C) on high-K evoked Ca-dependent releas

GABA の autoreceptor を介するものかどうかを知るために、antagonists が taurine と muscimol に対してどのように作用するかを次に検討した。

Fig. 4–A, 4–B, 4–C に示したように、muscimol の抑制作用は bicuculline、picrotoxin および strychnine（各 10^{-6} M）のいづれによつても拮抗された（Fig. 1 と比較）。一方、taurine の抑制作用は、Fig. 5–A に示したように、bicuculline によつては拮抗されたが、picrotoxin および Strychnine によつては有意に拮抗されなかつた（Fig. 5–B, 5–C）。したがつて、muscimol と taurine は共に bicuculline の拮抗作用からみて、GABA receptor に結合することが示唆されるが、muscimol は picrotoxin と strychnine の作用から、GABA receptor と関連した ionophore にも作用していると考えられる。

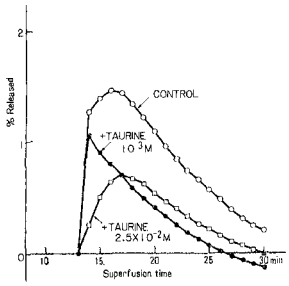


Fig. 3. Effect of taurine, 10^{-3}M &2.5x10^{-2}M, on high-K evoked Ca-dependent release of ^{3}H-GABA.

次に、この taurine の ^{3}H–GABA 放出抑制作用が GABA に対して特異的なものかどうかをみるため、^{3}H–L–glutamate の Ca^{2+} 依存性放出に対する taurine の作用を検討したが、^{3}H–L–glutamate の放出は、10^{-3} M および 2.5×10^{-2} M の taurine によつて有意な変化を受けなかつた。更に GABA の autoreceptor は GABA や taurine 以外のアミノ酸によつても作用をうけるかどうかをみるため、glycine（10^{-3} M）を taurine の代りに用いて Fig. 3 と同様な検討を行つたが、^{3}H–GABA の放出は有意に低下されなかつた。これらのことから、taurine の作用はある程度の特異性を持つているものと考えられる。

以上のように taurine の GABA 放出抑制は、GABA の autoreceptor を介するものと考えて矛盾な

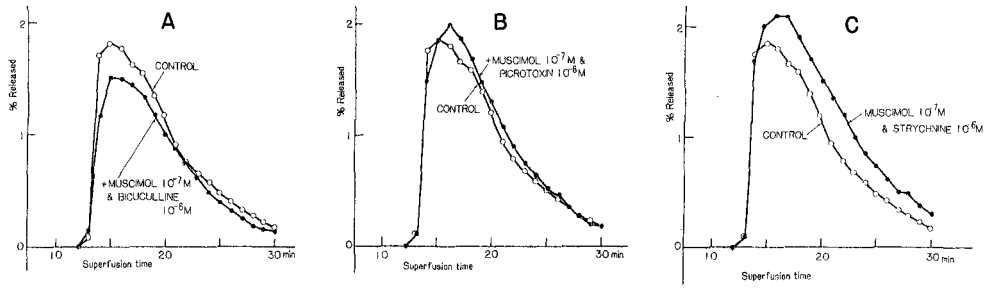


Fig. 4. Effects of bicuculline(10^{-6}M)(A), picrotoxin(10^{-6}M)(B) and strychnine (10^{-6}M)(C) on the suppression by muscimol(10^{-7}M) of high-K evoked Ca-dependent release of ^{3}H-GABA.

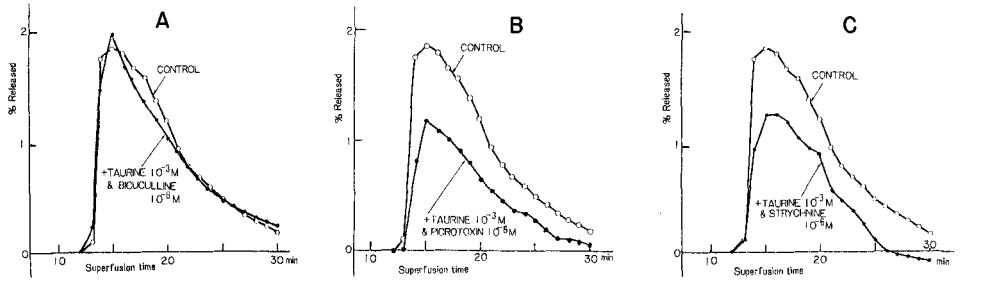


Fig. 5. Effects of bicuculline(10^{-6}M)(A), picrotoxin(10^{-6}M)(B) and strychnine (10^{-6}M)(C) on the suppression by taurine(10^{-3}M) of high-K evoked Ca-dependent release of ^{3}H-GABA.

いが、taurine が GABA の autoreceptor に結合した際に、どのような機序により GABA の放出を抑えるのかが次に問題になる。一つの可能性として我々は synaptic terminal 内への Ca^{2+} の流入が抑制されるのではないかと考え、$^{45}Ca^{2+}$ の P_2 分画への取り込みに対するアミノ酸の作用を検討した。Fig. 6-A、6-B、6-C に示したように、$^{45}Ca^{2+}$ の取り込み速度は taurine（10^{-3} 又は 2.5×10^{-2} M）により著明に抑制されるが、GABA および L-glutamate は taurine よりもかなり弱い抑制しか示さない。このことは、Ca^{2+} の動きに対する taurine の特異的作用を示すだけでなく、上記のような presynaptic autoreceptor における taurine の作用が Ca^{2+} を介しているとした予想と矛盾しない。今回の検討結果は、taurine が伝達物質としての機能の他に、GABA の synaptic release を抑制するという modulator 的な性質も持つていることを示しているが、小脳において taurine の伝達物質としての抑制作用と GABA の伝達物質としての抑制作用を抑えるという一見相反する作用がどのような生理的意義をもつているのかが今後の課題である。さらに、taurine の GABA autoreceptor での作用が Ca^{2+} を介したものではないかという示唆が一般的な問題として興味深いが、今後の一層の検討を必要とする。

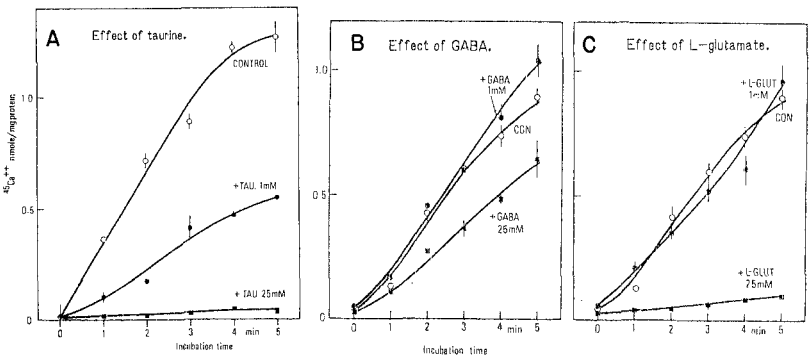


Fig. 6. Effects of taurine(10^{-3}M & 2.5×10^{-2}M)(A), GABA(10^{-3}M & 2.5×10^{-2}M)(B) and L-glutamate(10^{-3}M & 2.5×10^{-2}M)(C) on the uptake of $^{45}Ca^{2+}$ by cerebellar P_2 fraction.

〔文献〕

1. Kuriyama,K. et al(1978) in Taurine and Neurological Disorders (Baubeau,A. and Huxtable,R.J.,ed)pp.201-206,Reven Press,New York
2. Lowry,O.H. et al(1951) J.biol.Chem. 193,265-275
3. McBride,W.G. and Frederckson,R.C.A.(1978)in Taurine and Neurological Disorders(Baubeau,A. and Huxtable,R.J., ed)pp.415-427, Raven Press,New York
4. Mitchell,P.R. and Martin,I.L.(1978) Nature.274,904-905
5. Okamoto,K. and Namima,M.(1978) J.Neurochem. 31,1393-1402
6. Okamoto,K. and Sakai,Y.(1980) Br.J.Pharmac. 69,407-413
7. Whittaker,V.P.(1959) Biochem.J. 72,694-706

（本研究の一部は第8回国際薬理学会（1981.7 東京）において報告した。）

116 マウス脳シナプトゾームにおける新しいGABA生合成系路とその負のフィードバック機構について

米田幸雄(京府医大・薬理)
Eugene Roberts(シティオブホープ研究所・神経科学).

〔要　約〕

マウス脳粗シナプトゾーム(P₂)分画を用いて^{3}H-オルニチンの代謝を検討したところ，大量の^{3}H-プロリン，^{3}H-グルタミン酸および^{3}H-GABAの生成が認められたが，^{3}H-プトレシンの生成は著明ではなかった。各種の酵素阻害剤の影響を検索した結果，この代謝系路として以下の系路が示唆された。

オルニチン⟶グルタミン酸γセミアルデヒド⟶グルタミン酸⟶GABA
↑↓
Δ^1-ピロリン-5-カルボキシル酸⟶プロリン

一方，上記三種の主アミノ酸の生成は，反応液中にGABA(1-5mM)を添加することにより強く阻害され(40-70%)，その阻害作用は上記代謝系路の第一段階反応を触媒する酵素，オルニチンδ-アミノ転移酵素に対する競合的拮抗阻害に由来するものであった。更に，この阻害作用はGABAに選択性の高いものであることが判明した。以上の結果より，哺乳動物の中枢神経系においてオルニチンがグルタミン酸，さらにはGABA分子の前駆体となり得ること，およびその代謝系路にはGABAによる負のフィードバック機構が存在することが明らかとなった。

Key words : Ornithine δ-aminotransferase, Inhibition by GABA, Negative feedback mechanism

---

哺乳動物の中枢神経系(CNS)において抑制性神経伝達物質としての機能を持つγ-アミノ酪酸(GABA)が，L-グルタミン酸(GLU)からGLU脱炭酸酵素(GAD)により生合成されることは周知の事実であるが，このGLUのGABAニューロン終末部における由来については不明の点が多い。もちろん，神経組織においてもGLUの主な起源としては，TCA回路を経由して生成するものと，グルタミンから生成するものの両者が挙げられるが，これらの系路を経て生成されたGLUがGABAニューロン終末部において，直接GADの基質となり得るかどうかについては疑問視する考え方もあるのが現状である。また，GLU自身も興奮性神経伝達物質としての機能を示唆されているにもかかわらず，その興奮性神経終末部での生合成系路については充分に明らかにされていない。一方，哺乳動物の末梢組織においては，L-オルニチン(ORN)(3,12)のみならずL-プロリン(PRO)(4,13)がGLUの前駆物質となり得ることが証明されている。この場合，反応中間体としてL-グルタミン酸γセミアルデヒド(GGSA)，あるいはL-Δ^1-ピロリン-5-カルボキシル酸(P5C)の存在が知られている(両者は水溶液中では相互変換可能)。さらに，神経組織ではORNカルバモイル転移酵素活性が極めて低いため(5)，尿素回路が充分に機能していないにもかかわらず，ORNの脳内レベルは著しく低い(6,9)。これらの成績は，神経組織には尿素回路以外のORN代謝系路が存在することを示唆するものと思われる。従って本研究では，ORNが興奮性神経終末部，あるいはGABAニューロン終末部におけるGLU生合成の前駆物質となり得るかどうかについて検討を加えた。

〈方法〉

<u>ORN代謝の検討</u>：常法(2)によりマウス脳より精製した粗シナプトゾーム(P₂)分画を，

脱塩蒸留水を加えたのちPolytronにより ホモゲナイズし，300nM ^{3}H-ORN，500μM α-KG，0.1mM PLP，0.1mM NAD，および10mM Tris-HCl 緩衝液(pH 8.2)を含む混合液とインキュベートした。反応停止後遠心分離した上清を，Dowex 50W X8 を充填したカラムに通用し，10ml H_2O，および2ml 5N NH_4OH により溶出した。アンモニア溶出液を蒸発乾固させたのち，残渣を各アミノ酸およびプトレシン(PUT)をキャリヤーとして含む0.01N HCl 溶液に溶解して分析に用いた。各化合物の分離および同定は，セルロースプレートを用いた二次元薄層クロマトグラフィ(TLC)法，ならびに陽イオン交換TLC法により行なった。二次元TLCは一次展開溶媒として，イソプロパノール：ギ酸：水(8:1:1)を用い，二次溶媒としてはフェノール：水(75:25, 22±2°C)を用いた。一次元陽イオン交換TLCはクエン酸ナトリウム緩衝液(pH 3.3, Na^+=0.4N)を展開溶媒として用いて45°Cで行なった。両TLC法ともに全く同じ結果を与えたので，成績は両法より得た結果を合わせて表示した。

Table 1. ^{3}H-ORN metabolism in synaptosome (P_2)

Incubation Time	PRO	GABA	GLU	ASP	GLN	PUT	ΔORN
(min)	(cpm x 10^{-3}/mg protein)						
5	32.95 ±2.24	3.75 ±0.22	14.91 ±1.18	0.20 ±0.07	0.84 ±0.60	n.d.	61.24 ±2.23
15	47.55 ±4.44	13.71 ±0.73	12.27 ±1.04	0.42 ±0.12	0.83 ±0.35	0.42 ±0.11	84.74 ±7.29
30	49.28 ±2.81	19.10 ±1.37	5.84 ±1.66	0.76 ±0.24	1.09 ±0.72	0.54 ±0.14	107.03 ±9.62
60	51.66 ±2.71	23.18 ±2.64	2.68 ±0.46	0.92 ±0.32	0.23 ±0.11	1.39 ±0.20	113.90 ±9.60

N = 5

ΔORN: ^{3}H-ORN consumed.

Table 2. Effect of in vitro addition of L-canaline on ^{3}H-ORN metabolism in synaptosome (P_2)

ADDITION		PRO	GABA	GLU	ASP	PUT	ΔORN
		(cpm x 10^{-3}/mg protein/15 min)					
None	(7)	50.76 ±2.74	11.74 ±0.49	13.18 ±0.45	0.59 ±0.15	0.48 ±0.18	91.86 ±4.78
L-Canaline							
10^{-8} M	(4)	44.48 ±4.25	11.91 ±1.21	11.03 ±0.79	0.83 ±0.25	0.75 ±0.25	83.49 ±3.77
10^{-7} M	(4)	25.17† ±0.63	7.72† ±0.79	5.52† ±0.35	0.72 ±0.19	1.26* ±0.13	55.00† ±1.58
10^{-6} M	(4)	3.97† ±0.11	1.66† ±0.91	0.61† ±0.19	0.40 ±0.30	1.71† ±0.09	21.99† ±1.05
10^{-5} M	(4)	0.90† ±0.12	1.12† ±0.34	0.34† ±0.05	0.44 ±0.38	1.69† ±0.17	11.86† ±1.59
10^{-4} M	(4)	0.37† ±0.12	0.81† ±0.34	0.41† ±0.09	0.58 ±0.15	1.16 ±0.29	3.44† ±0.39

*P<0.05, †P<0.01

ORNよりアミノ転移酵素(OAT)活性の測定：ORNからGGSA⇄P5Cの生成を触媒する酵素OATの活性測定はPROオキシダーゼ活性(8)，およびP5Cシンターゼ活性(11)の測定法を一部変更して行なった。また，OAT酵素標品はラット脳より部分精製したものを使用した。本標品はコリンアセチル転移酵素の精製段階(1)における副産物で，常法(7)を用いて活性を測定したところ，1.84 nmoles/mg protein/min の比活性を有していた。

〈結果〉

PUTを経由してORNからGABAが生成されることが知られているが(10)，P_2分画における^{3}H-ORNの主な代謝産物として，^{3}H-PRO，^{3}H-GLUおよび^{3}H-GABAの生成が認められたが，^{3}H-PUTの生成は着明ではなかった(表1)。これら三種の主アミノ酸の生成は，OATの特異的阻害剤，L-カナリンの添加によりほぼ完全に抑制された(表2)。一方，GADの阻害剤，3-メルカプトプロピオン酸の添加は^{3}H-GABAの生成を抑制する反面，^{3}H-GLUの蓄積を促進した。PUTからGABA生成を触媒する酵素

Table 3. Effect of in vitro addition of o-AB and GABA on ^{3}H-ORN metabolism in synaptosome (P_2)

ADDITION	PRO	GABA	GLU	ASP	GLN	PUT	ΔORN
	(cpm x 10^{-3}/mg protein/15 min)						
None (6)	48.41 ±3.72	13.54 ±0.62	11.37 ±1.35	0.35 ±0.12	0.83 ±0.35	0.62 ±0.21	83.91 ±6.01
o-AB							
5 mM (5)	26.29† ±2.08	13.27 ±1.02	9.14 ±1.32	0.55 ±0.31	0.78 ±0.38	3.01 ±0.85	67.61 ±3.81
25 mM (5)	3.95† ±0.73	5.96† ±1.92	2.50† ±0.47	0.12 ±0.09	0.44 ±0.25	7.07 ±0.79	32.73† ±4.65
GABA							
1 mM (4)	30.68† ±2.03	8.30† ±1.31	6.96† ±1.09	0.23 ±0.13	0.57 ±0.33	0.55 ±0.19	66.59† ±2.04
5 mM (5)	18.41† ±2.26	3.83† ±0.68	2.91† ±0.63	0.14 ±0.08	0.31 ±0.29	0.38 ±0.23	35.68† ±3.42

*P<0.05, †P<0.01

の1つであるジアミン酸化酵素の阻害剤，アミノグアニジンは，P_2分画における^{3}H-ORNの代謝に著しい影響を与えなかった。これらの成績は，^{3}H-GABAが^{3}H-PUTではなく^{3}H-GLUを中間体として^{3}H-ORNから合成されたことを示唆するものである。このことはさらに，GGSA⇄P5Cと選択的に結合する化合物，o-アミノベンズアルデヒド(o-AB)の添加により，上記三者の主アミノ酸の生成が強く抑制されたことからも確認された(表3)。

一方，反応液中に1-5mMのGABAを添加することにより，^{3}H-ORNからのこれら三種のアミノ酸生成は強く(40-70%)阻害を受けることが判明した(表3)。この阻害作用の作用部位としてOATが推察されたので，次に部分精製したOAT活性に対するGABAの作用について検討を加えた。

本定量実験条件下では，OAT活性の指標であるo-AB/P5C複合体の生成は，5分迄はインキュベーションの時間に比例して増加し，48μgから280μgまでは使用した酵素蛋白量と直線関係にあった。また，その反応は低濃度のカナリンにより強く阻害された。表4からも明らかな様に，脳における ORN 主代謝産物の中で，GABAのみが強いOAT活性阻害作用を示した。さらに，他の脳内主要遊離アミノ酸，すなわちグリシン，アスパラギン酸，タウリン，β-アラニン，およびグルタミンについても同様の検討を加えたが，そのいずれにもGABAの様な強い阻害作用は見出せなかった。このGABAによる阻害作用は，Lineweaver-Burk分析(300nM-300μM)の結果，基質ORNに対する競合的拮抗阻害と判明した(図1)。

Table 4. Effect of in vitro addition of some possible products from ORN in brain on brain ornithine δ-aminotransferase activity

ADDITION	o-AB/P5C Formed	%
	(pmoles/mg protein/min)	
None	1.24 ± 0.12	100
GABA		
1 mM	0.72 ± 0.04*	59 ± 8
5 mM	0.39 ± 0.02†	32 ± 4
25 mM	0.14 ± 0.01†	11 ± 1
Glutamate		
1 mM	1.24 ± 0.16	100 ± 4
5 mM	1.08 ± 0.08	88 ± 3
25 mM	0.89 ± 0.07	72 ± 5
Proline		
1 mM	1.29 ± 0.08	105 ± 7
5 mM	1.35 ± 0.06	110 ± 7
25 mM	1.17 ± 0.09	96 ± 10
Putrescine		
1 mM	1.53 ± 0.11	125 ± 5
5 mM	1.01 ± 0.13	83 ± 12
25 mM	0.62 ± 0.03*	51 ± 6

*P<0.05, †P<0.01

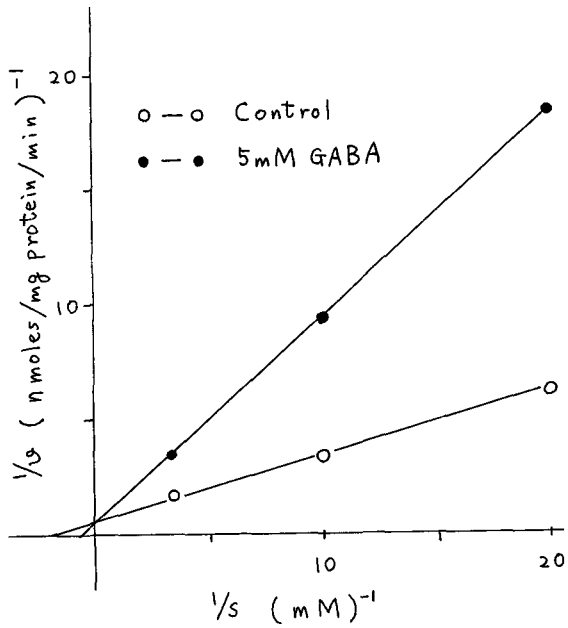


Fig. 1. Inhibition of brain ornithine δ-aminotransferase activity by GABA

〈考察〉

以上の様に，哺乳動物のCNSにおいてGLUを中間体としてORNからGABAが合成されることが明らかとなった。この新しいGABA生合成系路の生理的および代謝的意義については現時点では明らかでないが，この系路の活性がGABAにより選択的かつ強力に制御されている可能性が高いことは特筆に値するものと思われる。GABA自身はその生合成最終段階酵素GADに対しては殆んど著しい阻害作用を示さないことがよく知られており(14)，その意味でも本研究は，神経組織におけるGABA生合成系路に負のフィードバック機構が存在する可能性を示した最初の報告と言えよう。また，本研究では極端に低い^{3}H-ORN濃度を使用したが，ラット脳(6)およびマウス脳(9)におけるORN濃度は40μM以下であることが報告されており，脳内GABAレベルが2mM前後であること，高濃度(50-300μM)のORN存在下でも5mM GABAによるOAT活性阻害作用が著明に認められること(図1)，および^{3}H-ORN代謝抑制作用，OAT活性阻害作用の両者が共にGABAに選択性が高いこと，などを考え合わせると，ORNからのGABA生合成に対するGABAの負のフィードバック阻害作用が，両アミノ酸の濃度関係により微妙に影響を受けることは十二分に考えられるものである。

いずれにしても，哺乳動物のCNSにおいてORNがGLU分子，さらにはGABA分子の前駆物質となり得ること，およびその生成系路の活性がGABA自身により制御されていること，はきわめて興味深い結果と思われる。

〈文献〉

(1) Dietz,G.W.,Jr., and Salvaterra,P.M.(1980) J.Biol.Chem. 255,10612-10617 (2) Gray,E.G., and Whittaker,V.P. (1962) J.Anat. 96,79-88 (3) Herzfeld,A.,Mezl,V.A., and Knox,W.E.(1977) Biochem.J. 166,95-103 (4) Johnson,A. B., and Strecker,H.J.(1962) 237,1876-1882 (5) Jones,M.E.,Anderson,A.D.,Anderson,C.,and Hodes,S.(1961) Arch. Biochem.Biophys. 95,499-507 (6) Kandera,L.,Levi,G., and Lajtha,A.(1968) Arch.Biochem.Biophys. 126,249-260 (7) Peraino,C., and Pitot,H.C.(1963) Biochim.Biophys.Acta 73,222-231 (8) Phng,J.M.,Downing,S.J.,Valle,D.L., and Kowaloff,E.M.(1975) J.Lab.Clin.Med. 85,312-317 (9) Roberts,E.(1981) in Glutamate as a Neurotransmitter (DiChiara,G., and Gessa,G.L., eds)pp91-102,Raven Press,New York (10) Seiler,N.,Wiechmann,M.,Fischer,H.A., and Gottfried,W.(1971) Brain Res. 28,317-325 (11) Smith,R.J.,Downing,S.J.,Phang,J.M.,Lodato,R.F., and Aoki, T.T.(1980) Proc.Natl.Acad.Sci.USA. 77,5221-5225 (12) Strecker,H.J.(1965) J.Biol.Chem. 240,1876-1882 (13) Strecker,H.J., and Mela,P.(1955) Biochim.Biophys.Acta 17,580-581 (14) Wu,J.-Y., and Roberts,E.(1974) J. Neurochem. 23,759-767

117 視床下部視索上核・室旁核へのエンケファリンならびにその非代謝性アナログの微量注入による抗利尿作用

津島宏美・森　真由美・松田友宏
（名市大・医・薬理）

〔要　約〕

我々は、バゾプレッシン（抗利尿ホルモン）ニューロンの細胞体がある視床下部の視索上核（SON）、室傍核（PVN）へステレオタキシックに挿入したカニューレよりメチオニンエンケファリン（以下ME）、[D-アラニン^2]メチオニンエンケファリンアミド（以下DAMEA）を微量注入し、これら薬物の薬理作用を検討した。MEならびにDAMEAをSON、PVNに注入した時点に抗利尿作用を発現した。MEのED50はSONでは80 nmol、PVNでは60 nmol、DAMEAはそれぞれ0.6 nmol、0.4 nmolであり、DAMEAはMEより約100倍強い抗利尿作用を示した。ME 100 nmolのSONへの注入による抗利尿作用はナロキソン300 nmol前処置で抑制されなかったが、ME 60 nmolのPVN注入による作用はナロキソン300 nmol前処置で軽度抑制された。DAMEA 4 nmolのSON、PVN注入による抗利尿作用はナロキソン80 nmol前処置で抑制されなかった。非代謝性アナログDAMEAがMEより強い作用を示したのは分解酵素系によるMEの速やかな分解によるものと考えられる。DAMEAはノルアドレナリン、AChと比較して約30－50倍強く、コリン－、アドレナリン作働系に加えエンケファリン作働系のバゾプレッシン遊離調節が示唆される。

Key words： enkephalin, hypothalamus, vasopressin.

高等動物における体液の恒常性にバゾプレッシン（抗利尿ホルモン）が関与していることはよく知られている。このホルモンは視床下部視索上核（supraoptic nuclei, SON）、室傍核（paraventricular nuclei, PVN）で合成され、視索上核－、室傍核－下垂体路を経て下垂体へ軸索輸送され下垂体後葉から血中に遊離される（神経分泌）。中枢性鎮痛薬モルヒネにはこのバゾプレッシン遊離を促進し、抗利尿を発現する作用もある。一方、視床下部におけるモルヒネ様ペプチドエンケファリンの神経刺激伝達物質としての諸条件よりエンケファリン作働性ニューロンの存在が示唆されている[1]。すでに我々はバゾプレッシンニューロンの細胞体があるSON、PVNに直接各種生体アミンを微量注入し尿量の変化を調べることにより、この細胞体には感受性の高いノルアドレナリン－、ACh－受容体が存在し[6]、AChl受容体についてはムスカリン様であることを明らかにした[4,5]。今回、この実験系を用いバゾプレッシンニューロン細胞体におけるエンケファリン（メチオニンエンケファリン，以下ME）ならびにその非代謝性アナログ（[D-アラニン^2]メチオニンエンケファリンアミド，以下DAMEA）とアンタゴニスト（ナロキソン）の作用を検討した。

〔実験方法〕

すでに報告した通りである[6]：動物はWistar系雄性ラット300－350 gを用いた。前日より（約18時間）絶食し、実験当日水5 ml/100 g b.w.を経口投与し、45分後同量の13％エタノールを経口投与し麻酔した。膀胱カニューレ、気管カニューレ、頸静脈カニューレを挿入後ラット用脳定位固定装置に固定し、Königらのアトラス[3]に従いSON、PVNの位置を決定した。頸静脈カニューレからは3％エタノールロック液を0.1

ml/min の速度で持続注入し、膀胱カニューレからの尿流出量はドロップカウンターで10分毎に測定した。尿量が一定になった後脳内注入用カニューレをSON、PVNに挿入した。薬物は人工脳脊髄液に溶解しこのカニューレを少し微量注入した。投与後の尿量の変化は10分毎に測定し、投与前10分間の尿量を100%としその百分率で表わした。

脳内注入用カニューレの挿入部位の確認は次の方法で行なった：1) KCl 400 nmol 注入により抗利尿作用が発現された。2)実験終了後SON、PVNに挿入したカニューレに12Vの交流電流を2分間通電し断頭した。摘出した脳をHelly液で固定し、2%オスミック酸で処理後脱水し、常法通りパラフィン包埋した。ミクロトームで8μmの薄切片を作製し、バゾプレッシンニューロンの染色はGomoriの方法[2]に従った。カニューレの先端はSON、PVNの近傍に挿入されていた。

Fig. 1 Dose-response curve for microinjection of Met-enkephalin or [D-Ala^2]Met-enkephalinamide into SON.

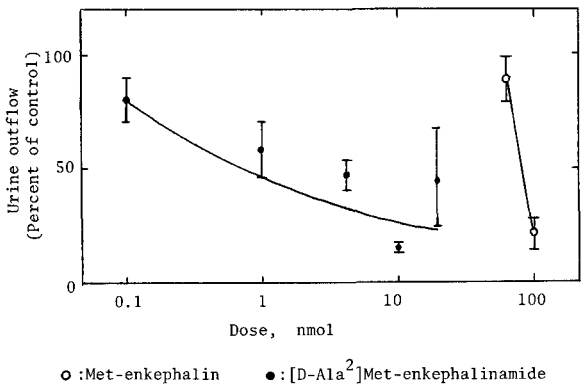
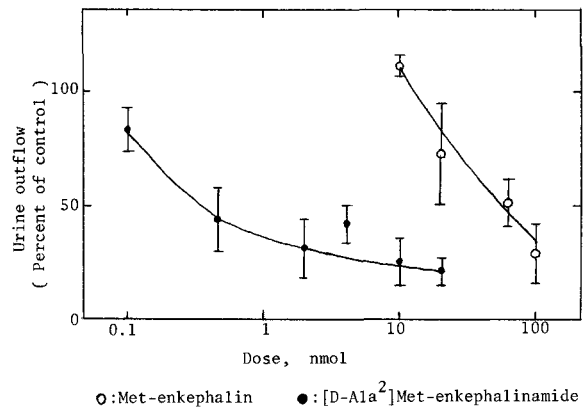


Fig. 2 Dose-response curve for microinjection of Met-enkephalin or [D-Ala^2]Met-enkephalinamide into PVN.



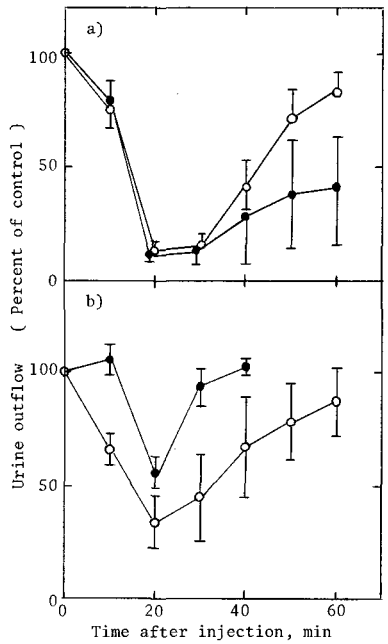
【実験結果】

1) MEの微量注入：ME 60 nmol をSONに微量注入した時尿量に変化は認められなかったが、ME 100 nmol では投与後約5分より尿量が減少しはじめ20分で最大抗利尿となり約60分で回復する抗利尿作用を発現した（図3, a）。図1に示したように用量作用曲線のスロープは非常に急であり、ED50は約80 nmol であった。MEをPVNに注入した時10 nmol から100 nmol までSONより緩やかな用量作用曲線を示し、ED50は約60 nmol であった（図2）。

2) DAMEAの微量注入：DAMEA 4 nmol をSONに投与すると約10分後より抗利尿作用が発現し約60分で投与前の尿量に回復した。SON、PVNともほぼ同程度の作用を示し用量依存性であった（図1、図2）。ED50はそれぞれ約0.6 nmol、約0.4 nmol であった。

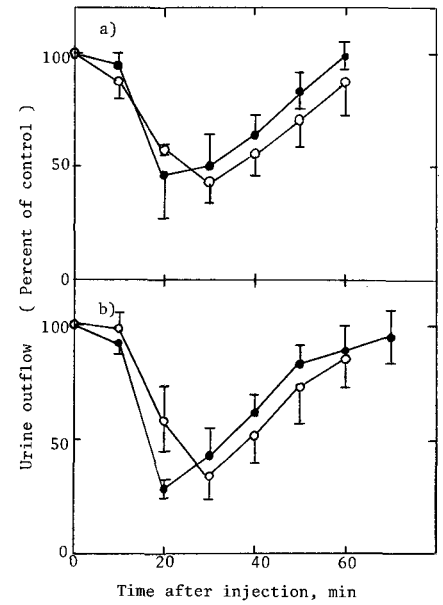
3)ナロキソンのME注入による抗利尿作用への影響：ME 100 nmol をSONに注入した時抗利尿作用が発現することを確認し投与前の尿量に回復した後、同一ラットの同一部位にナロキソン300 nmol を投与し尿量回復後、ME 100 nmol を再び投与し、ナロキソン

Fig. 3 Effect of naloxone on antidiuresis induced by microinjection of Met-enkephalin into SON or PVN.



a) SON b) PVN
○ :Met-enkephalin a)100nmol b)60nmol
● :Naloxone 300nmol+Met-enkephalinamide

Fig. 4 Effect of naloxone on antidiuresis induced by microinjection of [D-Ala^2] Met-enkephalinamide into SON or PVN.



a) SON b) PVN
○ :[D-Ala^2]Met-enkephalinamide 4nmol
● :Naloxone 80nmol+[D-Ala^2]Met-enkephalinamide

投与前後のMEによる抗利尿作用を比較したところ同程度の作用を示した（図3、a）。一方同様の方法によりPVNに注入したME 60 nmolの抗利尿作用はナロキソン300 nmol前処置によって一部抑制された（図3、b）。

4)ナロキソンのDAMEA注入による抗利尿作用への影響：SON、PVN共にDAMEA 4 nmolによる抗利尿作用はナロキソン80 nmol前処置により抑制されなかった（図4）。

〔考察〕

SON、PVN（バゾプレッシンニューロン細胞体）へのME、DAMEA注入による抗利尿作用は比較的遅い時間経過であり、内分泌性であることを示していた。

ME、DAMEAのSON、PVNへの注入は共に抗利尿作用を示し、DAMEAはMEの約100倍の強い抗利尿作用を持っていた。これは分解酵素（エンケファリナーゼ、アミノペプチダーゼ）によるMEの速やかな分解によるためと考えられる。DAMEAのED50はノルアドレナリン、AChに比較して約30-50倍強く[6]、コリン-、アドレナリン作働系に加えエンケファリン作働系がバゾプレッシン遊離調節に関与している可能性が示唆された。

PVNではMEの作用はナロキソンで抑制されたが、SONでは抑制されなかった。しかしDAMEAの作用はSON、PVNにおいて共にナロキソンで抑制されなかった。一般にμ型のオピエートレセプターではナロキソン感受性が高いがδ型では低いといわれている[1]のでSONとPVNにおけるオピエートレセプターのサブタイプが異なることが示唆されるが、PVNにおいてはナロキソンがMEの作用を抑制し、DAMEAの作用を抑制しない理由は不

明である。メチオニンエンケファリンならびにその非代謝性アナログがSON、PVNのシナプス前部において伝達物質の遊離調節に関与している可能性については目下検討中である。

（本研究は昭和55年度東洋医学財団の研究助成により支持された。研究に用いたナロキソンは名城大学薬学部亀山勉教授より提供をうけた。）

〔文献〕

1) Childers, S. R. (1980) in Receptors and Recognition (Eds. Enna, S. J. and Yamamura H. I.), Series B, Vol. 9, Neurotransmitter Receptors Part 1, pp.107-139, Chapman and Hall, Landon.

2) 榎並仁 (1957) 神経分泌序説 神経分泌II, 協同医書出版社, 東京.

3) König, J. F. R. and Klippel R. A. (1963) The Rat Brain, A Stereotaxic Atlas of the Forebrain and Lower Parts of the Brain Stem, Williams and Wilkins Co., Baltimore.

4) 森真由美, 津島京美, 松田友宏 (1981) 第44回日本薬理学会総会要旨集, P.98, 福岡.

5) Mori, M., Tsushima, H. and Matsuda, T. (1981) Abstracts of 8th International Congress of Pharmacology, p.588, Tokyo.

6) 津島京美, 森真由美, 松田友宏 (1980) 神経化学, 19, 238-241.

118 ラット大脳皮質切片における ^{45}Ca uptake に対する神経伝達候補物質の効果：特にL－グルタミン酸の効果について

・徳永　博(近畿・薬・生物化学)
市田成志・小田泰雄・徳永　博(近畿大・薬・生物化学)
喜多富太郎(同・薬理)

〔要　約〕

①ラット大脳皮質切片における^{45}Ca uptakeに対する神経伝達候補物質の効果を検討した所，ACh，L-Gluおよび5-HT添加によって^{45}Ca uptakeは有意に増大され，そのうちL-Gluの効果が最も大きかった．　②^{45}Ca uptakeはL-Glu添加後1分で平衡状態に達し，L-Gluの濃度に依存して増大した。最大効果の50％を生ずるに必要な濃度は約1μMであった。

③^{45}Ca uptakeに対する種々なL-Glu関連物質の効果について検討した所，D-glutamic acid D,L-aminoadipic acid D,L-homocysteic acidおよびN-methyl-D,L-glutamic acid各々10μMは^{45}Ca uptakeを有意に増大した．しかし，L-Gluによって生ずる効果より可成り弱かった．　④L-Gluの特異的なinhibitorであるD,L-α-methyl glutamic acidおよびL-glutamic acid diethylester各々10μMはL-Gluによってstimulateされた^{45}Ca uptakeをそれぞれ59％および68％抑制した。　⑤シナップス形質膜におけるMg·Ca-ATPase活性はL-Glu 1000μMによってもほとんど抑制されなかった。

以上の結果より，L-Gluによってstimulateされた^{45}Ca uptakeはL-Glu受容体を介することによってCa流入を増大させた結果生ずる可能性を示唆している．

Key words：Brain Slice, ^{45}Ca uptake, L-Glutamic acid

種々な神経伝達物質は対応する受容体と結合することによりそれぞれ特有な反応を生ずるが，この時Ca^{++}や環状ヌクレオチッド等の2次messengerを介することはよく知られている(1-4)．特にCa^{++}は2次messengerとして生理学的に重要であることが明らかにされつつある．例えば，Ca^{++}の細胞内濃度変化により収縮(7)，分泌(8)，膜透過性(9)，物質代謝(10)および細胞分化(11)等が影響を受ける所から，これらの系ではCa^{++}が重要であると考えられている．現在の所，神経伝達物質－受容体間の相互作用に続く環状ヌクレオチッド値の上昇過程の機構は可成り研究されている(3,4)．しかし，神経伝達物質－受容体間の相違作用に続く細胞内Caイオン濃度上昇過程の機構に関する報告は少なく，また断片的である(12,13)。それ故に，受容体を介した細胞内Caイオン濃度上昇（特にCa流入による）過程の機構を明らかにすることは意義ある様に思われる。そこで，我々は大脳皮質切片を使用し，^{45}Ca uptakeに対する種々な神経伝達候補物質の効果について検討し，次に最も著明な^{45}Ca uptakeの上昇効果を示したL-glutamic acid(L-Glu)について，その性質を検討したので報告する。

〔方　法〕

①大脳皮質切片の調製と^{45}Ca uptakeの測定：先に報告した方法(14,15)に従ってWistar系成熟雄ラット（体重150~250g）から大脳皮質切片を調製し，^{45}Ca uptakeの測定を行った。(4-6)．②シナップス形質膜（S.P.M.）の調製：S.P.M.は先の報告(17,18)と同様Gray & Whittaker(16)の方法に準じて調製した．③S.P.M.におけるMg·Ca-ATPase活性：反応条件は先に報告(17)した方法に従い，また無機リンの測定はTakahashiの方法(19)に従って行った。④その他：蛋白定量はLowryら(20)の方法に従った。

〔結　果〕

① ^{45}Ca uptakeに対する神経伝達候補物質の効果：Table I に示すごとく，ACh, L-Glu，および 5-HT（各々最終濃度 100μM）添加後２分インキュベートした時，^{45}Ca uptake 量は有意に増大されそのうち最も L-Glu の効果が大きかった。しかし，他の神経伝達候補物質は効果を示さなかった．添加後５分では，L-Glu 100μM のみが ^{45}Ca uptake を有意に増大した．この様に，L-Glu による効果が最も強くしかも安定していたので，神経伝達物質－受容体間の相互作用に続く ^{45}Ca 流入の上昇過程の機構を研究するには L-Glu が最も好都合と思われた。そこで L-Glu により生じた ^{45}Ca uptake の増大（L-Glu-stimulated ^{45}Ca uptake）について検討する事にした。

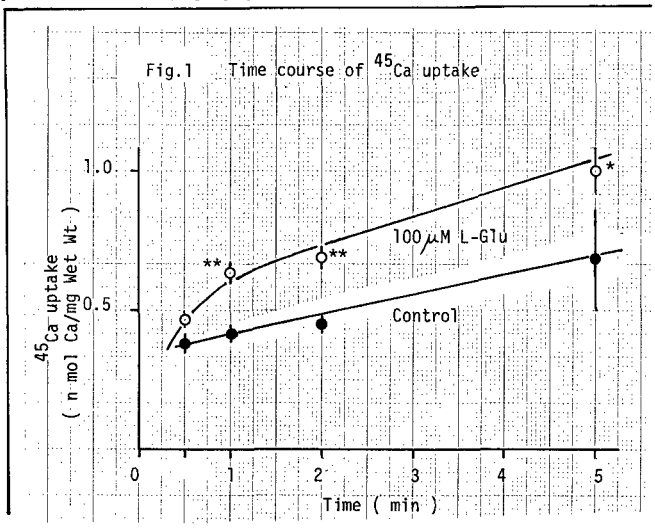
Table I
Effects of neurotransmitter candidates on ^{45}Ca uptake

Slices were prepared and the weighed slices were placed in ice-cold oxygenated standard medium. Then the slices were preincubated and incubated as described in 'Methods', except that time of incubation after addition of neurotransmitter candidates were 2 min or 5 min.

Neuro-transmitter candidates	Concentration (μM)	Time after addition (min)	^{45}Ca uptake n mol Ca/mg Wet Wt	Relative percent	P	n
Control		2	0.50 ± 0.02	100		7
		5	0.84 ± 0.03	100		6
ACh	100	2	0.65 ± 0.04	130	< 0.01	5
	100	5	0.85 ± 0.06	101	NS	3
GABA	100	2	0.57 ± 0.04	114	NS	4
	100	5	——	——	—	–
DA	100	2	0.51 ± 0.05	102	NS	4
	100	5	0.78 ± 0.06	93	NS	3
L-Glu	100	2	0.71 ± 0.06	142	< 0.05	8
	100	5	1.06 ± 0.06	126	< 0.05	4
His	100	2	0.56 ± 0.05	112	NS	4
	100	5	0.91 ± 0.05	108	NS	3
5-HT	100	2	0.65 ± 0.03	130	< 0.002	4
	100	5	0.95 ± 0.03	113	NS	3
NE	100	2	0.61 ± 0.07	122	NS	4
	100	5	0.93 ± 0.09	111	NS	3

Each volue is the mean ± standard error.
NS : not significant (P > 0.1)

② L-Glu-stimulated ^{45}Ca uptake の性質：Fig.1 は大脳皮質切片における ^{45}Ca uptake を経時的にみたものである。L-Glu 添加により ^{45}Ca uptake の速度は増大し，添加後１分で平衡状態に達した。L-Glu 添加２分後では L-Glu-stimulated ^{45}Ca uptake 量は約 0.27 ± 0.03 n mol Ca/mg Wet Wt (n=7) であった。^{45}Ca uptake は L-Glu の濃度に依存して増大し，L-Glu 5μM で平衡状態に達した．最大効果の 50% を生ずるに必要な L-Glu の濃度は約 1μM であった（Fig.2）。次に ^{45}Ca uptake に対する種々な L-Glu 関連物質の効果について検討した（Table II）．D-glutamic acid (D-Glu) D,L-α-aminoadipic acid (αAAA), D,L-homocysteic acid (HCA) および N-methyl-D,L-glutamic acid (NMG) 各々 10μM によって ^{45}Ca uptake 量は有意に増大した。しかし，これらの効果は L-Glu 10μM による効果より可成り弱かった。他の L-Glu 関連物質 10μM による効果は認められなかった。この様な結果は L-Glu 関連物質を微小電気泳動的適用法により大脳皮質神経細胞に適用することによって得られた報告 (21-23) とだいたい一致していた。L-Glu の特異的な inhibitor と考えられている (23) D,L-α-methyl glutamic acid (αMG) および L-glutamic acid diethylester (GDEE) 各々 10μM



はL-Glu-stimulated ^{45}Ca uptakeをそれぞれ59%および68%抑制した(Table Ⅲ)。

③ S.P.M. における Mg·Ca-ATPase 活性に対するL-Gluの効果：^{45}Ca uptakeを最大にstimulateする濃度より約200倍高濃度のL-Glu 1000μMによって Mg·Ca-ATPase 活性は約20%抑制されただけであった(Fig.3)。

〔考　察〕

神経伝達候補物質のうち，ACh，L-GluおよびS-HTは有意に^{45}Ca uptake量を増大した。この結果は，神経伝達候補物質が微小電気泳動的適用法により大脳皮質神経細胞へ適用された時に得られた結果(24-26)と一致していた．但し，5-HT ($p<0.002$) およびNEは大脳皮質切片における^{45}Ca uptakeをstimulateしたが，電気泳動的に5-HTおよびNEを適用した場合は興奮だけでなく抑制作用を示すことが報告されている(24-26)。この様な相違が生ずる理由は明らかでないが，1つには使用している神経細胞の興奮性に関する指標が質的に異なる（我々は大脳皮質切片における^{45}Ca uptakeを用い，彼らは電気泳動的適用による膜電位変化を用いている）ためか，あるいは質的には同じでも切片使用の場合はヘテロな神経細胞群全体で観察しているのに対し電気泳動的に投与する場合は単一神経細胞の興奮性を観察しているので，そのため異なった結果が生じたのかも知れない。L-Gluによる最大効果の50%を生ずるに必要なL-Gluの濃度は約1μMであった(Fig.2)。この値は，L-Gluを電気泳動的に大脳皮質の神経細胞に適用したとき生ずる興奮作用の有効濃度が約0.1 mMと見積もられている報告(22)やL-Glu 5mMがラット大脳皮質切片およびシナプトゾーム分画における^{45}Ca uptakeに使用されている報告(12,29)と比べて非常に低濃度である。しかし，Percyらが報告している値(13)とはよく一致していた。L-Gluは神経細胞のwater contentを上昇させることが知られている(27)。そのためL-Glu-stimulated ^{45}Ca uptakeはL-Gluによる神経細胞のswellingの結果，生ずる可能性が考えられる。しかし，[^{3}H] inulinを用いて"細胞内"spaceを測定すると，"細胞内"spaceはL-Glu 5mMによってわずかしか増加されなかったという報告(12)および大脳皮質切片にL-Gluを添加後，数分内であればK$^+$の蓄積

Fig.2 ^{45}Ca uptake as a function of increasing concentration of L-Glu

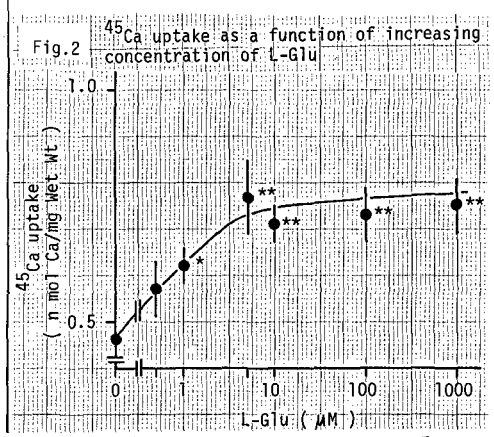


Table Ⅱ

Effects of related compounds of L-Glu on ^{45}Ca uptake

Slices were prepared and the weighed slices were placed in ice-cold oxygenated standard medium. Then the slices were preincubated and incubated as described in 'methods'.

Name and structure	Concentration (μM)	^{45}Ca uptake (n mol Ca/mg Wet Wt)	Relative percent	P	n
Control		0.58 ± 0.01	100		9
D-Glutamic acid (D-Glu) $HOOCCH_2CH_2CH(NH_2)COOH$	10	0.72 ± 0.01	124	<0.001	4
L-Glutamine (L-Gln) $H_2NOCCH_2CH_2CH(NH_2)COOH$	10	0.51 ± 0.06	88	NS	4
L-Aspartic acid (L-Asp) $HOOCCH_2CH(NH_2)COOH$	10	0.58 ± 0.06	100	NS	4
Glutaric acid $HOOCCH_2CH_2CH_2COOH$	10	0.63 ± 0.02	109	NS	4
D,L-αAminoadipic acid (αAAA) $HOOCCH_2CH_2CH_2CH(NH_2)COOH$	10	0.72 ± 0.05	124	<0.002	4
D,L-αAminopimeric acid (αAPA) $HOOCCH_2CH_2CH_2CH_2CH(NH_2)COOH$	10	0.60 ± 0.04	104	NS	4
D,L-Homocysteric acid (HCA) $HO_3SCH_2CH_2CH(NH_2)COOH$	10	0.68 ± 0.03	117	<0.005	4
N-Methyl-D,L-glutamic acid(NMG) $HOOCCH_2CH_2CH(NHCH_3)COOH$	10	0.71 ± 0.03	122	<0.001	4
L-Glutamic acid diethylester (GDEE) $H_5C_2OCCH_2CH_2CH(NH_2)COC_2H_5$	10	0.59 ± 0.01	102	NS	4
D,L-α-Methyl glutamic acid (αMG) $HOOCCH_2CH_2C(CH_3)(NH_2)COOH$	10	0.61 ± 0.05	105	NS	4

Each value is the mean ± standard error.

NS: not significant ($P>0.1$)

の結果生ずる"細胞内"spaceへの水の移動，即ち細胞のswellingは認められなかったという報告(21,28)から考えると，この様な可能性はないと思われる。D-Glu 10μMの^{45}Ca uptakeに対する効果は認められたがL-Glu 10μMより可成り弱かった。これはL-Gluの効果が立体特異性を有していることを示している。L-Gluより炭素数が少ないL-aspartic acid，および側鎖が長いαAAA，D,L-α-amino-pimeric acidの効果はいずれもL-Gluより弱いかまたは全く認められなかった。L-Gluの^{45}Ca uptakeに対する効果はL-GluのCa^{++}に対するchelatorとしての性質による可能性も考えられるが，glutaric acidの効果は全く認められず，D-Gluの効果も可成り弱い所からこの可能性もありそうにないと思われる。Mg-Ca-ATPase活性はCa effluxの一部に関与していると考えられているが，L-Glu 1000μMにより S.P.M.のMg-Ca-ATPase活性はあまり抑制されず，更にL-Gluは^{45}Ca uptakeの初速度を増加させることから，L-Glu-stimulated ^{45}Ca uptakeはL-Gluが^{45}Ca effluxを抑制した結果生じたのではないと考えられる。L-Gluの特異的なinhibitorであると報告(23)されているαMGおよびGDEE 10μMによってL-Glu-stimulated ^{45}Ca uptakeは抑制された所から，このL-Glu-stimulated ^{45}Ca uptakeはL-Glu receptorを介して生ずる可能性が考えられる．もしそうであるならば，大脳皮質切片におけるL-Glu-stimulated ^{45}Ca uptakeは受容体を介したCa channelのopeningの機構を明らかにするうえで非常に有用となろう。

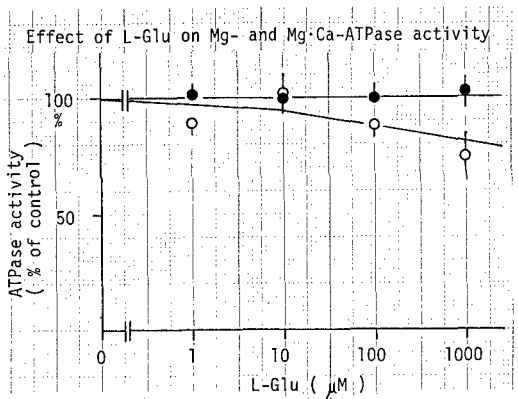
Table Ⅲ

Inhibitory effects of αMG and GDEE on L-Glu-stimulated ^{45}Ca uptake

Slices were prepared and the weighed slices were placed in ice-cold oxygenated standard medium. Then the slices were preincubated and incubated as descrived in 'methods'.

Agent added	^{45}Ca uptake (n mol Ca/mg Wet Wt)	L-Glu-stimulated ^{45}Ca uptake (n mol Ca/mg Wet Wt)	Inhibition (%)	n
Control	0.54 ± 0.02			3
L-Glu 10 μM	0.76 ± 0.03	0.22 + 0.04		3
L-Glu 10 μM + αMG 10 μM	0.63 ± 0.03	0.09 + 0.02	59	3
Control	0.44 ± 0.01			3
L-Glu 10 μM	0.63 ± 0.02	0.19 + 0.04		3
L-Glu 10 μM + GDEE 10 μM	0.50 ± 0.03	0.06 + 0.02	68	3

Fig.3 Effect of L-Glu on Mg- and Mg·Ca-ATPase activity



〔謝 辞〕

種々の御助言，御教示をいただきました吉田博教授(阪大医学部)に感謝いたします。

〔文 献〕

(1)Matthews,E.K.&Petersen,O.H.(1973)J.Physiol.231,283-295 (2)Prince,W.T.&Berrige,M.J.(1972)J.Expt.Biol.56, 323-333 (3)Goldberg,N.D.et al.(1973)Adv.Cyclic Nucleotide Res.3,155-223 (4)Robison,G.A.(1971)Cyclic AMP,Academic Press,New York (5)Berrige,M.J.(1975)Adv.Cyclic Nucleotide Res.6,1-98 (6)Borle,A.B.(1973)Fed.Proc.32, 1944-1950 (7)Sandow,A.(1970)Annu.Rev.Physiol.32,87-138 (8)Douglas,W.W.&Rubin,R.P.(1961)J.Pysiol.159,40-57 (9)Romero,P.J.&Whittam,R.(1971)J.Physiol.214,481-507. (10)Namm,D.H.(1971)J.Pharmacol.Exp.Ther.178,299-310 (11)Clothier,G.&Timouriam,H.(1972)Exp.Cell.Res.75,105-110 (12)Cook,W.J.&Robinson,J.D.(1971)Am.J.Pharmacol.221 218-225 (13)Percy,V.A.&Lamm,M.C.(1981)Biochem.Pharmacol.30,665-666 (14)Ichida,S.et al.(1980)Brain Res.192, 487-494 (15)Ichida,S.et al.(1981)Brain Res.213,472-475 (16)Gray,E.F.&Whittaker,V.P.(1962)J.Anat.96,79-88 (17) Ichida,S.et al.(1976)Jpn.J.Pharmacol.26,39-43 (18) Ichida,S.et al.(1976)Jpn.J.Pharmacol.26,551-558 (19) Takahashi,T.(1955)J.Japan.Biochem.Soc.26,690-698 (20)Lowry,O.H.(1951)J.Biol.Chem.193,265-275 (21)Krinjević,K. (1970)Nature 228,119-124 (22)Krinjević,K.&Phillis,J.W.(1963)J.Physiol.165,274-304 (23)Haldeman,S.et al.(1972) 39,419-425 (24)Crawford,J.M.&Curtis,D.R.(1966)J.Physiol.186,121-138 (25)Krinjević,K.&Phillis,J.W.(1963)Br.J. Pharmacol.20,471-490 (26)Roberts,M.H.T.&Straughan,D.W.(1967)J.Pysiol.193,269-294 (27)Terner,C.et al.(1950) Biochem.J.47,139-149 (28)Harvey,J.A.&McIlwain,H.(1968)108,269-274 (29)Goddard,G.A.&Robinson,J.D.(1976)331-350

119 痴呆患者体液中の神経伝達関連物質について

児玉和彦・貝谷壽宣・難波益之(岐阜大・医・神経精神)
近藤俊英・三瓶文義・吉田弘道(犬山病院)
佐藤寛一(和合病院)・矢内原昇(静岡薬大)

〔要　約〕

Alzheimer型老年痴呆5例(男性2例、女性3例)の血漿glutamic acid decarboxylase(GAD)、β-endorphin, substance Pと、Alzheimer型老年痴呆17例(男性9例女性8例)、Huntington's chorea(HC)7例(男性3例、女性4例)の髄液acetylcholinesterase(AChE)、γ-aminobutyric acid(GABA)を測定した。血漿GADは痴呆群では8.8±0.9単位で対照群(14.5±1.8単位)に比べ(P<0.10)減少傾向を示した。血漿β-endorphinは痴呆群では136.2±32.8 Pg/mlで対照群(179.1±26.0 Pg/ml)と差はなく、血漿substance Pは241.0±63.5 Pg/mlで対照群(258.8±21.0 Pg/ml)と差はないが、L-DOPA投与中の1高値例を除くと173.8±30.6 Pg/mlとなり(P<0.10)減少傾向を示した。髄液AchEは痴呆群では72.8±7.4単位で対照群(78.6±4.5単位)と差はないが、HCでは55.0±4.5単位で(P<0.01)有意に減少していた。髄液GABAは痴呆群では5.9±0.6nM/mlで対照群(5.6±0.3nM/ml)と差はないが、HCでは4.8±0.4nM/mlで(P<0.10)減少傾向を示した。

Key words : dementia, humor, Neurotransmitter-related agent

近年、痴呆という病態を神経伝達物質の変化からとらえようとする研究がさかんとなってきている。今回、われわれは各種病因による痴呆患者体液中のacetylcholinesterase(AchE)、γ-aminobutyric acid(GABA)、glutamic acid decarboxylase(GAD)、β-endorphin、substance Pを測定したので、若干の文献的考察を加えて報告する。

対象

血液検索を行った対象は、痴呆患者5名(男性2名, 女性3名)年齢52～69歳(平均59.8歳)と、非痴呆患者13名(男性10名, 女性3名)年齢6～76歳(平均43.0歳)であり、髄液検索を行った対象は、痴呆患者17名(男性9名, 女性8名)年齢32～72歳(平均56.9歳)、非痴呆患者12名(男性11名, 女性1名)年齢16～75歳(平均49.1歳)、Huntington's chorea(HC)7名(男性3名、女性4名)年齢41～57歳(平均51.2歳)である。

方法

髄液は午後1時～3時の間に腰椎穿刺後可及的速やかに-70℃の冷凍庫に測定時まで保存した。血液は午前9時～11時の間に採血を行ない、ヘパリンを加え血漿に分離し, 速やかに-70℃で保存した。

GADはSuezらの方法を改良した中村らの方法により測定した。AChEは、Monotest cholinesterase測定キットを利用し, β-endorphin, substance Pはradioimmunoassayにより, GABAは酵素的微量測定法により測定した。

結果

血漿β-endorphin-like immunoreactivity：非痴呆群では179.1±26.0 Pg/mlであるのに対

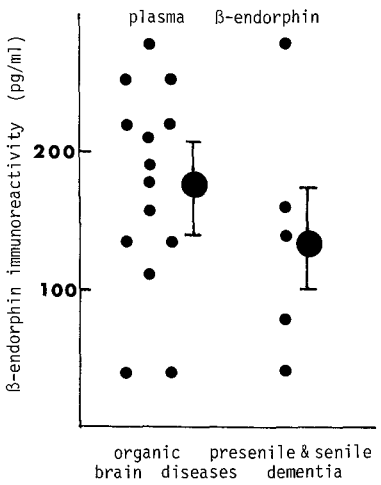


Fig.1 Plasma ß-endorphin
control=179.1 ± 26.0 pg/ml
dementia=136.2 ± 32.8 pg/ml

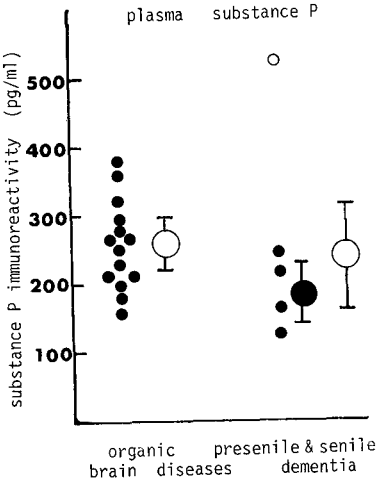


Fig.2 Plasma substance P
control=258.8 ± 21.0 pg/ml
dementia=241.0 ± 63.5 pg/ml (○)
dementia=173.8 ± 30.6 pg/ml (●)

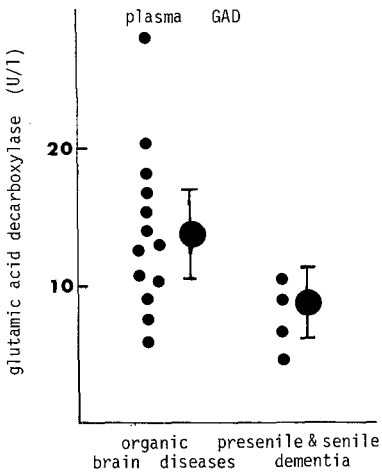


Fig.3 Plasma GAD
control=14.5 ± 1.8 U/l
dementia=8.8 ± 0.9 U/l

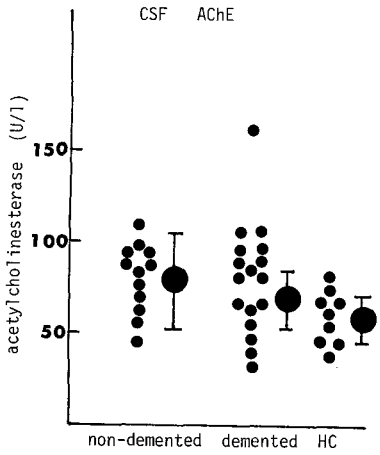


Fig.4 CSF AChE
control=78.6 ± 4.5 U/l
dementia=72.8 ± 7.4 U/l
HC=55.0 ± 4.5 U/l

して，痴呆群では136.2 ± 32.8 pg/ml で有意差を認めなかった(Fig.1)。

血漿substance P-like immunoreactivity：非痴呆群では258.8 ± 21.0 pg/ml であるのに対して，痴呆群では241.0 ± 63.5 pg/ml で差はないが(Fig.2)，L-DOPA投与中の1高値例を除いた4例(図の●の方)では173.8 ± 30.6 pg/ml となり減少傾向を示した。

血漿GAD：非痴呆群では14.5 ± 1.8 u/l であるのに対して，痴呆群では8.8 ± 0.9 u/l で減少傾向を示した(Fig.3)。

髄液AChE：非痴呆群では78.6 ± 4.5 u/l であるのに対して，痴呆群では72.8 ± 7.4 u/l で差はないが，HC群では55.0 ± 4.5 u/l で有意に減少していた(P < 0.01)(Fig.4)。

髄液GABA：非痴呆群では5.6 ± 0.3nM/ml であるのに対して，痴呆群では5.9 ± 0.6 nM/ml で差はないが，HC群では4.8 ± 0.4 nM/ml で減少傾向を示した(Fig.5)。

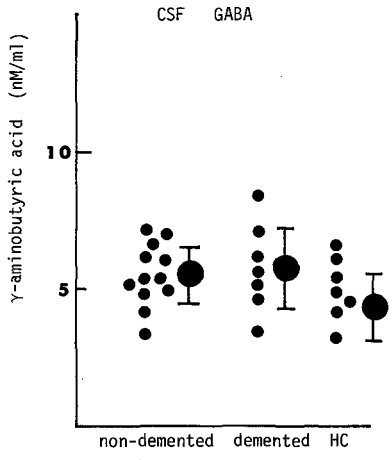


Fig.5 CSF GABA
control=5.6 ± 0.3 nM/ml
dementia=5.9 ± 0.6 nM/ml
HC=4.8 ± 0.4 nM/ml

以上まとめると，有意に低下していたものはHC患者での髄液AChEで，減少傾向を示したものは，痴呆患者での血漿GADと，L-DOPA投与中の1高値例を除いた時の血漿substance P，それにHC患者での髄液GABAであった。

考察

ここ10年間，初老期および老人性痴呆における神経伝達関連物質研究の進歩には目ざましいものがある。それらの伝達物質のなかで多くの研究者が認めているのが，acetylcholine(ACh)系物質の異常である。cholinergic neuron terminalに主に存在していると言われるcholine acetyltransferase(CAT)の著明な低下はアルツハイマー原線維変化，老人斑などの神経病理学的所見の出現率と相関しているとも言われ，生検脳でもCAT低下が証明されている。しかしCAT低下は脳全体にわたるものではなく被殻などはまぬがれており，かなり部位選択性がある。痴呆患者脳内でのAChE低下が報告されているが，髄液のAChEはDaviesらと同様今回の検索では低下を認めなかった。AChEはcholinergic neuron terminal, axon, perikaryal以外に，dopaminirgic neuron, noradrenergic neuron内にも存在し，髄液AChEの由来のはっきりしない点もあるため，本研究で明らかになったCSF値が正常範囲にあることから，cholinergic neuron系障害の有無を即座に推論することはできないように思われる。Perryらは痴呆脳のButylcholinesterase上昇に注目しているが，これはAch系障害ではなく，gliosisと相関しているようである。Richterらは，ACh，CATは低下しているが，cholineは正常範囲にあると報告している。また本研究では，HCでAChEが有意に低下していた

が，貝谷らは病期10年以上の3例のみに限ると有意に減少していたと言い，Consoloらは，髄液AChE，cholineはHC群とコントロール群で差がなかったと報告しており，病期の経過による脳萎縮を考慮に入れる必要があろう。次にGABA系酵素についてみると，剖検脳，血清でのGAD低下が多く報告されているが，GADは死亡前のHypoxiaの影響をうけやすく，剖検脳でのGAD活性値は示標としては不十分で，事実生検脳ではGADは正常範囲にあるとされている。これに比べ，血清GADは髄液GADとよく相関し，中枢由来と考えられ，今回の検索でも減少傾向を示し，GABA系障害が示唆される。髄液GABAについてみるとEnnaらはAlzheimer病，HCで低下をみているが，今回の検索ではHC群で減少傾向を認めたが，痴呆群では有意差を認めなかった。しかし，GABAは保存中上昇すると言われ，今回の症例では，ばらつきが大きいため，今後のより詳細な研究が必要と思われる。さらにreceptor bindingの研究も多数ある。CAT低下にもかかわらずmuscarinic receptor bindingは正常レベルにあるとする報告も多い。ReisimeらはGABA receptor，Spiroperidol receptorは低下しているが，ACh receptorは正常範囲にあると報告している。β-endorphinについては，内分泌疾患，精神疾患で異常がみられ，substance Pについては，HC群で減少しているという報告や，減少していないという報告がみられるが，β-endorphin，substance Pとも痴呆についての検索はみられないようである。今回の検索ではβ-endorphinはコントロール群と差はなく，substance Pについても差はないが，L-DOPA投与中の1高値例を除くと減少傾向を示したが，この高値例は，Hongらのハロペリドール投与中のsubstance Pが黒質で低下したという報告と比較すると興味深い。今後さらに広い視野からの痴呆の病態生理の研究が期待される。

文献

1) Bowen, D.M., Smith, C.B., White, P., Davison, A.N. (1976) Brain 99, 459-496

2) Consolo, S., Ladinsky, H., Branchi, S., Carceni, T. (1977) Arch. Psychiat. Nervenkr. 223, 265-270

3) Davies, P. (1979) Brain Res. 171, 319-327

4) Enna, S.J., Stein, L.Z., Wastek, G.J., Yamamura, H.Z. (1977) Arch. Neurol. 34, 683-685

5) Hong, J.S., Yang, H.Y. & Costa, E. (1978) Neuropharmacology 17, 83-85

6) 貝谷壽宣，森俊寛，森内巖，難波益之（1981）神経精神薬理 3，35－43

7) Lehmann, J. & Fribiger, H.C. (1979) Life Sci. 25, 1939-1947

8) Perry, E.K., Tomlinson, B.E., Blessed, G., Bergmann, K. (1978) Br. Med. J. 25, 1457-1459

9) Perry, E.K., Perry, R.H., Blessed, G. & Tomlinson, B.E. (1978) Neuropathology and Applied Neurobiology 4, 273-277

10) Perry, E.K. (1980) Age Aging 9, 1-7

11) Reisine, T.D., Yamah, H.I., Bird, E.D., Spokes, E. (1978) Brain Res. 159, 477-481

12) Richter, J.A., Perry, E.K. & Tomlinson, B.E. (1980) Life Sci. 26, 1683-1689

13) Spillane, J.A., White, P., Goodhardt, M.J., Flack, R.M.A. (1977) Nature 266, 558-559

人名索引（ABC順）

〔番号は演題番号を示す〕

(A)

阿部久美子……32
阿部輝雄……64
阿部敏明……22
相内敏弘……62
安達一真……104
秋山一文……12
天野武彦……91、113
安藤正人……80
青木英子……18
青山友三……22
荒木一明……36
浅野富子……74
朝倉幹雄……75、76
朝倉正……114

(B)

馬場明道……78、79
Benzer, S. ……54

(C)

千頭孝史……

(D)

大橋孝樹……62
出口武夫……83、84、95

(E)

遠藤俊郎……28
遠藤登代志……59

(F)

藤田省三……66
藤田忍……54
藤原仁……22
深津敏彦……26
福永浩司……63
古田知久……51
Ferrus, A. ……54

(H)

芳賀達也……87
原厚……29
原田泰弘……51
長谷川和夫……75、76
橋本康弘……30
鳩谷龍……70、110
畠中寛……67
播口之朗……4
早川洋一……20
林昭……5
林恵齢……10
林久美子……62
林要喜知……38
林時司……7
挾間秀文……100
広中郁朗……11
日高弘義……59、65
東田陽博……38、89
樋口宗史……88
平岩幹男……22
平松緑……24
平野誠……105
平島豊……28
平田進英……75、76
帆秋善生……108、109
本多虔夫……93
本多健治……86
本田昂……28
堀誠治……72
堀江賀与子……44
星野道雄……114
星野仁彦……8

(I)

市田成志……118
飯塚礼二……98
飯盛健一郎……108、109
井田能成……108、109
磯辺俊明……37、52、61、62
猪原慎一……81
井上敦子……112
井上桂……105、110
井上順雄……67
井上由紀子……30
石井一平……13
石岡憲昭……52、61、62
石谷良一……45
伊藤温子……53
伊藤仁一……60

(J)

Johnson, D. ……1
Jones, T. R. ……92

(K)

門田健……111
柿本泰男……3、21
貝谷寿宣……119
釜瀬春隆……100
神谷大雄……86
神守功二……82
上條一也……97
鴨志田智津恵……75、76
金長寿……105
金行孝雄……101
金子元久……8、26
金澤一郎……6

仮屋哲彦……13
笠間透……29
柏俣重夫……17、18
加藤兼房……19、50、53
加藤尚彦……85
加藤聖……107
加藤泰治……40、41、60
加沢鉄士……9
杵鞭宏育……97
川北幸男……25、27
菊野正隆……102
北村邦男……44
絹谷政江……39
喜多富太郎……118
楠木隆博……86
熊代永……8、26
国元憲文……100
小林和夫……102
小林清史……94
小林孝彰……114
児玉和彦……119
河野雅弘……24
河野康子……108、109
小出やよい……94
髙坂新一……35
小宮義璋……57
糀本芳郎……86
小島秀樹……98
小嶋久子……42、43
小山司……9
窪田耕輔……4
越智聡……81
郭哲輝……38
熊谷朗……31、39
熊倉鴻之助……102
倉田毅……22
栗原正……48
栗岡晋……72
栗山欣弥……82
黒田広生……2
黒田洋一郎……102
黒川正則……55、58
櫛谷悦子……37
工藤佳久……113
桑野良三……96
近藤俊英……119
近藤智善……5、98
高知宏喜……24
甲州啓二……28
L. Livett, B. G.……90

(M)

前田一……77
丸山勝一……10
増田達……37
俣賀宣子……14
松田誠……72、114
松原繁広……9
松原司……34
松田友宏……117
松本一夫……88
松本孝……105
松岡信夫……31
松谷天星丸……20、50
三瓶文義……119
三船和史……101
御子紫克彦……56
三木真由美……33
三木直正……38、89
三国雅彦……9
宮川明久……45
三宅正治……3、21
三宅好子……101
宮本英七……63
水口龍次……81
水川六郎……100
水野幸子……71、73
貝淵弘三……34
溝部文夫……90
溝渕真人……31
溝渕睦彦……21
正岡昭……41
前山一隆……99
本橋伸高……13
森昭胤……24、71、73
森啓……55
森浩一……25、27
森真由美……117
森則夫……26
森久博司……101
森川文雄……97
盛政忠臣……101
森野日出緒……3
森崎信尋……31
村上博彦……10
村本治……6
村野俊一……39

(N)

永井克也……39

長池一博……46
長崎信行……108、109
永田豊……47、80、93
永津俊治……98
中川八郎……39
中川勇三……89
中川良一……108、109
中河原通夫……13
中原辰雄……105、110
中原務……20
中島孝……50、52
中条茂男……62
中谷一泰……62
中村泰治……62
中根正樹……83、95
中西重雄……26
中田潤一……28
仲田義啓……112
中沢省三……23
難波経篤……80
難波益之……119
永吉道子……20
波間美佐子……115
楢林博太郎……5、98
成瀬浩……7
新村真人……30
西川徹……14
西本詮……51
西村健……4
西須英雄……64
西沢芳子……48
根岸晃六……107
野口鉄也……49
野村純一……70
野村正彦……47、104
野中千鶴……22
野田清美……28
額田敏秀……87
貫名至……2
沼田吉彦……8、26
(O)
小田泰雄……118
小笠原信明……74
小川希代子……22
小川紀雄……2、71、73
岡五百理……9
岡本浩一……115
岡村邦博……47
奥田正英……106
奥田拓道……39
奥村久仁子……60
奥谷正人……93
奥山典生……37、52、61、62
大藤真……2
大泉信行……102
大曲清……105
大西博……27
大西林吉……51
大野京介……25
大野拓夫……16
大迫俊二……84
大島直和……8、26
大塚英昭……30
大月三郎……2、12
大辻正高……47、104
尾崎哲……4
(R)
Roberts, E. ……116
(S)
斉藤雅……105
斉藤信太郎……43
斉藤彰……13
斉藤康……31
酒井豊……115
坂崎由起夫……41
桜井康子……86
崎村建司……36、37
佐野公彦……34
笹川展幸……102
沢政一……106
佐々木泰治……65
佐藤寛一……119
佐藤光源……12
佐藤修三……1
瀬川富朗……112
仙波禮治……19
仙波りつ子……17、18
脊山洋右……30
柴山敏子……62
志村俊郎……23
下村学……105
庄盛敏廉……94、101
須藤みゆき……97
杉崎哲朗……49
杉田秀夫……31
杉山博之……69
菅野仁喜……65
鈴木恵美子……7
鈴木富士子……53

鈴木　勝……44
鈴木友和……5
Seeman, P. ……15
Shotwell, S. L. ……54
Stadler, H. ……92
(T)
田渕和雄……51
田子久夫……26
田口吉孝……99
多田國利……4
高橋　章……111
高橋　弘……23
高橋十郎……81
高橋正身……91
高橋　良……7、11
高橋康夫……36、37、48、96
高井義美……34、81
高久　晃……8
高野行男……86
高崎親久……28
高嶋瑞夫……14
武田雅俊……4
竹田　稔……62
竹下正純……33
武富　保……29
玉井洋一……32、42、43
田丸政男……20
田村　実……23
田中正敏……108、109
田中　亮……40、41、60
立石紀昭……11
田代朋子……58
龍野　徹……78、79
所　安夫……22
富樫俊二……106
徳永博一……118
融　道男……14
土田哲也……30
都築紀宏……103
辻　正記……25、27
辻村良太郎……70
津島宏美……117
角岡秀彦……41
塚本　徹……75、76
塚本修司……71、73
塚田裕三……46、49、56
(U)
内田修次……88
内村英幸……105、110
内村公一……86
上原政治……68
植村慶一……44、68
宇佐美美穂子……111
(W)
和知　学……106
和田　博……99
渡部修三……15
渡辺明子……13
渡辺　厚……8、26
渡辺　実……8
渡辺　良……93
渡辺建彦……99
渡辺康裕……77
藁科　彬……66
Walker, J. H. ……92
(Y)
山上　栄……25、27
山口時男……98
山口知子……10
山川民夫……30
山川洋右……40
山本秀幸……63
山本光利……2
山本俊昭……8
山下　格……9
山下幸子……69
山西淳司……81
矢内原　昇……119
大和谷　厚……99
山脇泰秀……2
横尾秀康……105
横山(天野)恵美子…95
横山和仁……55
米田幸雄……116
吉田秀夫……11
吉田　豊……36、37
吉田弘道……119
吉田　博……77、88
吉野芳夫……23
吉野公博……101
吉野守彦……97
吉川和明……82
吉川　潮……81
指吸俊次……33
于　秉治……34

神経化学　Vol.　20

第 24 回　日本神経化学会抄録集

昭和56年11月27日(金)

28日(土)

NBCホール(長崎)