ISSN:0037-3796

神経化学

Bulletin of the Japanese Neurochemical Society

第28回　日本神経化学会大会論文集

Vol. 24, 1985

日本神経化学会

神経化学

第28回日本神経化学会大会論文集

PROCEEDINGS OF THE 28th ANNUAL MEETING OF
THE JAPANESE NEUROCHEMICAL SOCIETY

於 熊 本
11月5日(火), 11月6日(水), 11月7日(木)

Vol. 24, 1985

日 本 神 経 化 学 会

編集委員（五十音順）

荒木淑郎	（熊本大・医・Ⅰ内科）
岩佐隆史	（熊本大・医・Ⅰ薬理）
内村英幸	（国立肥前療養所）
岡野善郎	（熊本大・薬・薬物）
尾崎正若	（長崎大・医・Ⅱ薬理）
金戸洋	（長崎大・薬・薬物）
神谷大雄	（福岡大・薬・薬理）
公文明	（佐賀医大・生化）
反町勝	（鹿児島大・医・Ⅰ生理）
福永浩司	（熊本大・医・Ⅰ薬理）
宮田健	（熊本大・薬・薬物）
宮本英七（代表）	（熊本大・医・Ⅰ薬理）

目　次

1. ウシ脳からのγ－アミノブチリル－α－ハイプシンの単離同定 …… 25
佐野　輝・胡谷和彦・柿本泰男（愛媛大・医・神経精神）

2. ラット肝における histidyl-proline diketopiperazine [cyclo(His-Pro)] 結合の性状と調節 …… 28
広瀬由起子・小川紀雄・森　昭胤・嶋津　孝*・
斎藤昌之*（岡山大・医・脳研，愛媛大・医・第一医化*）

3. 実験的脳虚血における脳蛋白質の変化 …… 31
山下　正・多田國利・祖父江憲治*・新川久義・
鈴木英夫・播口之朗・西村　健
（大阪大・医・精神，高次研・神経薬理生化*）

4. 副腎髄質からの Ca^{2+} 依存性にアクチンフィラメントを切断する蛋白質の精製 …… 34
芦野伸彦・門脇浩三・田中敏彦・王　鳳翔・
祖父江憲治（大阪大・医・高次研・神経薬理生化）

5. ウシ脳 14-3-3 タンパク質の精製と性質：不均一性と分布 …… 37
門屋利彦・田村明敬・市村　徹・真鍋　敬・
礒辺俊明・奥山典生・中島　孝*
（東京都立大・理・化学，国立がんセンター・病理*）

6. 骨格筋，心筋に分布する $S100a_0$ 蛋白：各種動物筋組織における含量とヒト胸筋からの精製 …… 40
加藤兼房・木村茂樹*・灰本　元**・鈴木富士子・
清水温子
（愛知県コロニー研・生化，天野製薬・研究開発*，名古屋大・医・病理**）

7. 神経細胞のサブポピュレーションに発現する分子のモノクローナル抗体による系統的検索 …… 43
藤田　忍・小幡邦彦（群馬大・医・薬理）

8. ニワトリ胚脳の発生段階に応じて出現する酸性蛋白のモノクローナル抗体による解析 …… 46
白尾智明・小幡邦彦・児島伸彦（群馬大・医・薬理）

9. モノクローナル抗 Myelin-associated glycoprotein (MAG) 抗体を用いたリンパ球上の
共通抗原決定基の検索 …… 49
馬場広子・佐藤修三・犬塚貴・西沢正豊・
田中正美・宮武正（新潟大・脳研・神経内科）

10. 網膜に特異的な cDNA (pCR18) のクローニングと解析 …… 52
中川勇三・郭哲輝・三木直正（金沢大・がん研・薬理）

11. ニホンサル (Macaca fuscata) 脳の非極性糖脂質の特性及び組成 …… 55
武富保・原厚（信州大・医・心脈研・脂質生化）

12. PC12 細胞のガングリオシド，糖脂質，糖たんぱく質および全脂質合成に対する
外来性ガングリオシド GM1 の影響 …… 58
仙波りつ子・S.D. Skaper*・S. Varon*
（愛知県コロニー研・周生期，カリフォルニア大・サンディエゴ校・生物*）

13. *dw* マウス大脳のガングリオシドについて …… 61
杉崎哲朗・野口鉄也・佐藤勇*
（東邦大・医・第二生理，総研*）

14. アフリカツメガエル坐骨神経における CMP－シアル酸並びにガングリオシドの軸索内輸送 … 64
五十嵐道弘・小宮義璋・黒川正則
（東京大・医・脳研・生化）

15. 脳ミクロソームにおける極長鎖脂肪酸伸長の部分反応の特徴 …… 67
吉田敏・竹下正純（大分医大・生化）

16. ブタ大脳皮質プロスタグランジン E_2 結合蛋白の可溶化 …… 70
湯元昇・畑中道代・渡辺恭良・早石修
（新技術開発事業団・早石プロジェクト）

18. 両生類の変態に伴うミエリン脂質とタンパク質組成の変化 …… 73
玉井洋一・斉藤信太郎*・小嶋久子・小松博
（北里大・医・生化，山梨県立中央病院・精神*）

19. 2′:3′-環状ヌクレオチド 3′-フォスフォジエステラーゼの cDNA クローニング …… 76
栗原　正・高橋康夫　（新潟大・脳研・神経薬理）

20. モノクロナール抗体による中枢神経系及び末梢神経系 CNPase の免疫組織化学的検索 …… 79
藤城正敏・高坂新一・長池一博・塚田裕三
（慶応大・医・生理）

21. マウスにおける β-phenylethylamine 誘発行動発現機序の検討 …… 82
多賀千明・辻　元宏・高橋三郎　（滋賀医大・精神神経）

22. マウス脳の個体発生における β-phenylethylamine の変化 …… 85
明神徹郎・大井　健・辻　元宏・高橋三郎
（滋賀医大・精神神経）

23. 高速液体クロマトグラフィー電気化学検出器による Phenolic Amines の定量 …… 88
辻　元宏・増井　晃・多賀千明・高橋三郎
（滋賀医大・精神神経）

24. ガスクロマトグラフィー／質量分析法による髄液中フェニル酢酸の定量 …… 91
川端昌弘・小林清史・庄盛敏廉
（岡山大・医・脳研・病態生化）

25. PC12 サブクローンにおけるカテコールアミン含量と分泌量の増殖期依存性 …… 94
高島明彦・小池達郎　（佐賀医大・一般教育・化学）

26. 各種遺伝的疾患マウスにおける脳内アミンの変化について …… 97
三田浩一・須田治彦・御子柴克彦*・塚田裕三
（慶応大・医・生理，大阪大・蛋白研*）

27. 手綱脚路または線条体黒質路破壊後の，中脳皮質系ドーパミンニューロンの
ハロペリドールに対する反応性の変化 …… 100
小川篤子・侯賀宣子・高嶋瑞夫・西川　徹・
融　道男*
（国立武蔵療・神経センター・疾病3部，信州大・医・精神*）

28. メタンフェタミン逆耐性現象に伴う脳内モノアミンニューロンの機能と神経活性アミノ酸含量の変化 …… 103
橋本恒一・好田裕史・大熊誠太郎・栗山欣弥
（京都府医大・薬理）

29. 老齢ラット脳内のモノアミン及び過酸化ラジカル反応に及ぼす小柴胡湯合桂枝加芍薬湯の影響について …… 106
平松緑・枝松礼・加太英明・森昭胤・
河野雅弘*・石毛敦**
（岡山大・医・脳研・機能生化，日本電子・応用研*，津村薬理研・生理**）

30. プトレスチンの脳内分布 －SIM 法を用いて－ …… 109
能登直・長谷川武史*・上村宏・中尾純治・
橋本泰道・中嶋照夫 （京都府医大・精神，GC-MS 研究室*）

31. Conscious & freely moving ラットの大槽内髄液中モノアミン代謝物のレセルピン投与後の経時的推移 …… 112
澤温・大久保律子・鈴木義徳・奥山真司・
中澤恒幸 （藤田学園保衛大・医・精神神経）

32. メトアンフェタミン断薬後におけるラット脳部位別モノアミン代謝の特徴 …… 115
岡田尚志郎・盛政忠臣・池田正明・難波洋一郎*・
金行孝雄**・庄盛敏廉
（岡山大・医・脳研・病態生化，脳神経外科*，岡山県立短大**）

33. 黒質線条体系におけるドパミン代謝の日内動態と加齢による変化 …… 118
盛政忠臣・池田正明・岡田尚志郎・中野重行*・
庄盛敏廉 （岡山大・医・脳研・病態生化，愛媛大・医・薬理*）

34. 心理的ストレスによるラット脳内ノルアドレナリン代謝回転亢進に及ぼす diazepam と morphine の作用の差 …… 121
田中正敏・津田彰・辻丸秀策・佐藤洋美・
白尾一正・小口雅申・長崎信行 （久留米大・医・薬理）

35. ラット脳内部位別セロトニン代謝の日内変動と加齢による変化 …… 124
池田正明・盛政忠臣・岡田尚志郎・中野重行*・
庄盛敏廉 （岡山大・医・脳研・病態生化，愛媛大・医・薬理*）

36. アデニレートシクラーゼ調節機構に及ぼすデシプラミン，ACTH，リチウムの効果 …… 127
岡田文彦 （北海道大・保健管理センター）

37. ラット脳における α-adrenoceptor と Ca 拮抗剤結合部位の相互作用 …… 130
松林弘明・鬼頭昭三・片山禎夫・三好理絵
（広島大・医・第三内科）

38. ラット脳 α_2-アドレノセプター系機能に及ぼす百日咳毒素 (IAP) の影響 …… 133
川田恵子・北村佳久・野村靖幸
（富山医薬大・和漢薬研・生物試験）

39. ラット大脳皮質における α_2-と β-adrenoceptor の相互作用 -clonidine による
β-adrenoceptor high affinity state の減少 …… 136
中村豊紀・太田深雪・辻村良太郎・野村純一
（三重大・医・精神）

40. ラット脳 α_2-アドレナリン受容体のフォトアフィニティラベリング …… 139
松井宏晃・朝倉幹雄・塚本徹・今福淳・
伊野美幸・宮村智子・斉藤典子・長谷川和夫
（聖マリアンナ医大・神経精神）

41. 下垂体 D_2 ドーパミン受容体の Mg^{2+} イオンと Na^+ イオンによる調節 …… 142
渡辺雅幸・P. Seeman*
（藤田学園保衛大・医・精神，トロント大・医・薬理*）

42. ラット中枢 D-2 ドーパミン受容体における [^{3}H]sulpiride 結合部位の特性 …… 145
今福淳・朝倉幹雄・塚本徹・松井宏晃・
伊野美幸・宮村智子・斉藤典子・長谷川和夫
（聖マリアンナ医大・神経精神）

43. ラット肝ヒスタミン H_1 受容体の可溶化，部分精製及びその性質 …… 148
福井裕行・王乃平・渡辺建彦*・和田博
（大阪大・医・第二薬理，東北大・医・第一薬理*）

44. アセチルコリン伝達系のシナプス小胞マーカー，プロテオグリカンに対する抗血清の検討 …… 151
山口知子・D.V. Agoston*・V.P. Whittaker*
（東京女医大・生化，マックスプランク研・Abteilung Neurochemie*）

45. 抗躁病薬の中枢セロトニン受容体に及ぼす影響 …… 154
山脇成人・内富庸介・堀田和泉・柳川耕作・
長尾正嗣*・更井啓介*
（国立呉病院・臨床研究部・精神，広島大・医・神経精神*）

46. 高血圧自然発症および脳卒中易発症ラットの脳内カテコールアミンと回転運動変化 …… 157
野村正彦・岡村邦博（藤田学園保衛大・医・生理）

47. ラット脳虚血モデルにおける hydroxylase cofactor と monoamines の変化 …… 160
飯島節・原健二*・須賀博文*・中村重信*・
亀山正邦*（滋賀県立成人病センター，京都大・医・神経内科*）

48. MPTP による Parkinson 病モデルマウスにおける神経伝達物質と受容体の変化
ならびに L-DOPA の効果 …… 163
小川紀雄・広瀬由起子・小原節子・渡辺洋子・
小野剛（岡山大・医・脳研）

49. パーキンソン病惹起物質 MPTP の類似化合物と脳内 MAO との相互作用 …… 166
荒井裕一朗・杵鞭宏育（昭和大・医・第二薬理）

50. MPP^+ 及び MPTP の誘導体によるラット線条体スライスチロシン水酸化酵素系の阻害 …… 169
平田洋子・永津俊治（名古屋大・医・第一生化）

51. アニオンチャンネル依存性 Ca 刺激性グルタミン酸受容体について …… 172
米田幸雄・荻田喜代一・中牟田弘道・小井田雅夫
（摂南大・薬・薬理）

52. Na 依存性および非依存性 ^{3}H－グルタミン酸結合に対するグルタチオンの作用について …… 175
荻田喜代一・中牟田弘道・小井田雅夫・米田幸雄
（摂南大・薬・薬理）

53. キスカル酸感受性 L-[^{3}H] グルタミン酸結合部位：モルモット脳膜分画からの可溶化 …… 178
越谷和雄（金沢大・医・第二生理）

54. 伝達物質グルタミン酸の動態 －グルタミン回路仮説の検討－ …… 181
高垣玄吉郎・小長谷初枝（東京都神経研・神経生化）

55. アスパラギン酸特異抗体の作製と免疫組織化学 …… 184
斎藤尚亮・雲井一夫・坂上元祥・田中千賀子
（神戸大・医・薬理）

56. 神経伝達物質による摘出白鼠上頚交感および迷走神経節への α-aminoisobutyric acid (AIB) 輸送系の促進効果とその細胞局在の相違 …… 187
安藤正人・高濱和也・永田豊
（藤田学園保衛大・医・生理）

57. 軟体動物巨大神経細胞における芳香族アミノ酸誘導体の抑制作用 …… 190
船瀬広三・竹内宏（岐阜大・医・第一生理）

58. タウリン抗体の作成，特異性の検定およびその中枢神経系における免疫組織化学的応用 …… 193
冨田安信・木村宏・井田修二*・栗山欣弥*
（滋賀医大・第二解剖，京都府医大・薬理*）

59. *El* マウス大脳皮質切片からの taurine release とそれに及ぼす抗てんかん薬の影響について … 196
小川一寿・平松緑・加太英明・森昭胤
（岡山大・医・脳研・機能生化）

60. ラット小脳における新しい GABA ニューロンの可能性 …… 199
青木英子・仙波禮治・柏俣重夫
（愛知県コロニー研・周生期）

61. 培養牛副腎髄質クロマフィン細胞における ACh 応答機能の不活性化について …… 202
小原美佳・熊倉鴻之助（上智大・生命科学研）

62. 大脳皮質シナプス膜のコリン作動性膜機能と膜コンホメーション
-Nicardipine の膜修飾作用- …… 205
関谷　真・迫　昭子　（上智大・生命科学研）

63. 実験的脳梗塞モデルラットの学習行動および脳内コリン作働性神経系活動について …… 208
成実重彦・清田義弘・永岡明伸
（武田薬品・中央研・生物研）

64. ヒト胃におけるムスカリン様アンタゴニスト ^{3}H-QNB 特異的結合の多様性とその機能的局在 … 211
山本　純*・津島宏美・正岡　昭*・松田友宏
（名古屋市大・医・薬理，第二外科*）

65. ラット胃におけるムスカリン様アンタゴニスト ^{3}H-QNB の特異的結合能の
ストレスによる減弱 …… 214
山本　純*・津島宏美・正岡　昭*・松田友宏
（名古屋市大・医・薬理，第二外科*）

66. 培養星状膠細胞の老化とガングリオシド …… 217
阿相皓晃・武藤紀子・原田　寧・金本和男・
平野修助　（東邦大・医・生理）

67. α－アミノアジピン酸のグリア毒性について …… 220
加藤　聖・根岸晃六　（金沢大・医・神経情報研）

68. 培養グリオーマ細胞に及ぼす forskolin の影響 …… 223
本田千穂・田渕和雄・入江恵子・福岡高宏・
三野章呉・吉岡純二・植田清隆・大本堯史
（香川医大・脳神経外科）

69. ラット胎児脳細胞初代培養系に対するグリア腫細胞の条件培地 (GCM) の
Neuronotrophic Effects …… 226
松岡一郎・佐藤嗣道・栗原堅三　（北海道大・薬・薬剤）

70. TPA によるヒトグリオーマ細胞リン脂質代謝の変化 …… 229
桃井 真里子・粕谷 淳子*・桃井 隆*
（自治医大・小児科，国立武蔵療・神経センター・疾病5部*）

71. 脳腫瘍における src 遺伝子の発現について …… 232
竹中 信夫・御子柴 克彦*・岡野 栄之**・藤城 正敏**・
緋田 芳樹**・陣崎 雅弘**・高松 研**・塚田 裕三**・
大谷 光弘・戸谷 重雄
（慶応大・医・脳神経外科，大阪大・蛋白研*，慶応大・医・生理**）

72. モノクローナル抗体によるグリア線維性蛋白質 (GFAP) の抗原決定部位の解析 …… 235
羽賀 誠一・徳武 哲・石井 毅・篠田 友孝*
（東京都精神研・神化・超微，東京都立大・理・生化*）

73. ヒト正常大脳および膠芽腫における S-100 蛋白サブユニットの局在証明 …… 238
福岡 高宏・田渕 和雄・守屋 芳夫*・古田 知久*・
西本 詮* （香川医大・脳神経外科，岡山大・医・脳神経外科*）

74. 人神経膠腫由来の神経特異 γ-エノラーゼ (NSE) …… 241
倉光 正春・佐和 弘基・加藤 兼房*
（九州大・医・脳研・病理，愛知県コロニー研・生化*）

75. 星状膠細胞に特異的に局在するグルタチオン S-トランスフェラーゼ …… 244
千丈 雅徳・石橋 輝雄 （北海道大・医・第二生化）

76. ムスカリン性アセチルコリン受容体と GTP 結合蛋白質の精製及び再構成 …… 247
芳賀 和子・芳賀 達也 （浜松医大・第一生化）

77. ラット耳下腺における β- 及び α_1-アドレノセプターの相互関係
-Isoproterenol 処置による phosphatidylinositol 代謝回転の亢進- …… 250
宮本 篤・大鹿 英世 （札幌医大・薬理）

78. 血管 adrenergic nerve からの 5-hydroxytryptamine 遊離と
presynaptic α-adrenoceptor による調節 …… 253
川崎 博己・増元 圭三・高崎 浩一朗 （宮崎医大・薬理）

79. ラット大脳皮質細胞膜分画のアデニル酸シクラーゼ活性におよぼす各種抗うつ薬の影響 …… 256
山岡巧一・難波経篤*・野村総一郎・永田豊*・
中澤恒幸 (藤田学園保衛大・医・精神神経, 生理*)

80. Serotonin 受容体に対する phencyclidine の作用 …… 259
野田幸裕・鍋島俊隆・山口和政・吉田茂・
石川和宏・古川宏*・亀山勉
(名城大・薬・薬品作用, 薬化*)

81. $5HT_2$ receptor の血小板 5HT-induced shape change による検討 …… 262
増子博文・金子元久・柳内努・熊代永・
高野静子* (福島県医大・神経精神, 薬理*)

82. 手綱核破壊ラットにおける haloperidol 慢性投与後の脳内 D_2 受容体の変化 …… 265
西川徹*,**・高嶋瑞夫**・融道男***
(東京医歯大・医・神経精神*, 国立武蔵療・神経センター**, 信州大・医・精神***)

83. 新しい抗精神病薬 OPC-4392；ドパミン受容体アゴニスト／アンタゴニスト …… 268
菊地哲朗・保田好信・鈴木成生・筒井正博・
山田清文・桧山隆司・藪内洋一 (大塚製薬・徳島研)

84. ラット脳シナプトゾームにおける内因性カテコールアミンの遊離に対する EGTA の影響 …… 271
岡田三津子・片岡泰文・植木昭和*・藤原道弘
(福岡大・薬・応用薬理, 九州大・薬・薬理*)

85. モノクローナル抗体で識別されるシナプス小胞に特異的な4種の蛋白質 …… 274
小幡邦彦・児島伸彦・藤田忍・白尾智明・
西江弘*・内薗耕二**
(群馬大・医・薬理, 順天堂大・医・生理*, 静岡女子大**)

86. ラット副腎凍結切片への ^3H－グルタミン酸結合について …… 277
中牟田弘道・荻田喜代一・小井田雅夫・米田幸雄
(摂南大・薬・薬理)

87. グルタミン酸受容体とアニオンチャンネルの関連性について …… 280
米田幸雄・荻田喜代一・中牟田弘道・福田美衛・
小井田雅夫 （摂南大・薬・薬理）

88. カイニン酸誘発性線条体－黒質系 GABA ニューロン変性に伴う
GABA 受容体結合の変化と活性酸素生成 …… 283
高橋守・栗山欣弥 （京都府医大・薬理）

89. ハルミンの行動薬理学的研究（第4報）：アポモルフィン併用で生じるラットの
Jumping における GABA 作動性神経系の関与 …… 286
諸井佳代子・久我哲郎 （千葉大・生物活性研・薬理活性）

90. ラット下垂体キニン系に関する研究 …… 289
仮家公夫・山内あい子・李英培（神戸学院大・薬・薬理）

91. 培養グリオーマ細胞水溶性蛋白の二次元電気泳動法による解析 …… 292
本田千穂・田渕和雄・入江恵子・福岡高宏・
三野章呉・吉岡純二・植田清隆・大本堯史
（香川医大・脳神経外科）

92. ウシ末梢神経 Po 糖蛋白のアミノ酸配列 …… 295
坂本安・北村邦男・吉村和法・西島樹重・
植村慶一 （埼玉医大・第一生理）

93. 軸索内を輸送される細胞骨格蛋白の相互関係 …… 298
田代朋子・小宮義璋・黒川正則
（東京大・医・脳研・生化）

94. 神経細胞体のニューロフィラメント蛋白質の高分子量成分 …… 301
山本彰夫・佐武明・豊島至*・宮武正*・
藤田忍**
（新潟大・脳研・神経化学，神経内科*，群馬大・医・薬理**）

95. 早期ヒト胎芽における γ-enolase の局在 …… 304
篠原春夫・仙波禮治*・加藤兼房**・柏俣重夫*・
田中修 （島根医大・解剖，愛知県コロニー研・周生期*，生化**）

96. ラット大脳切片におけるオルニチン代謝生成物の量的変化と調節 …… 307
松澤健夫・笠原正男*・小原嘉彦**
(藤田学園保衛大・医・生化，病理*，名城大・農**)

97. ラット脳内鉄の分布と神経伝達物質合成酵素活性 …… 310
石田裕一・野田行文 (中外製薬・新薬研)

98. ウサギにおける，ミエリン塩基性蛋白上の脳炎誘発部位の検討 …… 313
吉良潤一・R.E. Martenson*・M.W. Kies*・E.C. Alvord, Jr.**
(九州大・医・神経内科， Lab. of Cerebral Metab., NIMH, USA*,
Lab. of Neuropath., Univ. of Washington, USA**)

99. PC12 細胞の内因性 Ca^{2+} 依存性タンパクリン酸化 …… 316
野路久仁子・田中亮 (名古屋市大・医・第一生化)

100. 免疫組織化学及び酵素免疫測定法によるカルシニューリンのラット脳内分布の検討 …… 319
後藤恵・三原洋祐・井上信博・松角康彦・
宮本英七* (熊本大・医・脳神経外科，第一薬理*)

101. ラット大脳皮質におけるプロスタグランジン D 合成酵素の免疫組織化学的局在の
加齢に伴なう変化 …… 322
裏出良博・藤本昇・早石修・金子武嗣*・
小西昭*・水野昇*
(新技術開発事業団・早石プロジェクト，京都大・医・第一解剖*)

102. 低酸素後の脳内モノアミン代謝回転に及ぼす S-adenosylmethionine
(SAMe : FO-1561) の効果 …… 325
石川敏三・西山芳憲・阿部政則・前川剛志・
坂部武史・武下浩 (山口大・医・麻酔)

103. ハロペリドールによるラット線条体スライスからのドパミン遊離に対するコリン系の関与 …… 328
山田茂人・小島秀樹・横尾秀康・堤哲之・
高向和宜*・西彰五郎・安楽茂己・稲永和豊*
(久留米大・医・脳研，精神*)

104. 電撃ストレッサーへの予測可能性がラット脳内ノルアドレナリン放出に及ぼす影響 …… 331
津田　彰・田中正敏・辻丸秀策・小口雅申・
長崎信行　（久留米大・医・薬理）

105. ラット脳内ノルアドレナリン代謝回転及び末梢臓器に対する昼間時，
夜間時拘束ストレスの差 …… 334
辻丸秀策・田中正敏・津田　彰・佐藤洋美・
白尾一正・長崎信行・稲永和豊*
（久留米大・医・薬理，精神神経*）

106. Age- and sex-related changes in histamine in the central nervous system …… 337
R. Cacabelos・大和谷　厚*・渡辺建彦**・播口之朗・
西村　健・和田　博*
（大阪大・医・精神，第二薬理*，東北大・医・第一薬理**）

107. Methamphetamine 連続投与による dopamine および serotonin 神経系の
感受性の変化について －Phencyclidine との比較－ …… 340
深谷公昭・鍋島俊隆・古川　宏*・亀山　勉
（名城大・薬・薬品作用，薬化*）

108. ラット大脳皮質鉄塩投与後の脳内カテコールアミン，セロトニン及びアミノ酸について …… 343
福島正登・平松　緑・加太英明・枝松　礼・
森　昭胤　（岡山大・医・脳研・機能生化）

109. 高速液クロによるカルボキシ末端アミド化ペプチドの検出について …… 346
高野宏美・西島樹重・北村邦男・植村慶一
（埼玉医大・第一生理）

110. 低体温動物モデルにおける脳内 TRH の変化 …… 349
奥田千恵子・溝部俊樹・宮崎正夫・木村　宏*・
栗山欣弥**
（京都府医大・麻酔，滋賀医大・第二解剖*，京都府医大・薬理**）

111. 牛副腎髄質初代培養細胞のリン酸化とエンケファリンの動態 …… 352
竹田二美代・竹田稔・島田明範・倉岡幸令・
内海晃・紺野邦夫・相内敏弘*・中村泰治*
（昭和大・医・生化，薬・生物化学*）

112. ストレスによるラット脳内メチオニンエンケファリン含量の変化に関する研究 …… 355
車地暁生・高嶋瑞夫・渋谷治男*・融道男**
（国立武蔵療・神経センター・疾病3部，
東京医歯大・医・精神*，信州大・医・精神**）

113. ラット脳における心房性ナトリウム利尿ポリペプチドの存在及び分布について …… 358
森井成人*・中尾一和*,**・坂本誠*・菅原照*・
伊藤裕*・山田敬行*・塩野尚三*・井村裕夫*
（京都大・医・第二内科*，RI 総合センター**）

114. 向精神薬投与後のラット前頭葉皮質の VIP 含量の変化 …… 361
三ツ汐洋・高嶋瑞夫・侯賀宣子・融道男*
（国立武蔵療・神経センター・疾病3部，信州大・医・精神*）

115. 脳障害とリソゾーム －遺伝性高ビリルビン血症 Gunn ラットにおける
小脳リソゾームの変化－ …… 364
佐藤浩・慶野宏臣・青野幸子・仙波禮治・
柏俣重夫（愛知県コロニー研・周生期）

116. 脳のアミロイド …… 367
徳武哲・羽賀誠一・石井毅・亀谷富由樹*・
篠田友孝*（東京都精神研・神化・超微，東京都立大・理・生化*）

117. 発達期および成熟期マウス脳におけるピペコリン酸濃度とその取り込みについて …… 370
金長寿・E. Giacobini*
（国立肥前療養所，南イリノイ大・医・薬理*）

118. 多発性硬化症脳における免疫グロブリン G について …… 373
細川武・浜口勝彦・E.L. Hogan*・J.J. Marchalonis*
（埼玉医大・神経内科，Med. Univ. of South Carolina*）

119. プロスタグランディン D_2 の神経腫細胞に対する細胞分化作用 …… 376
上野隆司・林　祐一・三輪直人・杉野弘明・
三輪俊明・早石　修・工藤佳久*・天野武彦*
（新技術開発事業団・早石生物情報伝達プロジェクト，
三菱化成・生命研・脳神経科学*）

120. 正常マウスおよび網膜変性症マウスの網膜内におけるグルタミン酸脱炭酸酵素
(EC 4.1.1.15, GAD) と γ-アミノ酪酸 (GABA) の分布 …… 379
村島善也・加藤尚彦*　（東京都精神研，東京大・医・脳研*）

121. 節前および節後神経切断後のラット上頸部神経節内神経成長因子 (NGF) 含量の
高感度酵素免疫測定法による定量 …… 382
高濱和也・岩田光良・三輪正人・安藤正人・
永田　豊・堀　真一郎*・加藤兼房**
（藤田学園保衛大・医・生理，東京都神経研・神経生化*，
愛知県コロニー研・生化**）

122. PC12h 細胞における Na^+, K^+-ATPase に対する神経成長因子の影響 …… 385
井上順雄・松井英男・畠中　寛*
（杏林大・医・生化，三菱化成・生命研*）

123. ヒトおよびラット培養脳腫瘍細胞における $pp60^{src}$ および
上皮成長因子受容体 (EGF-R) の発現の検討 …… 388
本田千穂・田渕和雄・入江恵子・福岡高宏・
三野章呉・吉岡純二・植田清隆・大本堯史
（香川医大・脳神経外科）

124. ヒト脳のアシアロ GM1：Glioma 組織における減少とヌードマウス皮下移植
Glioma における増量 …… 391
岩森正男・石原映子・永井克孝・中村　治*・
高倉公明**
（東京大・医・生化，国立がんセンター・脳外科*，東京大・医・脳外科**）

125. アストロサイトーマ GA-1 の autocrine 型増殖調節 …… 394
伊藤仁一・加藤泰治・田中　亮・加藤兼房*
（名古屋市大・医・第一生化，愛知県コロニー研・生化*）

126. グリア芽細胞増殖抑制因子 (GGIF) の生物活性：グリア細胞成長因子 (GMF) 活性に対する抑制作用 …… 397
原　普二夫・田中恭子*・伊藤仁一**・加藤泰治**・田中　亮**
（名古屋市大・医・第二外科，粟津神経生物研*，名古屋市大・医・第一生化**）

127. 培養オリゴデンドロサイトの細胞骨格 …… 400
熊谷博道・佐藤七枝・今澤正興・田平　武*・宮本侃治　（国立武蔵療・神経センター・代謝研，疾病6部*）

128. ラット脳を用いた培養オリゴデンドログリアの形態的特徴とミエリン形成能力 …… 403
武藤紀子・阿相皓晃・平野修助（東邦大・医・第二生理）

129. ウシ脳からの Substance P 結合部位の可溶化 …… 406
田中祥裕・仲田義啓・森島義行・瀬川富朗
（広島大・医・総合薬学・薬効解析）

130. ラット辺縁脳の TRH レセプターへの 5-HT と向精神薬の結合 …… 409
舩津邦比古・手嶋茂紀・稲永和豊　（久留米大・医・精神）

131. ラット辺縁脳と線条体における TRH レセプターと dopamine autoreceptor の相互作用 …… 412
舩津邦比古・手嶋茂紀・稲永和豊　（久留米大・医・精神）

132. 老令ラットにおける TRH 神経機構の変化と *Dihydroergotoxine* の効果 …… 415
野村正彦・小川紀雄*・広瀬由起子*
（藤田学園保衛大・医・生理，岡山大・脳研・機能生化*）

133. 脳内神経ペプチドとその受容体に及ぼす拘束ストレスの影響 …… 418
高山晴彦・貫名　至・広瀬由起子*・小川紀雄*
（岡山大・医・第三内科，脳研*）

134. ラット副腎のグルタミン酸受容体について …… 421
米田幸雄・中牟田弘道・荻田喜代一・小井田雅夫
（摂南大・薬・薬理）

135. 神経細胞における受容体活性化による Ca^{2+} mobilization への GTP 調節蛋白の関与 …… 424
大杉　武・今泉太郎・水島　淳・内田修次・
吉田　博　（大阪大・医・第一薬理）

136. Conotoxin GIII による Na channel に対する [^{3}H]Lys-tetrodotoxin の阻害 …… 427
柳川右千夫・阿部輝雄・佐武　明
（新潟大・脳研・神経化学）

137. スピンラベル法によるラット脳神経終末形質膜 (SPM) 及びシナプス小胞 (SV) 膜の流動性測定 …… 430
都築紀宏　（名古屋市大・医・生化）

138. 線条体黒質路に含まれるオピオイドペプチド …… 433
市川宏伸*,**・西川　徹*,***・三ツ汐　洋*・高嶋瑞夫*・
融　道男****・松尾壽之*****
（国立武蔵療・神経センター*，都立梅ケ丘病院**，東京医歯大・医・神経精神***，
信州大・医・精神****，宮崎医大・第二生化*****）

139. 線条体への kainic acid 投与に伴う海馬での (Met^5)-enkephalin 合成系の変化
－Preproenkephalin A に対する cDNA による検討－ …… 436
金松知幸・J.S. Hong*　（東邦大・医・第二生理，NIEHS, NIH*）

140. 実験的脳卒中ネコの脳における ^{3}H-EKC binding および Dopamine,
GABA-uptake に与える Dynorphin (1-13) の効果 …… 439
黒田広生・Y. Hosobuchi*
（岡山大・医・第三内科，UCSF・脳外科*）

141. ラット性行動調節における Opioid Peptide Leumorphin (Dynorphin B-29) の
生理的役割について …… 442
須田光明・中尾一和・坂本　誠・森井成人・
菅原　照・井村裕夫　（京都大・医・第二内科）

142. Kyotorphin (Tyr-Arg) の神経終末への取り込みと放出機構について …… 445
植田弘師・高木博司　（京都大・薬・薬理）

143. ラット脳内神経ペプチドに及ぼす Ketamine の影響 …… 448
小野　剛・小川紀雄・広瀬由起子・梶田三郎*
（岡山大・医・脳研，神経精神*）

144. activity stress 負荷時のラット脳内 CRF 様免疫活性について …… 451
鈴木孝尚・池田淑夫・伊島正次・藤木嘉明・
坂井田四郎・中尾一和*・中澤恒幸
（藤田学園保衛大・医・精神神経，京都大・医・第二内科*）

145. 覚醒剤精神病モデルにおける脳内 TRH 系の変化 …… 454
梶田三郎・藤原　豊・佐藤光源・大月三郎・
小川紀雄*　（岡山大・医・神経精神，脳研・機能生化*）

146. ラット脳内ニューロテンシン様免疫活性に及ぼすメトアンフェタミン及び
ハロペリドールの効果 …… 457
和知　学・奥田正英・富樫俊二・不破野誠一・
宮下　理　（新潟大・医・精神，脳研・神経化学）

147. 血清浸透圧と血漿バゾプレッシン濃度におよぼす向精神薬長期投与の影響 …… 460
平井基陽・岸本年史・大沢弘吉・井川玄朗・
橋本泰道*・能登　直*・中嶋照夫*
（奈良医大・精神，京都府医大・精神*）

148. ラット心房性 Na 利尿ペプチド（28）結合部位：脳，副腎，腎 …… 463
尾崎正若・丹羽正美・姫野明彦・太田　尚・
猪狩伸比古・下村千枝子　（長崎大・医・第二薬理）

149. タキキニン・ペプチド，Substance P と Substance K の中枢作用とその分布 …… 466
高野行夫・永島　亮・波多江靖之・神谷大雄・
増井治憲*・山田勝士**
（福岡大・薬・薬理，RI センター*，医・薬理**）

150. ラット胎児脳初代培養におけるアストログリアの neuronotrophic および
maturation 効果について …… 469
吉田一成*・高坂新一・大谷光弘*・戸谷重雄*・
塚田裕三　（慶応大・医・生理，脳外科*）

151. 培養毛様体神経節ニューロンに働く神経突起伸展因子 －免疫化学・免疫組織化学的研究－ …… 472
林　　要喜知・三　木　直　正　　（金沢大・がん研・薬理）

152. 脳内における神経成長因子 …… 475
天　野　武　彦　　（三菱化成・生命研・脳神経化学）

153. 心臓細胞条件培養液中の神経突起成長因子の特性 …… 478
山　本　亘　彦　　（大阪大・基礎工・生物工学）

154. 神経成長因子およびコレラトキシンのタンパク質リン酸化における作用 …… 481
橋　本　誠　一・葛　谷　博　磁　　（東北歯大・生化）

155. 外因性 GM_1 ganglioside のラット中枢 5-HT 神経終末修復促進効果 …… 484
小　島　秀　樹・案　納　直　子・石　橋　義　広・横　尾　秀　康・
山　田　茂　人・堤　　哲　之・安　楽　茂　己・西　　彰五郎・
稲　永　和　豊*・G. Jonsson**・A. Gorio***
（久留米大・医・脳研，精神*，Karolinska Ins.**，Fidia Res. Lab.***）

156. 神経成長因子および海馬由来因子等によるラット中隔野培養神経細胞の
コリナージック機能の増大 …… 487
畠　中　　寛・津久井　弘　子・二本松　伊都子
（三菱化成・生命研・脳神経科学）

157. ラット中枢神経系の Neuronotrophic factor －特に海馬由来因子について－ …… 490
高　坂　新　一・吉　田　一　成*・大　谷　光　弘*・戸　谷　重　雄*・
塚　田　裕　三　　（慶応大・医・生理，脳外科*）

158. 海馬可溶性神経発育促進因子の partial purification について …… 493
小　鹿　幸　生・田　中　　亮*・S.H. Appel**
（名古屋市大・医・第二内科，第一生化*，Baylor 大・神経内科**）

159. 牛副腎髄質アクトミオシンの Ca^{2+} 制御機構 …… 496
田　中　敏　彦・神　田　啓　子・伊　藤　和　幸・藤　尾　　慈・
祖父江　憲　治・垣　内　史　朗　　（大阪大・医・高次研・神経薬理生化）

160. ニューロフィラメント・アクチンフィラメント相互作用：Ca^{2+} による制御機構 …… 499
岡部登志男・田中敏彦*・高橋克彦*・鬼頭ひろ志*・
祖父江憲治*　（大阪大・医・精神，高次研・神経薬理生化*）

161. Protein kinase C に対する単クローン抗体の作製と免疫組織化学 …… 502
北野達郎・斎藤尚亮*・河本純子・橋本規・
吉川潮・田中千賀子*・西塚泰美
（神戸大・医・第二生化，薬理*）

162. Protein kinase C によるリン酸化の，adenylate cyclase に対する影響について …… 505
渡辺康裕・S. Bauer*・K.H. Jakobs*
（大阪大・医・第一薬理，ハイデルベルグ大・薬理研*）

163. カルモデュリン拮抗剤マストパランの細胞内マイクロインジェクションによる
ゾウリムシの行動変化 …… 508
芳賀信幸・黒田洋一郎*
（東北大・理・生物，東京都神経研・神経生化*）

164. ラット脳におけるカルシウム拮抗薬とムスカリン性アセチルコリン結合部位の相互作用 …… 511
片山禎夫・鬼頭昭三・松林弘明・三好理絵
（広島大・医・第三内科）

165. ラット脳カルモデュリン特異性 N－メチル化酵素の精製とその特性 …… 514
森野日出緒・川本立夫・柿本泰男・三宅正治*
（愛媛大・医・精神，機器センター*）

166. 白鼠上頸神経節の節前，節後神経切断とカルモデュリン …… 517
大島章子・佐野護・河村則子・北島哲子・
永田豊*
（愛知県コロニー研・形態，藤田学園保衛大・医・生理*）

167. PC12 細胞の神経線維伸長とカルモデュリン …… 520
北島哲子・大島章子・佐野護
（愛知県コロニー研・形態）

168. ラット Synaptic Junction 画分による Ca^{2+}／Calmodulin 依存性の微小管重合阻害 …… 523
鈴木龍雄・田中　亮・藤井敏弘*
（名古屋市大・医・第一生化，信州大・機能高分子*）

169. 脳のカルモデュリン依存性プロテインキナーゼⅡと筋肉のカルモデュリン依存性グリコーゲン合成酵素キナーゼの比較（第2報） …… 526
山内　卓・藤沢　仁　（旭川医大・第一生化）

170. 脳 Ca^{2+}，カルモデュリン依存性プロテインキナーゼに対するモノクローン抗体の作製とその性質 …… 529
福永浩司・佐藤　宏・宮本英七
（熊本大・医・第一薬理）

171. Cytosine arabinoside 処置ラットにおける運動失調に及ぼす TRH およびその類縁体 DN-1417 の影響 …… 532
栗原悦雄・福田尚久・成実重彦・佐治美昭・名川雄児　（武田薬品・中央研・生物研）

172. *dw* マウスと *lit* マウスの行動異常と視交叉上核との関係 …… 535
野口鉄也・杉崎哲朗・工藤玄恵*・佐藤　勇**
（東邦大・医・第二生理，病理*，総研**）

173. *El* マウス脳の sequence complexity …… 538
平山栄一・山上　栄・大西　博・森　浩一・撫井弘二・川北幸男　（大阪市大・医・神経精神）

174. 抗精神病薬 Zotepine のセロトニン (5HT-1, 5HT-1A, 5HT-1B, 5HT-2) 受容体に対する作用について …… 541
原田俊樹・藤原　豊・福田賢司・梶田三郎・佐藤光源・大月三郎　（岡山大・医・神経精神）

175. 老年痴呆における choline acetyltransferase 最大活性とコリン親和性異常 …… 544
越村邦夫・加藤智信・遠山育夫・中村重信・亀山正邦　（京都大・医・神経内科）

176. 髄液 Cholinesterase 活性の微量定量法と *none* neurological disease に於ける活性について … 547
岩田　悟・小鹿幸生・山本正彦
（名古屋市大・医・第二内科）

177. ミエリン形成不全マウス (Jimpy) 脳ミクロソームの脂肪酸伸長及び縮合 …… 550
竹下正純・斉藤寿仁・吉田　敏　（大分医大・生化）

178. 黄疸ラット小脳におけるニューロンとグリア細胞マーカー蛋白および
環状ヌクレオチドの挙動 …… 553
青野幸子・加藤兼房*・加藤泰治**・佐藤　浩・
田中　亮**・柏俣重夫
（愛知県コロニー研・周生期，生化*，名古屋市大・医・生化**）

179. 家族性アミロイドポリニューロパチーの発症機構の生化学的解明と早期診断法の確立 …… 556
松尾壽之・寒川賢治・中里雅光*・栗原照幸*・
松倉　茂*・俵　哲**
（宮崎医大・第二生化，第三内科*，山鹿市民病院・内科**）

180. β-フェニルエチルアミンによる常同行動変化とラット中枢各部位のモノアミンおよび
代謝産物の変化 …… 559
石橋賢治・松本　孝・平野　誠・平野　均・
中村　薫・中原辰雄*・内村英幸
（国立肥前療養所，九州大・理・化学*）

181. 長期強制回転ストレスによる中枢神経諸核のチロジン水酸化酵素活性の変化 …… 562
小森照久・井上　桂・北山　功・野村純一
（三重大・医・精神神経）

182. チロシン水酸化酵素の活性調節機構（Ⅱ） …… 565
奥野幸子・山内　卓・藤沢　仁
（旭川医大・第一生化）

183. 生体 31-P NMR 法による脳内 ATP，Pcr の計測：マイクロウェーブ照射法との比較…… 568
湯浅龍彦・桑原武夫・関　耕治・宮武　正
（新潟大・脳研・神経内科）

184. 中性スフィンゴミエリネースと酸性スフィンゴミエリネースは同一蛋白か？
－アミノ酸組成と免疫学的検討－ …… 571
野口悦子（国立武蔵療・神経センター・疾病2部）

185. 髄液中の中性プロテアーゼによるミエリン塩基性蛋白の分解と
FOY305による抑制について …… 574
犬塚貴・馬場広子・佐藤修三・宮武正
（新潟大・脳研・神経内科）

186. DAおよびGABA関連薬物によるラット視床下部－下垂体系
Prolyl endopeptidase活性の変化 …… 577
富山貴美・岡田正路・越谷和雄*・加藤武
（東京工大・生命化学，金沢大・医・第二生理*）

187. 牛大脳皮質のゴルジ体：分離と特性化 …… 580
宇佐美美穂子・門田朋子*・門田健
（東京都精神研・神経化学，千葉大・医・解剖*）

188. 神経切断縫合および交叉縫合に伴う長指伸筋，ヒラメ筋のβ-エノラーゼ含量の変動 …… 583
松下秀典・加藤兼房*・佐藤豊彦
（愛知学院大・歯・生理，愛知県コロニー研・生化*）

189. ラット脳型クレアチンキナーゼ(CK-BB)の高感度イムノアッセイ系：
単離プルキンエ神経細胞体での測定 …… 586
加藤兼房・鈴木富士子・清水温子・篠原春夫*・
仙波禮治**
（愛知県コロニー研・生化，島根医大・解剖*，愛知県コロニー研・周生期**）

190. 成熟ラットニューロン核におけるDNAトポイソメラーゼⅠ及びⅡの存在 …… 589
筒井公子・桜井弘子・庄盛敏廉・筒井研*・
小田琢三*（岡山大・医・脳研・病態生化，癌研・生化*）

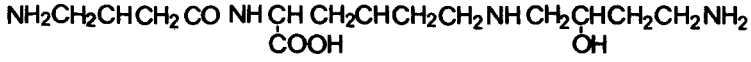
191. 脳のミオシン重鎖上のカゼインキナーゼⅡに対する燐酸化部位の存在領域の同定 …… 592
松村末夫・村上規子・安田誠治・田代裕子・
公文明（佐賀医大・生化）

1. ウシ脳からのγ-アミノブチリル-α-ハイプシンの単離同定

佐野　輝・胡谷和彦・柿本泰男　　（愛媛大・医・神経精神）

〔要　約〕

脳に特異的とされるγ－アミノ酪酸には、そのペプチドとしてγ－アミノブチリルペプチドの存在が知られている。すなわちγ－アミノブチリルヒスチジン（ホモカルノシン）、γ－アミノブチリル－1－メチルヒスチジン（ホモアンセリン）、γ－アミノブチリルリジンおよび、γ－アミノブチリルシスタチオニンが現在までにほ乳類の脳から分離同定されている。今回われわれは、ウシ脳からγ－アミノ酪酸と特殊な塩基性アミノ酸であるハイプシンとのジペプチドを精製単離した。これを合成したγ－アミノブチリル－α－ハイプシンと比較し、本物質をγ－アミノブチリル－α－ハイプシンと同定した。すなわち、ウシ全脳1,2Kgを出発材料とし、5段階のイオン交換クロマトグラフィーを用いて最終的に約0,9μmoleのγ－アミノブチリル－α－ハイプシンを得た。



γ-Aminobutyryl-α-hypusine

Key word：γ-Aminobutyric Acid, Hypusine, γ-Aminobutyryl-α-hypusine

γ－アミノ酪酸は中枢神経系に高濃度存在し、抑制性ニューロンの伝達物質として、またアミノ酸、ポリアミンおよび糖の代謝に関連するＧＡＢＡshunt の中間体として注目されている。このアミノ酸はさらにヒスチジン、1－メチルヒスチジン、リジンおよびシスタチオニンとジペプチドを形成して脳内に存在している。それらはそれぞれホモカルノシン[1]、ホモアンセリン[2]、γ－アミノブチリルリジン[3]およびγ－アミノブチリルシスタチオニン[4]とよばれる。これらはいずれも脳に特異的に存在し、この事実はγ－アミノ酪酸の脳における特異的存在に基づくと考えられている。一方ハイプシンは中島、柿本らによってウシ脳から単離され芝らにより構造決定された特殊な塩基アミノ酸である[5]。その構造はhydroxyputrescine と lysineとが縮合したもので、その頭文字をとってhypusineと命名された。その後、遊離型に加え種々の組織の蛋白質中にもハイプシンがアミノ酸残基として存在することが明らかにされ[6]、著者らはこれらのハイプシン残基は分子量１８０００の単一な蛋白質に含有されることを明らかにした。[7][8] この蛋白質中のハイプシン形成については、リジン残基にポリアミンの一種であるスペルミジンのブチラミン部分が付加され、さらに水酸化を受けて生ずるが[9]、遊離型ハイプシンとの代謝関連については現在不明である。γ－アミノブチリル－α－ハイプシンの存在は、中島らによりハイプシンの分離同定の際に予測されていたが、今回われわれはウシ脳より同ペプチドを単離同定することに成功したので報告する。

実験方法

1）実験材料：合成ハイプシンおよびデオキシハイプシンは大阪大学理学部芝教授より供与された。

2）γ－アミノブチリル－α－ハイプシンの合成：N^7,N^{11} －ジカルボベンゾキシハイプシンはハイプシンの銅錯体をカルボベンゾキシ化した後、硫化水素で脱銅して合成した。カルボベンゾキシ－γ－アミノ酪酸とN－ヒドロキシスクシンイミドをジシクロヘキシルカルボジイミド存在下に縮合させ活性エステルを得た。この活性エステルを N^7,N^{11} －ジカルボベンゾキシハイプシンに作用させ、接触還元しカルボベンゾキシ基を除去した後、生成物を Dowex 50W x 8 （NH_4^+ 型）で精製した。

3）高速液体クロマトグラフィー：既報の方法に従い[7]、強酸性陽イオン交換樹脂を用いて分離したアミノ酸およびペプチドをオルトフタルアルデヒドで蛍光誘導体化して検出を行なった。ただし、塩酸水解物の分析では、開始から25分間0,05Nナトリウムークエン酸緩衝液（pH 4,25）で溶出した後、既報[7]の緩衝液で溶出を行なった。

実験結果

1）ウシ脳からのγ－アミノブチリル－α－ハイプシンの精製：1,20Kgのウシ脳を細切し等量の沸騰水中で10分間加熱後267mlの100%トリクロル酢酸を加えてホモジナイズした。ホモジネートを遠心し生じた沈さをさらに2倍量の10%トリクロル酢酸で3回洗浄し各々の遠心上清を先の遠心上清と合わせ5,5×30 cm Amberlite IR120H型に通した。続いてカラムを各3,2lの水、1Mピリジンで洗浄後、塩基性物質を3,2lの4Nアンモニア、50%エタノール溶液で溶出した。これを減圧乾固後水に溶かし、さらに5,5×15 cm Amberlite CG50アンモニウム型に通し、2lの水で洗浄後、1,5lの4Nアンモニア、50%エタノール溶液で溶出し、塩基性脂肪族アミノ酸分画を得た。次にこの分画を2×44 cm Amberlite IR 120アンモニウム型カラム上で0,7Nアンモニア水で溶出展開した。溶出液を約7mlずつ集めその一部を高圧ろ紙電気泳動および高速液体クロマトグラフィーで分析し分画した。ハイプシンは238－343mlの分画に溶出され、623－784mlの分画に塩酸水解でハイプシンを生ずる物質を検出した。後者の分画を減圧乾固し水に溶解し1×28 cm Amberlite CG50アンモニウム型に通し、このカラム上で0,4Nアンモニア水で溶出展開した。同様の方法で49－77mlの分画に塩酸水解でハイプシンを生ずる物質を検出した。この分画をさらに1×26 cm Dowex 50W x 8 アンモニウム型カラム上で1Nアンモニア水で溶出展開した。目的とする物質は60－84mlの分画に溶出され、高圧ろ紙電気泳動および薄層クロマトグラフィー上で他のニンヒドリン陽性の物質の混在は認められず、高速液体クロマトグラフィーではオルトフタルアルデヒドでの発色からは、95%以上の purity（図2B）と算定した。

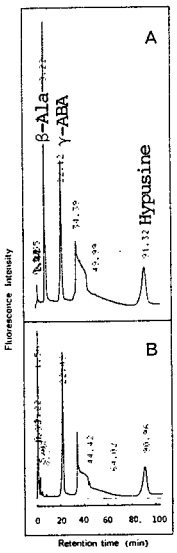


Fig.1. Patterns of HPLC of authentic β-Alanine, γ-Aminobutyric acid, and Hypusine (A) and hydrolysate of the purified compound (B).

2）γ－アミノブチリル－α－ハイプシンの同定：精製化合物を6N塩酸、110°C、4時間で水解し、高圧ろ紙電気泳動および3種の溶媒系での薄層クロマトグラフィーで分析を行なうと、2つのスポットが生じそれらは γ－アミノ酪酸およびハイプシンの泳動距離とRf値に一致した（表1）。さらにこの水解物を高速液体クロマトグラフィーにて分析を行なうと、等モルのγ－アミノ酪酸とハイプシンを検出した（図1）。次に精製化合物のダンシル化を行ない塩酸水解後高

Table 1. Identification of γ-Aminobutyryl-α-hypusine by thin-layer chromatography and high-voltage paper electrophoresis

	R_F in solvent*			High-voltage electrophoresis migration distance† (cm)
	1	2	3	
γ-Aminobutyryl-α-hypusine	0.28	0.20	0.21	25.0
γ-Aminobutyric acid	0.79	0.52	0.41	21.8
β-Alanine	0.82	0.53	0.33	16.9
Hypusine	0.38	0.24	0.12	26.5
Deoxyhypusine	0.32	0.25	0.21	27.9
Lysine	0.68	0.35	0.24	21.2
Purified compound				
Before hydrolysis	0.28	0.20	0.21	25.0
After hydrolysis	0.38,0.79	0.24,0.52	0.12,0.41	21.8,26.5

*Chromatography was carried out on HPTLC silica gel 60 (Merk) in 1,citric acid·H_2O 2.46g/HCl 0.65ml/NaOH 1.40g/100ml (pH 5.28);2,chloroform/methanol/ammonia (2:2:1);3,phenol/water/ammonia (15:5:1).

†High-voltage electrophoresis was carried out in a solution of pyridine/acetic acid/water (50:5:945, by vol., pH 3.4) at a potential gradient of 100 V/cm for 20 min.

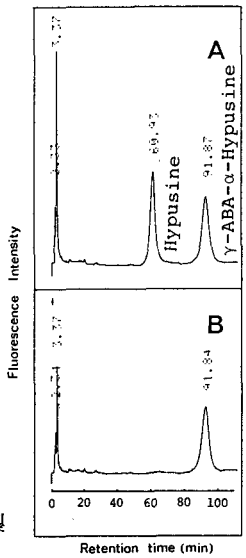


Fig.2. Patterns of HPLC of authentic Hypusine and γ-ABA-α-Hypusine (A) and the purified compound.

速液体クロマトグラフィーにて分析を行なうと、ダンシルーγーアミノ酪酸と他の未同定ダンシル化合物が一種類検出された。さらに精製化合物と合成γーアミノブチリルーαーハイプシンを高圧ろ紙電気泳動、薄層クロマトグラフィーおよび高速液体クロマトグラフィーで分析したところ、それらの泳動距離、Rf値および溶出時間は完全に一致した（表1、図2）。なお高速液体クロマトグラフィーでの分析定量から精製標品の量は約870nmoleであった。

考察

先に述べたように脳には数種のγーアミノブチリルジペプチドの存在が報告されている。それら化合物は、いずれも脳に特異的に存在し、神経機能との何らかの関連が予測されているがその実態は明らかでない。今回われわれはウシ脳よりγーアミノブチリルーαーハイプシンを単離同定し、一連のγーアミノブチリルジペプチドのリストに一化合物を付け加えた。この物質を含めγーアミノブチリルジペプチドの神経機能との関連を検索していきたい。

文献

1) Pisano,J.J.,Wilson,J.D.,Cohen,L.,Abraham,D.and Udenfriend, S.(1961)J.Biol.Chem. 236, 499-512

2)Nakajima,T.,WolfgramF.,and Clarks,W.G. (1967)J.Neurochem.14, 1107-1112

3)Nakajima,T.,Kakimoto,Y.,Kumon,M., and Sano,I. (1969)J.Neurochem.16, 417-422

4)Perry,T.L.,Hansen,S.,Schier,G.M.,and Halpern,B. (1977)J.Neurochem. 29,791-795

5)Shiba,T.,Mizote,H.,Kaneko,T.,Nakajima,T.,Kakimoto,Y.,and Sano,I. (1971)Biochim.Biophys.Acta 244,523-531

6)Imaoka,N.,and Nakajima,T. (1973)Biochim.Biophys.Acta 320, 97-103

7)Sano,A.,Miyake,M.,and Kakimoto,Y. (1984)Biochim.Biophys.Acta 800,135-139

8)Sano,A. (1985)in Polyamines: Basic and Clinical Aspects, pp. 81-88, VNU Science Press, The Netherland

9)Park,M.H., Cooper,H.L., and Folk,J.E. (1982)J.Biol.Chem.257,7217-7222

2. ラット肝における histidyl-proline diketopiperazine [cyclo(His-Pro)] 結合の性状と調節

広瀬由起子・小川紀雄・森　昭胤・嶋津　孝*・斎藤昌之*
(岡山大・医・脳研, 愛媛大・医・第一医化*)

〔要　約〕

ラット肝における histidyl-proline diketopiperazine[cyclo(His-Pro)] 受容体結合の基礎的検討と、その視床下部による調節について検討した。 cyclo(His-Pro)結合は、Scatchard 解析では、 Kd値が 70nMの single binding site であった。受容体標品を trypsin や phspholipase Aで処理すると、cyclo(His-Pro)結合は著減し、蛋白、リン脂質が必須であり、SH試薬によっても結合が減少したことからSH groupも結合部位に重要であることが示された。TRH やそのanalog、L-His 、L-Pro 、との交叉反応性は著しく低かった。雄ラットにsomatostatin(SRIF)400 μg/kg/ day 、3日間腹腔内投与は、cyclo(His-Pro)結合を減少させた。また、雌は雄の約10分の1 の結合しか持たないが、視床下部腹内側核(VMH) 破壊により肥満を起こした雌ラットでは、さらにその約2分の1に減少した。すでにVMH-破壊でSRIFの分泌亢進が起きることが知られていることから、これらの結果は肝のcyclo(His-Pro)受容体の調節には、SRIFが大きく関与していることが示唆される。

Key word : cyclo(His-Pro)-receptor, VMH-lesion, somatostatin (SRIF)

histidyl-proline diketopiperazine [cyclo(His-Pro)] は、thyrotropin releasing hormone (TRH) の代謝産物として報告された(3) が、その生体内分布はTRH とは著しく異なり、また、脳にも広く分布するにもかかわらず、TRH のような特異的結合は認められない。Batainiら(1) は副腎に特異的結合を報告したが、私共は予備試験でラット肝にcyclo-(His-Pro) の特異的結合を認めたことから、今回、肝におけるcyclo(His-Pro)結合の基礎的検討を行うと共に、視床下部ホルモンの投与、視床下部内腹側核(VMH) 破壊による肥満が肝のcyclo(His-Pro)結合にどう影響するかを見た。

〔方法〕 1．受容体標品の調製： SD系雄ラット(200-300g)の肝から以下の方法で調製した。 bufferにはすべて 100KIU/ml の aprotinin と 2μg/mlのsoybean trypsin inhibitor を入れた。 <A法> 肝を10倍容の0.32M sucrose 溶液中でホモジナイズし、900 g で10分間遠心し、上清をさらに27,000 gで40分間遠心し、その沈査を用いた。 以下特に断りのない場合は本法による標品である。 <B法> 肝を 10倍容のTris-buffer(50mM Tris-HCl buffer, pH 7.6) 中でホモジナイズし12,000 gで20分間遠心し、その沈査を用いた。 2．cyclo(His-Pro) 受容体結合の定量： 0.2mg protein/tubeの受容体標品を [^{3}H]cyclo(His-Pro) (2nM) とTris−buffer (0.1% BSA, 50 μg/ml bacitracin を含む) 1ml 中で 0° C 1時間incubateした。 B・F

Table 1 Binding of [^{3}H]cyclo(His-Pro) to subcellular fractions of rat liver

	specific binding (fmol/mg protein)
P_1	23.08
P_2	25.62
P_3	61.04
Method A	50.14
Method B	43.16

Table 2 Effects of enzymes on the specific binding of [^{3}H]cyclo(His-Pro)

Enzyme	Concentration	Specific binding (% of control)
Trypsin	10 μg/ml	11
	2 μg/ml	31
Trypsin + Soybean inhibitor	2 μg/ml 10 μg/ml	135
Soybean inhibitor	10 μg/ml	120
	5 μg/ml	127
	2 μg/ml	129
	1 μg/ml	121
	0.5μg/ml	116
Phospholipase A	100 μg/ml	11
	10 μg/ml	13
	1 μg/ml	82
Phospholipase C	100 μg/ml	58
	10 μg/ml	103
Phospholipase D	100 μg/ml	97
	10 μg/ml	81

Table 3 Effects of various treatments on the specific binding of [^{3}H]cyclo(His-Pro)

Treatment	Concentration	Specific binding (% of control)
HCl	0.1 M	17
NaOH	0.1 M	5
Urea	6 M	9
Boiling at 100°C 5 min		4
2-Mercaptoethanol	5 mM	115
	2 mM	119
Dithiothreitol	5 mM	83
	2 mM	99
N-Ethylmaleimide	5 mM	18
	2 mM	37
Dithiothreitol + N-Ethylmaleimide	2 mM 2 mM	63
p-Chloromercuri-benzoate	5 mM	14
	1 mM	19
	0.1mM	24

の分離にはWhatman GF/C glass fiber filter を用い、吸引ろ過法によった。非特異的結合は、cyclo(His-Pro) 100μM 存在下の放射活性とした。 3．種々の酵素及び試薬の影響： 受容体標品をそれぞれの酵素、試薬とともに20° C 30分間incubateし、遠心して洗浄し、Tris-buffer に再懸濁して、受容体結合を調べた。 4．視床下部ホルモンの投与とVMH-破壊による肥満の cyclo(His-Pro)結合に対する影響： ラットに図２に示す量のTRH 、LH-RH 、SRIFを１日１回３日間腹腔内投与し、最終投与の１時間後に断頭屠殺し肝臓を取り出した。VMH-破壊は、Ishikawaら(2) の電気破壊法により雌ラットに行った。

[結果と考按]

1．cyclo(His-Pro)結合の基礎的検討： cyclo(His-Pro)の特異的結合は、氷水中、約１時間で平衡に達し、以後２時間目まで安定であった。受容体標品の量に従って特異的結合は増加したが、1mg protein/tube以上の濃度では増加はゆるやかになった。以上から通常受容体標品の蛋白量 0.2mg/tube を用いた。表１では0.32M sucrose を用いた標準的な細胞分画法とＡ法、Ｂ法によって作成した受容体標品のcyclo(His-Pro)結合について比較した。この結果、P$_3$分画で最大の値が得られた。 肝をPolytron PT-10でホモジナイズすると、細胞膜の含有率はP$_3$分画で最大であり成長ホルモン受容体結合もP$_3$分画で最大となる(5) ので cyclo(His-Pro)結合部位も肝細胞膜上に存在し得るものと思われる。Ａ法による受容体標品もP 分画と同様の特異的結合を示したので、方法の簡便さから、以下の検討にはＡ法による受容体標品を用いた。[^{3}H]cyclo(His-Pro)の飽和実験の結果を図１に示した。Scatchard plotの解析では、Kdは約70nM、Bmaxは約2.5pmol/mg proteinであった。cyclo(His-Pro)結合は陽イオンを添加すると濃度の増加に従い特異的結合が減少した。これは、脳のTRH 受

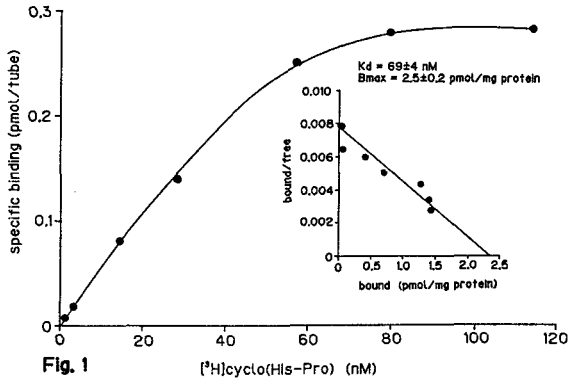


Fig. 1

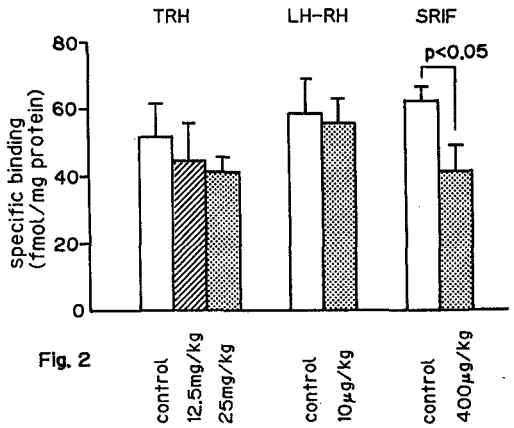


Fig. 2

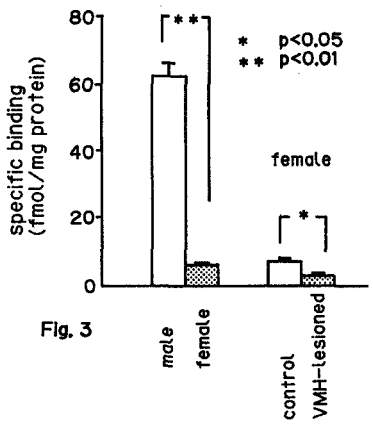


Fig. 3

容体結合が生理的血中濃度のCu^{2+} Zn^{2+}で著しく増加するのとは全く異なる。酵素処理の影響（表2)では、trypsin、phospholipase Aが著しく結合能を低下させtrypsinの作用はsoybean inhibitorで防ぐことができることからcyclo(His-Pro)結合には、他のペプチドの受容体結合と同様に polypeptide bond、phospholipidが必須であることが示唆された。 また、soybean inhibitorのみの添加で結合の増加が見られたが、これは内因性のtrypsin様蛋白分解酵素の影響をsoybean inhibitorが防いだことによると思われる。種々の化学処理の影響を表3に示した。N-ethylmaleimide、p-chrolomercuribenzoateにより著しく阻害されることや、 表2には示していないが、assay系に添加した dithiothreitolによっても著しく阻害されることからcyclo(His-Pro)結合も、他のペプチドの受容体と同様、SH groupが その機能維持に重要な役割を果たしていることが示唆された。cyclo(His-Pro)結合の特異性の検討では、cyclo(His-Pro)を100%とすると、TRHは 1.4% MK-771は9.0% DN-1417は3.5% CG-3509は2.2% L-Hisは0.2% L-Proは0.005%以下と低値であった。以上のように肝のcyclo(His-Pro)受容体結合は、ペプチドの受容体一般の性質を持つと共に、陽イオンの影響、交叉反応性など独自の性質を持ち、cyclo(His-Pro)に特異性の高いものであった。

2．視床下部ホルモンとVMH-破壊のcyclo(His-Pro)結合に対する影響： 図2に示すように、SRIF 400μg/kg投与でcyclo(His-Pro)結合は有意に減少したが、TRH、LH-RHの注射は効果を持たなかった。VMH-破壊による肥満は雌にしか起きないため、まず雌雄の比較を行ったところ、図3のように雌には雄の10分の1の特異的結合しか認められなかった。VMH-破壊群では雌のコントロール（偽手術群）よりも更に約2分の1の結合の減少が見られた。VMH-破壊ラットではすい臓においてinsulinと共に、SRIFの分泌も亢進することが報告されていることから(4)、肝のcyclo(His-Pro)結合の制御的調節にSRIFが大きく関与していることが示唆される。

[文 献]
1. Bataini, F., Koch, Y., Takahara, Y., and Peterkofsky, A. (1983) Peptides 4, 89-96
2. Ishikawa, K., and Shimazu, T. (1980) Am. J. Physiol. 238 (Endocrinol. Metab. 1), E21-E25
3. Prasad, C., Matsui, T., and Peterkofsky, A. (1977) Nature 268, 142-144
4. Sieno, S., Seino, Y., Sakurai, H., Takemura, J., Kuzuya, H., Imura, H., Ishikawa, K., Shimazu, T., Usami, M., and Ikeda, M. (1981) Life Sci. 28, 2231-2236
5. Tsushima, T. (1980) in Growth and Growth Factors (Japan Medical Research Foundation eds.) pp171-190, University of Tokyo Press, Tokyo

3. 実験的脳虚血における脳蛋白質の変化

山下　正・多田國利・祖父江憲治*・新川久義
鈴木英夫・播口之朗・西村　健
（大阪大・医・精神，高次研・神経薬理生化*）

〔要　約〕

脳虚血状態における脳蛋白質の変化を調べる目的で，砂ネズミ（Mongolian gerbil）を用いて実験的脳虚血を作製し，その脳内の蛋白質変化について検討し，以下の知見を得た。①砂ネズミの両側総頸動脈を5分，10分，15分間閉塞し，再開通直後，4日後，1週後の大脳皮質，線条体，海馬の各組織の蛋白質についてSDSポリアクリルアミドゲル電気泳動（SDS−PAGE）を行なったところ，水溶性分画中の分子量255K（band−1），230K〜240K（band−2）及び180K（band−3）の各蛋白質に明らかな変化を認めた。②SDS−PAGE及びimmunoblottingにより，band−1蛋白質はmicrotubule−associated protein 2（MAP2），band−2蛋白質はカルスペクチンと同定した。③MAP2は再開通直後でも変化しており，閉塞時間に関わりなく各部位で有意に減少した。カルスペクチンは再開通4日後の線条体で，いずれの閉塞時間においても有意に減少し，1週後では更に減少した。band−3蛋白質は1週後に各閉塞時間，各部位で有意に減少した。上記蛋白質の減少は，概ね大脳皮質に比べ，線条体，海馬でよりその程度が強調された。以上のことから，MAP2，カルスペクチンなどの蛋白質が，脳虚血状態における脳機能障害発現に関与している可能性が示唆された。

Key word：　Cerebral ischemia, MAP2, Calspectin (Fodrin)

脳血管性痴呆は老年痴呆と並んで発現頻度が高く，病因，治療両面にわたる研究が急務とされている。そこでわれわれは，アプローチの第一段階として実験的脳虚血モデルを作製し，脳内の蛋白質変化という側面から検討を行なった。

〔方　法〕

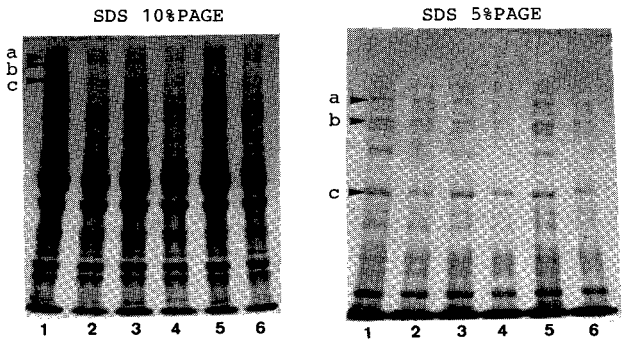
実験動物には砂ネズミ（60〜80g）を使用した。ケタミン麻酔（50mg／kg, I.P.）下に両側総頸動脈を露出し，覚醒後Scovill clipを用いて5分，10分，15分間閉塞した後，クリップを除去し，その直後，4日後，1週後に断頭して脳を摘出し，9グループ各5匹の脳標本を得た。Sham Operationを施したものをコントロールとし，同様に3グループ各5匹を経時的に断頭した。摘出脳は4°C下に前頭葉皮質，線条体，海馬に分離し，湿重量を測定した後，4倍容の0.01M phosphate buffuer（pH 7.2）でホモジナイズし，100,000×g, 30分間遠沈して，その上清の水溶性分画と沈査の不溶性分画とに分離し，それぞれをSDSポリアクリルアミドゲル電気泳動（SDS−PAGE）で分析した。コントロールとは別に無処置のもの及び生食灌流により十分に脱血したもの各1匹の脳についても，同様の処理を行ない，コントロール脳と比較した。変化の認められた蛋白質についてデンシトメーターで定量し，対照脳との変化率を算出した。蛋白質の同定はSDS−PAGE及びimmunoblottingにより行なった。ウシ脳から精製したカルスペクチン[1]，microtubule−associated protein 2（MAP2）[2]をニュージーランドラビットに免疫し，得られた各抗血清のIgG分画をaffinity purifyし，抗体として使用した。

〔結　果〕

(1)蛋白質の泳動パターン：脳水溶性分画及び不溶性分画のSDS−PAGEでは，水溶性

分画のうち分子量255K（band−1），230K～240K（band－2）及び180K（band−3）の蛋白質に著明な変化が認められた。15分虚血1週後のSDS−PAGEパターンをFig. 1に示す。band−1, band−2, band−3蛋白質はいずれの部位においてもコントロールに比べて減少している。

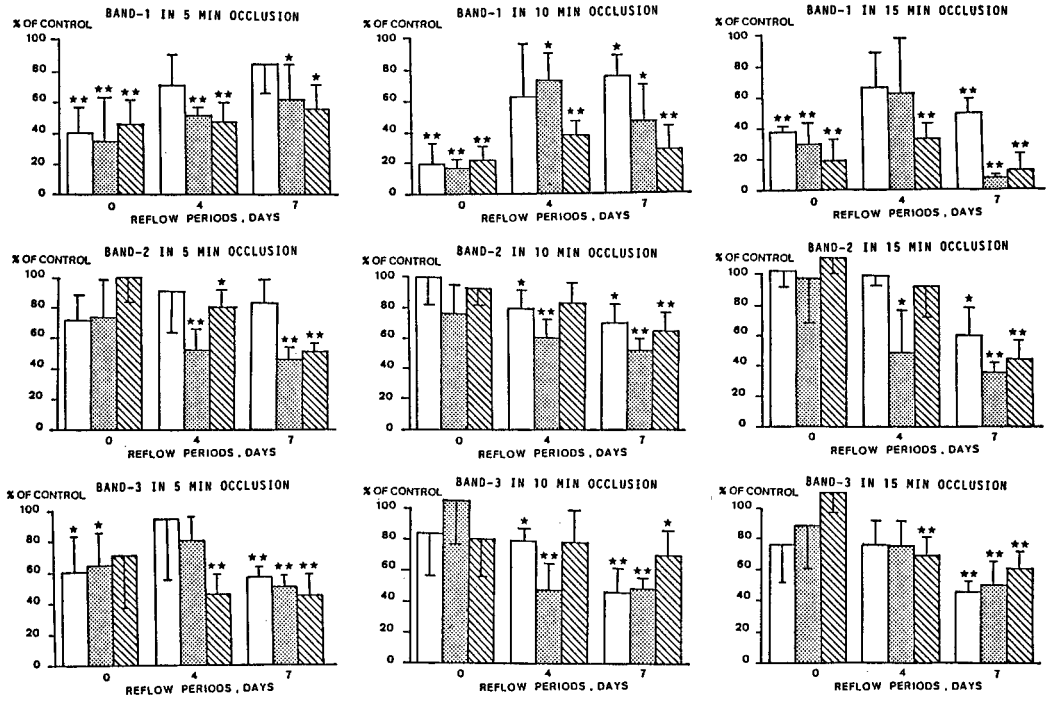
Fig.1. Brain soluble fractions of the gerbil with 15 min occlusion and 1 week reflow and control



a;band-1 b;band-2 c;band-3, 1,2;cortex 3,4;striatum 5,6;hippocampus 1,3,5;control

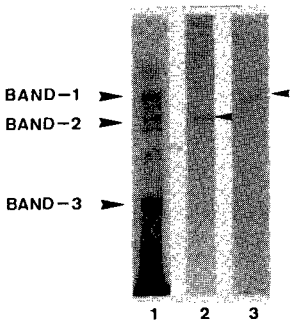
(2)各バンド蛋白質の量的変化：水溶性分画泳動ゲルをデンシトメーターでスキャンし，水溶性蛋白質総量に対するband−1, band−2, band−3蛋白質の割合を対照脳と比較したものをFig. 2に示す。band−1蛋白質は，再開通直後に各閉塞時間，各部位で有意な減少を示す。その後5分虚血群ではいずれの部位でも回復傾向をみせ，10分虚血群

Fig.2. Relative changes in regional band-1,band-2,and band-3 contents of postischemic gerbils.The relative regional content was calculated as a percentage of control after each protein was quantitated by densitometric scanning of gels.Each column represents the mean ± SEM for five gerbils.The asterisks mark values significantly different from control mean(★p<0.05,★★p<0.01). □ cortex, ▨ striatum, ▨ hippocampus



でも大脳皮質にその傾向が認められる。10分虚血群の線条体と海馬及び15分虚血群では，4日後に回復傾向をみせるが，1週後には再び有意に減少する。band－2蛋白質は，直後には有意な減少を示さないが，4日後の線条体では各閉塞時間で有意に減少し，1週後では5分虚血群の大脳皮質を除く全ての部分で有意な減少を示した。band－3蛋白質は，直後では5分虚血群の大脳皮質，線条体を除いて有意な変化を認めないが，概ね経時的に減少し，1週後では全てにおいて有意に減少した。コントロール脳と無処置脳及び脱血脳との間に，差異は認められなかった。

Fig.3. Soluble fraction of the cortex from gerbil. 1;SDS 5% PAGE. 2;immunostained with anti--calspectin antibody 3;immunostained with anti-MAP2 antibody



(3) band－1蛋白質，band－2蛋白質の同定：band－1蛋白質は，砂ネズミ脳より重合・脱重合をくり返して抽出した微小管蛋白質分画[4]のMAP2と電気泳動上同一の移動度を示し，抗MAP2抗体と反応した。band－2蛋白質は，ウシ脳カルスペクチンと電気泳動上移動度が一致し，その抗体で検出された。これより，band－1蛋白質はMAP2，band－2蛋白質はカルスペクチンと同定した。immunoblotの結果をFig.3に示す。

〔考　察〕

今回の結果から，脳虚血において三種類の高分子蛋白質即ち，MAP2，カルスペクチン及びband－3蛋白質が変化することを明らかにした。なかでも，MAP2は虚血後早期において，いずれの部位でも，いずれの虚血時間においても，他の蛋白質に先行して著明に減少した。近年，MAP2がチューブリンのみならず，他の細胞骨格蛋白質とも広く関与していることが確認されており[5]，その点からするとMAP2の先行性の変化は，神経機能との関わりにおいて重要であり，虚血による脳組織変化の発生過程あるいはその機序を探るうえでも興味ある所見と考えられる。カルスペクチンは，MAP2と同様カルモデュリン結合蛋白質の一つであり，脳内シナプス膜分画に高い比活性を認めている[1]。このものも，特にアクチン線維との関係において神経機能，形態維持に重要な役割を演じていると思われるが，水溶性分画における動態は不明であり，従って今回の結果の解釈も今後の課題と言わざるを得ない。band－3蛋白質の由来については現在のところ不明である。われわれは既に，アルツハイマー病やアルツハイマー型老年痴呆において，脳線維性蛋白質の平衡動態に異常が生じていることを明らかにしたが[3]，脳虚血においても，それらと深い関連を有する蛋白質の変化が認められたことは，脳血管性痴呆との関わりにおいて興味深い。

〈本研究は一部，昭和59年度循環器病研究委託費の援助を受けた。〉

（文　献）(1) Kakiuchi, S., Sobue, K., Morimoto, K., Kanda, K., (1982) Biochem. Int., 5, 755－762 (2) Kim, H., Binder, L.I. Rosenbaum, J.L. (1979) J. Cell Biol., 80, 266－276 (3) Nishimura, T., Hariguchi, S., Tada, K., Takeda, M. (1983) in "Neuropsychiatric Disorders in the Elderly", Igakushoin, 79 (4) Shelanski, M.L., Gaskin, F., Cantor, C.R. (1973) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 70, 765－768 (5) Sobue, K., Tanaka, T., Ashino, N., Kakiuchi, S. (1985) Biochem. Biophysi. Acta 845, 366－372.

4. 副腎髄質からの Ca^{2+} 依存性にアクチンフィラメントを切断する蛋白質の精製

芦野伸彦・門脇浩三・田中敏彦・王　鳳翔・祖父江憲治
（大阪大・医・高次研・神経薬理生化）

〔要　約〕

牛副腎髄質から，ゲルクロマトグラフィー，イオン交換樹脂クロマトグラフィー，DNase I-actin アフィニティークロマトグラフィーにより，Ca^{2+} 依存性にアクチンフィラメントを切断する蛋白質を分離精製した。精製した蛋白質はSDSポリアクリルアミドゲル電気泳動（SDS PAGE）上分子量80Kで，Sephacryl S-300 ゲルクロマトグラフィーでは70Kと計算され，native formはmonomerであると考えられる。low-shear falling ball 法によりアクチンフィラメントの粘度を測定すると，10^{-6}M 以上の Ca^{2+} 存在下でこの蛋白は濃度依存性にアクチンフィラメントの粘度を減少させる。また，この蛋白質は Ca^{2+} 存在下においてのみ，アクチンフィラメントを切断することを電子顕微鏡観察により確認した。

Key word：　Ca^{2+}-sensitive actin filament fragmenting protein,
DNase I-actin affinity chromatography

細胞運動・神経伝達・ホルモン分泌等細胞機能の発現には，細胞骨格蛋白質が重要な役割を果たしており，Ca^{2+} がその制御を行っていると考えられる。細胞骨格蛋白質の中では，アクトミオシン系，微小管系などの Ca^{2+} 制御機構解明が進展してきた。また，近年 Ca^{2+} 依存性にアクチンフィラメントを切断する蛋白質が多くの組織より抽出されて，神経系においてもアクチンフィラメントの切断（7）やcapping（3）を行なう蛋白質が精製されている。我々は牛副腎髄質より Ca^{2+} 感受性のあるアクトミオシンを抽出し，その Ca^{2+} 制御機構を明らかにしたが，今回牛副腎髄質より Ca^{2+} 濃度に依存してアクチンフィラメントを切断する蛋白質を分離精製し，その性質を検討したので報告する。

＜実験方法＞

蛋白質の精製　牛副腎を氷冷生理食塩水で灌流し血液成分を除外した後，副腎髄質を取り出した。抽出 buffer〔50mM imidazole・HCl(pH 6.9), 0.3M KCl, 0.5mM $MgCl_2$, 0.5 mM dithiothreitol, protease inhibitors〕で homogenize，超遠心で得られた上清分画を60％飽和硫安で濃縮し，Sepharose 6Bゲルクロマトグラフィーを行った。falling ball 法で粘度を測定し，Ca^{2+} 依存性にアク

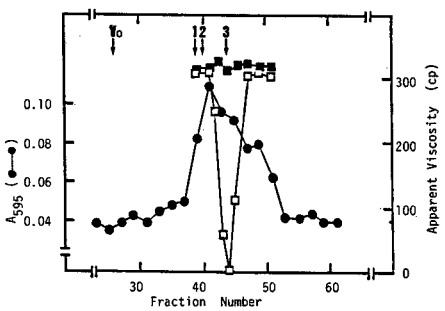


図1 Sephacryl S-300 ｹﾞﾙｸﾛﾏﾄｸﾞﾗﾌｨｰ
Vo: Void volume　1: catalase (232,000)
2: aldolase (158,000)　3: BSA (68,000)

チンフィラメントの粘度を減少させる分画（活性分画）を集め，DEAE Sepharose CL-6Bカラムにapplyし，20mMから400mM KClのlinear gradientで溶出を行なった。活性分画は100mM KCl付近で溶出された。この分画を，50% sucroseで濃縮した後Sephacryl S-300ゲルクロマトグラフィーを行なった。low-shear falling ball法で測定した活性のピークは牛血清アルブミンのピークとほぼ一致した（図1）。次にこの活性分画を，Ca^{2+}存在下でDNase I-actinアフィニティーカラムにapplyし，EGTAで溶出を行なった。EGTAで溶出される分画には，SDS PAGE上分子量80Kの蛋白質が主要バンドで他に微量のアクチンの混在を認めた。またEGTAによる溶出パターンと一致してアクチンフィラメントの粘度を減少させる活性が認められた。微量に混在するアクチンはSephacryl S-200ゲルクロマトグラフィーで容易に分離できた。

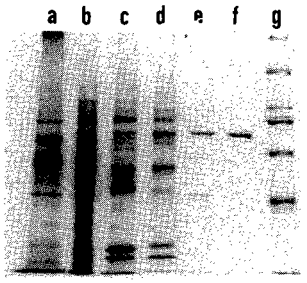


図2 80K蛋白質の精製過程(9% SDS-PAGE)
a: 抽出 b: Sepharose 6B分画
c: DEAE Sepharose CL6B 分画
d: Sephacryl S-300 分画
e: DNase I affinity column 分画
f: Sephacryl S-200 分画
g: 分子量 marker

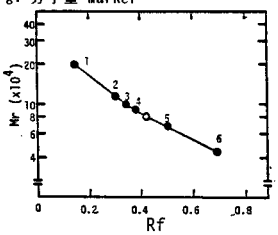


図3 SDS-PAGEでの分子量の推定
1: gizzard myosin heavy chain (200,000)
2: β-galactosidase (116,000)
3: α-actinin (100,000)
4: phosporylase b (92,500)
5: BSA (68,000) 6: ovalbumin (45,000)

falling ball法によるアクチンフィラメントの粘度の測定，アクチンフィラメントの粘度は，MacLean-Fletcher & Pollardによるlow-shear falling ball法で測定した(5)。F－アクチンと副腎髄質抽出液を，0.2mM $CaCl_2$（Ca^{2+}存在下，□-□）あるいは1mM EGTA（Ca^{2+}非存在下，■-■）を含む緩衝液〔20mM imidazole・HCl（pH 7.2），100mM KCl，0.1mM dithiothreitol〕に混合しcapillary tubeに吸引した。25℃，20分間incubationした後，stainless ballの落下速度を測定し，glycerol／水混合液を基準にして粘度に換算した。

その他　DNase I-actinアフニティーカラムの作成はLazaridesらの方法に従った(4)。DNase I-actinアフィニティークロマトグラフィーはBretscherらの方法(1)に準じて行ない，0.2mM $CaCl_2$存在下でapplyし，1mM EGTAで溶出を行なった。アクチ

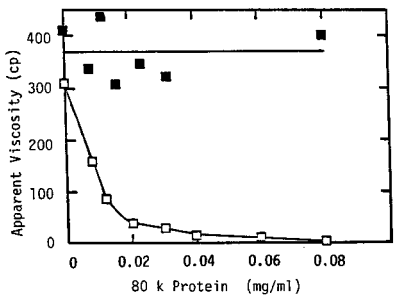


図4 80K蛋白質のアクチンフィラメント粘度への影響
actin: 0.63 mg/ml

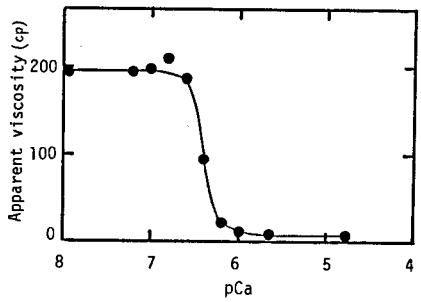


図5 80K蛋白質のアクチンフィラメント切断効果に対するCa^{2+}濃度の影響
actin: 0.53 mg/ml，80k 蛋白質: 0.017 mg/ml

ンはSpudich & Wattの方法で精製した。電子顕微鏡観察は，試料をuranylacetate によるネガティブ染色で行なった。SDS PAGEはLaemmliの方法に従がい9％アクリルアミドゲルで行なった。蛋白質濃度はLowry法で測定した。

＜結果と考察＞

図2は各精製過程におけるSDS PAGE像である。精製した蛋白質はSDS PAGE上分子量80Kである（図3）。Sephacryl S-300では70Kと計算されることから，native formはmonomerであると考えられる。low-shear falling ball法による粘度の測定では，この蛋白質はCa^{2+}存在下でのみ濃度依存性にアクチンフィラメントの粘度を低下させた（図4）。また80K蛋白質は，10^{-6}M以上のCa^{2+}濃度で，アクチンフィラメントの粘度を低下させた（図5）。電子顕微鏡観察ではCa^{2+}存在下においてのみアクチンフィラメントの切断を示した。

1979年，Yin & Stosselがウサギ肺マクロファージよりゲルゾリンを精製（8）して以来，多くの組織でCa^{2+}依存性にアクチンフィラメントを切断する蛋白質が精製されている。神経系においてもPetrucciらにより，Ca^{2+}依存性にアクチンフィラメントを切断する分子量90Kの蛋白質が分離された（7）。副腎髄質では，chromaffin granule膜がCa^{2+}非存在下でアクチンフィラメントの粘度上昇をおこし，Ca^{2+}存在下でその上昇が抑制されると報告されている（2）。しかしその性質は明らかではない。今回我々が精製した蛋白質は分子量80Kで，DNase I-actin アフィニティーカラムから溶出された分画に混在するアクチンをゲルクロマトグラフィーで容易に分離できることなどから，神経系の90K蛋白質とは多少異なるものであろうと考えられる。

Ca^{2+}依存性にアクチンフィラメントを切断する蛋白質の中にも，Ca^{2+}非存在下ではアクチンフィラメントをゲル化するもの〔小腸絨毛刷子縁より精製されたvillin（1）〕や，Ca^{2+}存在下でG－アクチンと結合し容易に解離しないもの〔神経系の90K 蛋白質，platelet gelsolin（6）〕などがある。我々の精製した80K蛋白質を含めて，アクチンフィラメントを切断する蛋白質の細胞内での生理的な意義や局在などは明らかではないが，分泌細胞において，分泌顆粒が細胞膜へ移動する際のCa^{2+}制御因子として働いている可能性が考えられる。今後この点について検討してゆきたい。

[References]
1) Bretscher, A. & Weber, K. (1980) Cell 20, 839-847.
2) Fowler, V. M. & Pollard, H. B. (1982) Nature 295, 336-339.
3) Isenberg, G. Ohnheiser, R. & Maruta, H. (1983) FEBS Lett. 163, 225-229.
4) Lazarides, E. & Lindberg, U. (1974) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 71, 4742-4746.
5) MacLean-Fletcher, S. D. & Pollard, T. D. (1980) J. Cell Biol. 85, 414-428.
6) Markey, F., Persson, T. & Lindberg, U. (1982) Biochim. Biophys. Acta 709, 122-123.
7) Petrucci, T. C., Thomas, C. & Bray, D. (1983) J. Neurochem. 40, 1507-1516.
8) Yin, H. L. & Stossel, T. P. (1979) Nature 281, 583-386.

5. ウシ脳14-3-3タンパク質の精製と性質：不均一性と分布

門屋利彦・田村明敬・市村　徹・真鍋　敬
礒辺俊明・奥山典生・中島　孝*
（東京都立大・理・化学，国立がんセンター・病理*）

〔要　約〕

1．ウシ脳より14-3-3タンパク質の大量調製を試み、少なくとも6種類以上の分子種を含む5つの14-3-3タンパク質画分(1.9 gタンパク質／40 kg 脳) を得た。これらの画分のアミノ酸組成は、互いによく似ており、また画分III に対して調製したマウス抗血清はI－Vすべてのタンパク質画分と反応した。

2．2次元電気泳動によれば、14-3-3タンパク質は分子量約55Kで、等電点が4.7-5.3 に分布する一連のスポットとして検出された。これらはSDS存在下では分子量27K及び30Kの位置に泳動された。

3．画分Iより2種類の主要14-3-3タンパク質(aとb)を単離精製した。a、bはいずれもサブユニット分子量27Kの二量体でよく似たアミノ酸組成を示した。ペプチドマップ法から1次構造の一部のみが異なる分子種であることが示唆された。

4．マウス抗血清を用いた2次元電気泳動－immunoblotting法によって、14-3-3タンパク質は脊椎動物脳、ウシ臓器に広く分布する種特異性や臓器特異性の比較的小さなタンパク質であることがわかった。ヒト神経組織を用いた組織化学的な検出法では14-3-3タンパク質は神経細胞に局在していた。

Key word：　brain 14-3-3 protein,　purification and characterization,
tissue localization.

14-3-3タンパク質[9]は、S100 タンパク質や神経特異エノラーゼ(NSE) などと同様に脳神経組織の可溶性タンパク質画分中に多量に存在する酸性タンパク質である。しかし、その構造や、生体内分布、神経系での機能などの詳細については不明である。そこで、ウシ脳を用いて14-3-3タンパク質の分離精製を行い、そのタンパク質化学的性質を明らかにすると共にマウス抗血清を調製して14-3-3タンパク質の種特異性、臓器特異性及び組織内での分布について検討した。

〔材料及び方法〕

(1) 脳可溶性タンパク質の抽出と分画；脳可溶性タンパク質の抽出と分画については既報の方法[3,4]、に従って行った。ウシ脳(40Kg)から、0.1Mリン酸カリウム緩衝液(pH 7.1, 1 mM EDTAを含む) を用いて抽出した可溶性タンパク質画分を硫安分画(30-85 %飽和) 後、DEAE－セファデックスA-50カラム(8.5 cm I.D. x 23 cm) に添加し、NaCl濃度を段階的に上昇(0.1 M, 0.15 M, 0.22 M, 0.3 M, 0.45 M)させてタンパク質を溶離した。

(2) 高速液体クロマトグラフィー(HPLC)；イオン交換HPLCは、TSK-ゲルDEAE-5PWカラム(0.78 cm I.D. x 7.5 cm) を用いた。タンパク質の溶離は、0.05 Mトリス－塩酸緩衝液(pH 7.5)中のNaClの直線濃度勾配法及びイソクラティック法を用いた[5]（流速1.0 ml/min ）。逆相系HPLCは、TSK-ゲルPhenyl-5PW RP(0.48 cm I.D. x 7.5 cm)及びオクタデシルガラス(ODG) カラム[2] (0.4 cm I.D. x 15 cm, 富士フィルム社製) を用い、0.1 % TFA 中のアセトニトリル濃度を20 %から75 %まで上昇させる方法で溶離した（流速1.0 ml/min）。

(3) 抗血清の調製；14-3-3タンパク質を0.15 M NaCl を含む0.01 Mリン酸ナトリウム緩衝液(pH 7.2)に溶解(1 mg/ml) し、等量のFreund's complete adjuvandと混合し、BALB/cマウス(5 週齢) の腹腔内に各50 ug/100 ugを注入した。さらに、2週間後から10日毎に皮下、あるいは筋肉に同量注入し、抗体価の上昇をELISA 法によって追跡した。

(4) 2次元電気泳動法とimmunoblotting法；ミクロ2次元電気泳動とタンパク質スポットのニトロセルロース膜への転写、酵素抗体法による検出(immunoblotting)は、いずれも真鍋らの方法[6,7] で行った。

〔結果及び考察〕

(1)14-3-3 タンパク質の大量調製；ウシ脳の可溶性タンパク質画分のDEAE－セファデックスA-50カラムクロマトグラフィーにおいて、14-3-3タンパク質は、S100 タンパク質やNSE と共に0.22 M NaCl 溶離画分中に検出された。セファデックスG-75カラムクロマトグラフィーによってS100 タンパク質及び高分子量タンパク質を除去した後、更にDEAE－セファデックスA-50カラムクロマトグラフィーを行った(Fig.1) 。これにより、6つのタンパク質画分(NSE画分及び画分I-V)を得た。画分I-V のタンパク質収量は1.9 g/40 kg 脳であった。画分I-V のアミノ酸組成は互いによく似ており、報告されているヒト脳14-3-3タンパク質[1] ともよく似ていた（相関係数0.95以上）。

また、画分III を抗原として得られた抗血清との反応性をスポットテスト[8] によって調べたところ、画分I-V について強い反応性を示した。

(2) 2次元電気泳動とimmunoblotting；ミクロ2次元電気泳動によりウシ脳可溶性タンパク質の2次元マップを作成し、immunoblottingにより14-3-3タンパク質スポットを同定した(Fig.2) 。14-3-3タンパク質は、分子量約55K，等電点4.7-5.3 の領域に連続的なスポットとして検出された。これらのスポットは、SDS存在下では分子量27K及び30Kの位置に泳動された。よって、14-3-3タンパク質は二量体構造を有する複数の分子種から構成される不均一なタンパク質であると考えられた。

(3) 14-3-3タンパク質成分の単離；画分Iに存在する2種類の成分(aとb)をイオン交換HPLCによって分離した(Fig.3) 。単離成分は逆相系HPLCで、各々、単一ピークを与えた。aとbのアミノ酸組成(Table 1) は非常によく似ており（相関係数0.99）、トリプシン分解によるペプチドマップ(Fig.4) では、一部のペプチドを除いて共通の1次構造を持っていると考えられた。

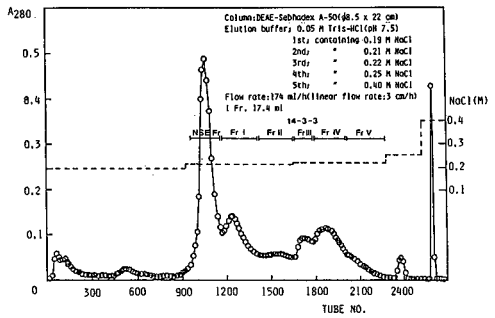


Fig.1 Purification of 14-3-3 protein on DEAE-Sephadex A-50

Table 1. Amino acid compositions of 14-3-3 protein

	a	b	human brain
Lys	9.2	9.1	9.3
His	1.0	0.6	0.8
Arg	5.1	5.4	4.8
Asp	11.9	11.0	11.9
Thr	4.5	4.0	4.4
Ser	6.4	6.1	6.4
Glu	19.0	19.0	18.3
Pro	2.5	1.5	1.9
Gly	4.5	4.5	4.2
Ala	8.4	10.2	9.8
Cys	n.d.	n.d.	n.d.
Val	4.5	5.1	3.8
Met	2.6	2.3	2.9
Ile	4.0	4.3	4.1
Leu	9.7	10.1	10.3
Tyr	4.4	4.1	4.6
Phe	2.6	2.7	2.4
Trp	n.d.	n.d.	n.d.

n.d.= not determined.

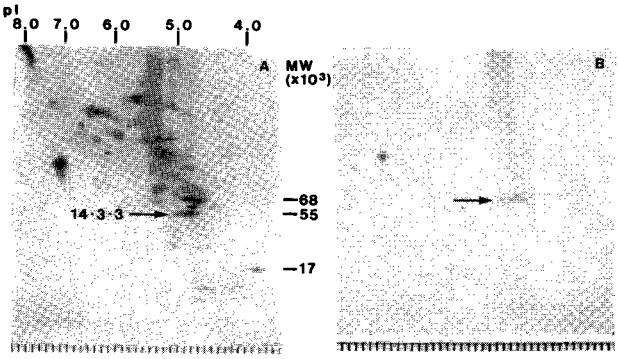


Fig.2 Identification of 14-3-3 protein on two-dimensional electrophoretogram of bovine brain soluble proteins. CBB staining gel(A) and its immunoblotting(B)

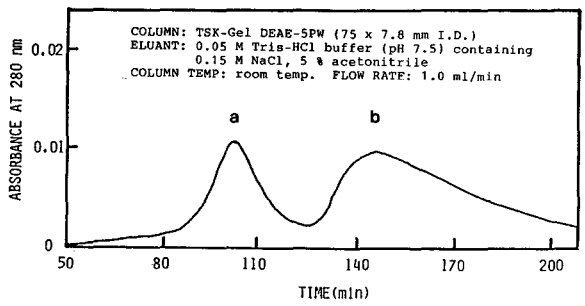
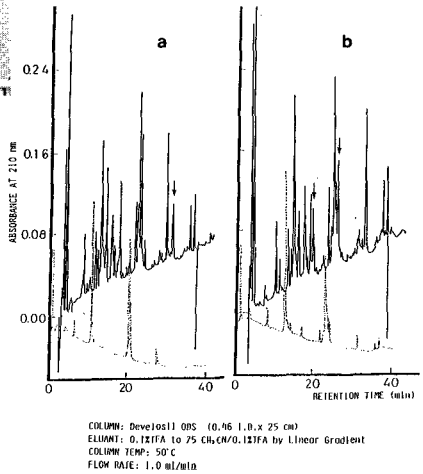


Fig.3 Separation of 14-3-3 a & b protein in Fr.I

Fig.4 Peptide mapping of 14-3-3 a & b protein with trypsin



(4) 各種組織分布；２次元電気泳動とimmunoblottingを組合せ、各種動物脳及びウシ臓器での14-3-3タンパク質の分布を調べた。検出感度約0.5 ngの染色条件下で14-3-3タンパク質は、魚類から哺乳類にいたるすべての脊椎動物脳（キンギョ、カエル、カメ、ニワトリ、ヒト）及び血清を除くすべてのウシ臓器（心、肝、腎、卵巣、大腸）に検出された。組織化学的方法では、ヒト神経節のニューロンが陽性の所見を示した。

〔結論〕

14-3-3タンパク質は分子量27Kと30Kのサブユニットからなる６種類以上の二量体分子種からなる不均一なタンパク質の総称であることが分かった。これらは、アミノ酸組成分析及び単離した２種類の14-3-3タンパク質のペプチドマップから、各々、その１次構造の大部分が共通で一部分のみが異なる分子種であることが示唆された。また、免疫化学的検討より14-3-3タンパク質種差による構造の変異が小さく、またNSEやS100 タンパク質に比べると臓器特異性が小さいタンパク質であると考えられた。

REFERENCES

1. Boston,P.F., Jackson,P., Kynoch,P.A.M. and Thompson,R.J. (1982) J. Neurochem., 1466-1474.
2. Ichimura,T., Isobe,T. and Okuyama,T. (1985) Bunseki Kagaku, in press
3. Ishioka,N., Isobe,T., Kadoya,T., Okuyama,T. and Nakajima,T. (1984) J. Biochem., 95, 611-617.
4. Isobe,T., Nakajima,T. and Okuyama,T. (1977) Biochem. Biophys. Acta, 494, 222-232.
5. Kadoya,T., Isobe,T., Amano,Y., Kato,Y., Nakamura,K. and Okuyama,T. (1985) J. Liq. Chromatogr., 8, 635-650.
6. Manabe,T., Hayama,E. and Okuyama,T. (1985) Clin. Chem. 28, 824-827
7. Manabe,T., Takahashi,Y. and Okuyama,T. (1984) Anal. Biochem., 143, 39-45.
8. Manabe,T. and Okuyama,T. (1984) Electrophoresis '84, 387-399.
9. Moore,B.W. and Perez,V.J. (1968)in Physiological and Biochemical Aspects of Nervous Integration (Carlson,F.D. ed.) pp 343-359, Prentice-Hall, Englewood Cliffs, New Jersey.

6. 骨格筋，心筋に分布する S100a_0 蛋白：各種動物筋組織における含量とヒト胸筋からの精製

加藤兼房・木村茂樹*・灰本　元**・鈴木富士子・清水温子
（愛知県コロニー研・生化，天野製薬・研究開発*，名古屋大・医・病理**）

〔要　約〕

1) ヒトおよびラットの各組織の S100 含量をサブユニット（αとβ）に特異的な EIA 法で測定すると，α-S100 と β-S100 の組織分布は全く異り，β-S100 は従来の報告のように中枢神経系（CNS），脂肪組織，軟骨組織で高値を示すのに対し，α-S100 はおもに骨格筋と心筋に CNS 以上の高濃度で存在することがわかった。

2) ヒト胸筋 200 g より約 3 mg の S100a_0（$\alpha\alpha$）精製した。最終標品は電気泳動で単一バンドを示し，HPLC（TSK-SW3000 カラム），FPLC（Mono Q カラム）でもウシ S100a_0 とほぼ同じ位置に単一ピークとして溶出した。アミノ酸組成もウシ S100a_0 の組成と類似していた。またウシ S100 の分別測定系に加わえると S100a，S100b の測定系には全く反応せず，S100a_0 の測定系とのみ反応性を示した。

3) ウシ，ブタ，イヌ，マウスの心筋，骨格筋でも多量の α-S100 が検出されたが，β-S100 は低値を示すことから，心筋と骨格筋には動物種を問わず普遍的に S100a_0 が分布すると推定された。

4) 免疫組織化学的には，α-S100 は横紋筋，心筋の筋細胞質に局在した。心筋では，とくに刺激伝達系が強く染色された。

Key word： S100a_0, Muscle, Purification

〔序論〕　S100 蛋白は，非神経組織・細胞にも存在することが相次いで報告[1]されたにもかかわらず，量的には大部分が CNS に分布する特異蛋白だと考えられている。S100 の組織・細胞分布に関する報告のほとんどは S100β サブユニットの分布である。これはウシ脳より純化した S100 混合物（大部分が $\beta\beta$ 型の S100b）を抗原としてウサギで作製した抗体を用いて得られた成果だからである。我々はウシ S100 の α と β に特異的なそれぞれの抗体を使って三型の S100（S100a_0，$\alpha\alpha$；S100a，$\alpha\beta$；S100b，$\beta\beta$）の分別測定系を確立し，ウシ CNS では S100a_0 が全 S100 の数%程しか存在しないことを報告した[2]。一方免疫組織化学的に S-100a_0 が神経細胞[3]あるいは腎尿細管上皮細胞[4]に存在することが報告されている。ウシ S100 の各サブユニットに対する抗体は，他種動物 S100 の対応するサブユニットと反応すること[2]を利用して，上記の測定系を用いてヒトとラットにおける組織分布を調べたところ，心臓と横紋筋組織に高濃度で S100a_0 が存在することを見出した。ヒト胸筋より S100a_0 を精製してこの事実を確かめると同時に，ウシ・ブタ・イヌ・マウスの心筋と骨格筋にも多量の S100a_0 が分布することを発見したので報告する。

〔実験方法〕　S100 の EIA 系[2]：抗ウシ S100α サブユニット抗体と抗ウシ S100β サブユニット抗体を使った抗体結合ポリスチレン球と β-ガラクトシダーゼ標識抗体よりなるサンドイッチ型 EIA 法で，α-S100 の測定は抗 α 抗体，β-S100 の測定は抗 β 抗体よりなる系である。理論的にはそれぞれのサブユニットの測定系であるが、今回用いた α-S100 の測定系はウシ S100a，S100b とは全く交叉反応せず，S100a_0 の特異的測定系であった。しかし他種動物の S100a（$\alpha\beta$）との交叉性については不明である。

β-S100の測定系はS100a_0とは反応しないが，S100aとは約15%交叉反応した。α-S100とβ-S100の測定値は，それぞれ標準として使ったウシS100a_0等価，S100b等価で表わした。　組織抽出液の調製：　各組織は10倍量（v/w）の50mMリン酸ナトリウム，pH7.0液中でホモジナイズし，20000g，20分間遠心上清を得てS100測定に供した。ヒト胸筋のS100a_0の精製：　約200gの筋肉を5倍量の20mMリン酸ナトリウム，pH6.0でホモジナイズし，これを沪過して抽出液を得た。抽出液中のS100a_0はbutyl Sepharose（20mMリン酸ナトリウム，pH6.0，0↗0.4M NaCl），DEAE-Sepharose（20mM Tris-HCl，pH8.0，0.1↗0.35M NaCl），Sephadex G-75（20mM Tris-HCl，pH8.0）のカラムクロマトにて精製し，最後にFPLC（Mono Qカラム，5.0mM Tris-HCl，pH8.0，0.25↗0.4M NaCl）にて分離した主ピークを集めた。各画分のS100a_0はα-S100の測定系にて検出した。

〔実験結果〕　図1にヒト組織におけるα-S100とβ-S100の濃度分布を示した。心臓と横紋筋組織ではα-S100が≳1μg/mgタンパクの高濃度で存在した。β-S100濃度は低値であることからこれらの組織に分布するのはS100a_0（αα）であると推定された。ラットの各組織のα-S100の分布もヒト組織とほぼ同じで，心臓，骨格筋，腎，甲状腺でCNSより高値を示した。心臓，腎，脳の抽出液中のα-S100はイオン交換クロマト，ゲル沪過クロマトで同一位置に溶出されることから，EIA法にて測定された値はS100であると思われたが，この事実を確認するためEIA法で検出測定されるα-S100をヒト胸筋から精製した。結果は表1に示すように筋200gから約3mgの精製物質を得た。最終標品はポリアクリルアミド電気泳動で単一バンドを示し，HPLC（TSK-SW3000

Fig. 1. Concentrations of α-S100 and β-S100 in human tissues.

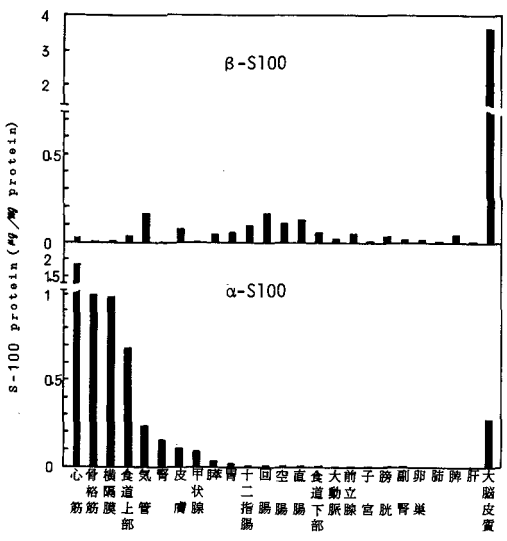


Table 1. Purification of S-100ao protein from human pectoral muscles

Fractions	Total volume (ml)	Protein concentration (A_{280})	S-100a_0 protein (μg*/ml)	(μg*/A_{280})	total (mg)
Crude extract**	1000	12.5	12.1	0.968	12.1
Butyl-Sepharose	95	0.718	92.0	128	8.74
DEAE-Sepharose	152	0.223	51.0	229	7.75
Sephadex G-75	40	0.199	145	729	5.80
FPLC	8.3	0.240	370	1540	3.07

* Bovine S-100a_0 equivalents.
**Pectoral muscles (about 200 g) obtained at autopsy were used.

REFERENCES

1. Nakajima, T., Kameya, T., Watanabe, S., Hirota, T., Shimosato, Y., and Isobe, T. In "Advances in Immunohistochemistry" ed. R.A. DeLellis, pp 141-158, 1984. Masson Publishing USA, Inc., New york.
2. Kimura, S., Kato, K., Semba, R., and Isobe, T. Neurochem. Int., 6, 513-518, 1984.
3. Isobe, T., Takahashi, K., and Okuyama, T. J. Neurochem., 43, 1494-1496, 1984.
4. Semba, R., Kato, K., and Isobe, T.
5. Suzuki, F., Nakajima, T., and Kato, K. J. Biochem., 92, 835-838, 1982.
6. Kato, K., Suzuki, F., and Nakajima, T. Int. J. Biochem., 15, 609-613, 1983.

Table 2. Amino acid composition of S100a_0 protein purified from human pectoral muscle.

Amino acid	Human S100a_0	Bovine S100a_0
	(mol%)	
Asparatic acid	14.8	13.9
Threonine	3.9	4.7
Serine	5.3	5.6
Glutamic acid	15.7	15.1
Proline	0	0
Glycine	7.6	7.2
Alanine	7.4	9.3
Valine	8.5	9.4
Methionine	3.1	2.4
Isoleucine	2.0	1.8
Leucine	12.5	12.2
Tyrosine	2.4	2.0
Phenylalanine	4.7	4.5
Lysine	9.9	10.3
Histidine	2.2	1.6
Arginine	0	0

Contents of half-cystine and tryptophane were not determined.

Table 3. Contents of α-S100 and β-S100 in skeletal muscles and heart muscles of various animal species.

Tissues	No. of samples	α-S100 (ng*/mg protein)	β-S100 (ng*/mg protein)	α/β
Human brain	5	278 ± 106**	3590 ± 2800**	0.08
heart	6	1840 ± 500	23.0 ± 20.5	80
muscle	4	1000 ± 467	8.6 ± 6.4	116
Bovine brain	5	340 ± 190	8400 ± 1500	0.04
heart	5	366 ± 166	319 ± 146	1.2
muscle	5	662 ± 484	31.8 ± 8.2	21
Porcine heart	5	2570 ± 690	23.0 ± 4.5	112
muscle	5	211 ± 109	4.5 ± 0.7	47
Dog heart	4	622 ± 80	<0.1	—
muscle	4	507 ± 86	<0.2	—
Rat cerebrum	5	60 ± 10	2640 ± 230	0.02
heart	5	99 ± 19	0.9 ± 0.1	100
muscle	5	292 ± 143	8.4 ± 4.9	35
Mouse cerebrum	5	118 ± 2	294 ± 22	0.40
cerebellum	5	75 ± 38	1390 ± 80	0.05
heart	5	1650 ± 200	1.0 ± 0.2	1650
muscle	5	79 ± 15	3.4 ± 0.6	23

*bovine S100a_0- or S100b-equivalents. **mean ± SD

カラム), FPLC(Mono Qカラム)でもウシS100a_0とほぼ同じ位置に単一ピークとして溶出した。表2に示すように，アミノ酸組成もウシS100a_0の組成と類似していた。また精製標品をウシS100の分別測定系に加えて測定してみると，α-S100(S100a_0)の測定系でのみ反応し，S100a，S100b(β-S100)の測定系には全く交叉反応を認めないことから最終精製物はヒトのS100a_0と断定した。表3はウシ，ブタ，イヌ，ラット，マウスの心筋，骨格筋(と一部脳)のα-S100とβ-S100を測定した結果で，ヒトの値も加わえて列記した。測定系の抗体と測定抗原との交叉反応率が動物種により異る可能性があるため，種間にわたっての測定値の正確な比較はできないが，いずれの動物種でも心筋と骨格筋でα-S100が高値を示すことは明らかである。すなわちS-100a_0は動物種を問わず心筋と骨格筋に高濃度で分布している。ヒト心筋と骨格筋における免疫組織化学的α-S100の局在は，筋細胞質ならびに心臓の刺激伝達系に陽性染色された。

〔考察〕 神経組織特異蛋白と考えられてきたS100(S100b)が脂肪組織や軟骨組織にも高濃度で存在することを以前に報告した[5,6]が，今回はS100a_0が筋組織に多量に分布することを見出した。全身の筋組織の容量の大きさから計算すると，S100の大半は神経組織よりも骨格筋中に分布することになる。S100a_0が筋組織に多いことは各種動物で共通して認められ，筋機能に何らかの役割を果していることが示唆される。筋の発育分化に伴うS100a_0の動態や，筋ジストロフィーなどの筋疾患筋肉中のS100a_0含量を検索して筋におけるS100a_0の生理的意義を今後明らかにしたい。

本研究の一部は文部省科研費№59570118と日母おぎゃー献金基金の援助を受けた。

7. 神経細胞のサブポピュレーションに発現する分子のモノクローナル抗体による系統的検索

藤田　忍・小幡邦彦　（群馬大・医・薬理）

〔要　約〕

神経細胞のサブポピュレーションに局在する未知物質を系統的に検索する目的で，ウシガエル皮膚ホモジネートより抽出したゲルろ過分画（分子量10^3－10^4）をカブトガニヘモシアニンに結合したものでマウスを免疫し，その脾臓細胞を用い常法によって3回のハイブリドーマ実験を行なった．ハイブリドーマ抗体は，ニワトリ6日および18日胚，およびラットの脊髄のホルムアルデヒド固定凍結切片を用い，間接螢光抗体法によって免疫組織化学的にスクリーニングし（1646検体），脊髄または脊髄神経節内の抗体結合分布に特徴のみられた18個のモノクローナル抗体について，ハイブリドーマクローンを確立した。これらの抗体のうち少くとも4個はニワトリ脊髄後角部においてそれぞれ特徴的な結合パタンを示した．13個の抗体ではウシガエル皮膚において免疫組織化学的に特定の細胞種などに免疫活性が認められ，また8個の抗体はニトロセルロース紙上に吸着させたカブトガニヘモシアニン標品に対して強い結合性を示した．

Key word： monoclonal antibodies, neuronal subpopulation, amphibian skin

神経系において神経細胞間の特異的な結合の形成と維持および情報伝達に直接関与している分子は多様性を有しそれぞれ神経細胞の特定のサブポピュレーションに局在することが予想される．事実，神経ペプチドは一部の神経細胞にのみ見い出されるのが通例である．大多数の神経ペプチドは生理学的な活性を示標に発見されたものであるが，逆に神経組織内での局在を示標としてそのような分子を検索するアプローチが考えられる。モノクローナル抗体技術の開発によって，組織ホモジネートなどの複雑な混合物を免疫原とし，生起するハイブリドーマの抗体を逐一免疫組織化学的に検索して，所与の組織内分布を示す分子を発見することができるようになった（6，4）ので上記のアプローチは実行可能である。

我々はこのような視点に立ち，今回は，インドールアミンや神経ペプチドの宝庫といわれる両生類皮膚（2）に着目し，その抽出分画を免疫原としてニワトリおよびラット脊髄切片において特異な結合分布を示すモノクローナル抗体を免疫組織化学的に検索した．このように検索組織とは異質の組織に免疫原を求めること（heterologous immunization）により，両者に共通な抗原分子に焦点を合わせ，また検索組織には微量なために免疫原活性を発現できないものに対して抗体が得られる可能性がある。また脊髄を第一次検索組織に採用したのは神経ペプチドなどが脊髄後角部においてそれぞれ特徴的な分布を示すことが知られており，ほぼ等価な切片が容易に多数得られるためである。

実験方法

<u>免疫原</u>　ウシガエル背部の皮膚39 gを凍結保存したものに，120 *ml*の2倍希釈PBSを加え破砕分散した．2万g，4° Cで30分間遠心後，上清にEGTAを加えて2mMとし，その60 *ml*を凍結乾燥によって29 *ml*に濃縮後，セファデックスG 25カラムクロマトグラフィに

より分子量10^3～10^4の分画を集めて凍結乾燥した。（13 mg蛋白）このものをカブトガニヘモシアニン 60 mgと EDCI 20 mgによって縮合反応（2.4 ml，室温，24時間）（1）させた後PBSに対して透析しやや濁りのある標品を得た。

ハイブリドーマ実験　上記縮合物をフロインド完全アジュバントを用いてBALB/cマウスに腹腔内投与した。（3匹，各0.15 ml）36日後（180および190番台抗体）もしくは36および121日後（230番台抗体）に同抗原で静注により追加免疫した。その3または4日後に脾臓細胞をミエローマ細胞X 63 Ag8 653と常法により細胞融合させた後，96穴プレート計25枚に分割培養した。2～4週間後にハイブリドーマの増殖した培養上清について抗体スクリーニングを行った。スクリーニングはFITC結合ヤギ抗マウスIgG（H＋L）を用いて間接螢光抗体法による免疫組織化学によった。切片は10%ホルマリン／PBSで固定したニワトリ6日胚胴と18日胚の脊椎，および同じ固定液で灌流固定したラット脊髄を30%庶糖／PBSに沈めた標本よりクリオスタットで切り出した横断切片を使用した（3）。

表Ⅰ．　得られたモノクローナル抗体

抗体番号	抗体クラス	ニワトリ脊髄での特徴[a]	ラット脊髄[a]への反応性	カエル皮膚[a]における抗原活性	ヘモシアニン[b]への結合
181F1	M	主に白質	++	++	+
183A8	G	主に灰白質	++	++	+++
183F8	M	特に神経繊維が強	++	+++	+++
184DK		後角にパタン	±	+++	+++
188C1	M	後角にパタン	+	+++	+
188E12		神経細胞体など	−	+	+++
192A9	M	主に灰白質	++	−	−
192E2	M	神経繊維	++	−	−
193G2	M	（DRG染め分け）	±	−	−
194D2	M	後角にパタン	++	+	++
195H5	M	後角にパタン	++	++	−
196E4		グリアなど	+++	+++	−
196E11	M	主に灰白質	++	++	++
196G1	M	白質	++	++	−
233C4	M	白質の微繊維	−	−	−
235G10	G	（初期の後索に特異的）	−	−	+++
236G12		神経繊維	++	++	+++
239D2	M	（初期脊髄索が強）	++	+++	+

a）固定凍結切片に対する間接螢光抗体法による。

b）ニトロセルロース紙上に吸着させたカブトガニヘモシアニン10 μgに対する酵素抗体法による。

結果と考察

抗体のスクリーニングにおいて，特に①神経組織に特異性の高いもの，②脊髄後角部において特徴的な染色パタンを示すもの，③脊髄神経節（DRG）において神経細胞の一部が染まるものを探索し，1646検体の中より表Ⅰに示す18個のモノクローナル抗体について各ハイブリドーマクローンを確立した．螢光標識クラス特異的抗体を用いて組織化学的に調べたところ2個はIgG，12個はIgMであった。表Ⅰに示すように13個の抗体はニワトリ脊髄だけでなくラット脊髄でも組織化学的に活性が認められたが，その特異性パタンは両動物間でおおむね対応した。たとえばニワトリ脊髄後角部で特徴的な染色パタンの認められた抗体188C1や194D2では，ラット脊髄後角部の第Ⅲ層付近に他部位より強い染色が観察された。免疫原の調製に用いたウシガエル皮膚においてそれぞれの抗原活性を検索したところ，13個の抗体について特定の細胞種，腺などに抗体の結合が認められた．他方キャリアとして使ったカブトガニヘモシアニンに対する結合を酵素抗体法によるニトロセルロース紙ドットアッセイによって調べたところ 8個の抗体で強い反応が検出された．カエル皮膚，ヘモシアニンのいずれにも反応しなかった抗体4例は，固定したカエル皮膚において抗原決定基が失活した可能性が考えられる。カエル皮膚とヘモシアニンの両者に強い活性の認められる抗体も5例あったが，これらは①両者に共通する抗原決定基が存在する可能性と，②いずれかに対して生じた抗体が他方の類似抗原決定基に交叉反応している可能性が考えられる。

これらのモノクローナル抗体のうち，特に神経ペプチドの分布との比較で興味深いのは抗体188C1で，これによりニワトリ脊髄神経節において内側よりに分布する一部の神経細胞が染まり，脊髄後角部で染まる繊維の密度が高く，小腸においては固有層に多数の顆粒状の強い免疫活性が認められる。さらにカエル皮膚においては，その表層近くに粗に分布する小突起を有する細胞の細胞質が強く染まる。他方極めて特異的な抗体235G10はニワトリ6日胚において脊髄後索と後根，脊髄神経節およびそこより出る神経のみが染まり，これは我々が先にニワトリ胚視神経を免疫原として得た抗体87D10（5）によく似ている。抗体235G10はカエル皮膚切片には結合が認められず，ヘモシアニンに強く結合するので，もともと後者に対して反応したクローンの抗体であると考えられる。現在これらの抗原分子を同定するための実験を行なっている．

文　献

1．Bauminger,S. & Wilchek,M. (1980) Methods Enzymol. 70, 151-159

2．Erspamer,V. (1971) Ann. Rev. Pharmacol. 11, 327-350

3．藤田　忍 (1983) 生体の科学 34, 474-478

4．藤田　忍 (1984) 蛋　核　酵 29, 1880-1888

5．Fujita,S.C. & Obata,K. (1984) Neurosci. Res. 1, 131-148

6．Milstein,C. (1981) Proc. R. Soc. Lond. B 211, 393-412

8. ニワトリ胚脳の発生段階に応じて出現する酸性蛋白のモノクローナル抗体による解析

白尾智明・小幡邦彦・児島伸彦　　(群馬大・医・薬理)

〔要　約〕

我々はニワトリ視蓋の発生過程における蛋白の組成変化を解析し，脳の発生段階に応じて出現する抗原性の類似した三つの可溶性酸性蛋白S5（分子量95,000），S6（分子量100,000），S54（分子量110,000）について，既に報告した。今回我々はこれらの蛋白に対するモノクローナル抗体を用いて生化学的および組織化学的解析を行い，以下の結論を得た．

1) 複数のモノクローナル抗体を用いたイムノブロットにより，S5，S6，S54蛋白は複数の共通エピトープをもつ類縁蛋白であることが確認された．
2) 本蛋白を限定分解し，その後でイムノブロットで解析した結果，本蛋白は種に特異的な部位と非特異的な部位よりなると考えられた．
3) 本蛋白は神経系に高濃度存在するが，発生過程においては神経系以外にも存在することがわかった。
4) 本蛋白は発生過程の神経系では，分化後間もない神経細胞，次いで作られたばかりの突起に高濃度存在した。成鶏脳では一部のシナプスに局在した．また同時に，細胞体に本蛋白が検出される神経細胞も少数ではあるが存在した。

Key word : Development associated proteins, chick brain, monoclonal antibody

ニワトリ胚視蓋の発生過程における蛋白の組成変化を二次元電気泳動により解析したところ，三つの可溶性蛋白S5（分子量95K，等電点約4.5），S6（分子量100K，等電点約4.5），S54（分子量110K，等電点約4.5）が，神経細胞の移動が盛んな時期，神経突起の成長が盛んな時期，神経網の完成期以降にそれぞれ対応して出現することがわかった[4]．またこれらの蛋白をふ卵11日ニワトリ胚脳より精製したところ，co—purifyされてきたこと，および精製蛋白のpeptide mappingの結果が互いに類似していたことより，これらの蛋白は構造の類似した類縁蛋白であることがわかった[3,4]。このことは電気泳動的に精製したS5あるいはS6蛋白を免疫原として作製した抗血清がすべてS5，S6，S54の三蛋白と特異的に結合することにより確められた[3]．今回我々は本蛋白に対するモノクローナル抗体を作製し，本蛋白の生化学的解析を進めた。

また本蛋白は，ふ卵11日のニワトリ胚では大部分が脳および脊髄にあること，そして肝では発生過程を通じて検出できなかったことより，神経系に局在しているらしいことがわかっているが[4]，神経系内での詳細な局在についてはわかっていない．そこでモノクローナル抗体による免疫組織化学で本蛋白の神経系内での局在を調べた。

〔実験方法〕

<u>免疫原蛋白の精製</u>　白尾らの方法[4]によった．すなわちふ卵11日ニワトリ胚全脳の可溶性画分より，pH5.5沈澱，イオン交換（DEAE—セファロース）クロマトグラフィー，及び硫安分画により部分精製し，その後電気泳動的にS6蛋白を精製した。

<u>モノクローナル抗体の作製</u>　この精製S6蛋白（0.1*mg* 蛋白）でBALB/cマウスを免疫し，常法によりモノクローナル抗体を作製した。抗体産生のスクリーニングは，下記のように免疫組織化学およびイムノブロットにより行った。

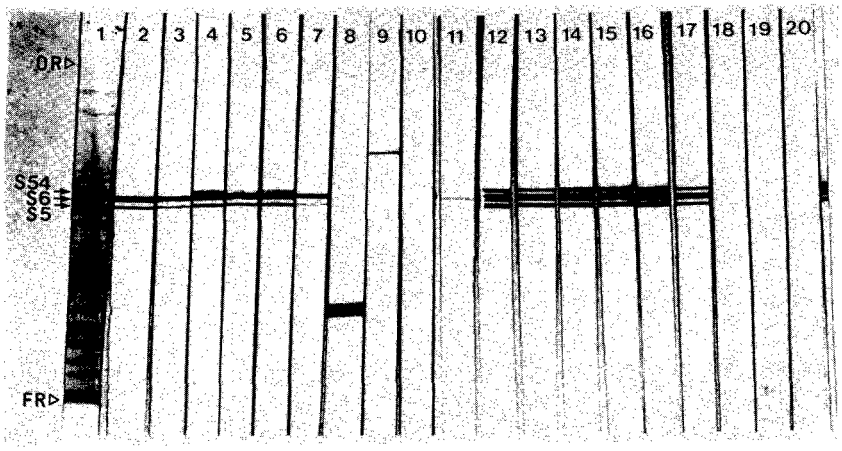


図１．ふ卵11日ニワトリ胚視蓋（1−10）および部分精製画分（11−20）のイムノブロット分析．1と11，アミドブラック染色；2と12，M2A6；3と13，M2B2；4と14，M2D8；5と15，M2E7；6と16，M2F6；7と17，M2H1；8と18，抗β−tubulin抗体，9と19，抗ニューロフィラメント抗体；10と20，ミエローマ培養液上清．OR，origin；FR，front．7%ポリアクリルアミドゲル

<u>免疫組織化学</u>　ニワトリ胚および10%ホルマリンで灌流固定したニワトリから脳を取り出し，10%ホルマリンで一晩固定後，凍結切片あるいはパラフィン切片を作製した．染色は凍結切片はFITCで標識された抗マウスIgG（ヤギ，Cappel）を二次抗体として間接螢光抗体法により，パラフィン切片はＡＢＣ法（Vectastainキット）により行った．

<u>ゲル電気泳動とイムノブロット</u>　組織ホモジネートおよび本蛋白の部分精製画分について行った．ＳＤＳ−ポリアクリルアミド電気泳動はLaemmli[1]の方法によった．二次元電気泳動はO'Farrell[2]の方法によった．エレクトロブロットしたニトロセルロース膜の染色は二次抗体としてHRP標識した抗マウスIgG（ヤギ，Cappel）を用いて，クロロナフトールで発色させた．

〔結果と考察〕

我々はＳ６蛋白を免疫原として６個のモノクローナル抗体（MAbs）を作製した．これらのMAbsは以下３つの判定基準により，Ｓ５，Ｓ６，Ｓ54蛋白と特異的に結合すると考えられた．(1)図１に示すように各MAbはふ卵11日胚視蓋のホモジネートのＳＤＳ−ポリアクリルアミド電気泳動上で，Ｓ５，Ｓ６，Ｓ54蛋白と一致する移動度の三つのバンドと特異的に結合した．(2)本蛋白を部分精製すると各MAbの認識する抗原蛋白も濃縮されてきた（図１）．(3)各抗体の認識する三つの抗原分子の発生過程での量的変化が，Ｓ５，Ｓ６，Ｓ54蛋白の変化と一致した．

以上より各MAbはＳ５，Ｓ６，Ｓ54の三つの蛋白すべてを特異的に認識することがわかった．したがってこれらのMAbsの認識するエピトープはすべてＳ５，Ｓ６，Ｓ54の三つの蛋白に共通して存在していること，および他の蛋白にはこれらのエピトープは存在しないことがわかった．このこととペプタイドマッピングの結果[4]より，Ｓ５，Ｓ６，Ｓ54蛋白はある蛋白の三つのsubtypeであると考えられた．

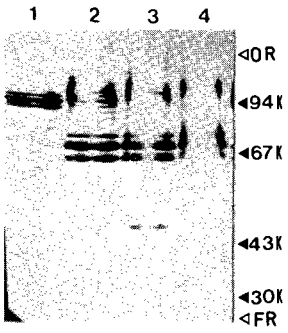


図２．部分精製画分の限定分解後の抗体M2E7によるイムノブロット分析．V8 proteaseの量：1，0㎎；2，0.001㎎；3，0.01㎎；4，0.1㎎．10%ポリアクリルアミドゲル．

次に各MAbの種特異性をイムノブロットにより調べた．抗体M2B2,M2D8,M2F6,M2H1は成熟ラットや成熟モルモットの脳にある抗原蛋白と結合したが，抗体M2A6とM2E7は結合しなかった．よって抗体M2A6とM2E7は種特異的であることがわかった．また成熟ラットや成熟モルモットの脳で，MAbsにより認識された抗原蛋白の分子量は成鶏の本蛋白（S 54蛋白）よりも大きかった．

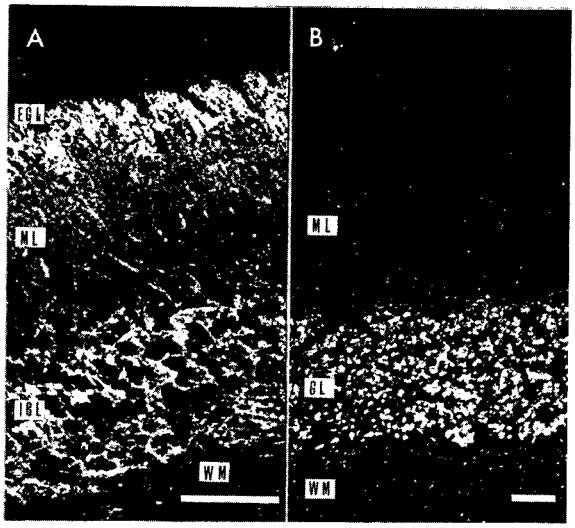


図３．　ふ卵16日胚(A)および成鶏(B)の小脳の抗体 M2F6による染色像．EGL,外顆粒層；GL,顆粒層；IGL,内顆粒層；ML,分子層；WM,白質．スケールは0.05㎜。

次にMAbsを用いて本蛋白の構造を解析するために，まずS 5，S 6，S 54蛋白が濃縮されている画分をV 8プロテアーゼで限定分解し，その限定分解産物をイムノブロットで分析した．低濃度の酵素処理を行った時は分子量65K,68K,75Kの限定分解産物が，種に特異的な抗体M2A6とM2E7により，認識された．酵素の濃度を10倍に上げると分子量48 Kのバンドも染色されるようになった．これらのポリペプタイドは他の抗体によっては認識されなかった．より高濃度の酵素処理を行うと抗体と反応する分解産物は消失した．以上より，本蛋白は種を越えて保存されている共通部位と種特異的な部位とよりなると考えられた。

次に抗体M2F6を用いて免疫組織化学により，本蛋白の局在を調べた．図３Aはふ卵16日の小脳の矢状断の染色像である．外顆粒層では表層のproliferative zoneはほとんど染まっていないが，深層のpremigratory zoneは濃染している。また内顆粒層では細胞移動を終了した顆粒細胞は，細胞体は染まらなくなっていたが細胞集落の間隙に分布している樹状突起の領域が濃染していた．図３Bは成鶏小脳の前額断であるが，顆粒層のglomeruliだけが染まっており，分子層，白質は染まらなかった．したがって本蛋白は発生過程の神経系においては，分化後間もない神経細胞の細胞体次いで作られたばかりの突起に高濃度存在するが，発生が進むに従い本蛋白の大部分は一部のシナプスに局在するようになると考えられた。また成鶏においても少数の神経細胞では細胞体に本蛋白が検出されているが，これらの神経細胞と濃染するシナプスとの関連は今後の課題である．

成鶏においては本蛋白はイムノブロットおよび免疫組織化学的には非神経組織にはいまのところ検出されていないが，発生過程においては免疫組織化学により非神経組織にも存在することがわかっている．たとえばふ卵４日胚の体幹の切片では脊髄などの神経組織以外にも表皮や体節が染まっていた。したがって，本蛋白がこれらの非神経組織において，末梢神経系の発生を調節する因子として働らいている可能性も考えられ，今後更に詳しい研究が必要である。

(1) Laemmli U. K. (1970) Nature 227, 680-685.
(2) O'Farrell P. H. (1975) J. Biol. Chem. 250, 4007-4021.
(3) Shirao T. and Obata K. (1984) International Cell Biology, 371 (abstr.).
(4) Shirao T. and Obata K. (1985) J. Neurochem. 44, 1210-1216.

9. モノクローナル抗 Myelin-associated glycoprotein (MAG) 抗体を用いたリンパ球上の共通抗原決定基の検索

馬場広子・佐藤修三・犬塚 貴・西沢正豊
田中正美・宮武 正 (新潟大・脳研・神経内科)

〔要 約〕

先に我々はヒトのnatural killer(NK)細胞と反応する抗Leu-7(HNK-1)モノクローナル抗体がヒトのミエリン中のMyelin-associated -glycoprotein(MAG)を認識すること、家兎で作製した抗MAG 抗体が蛍光抗体法にてヒト末梢血単核球の10% 前後を染色すること、さらに抗MAG 抗体が抗Leu-7 抗体の免疫原であるHSB-2 細胞上の抗原を認識することを報告し、MAG とリンパ球との共通抗原の存在を示した。また、モノクローナル抗MAG 抗体と補体によりヒトnatural killer(NK)細胞がin vitroでkilling され、NK活性が約1/3 に減少することを確認している。ELISA 法にて多発性硬化症、ギランバレー症候群などの脱髄疾患で抗MAG 抗体価上昇例があることから、これらの患者でも抗MAG 抗体がNK活性を障害している可能性も考えられ、この共通抗原の検討は重要であると思われる。今回マウスでモノクローナル抗MAG 抗体を作製し、ペプチド部分を認識する抗体(IgG-P) および糖鎖部分を認識する抗体(IgM-c) の２種類を用いて、HSB-2 細胞上のMAG との共通抗原決定基の検索を行った。ELISA 法を用いた吸収試験およびインムノブロッティング においてIgM-c のみがHSB-2 細胞で吸収され、ブロットでも数本のbands を認識することから、抗Leu-7 の免疫原であるHSB-2 細胞上のMAG との共通抗原基はペプチドではなく、糖鎖であろうと推測された。

Key word :
Myelin-associated glycoprotein(MAG) , Natural killer cell
Monoclonal antibody

我々は先に抗Leu-7 (HNK-1) モノクローナル抗体がヒトのミエリン中のmyelin-associated-glycoprotein(MAG) を認識すること[4),6)] 、また、家兎に免疫して得たポリクローナル抗MAG 抗体が蛍光抗体法にてヒト末梢単核球の10% 前後を染色すること[7)] を報告し、MAG とnatural killer(NK) 細胞との共通抗原の存在を示した。さらにヒトT細胞性白血病由来のcell line であり、抗Leu-7 の免疫原であるHSB-2 細胞を用い、家兎に免疫して得たポリクローナル抗MAG 抗体および多発性神経炎を伴うモノクローナル抗MAG 抗体を有する米国の患者血清が、吸収試験・インムノブロッティング法によりHSB-2 細胞上の抗原を認識することを報告した。[5)] 今回は我々が作製したモノクローナル抗MAG 抗体を用い、HSB-2 細胞上の共通抗原決定基の特性につき検索した。

［方法］Nortonらの方法によりヒト脳白質からミエリンを精製し、lithium diiodosalicylate-phenol法とゲル濾過にてMAG を精製した。精製MAG のdeglycosylation はEdgeらの方法によりtrifluoromethane sulfonic acid(TFMS)を用いた。モノクローナル抗体作製は、MAG 50μg とFreund's adjuvant で２週毎３回免疫したBalb/cマウスのspleen lymphocyte とマウスmyeloma cell (X63Ag8.653) をpolyethylene glycol 4000を用いてfusionさせhybridoma を作製した。培養上清の抗MAG 活性をELISA 法にてスクリーニングし、positive cloneを限界希釈法にてクローニングした後、各クローンの細胞をBalb/cマウス腹腔に移殖し、腹水の抗体価をELISA で測定した。MAG およびdeglycosylation 後のMAG(deg MAG)を10%SDS-polyacrylamide ゲル電気泳動（以下SDS-PAGE) 後ニトロセルロース膜に転写し、各モノクローナル抗MAG 抗体を一次抗体，peroxidaseラベルのヤギ抗マウスIgG あるいはIgM 抗体を二次抗体とし、色原体に4-chloro-1-naphthol を用いて免疫染色した。HSB-2 細胞は10%FCS含有のRPMI 1640 にて３日間培養後、phosphate buffer saline(PBS)にて３回洗浄し、ホモゲナイズ後蛋白量4mg/mlに調製した。ミエリン，赤血球膜，HSB-2 および精製MAG は各種濃度に希釈し、その30μl を希釈したモノクローナル抗体30μl と混和し、 4℃、18時間インキュベーションし、抗体の吸収を行った。インキュベーション後90μl のBSA-PBS を加え、1000g 10分遠心し、上清の抗MAG 抗体価をELISA 法にて測定した。ELISA 法は先の報告に準じたが[1)] 、色原体にはO-phenylenediamineを用い、25℃１時間インキュベーション後492nm/630nm にて吸光度を測定した。

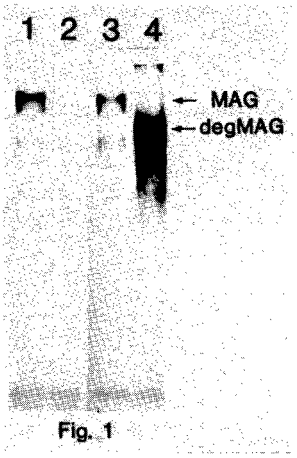


Fig. 1

Fig 1 Immunostaining of human CNS MAG(lane 1,3) and its deglycosylated derivatives(deg MAG)(lane 2,4). Proteins were electrophoresed on 10% SDS-PAG and transferred onto nitrocellulose sheets. Lane 1,2 were immunostained with a 1:20 dilution of the culture medium containing IgM-C as the first antibody, a 1:400 dilution of peroxidase conjugated anti-mouse IgM(goat)(Cappel) as the second antibody. Lane 3,4 were immunostained with a 1:20 dilution of the culture medium containing IgG-P, and then a 1:400 dilution of peroxidase conjugated anti-mouse IgG(goat)(Cappel). IgM-C represents an IgM antibody recognizing the carbohydrate moiety of MAG, and IgG-P represents an IgG antibody recognizing the peptide moiety of MAG respectively.

また、ミエリンおよびHSB-2 細胞homogenateを 7.5%SDS-PAGE 後ニトロセルロース膜に転写し、各モノクローナル抗体を一次抗体として、先に示した方法にて免疫染色を行った。

［結果］得られたモノクローナル抗体のうち、deglycosylation 後も染色性が保たれたためMAG のペプチド部分(p) を認識すると思われたIgG 抗体 (IgG-P)と、染色性が失われたため、糖鎖部分(c) を認識すると考えられたIgM 抗体(IgM-c) を用いた(Fig 1) 。ミエリン，赤血球膜，HSB-2 ，MAG を抗原とした吸収試験では、IgM-c はHSB-2,ミエリン，MAG にて吸収されるが、IgG-P はMAG のみに吸収され、HSB-2 ，ミエリンでは吸収されなかった。(Fig 2,3) 。ミエリンおよびHSB-2 のブロットでは、IgM-c,IgG-p 共にミエリン中のMAG を染色するが、HSB-2 は、IgM-c のみいくつかのbands が染色されるのに対し(Fig 4,Lane 2)、IgG-P では染色されなかった(Fig 4,Lane 4)。

［考察］多発性硬化症(MS)患者脳でMAG が著しく減少していること[2),3)] 、多発性神経炎を伴うIgM paraproteinemia 患者の血清中に抗MAG 抗体が検出されたこと[1)] から、MAG と脱髄疾患との関連が注目されている。さらに先に述べたように、我々はNK細胞表面マーカーであるleu-7 とMAG との間に共通抗原性を有することを報告し、免疫系と神経系との関わりにおいてもMAG が重要であると思われ

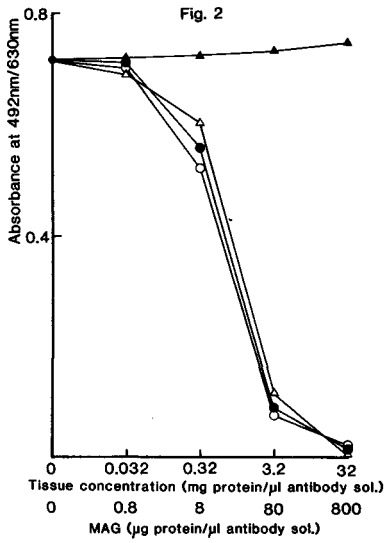


Fig. 2

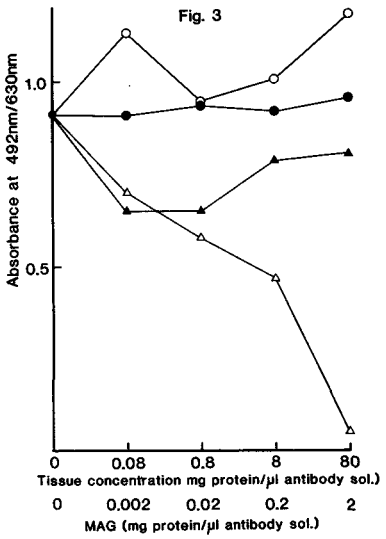


Fig. 3

Fig 2 Absorption analysis by ELISA. Ascites containing monoclonal anti-MAG antibody, IgM-C, was absorbed by various human tissues (●, HSB-2 cells; ○ , myelin; △ , MAG; and ▲ , red blood cell ghosts). Thirty microliters of diluted ascites(1:8,000) were mixed with 30μl of the tissue suspension in various concentrations(4, 0.4, 0.04 and 0.004mg protein/ml of HSB-2, myelin and red blood cell ghosts, and 0.1, 0.01, 0.001 and 0.0001mg protein/ml of MAG). The final dilution of the first antibody was 1:40,000. The absorbance was measured at 492nm/630nm after 1 h-incubation at 25°C with substrate solution.

Fig 3 Absorption of ascites containing monoclonal anti-MAG antibody, IgG-P, by the same various human tissues as Fig 2. Thirty microliters of diluted ascites(1:20,000) were mixed with 30μl of the tissue suspension in the same concentrations as Fig 2. The final concentration of the first antibody was 1:100,000. The absorption was measured at 492nm/630nm after 1 h-incubation at 25°C.

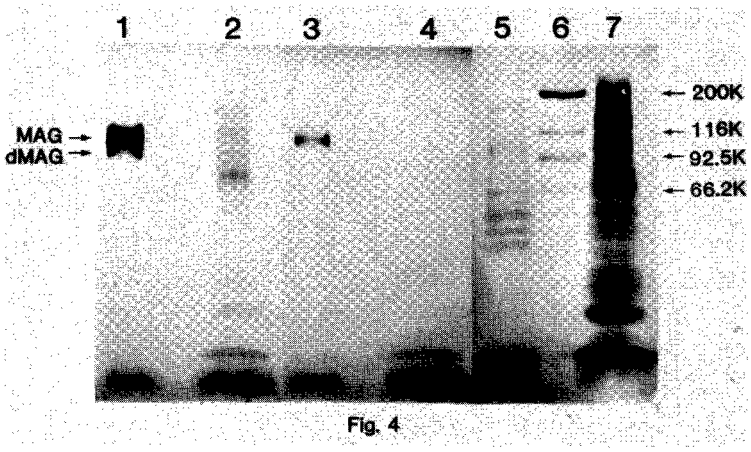


Fig. 4

Fig 4 Immunostaining of human CNS myelin(lane 1,3,5) and HSB-2 cell homogenate (lane 2,4,7). Myelin and cell homogenate were electrophoresed on 7.5% SDS-PAG and transferred to nitrocellulose sheet(blot). The blots were immunostained with a 1:50 dilution of the ascites containing IgM-C (lane 1,2), or a 1:100 dilution of the ascites containing IgG-P (3,4) as first antibodies. A 1:400 dilution of peroxidase conjugated anti-mouse IgM (lane 1,2) or peroxidase conjugated anti-mouse IgG (lane 3,4) were used as the second antibodies. Lane 4 to 6 were stained with Amido black. Lane 6 was molecular weight standards; myosin(200,000), β-galactosidase(116,250), phosphorylase B (92,500), bovine serum albumin(66,200) and ovalbumin(45,000).

た。我々はまた、モノクローナル抗MAG 抗体と補体により、ヒトNK細胞がin vitroでkilling され、NK活性が約1/3 に減少することを確認し、in vivo でも抗MAG 抗体がNK活性を障害する可能性を示した[8]。最近、ELISA 法を用い、MS, ギランバレー症候群などの中枢または末梢神経系脱髄疾患のいずれにも抗MAG 抗体価上昇例のあることを認め、これらの疾患にて抗MAG 抗体がNK活性を抑制し、免疫調製機構に影響を与える可能性もあり興味深い。抗Leu-7 および各種抗MAG 抗体の認識するHSB-2 細胞上の抗原決定基に関しては、イムノブロッティングによる結果を先に報告しているが、今回、ペプチド部分を認識するIgG-P と糖鎖部分を認識するIgM-c の２種のモノクローナル抗MAG 抗体を用いた吸収試験の結果から、HSB-2 細胞上の抗MAG 抗体が認識する部分は、ペプチドではなく、糖鎖部分であろうと推測された。この結果は、IgM-c がヒト末梢血単核球の9-16 % を染色するのに対し、IgG-P は全く染色しないという我々の以前の報告と矛盾しないと思われた。また、IgM-c がミエリンにて吸収されるのに対し、IgG-P はMAG では吸収されるがミエリンでは全く吸収されないのは、IgM-c が認識するMAG の糖鎖部分がミエリン膜表面に露出しているのに対し、IgG-P が認識するペプチド部分の抗原決定基はミエリン膜内に埋没している可能性が考えられた。

［文献］

1. Braun,P.E., Frail,D.E., and L atov,N. (1982) J. Neurochem. 39, 1261-1265
2. Itoyama,Y., Sternberger,N.H., Webster H.deF., et al. (1980) Ann. Neurol. 7, 167-177
3. Johnson,D., Sato,S., Quarles, R.H., et al. (1981) J. Neuropathol. Exp. .Neurol. 40,308
4. Sato,S., Baba, H., Tanaka,M., et al. (1983) Biomed. Res. 4 , 489-494
5. Sato,S., Tanaka,M., Miyatani, N., et al. (1985) J. Neuroimmnol. 7, 287-298
6. Tanaka,K., Tanaka,M., Sato,S., et al. (1984) Biomed.Res. 5 , 225-228
7. Tanaka,M., Sato,S., Miyatake,T. (1984) Japan J. Exp. Med. 54, 9-15
8. Tanaka,M., Nishizawa,M., Inuzuka,T., et al. (J.Neuroimmunol. in press)

10. 網膜に特異的な cDNA (pCR18) のクローニングと解析

中川勇三*・郭　哲輝・三木直正　　(金沢大・がん研・薬理)

〔要　約〕

網膜組織に特異的なcDNAクローンの1つpCR18について、種々の解析を行い、以下の結論を得た。

1) pCR18のDNA塩基配列の決定により、1つのOpen reading frameの存在が認められ、その配列から147個のアミノ酸からなる15,700ダルトンの蛋白質をコードしていることが推定された。2) 約3,100種の既知蛋白質ライブラリーから、本実験で推定した蛋白質のアミノ酸配列とのホモロジー検索を行ったが、ホモロジーの認められるものはなかつた。3) pCR18にハイブリダイズしたmRNAは、約19,000ダルトンの蛋白質を翻訳した。4) Southernブロット解析によつて、pCR18の遺伝子がウシゲノム中に単一コピー存在することが示された。5) RNA dotブロット解析から、ヒト網膜芽腫細胞(Y79およびWERI)からのポリ(A)RNAがpCR18とハイブリダイズし、その強さはウシ網膜と同程度であつた。以上の結果は、pCR18は網膜に特異的な新しい蛋白質をコードするクローンであること、及びpCR18クローンの遺伝子がヒト網膜芽腫細胞にも発現していることが示唆された。

Key word :　Retina specific cDNA, Molecular cloning, Neural retina

神経組織では他の組織に比べて、非常に多くの特異的な遺伝子が発現していることが知られている(2)。従って、これら神経系に特異的な遺伝子及びその産物についての研究は、神経の分化や機能の解明に重要な知見を与えるものと思われる。近年、組換えDNA技術を用いたクローニングの手法により、神経系に特異的な遺伝子の解析が可能となつてきている。特に、Schellerら(7)によるアメフラシの産卵行動を制御する遺伝子クローニングの報告や、ラット脳に共通した82ヌクレオチド配列(identifier sequence)の存在、及びその特異的な遺伝子発現に関するSutcliffeら(8)の報告が挙げられる。我々は、既にOkayama-Berg法によるcDNAライブラリーから、網膜に特異的な一つのクローンpCR18の単離およびその諸性質について本学会で報告している(5)。今回は、pCR18クローンの塩基配列、ハイブリッド一選択法による翻訳、Genomic Southernブロット及びRNA dotブロットの各種の解析を行い、網膜に特異的な蛋白質を推定したので報告する。

[実験方法]

DNA塩基配列の決定：Maxam-Gilbertによる化学的配列決定法(4)及びSangerらによるジデオキシ法(6)に従つた。

ハイブリッド一選択法による翻訳実験：Clevelandらの方法(3)に従つて行つた。ウシ網膜ポリ(A)RNAとpCR18との間のハイブリッド形成法によつてmRNAを選別した。そのmRNAをウサギ網状赤血球由来の無細胞蛋白合成系で翻訳させた。[^{35}S]メチオニン標識蛋白の解析は、SDSポリアクリルアミドゲル電気泳動で行つた。

*現所属：サントリー(株)生物医学研究所

Genomic Southern ブロット解析：高分子量のDNA はBlinら (1)の方法に従い、ウシ脳から調整した。得られたDNA を数種類の制限酵素で処理した後、0.8%アガロースゲルでDNA 断片を分離した。泳動後、Southern法によりニトロセルロースフィルターにブロットした。フィルターをプローブ存在下で、20 mM HEPES(pH 7) 、 1 mM EDTA、 3 x SSC 、 0.5 x Denhart 溶液、50% ホルムアミド、100 μg/ml麦芽tRNA 及び10μg/ml変性ヤツメウナギDNA を含むハイブリダイゼーション混液中で 41℃, 45時間反応させた。反応後、フィルターを0.1 x SSC 、 0.1% SDS 溶液中、50℃、20分間3回洗浄し、オートラジオグラフィーを行つた。

RNA dot ブロット解析： Whitesの方法 (9)に従つた。RNA を60℃、15分間処理で変性させた後、ニトロセルロースフィルター上にスポットした。フィルターを、50 mM HEPES (pH 7.4)、3 x SSC 、1 x Denhardt 溶液、200 μg 麦芽tRNA及び50μg /ml 変性ヤツメウナギDNA を含むハイブリダイゼーション混液中で42℃、15時間反応させた。フィルターを2 x SSC 、0.1%SDS 溶液で 55℃、 45 分間洗浄後、オートラジオグラフィーを行つた。

実験動物および培養細胞：ウシの網膜及び脳は、石川県食肉センターより、ヒト網膜芽腫細胞の細胞株Y79 はCroce 博士(Wister Institute)より、WERIはMcFall博士(Wills Eye Hospital) より、NG108-15細胞は Nirenberg 博士より分与されたものを用いた。腫瘍細胞は、10% ウシ胎児血清を含むDMEMを用い、90% 空気／10%C02、37℃の条件下で培養を行つた。

［結果と考察］

mRNAによつて翻訳される蛋白質を同定するために、pCR18 の塩基配列の決定を行つた。図1に示す通り、905 塩基で、3′- 末端に81個のポリ(A) 鎖を含んでおりポリ(A) 鎖の20－25番目上流にAATAAAのポリ(A) 付加シグナルが認められた。一方、5′-末端の138 －140 番目の開始コドン(ATG) から579 －581 番目の終止コドン(TGA) まで連続したOpen reading frameが存在した。推定される蛋白質のアミノ酸残基は147個で分子量は、15,700であつた。しかし、最終的な開始コドンの決定には、蛋白質の精製を行い、そのN 末アミノ酸を同定する必要がある。推定される蛋白質と既知の蛋白質（約 3,100 種）とのホモロジーを検索したが、類似性を有する蛋白質をデーターバンクから見出すことはできなかつた。次にpCR18 で選択したmRNAによる翻訳産物を調べた。その結果、約 19,000 ダルトンのゲル移動度をもつ蛋白質のバンドが認められた。ゲノムDNA 上にpCR18 遺伝子が複数個存在するかどうかを確かめるためにGenomic Southernブロット解析を行った。BamHI, PstI及びHindIII 消化は、それぞれ3.1 K 、3.4K及び3.25K 塩基対を示す一つのDNA 断片が検出された（図３）。これらの結果は、pCR18 遺伝子がウシゲノムDNA 上に単一コピー存在していることを示している。種々の腫瘍神経細胞において、pCR18 に対するmRNAが発現しているかどうかを調べるために、RNA のDot ブロット解析を行つた。網膜芽腫細胞 (Y79 細胞株、WERI細胞株）及びマウス神経芽腫細胞ｘラット膠腫雑種（NG108-15）の細胞株からポリ(A)RNAを抽出し0.625 μg から5 μg の範囲のRNA 量をニトロセルロースにブロットし、プローブ (pCR18) とハイブリダイゼーションを行つた（図４）。その結果、Y79 及びWERI細胞株において、ハイブリダイズが認められた。一方、同一条件下、

ウシ脳及びNG108-15細胞にはハイブリダイズは検出されなかつた。また、網膜芽腫細胞RNAへの交叉ハイブリダイゼーションは、ウシ網膜組織とほぼ同じレベルであつた。従って、これらの結果は、ヒトの網膜にもpCR18とハイブリダイズする遺伝子が発現されていることを示唆している。

今後、さらに解析を進め、pCR18遺伝子産物の網膜における機能的役割を明らかにすることが重要になるであろう。

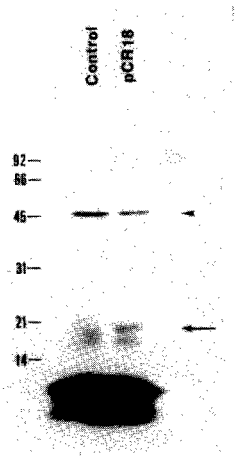


図２．pCR18-選択mRNAによるin vitro翻訳：◀は網状赤血球由来の無細胞蛋白系の内在性のmRNAの翻訳産物。←は19,000ダルトンのバンド位置。

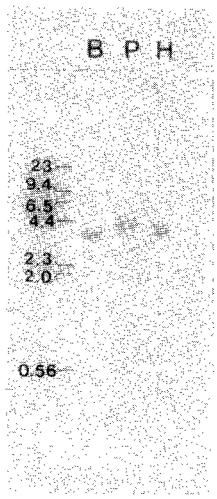


図３．pCR18のサザーンブロット解析：ウシ脳ゲノムDNA（10 μg／レーン）をBamHI, PstI及びHindIIIで消化した。

[文献]

1) Blin et al. (1976) Nucl. Acids Res., 3, 2303 -2308. 2) Chikaraishi et al. (1978) Cell, 13, 111-120. 3) Cleveland et al. (1980) Cell, 20, 2303-2308. 4) Maxam et al. (1980) Methods Enzymol., 65, 499-560. 5) 中川勇三、郭哲輝、三木直正. (1984) 神経化学、 23, 294-296. 6) Sanger et al. (1977) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 74, 5463-5467. 7) Scheller et al. (1982) Cell, 28, 707-719. 8) Sutcliffe et al, (1982) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 79, 4942-4962. 9) White et al. (1982) J. Biol. Chem., 257, 8569-8572.

```
                                                    TTTAGCCTCAGCCGTGA
                                                                   17
CCGGCCCCGTCCCGCGGCGCCGGGAGTTCGTGTGAACGGGTAGGTGTACCGACTTCGCCC
                                                                   77
GTCCGTGAATCCCGTGGTCGCAAAGGCCCGCGCGGCGGGCCGGGTTCTGCCGATACCTTA
                                                                  137
MetGlyCysAlaArgGlyGluProGlnLeuGlnValGlyArgGlyAspArgHisAlaGly
ATGGGCTGTGCGCGAGGAGAGCCTCAATTGCAAGTTGGTCGAGGAGATCGCCACGCTGGT
                                                                  197
AlaGluLeuAlaSerLeuValAlaAlaSerValGlyArgCysThrProThrPheArgLys
GCAGAGCTGGCCTCACTAGTTGCGGCTAGTGTAGGACGTTGTACTCCGACATTCCGCAAG
                                                                  257
ProPheHisThrAspSerProSerIleGlnGlyGlnTrpHisProPheThrAsnLysPro
CCCTTCCACACGGACAGTCCTAGCATCCAGGGTCAGTGGCACCCCTTCACCAACAAACCG
                                                                  317
ThrAlaLeuGlyCysSerSerArgGlyProGluSerCysProAspProAlaAlaSerThr
ACAGCACTGGGGTGCTCCTCGAGAGGTCCAGAATCCTGCCCCGACCCAGCGGCCAGCACA
                                                                  377
MetLysThrAsnSerIleProThrValTrpThrPheThrProAlaGluGlyGlySerCys
ATGAAGACCAACTCCATACCCACAGTTTGGACTTTTACTCCAGCAGAGGGTGGTTCCTGC
                                                                  437
SerTrpPheAlaSerArgGluThrAspGluAlaThrAsnGlyValLeuLeuAlaTrpAsp
TCCTGGTTTGCTTCACGGGAGACAGATGAAGCCACCAATGGGGTACTTCTTGCTTGGGAT
                                                                  497
LysGluGluLeuProValSerPheAspValHisArgGluAlaGlyThrValSerLeuLeu
AAAGAAGAGCTGCCTGTCTCTTTTGATGTCCACCGTGAGGCAGGGACTGTGAGTCTCCTC
                                                                  557
IleLeuSerGlnLeuThrSer***
ATTCTTAGCCAGTTGACATCCTGAAACCCTGAGAATCTTCAGAGATTTGACTTGGTCTTC
                                                                  617
ATTTCTTAAATCCAAATCAATAATAGTGATCTCAAATCAAGTGAGGGCTTTCAAGGCTGG
                                                                  677
CTTCTGAAGAATTCCTTTTGGCCTGTTTCTGTAGCCAGTGACCAAGAGAGTCTGCTGTGA
                                                                  737
GCTGGCATTGGGCTAGGCCTTGTATCTATGTGATGTTTGTGTGCAGTTAGAAAACTGAAG
                                                                  797
TTAATAAATTTGCCAAGGTCACACTTG(A)81
```

図１．pCR18の塩基配列：ポリ(A)付加シグナル(AATAAA)及び終止コドンは、横線と*** で示した。

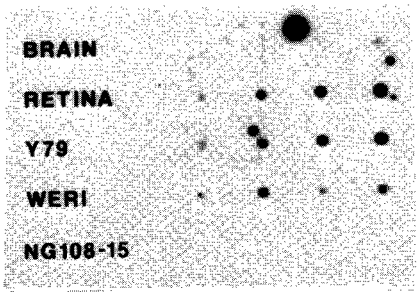


図４．各種神経腫瘍細胞のRNA dotハイブリダイゼーション：左から右側へ0.626 , 1.25, 2.5 及び5 μg のRNA をスポットした。

11. ニホンサル (Macaca fuscata) 脳の非極性糖脂質の特性及び組成

武富　保・原　厚　(信州大・医・心脈研・脂質生化)

〔要　約〕

ニホンサル脳に非極性糖脂質として，non-hydroxy, hydroxy cerebroside の galactose C-3 位に脂肪酸(C16, C18, C18:1)がエステル結合した cerebroside (gal 3-)acyl ester と C-6 位に脂肪酸がエステル結合した non-hydroxy, hydroxy cerebroside (gal 6-)acyl ester が確認された。更に，後者の分画には分離精製が極めて困難な alkylgalactolipid と galactosyl diacylglycerol が共存することが，メタノリース後 alkyl ether glycerol と free glycerol の同定，定量によって明らかになった。これらの組成百分率は non-hydroxy cerebroside (gal 3-)acyl ester 15.4%，hydroxy cerebroside (gal 3-)acyl ester 20.9%，non-hydroxy cerebroside (gal 6-)acyl ester 4.3%，hydroxy cerebroside (gal 6-)acyl ester 17.5%，alkylgalactolipid 32.0%，galactosyl diacylglycerol 9.9% であった。なお，これら非極性糖脂質の総量は総脂質のほぼ 1% に相当した。

また，微量成分ながら glucosylceramide を分離精製し，その脂肪酸組成は予想に反して，non-hydroxy galactosylceramide や ceramide のそれらに類似していることが確認された。

以上のような結果が得られたのも，Florisil column chromatography 各分画の borax 含有 silica gel 60 プレートによる TLC 分析が試みられたことによると思われる。

Key word : non-polar glycolipids, cerebroside fatty acid esters, glycerogalactolipids

脳組織に特有な糖脂質である cerebroside, sulfatide 及び ganglioside については種々の動物脳についてよく知られているが，これらの他にも脳に特異的な微量成分の非極性糖脂質が存在することも注目されている。しかしながら，これらの糖脂質については研究者の間で必ずしも一致した見解が得られていない。今回，新しい手技と分析法を試み，ニホンサル (Macaca fuscata) 脳のこれら微量成分糖脂質の性質と組成を明らかにすることができたので報告したい。

〔実験方法〕

ニホンサル新鮮脳より常法により chloroform-methanol (C-M, 2:1) で総脂質を抽出し，Folch 分配で下層の脂質を出発材料として用いた。1.4 g m の脂質を chloroform に溶かし，100 g m の Florisil column に流し込み，約 600 m l の chloroform で大量の cholesterol を溶出後，C-M (95:5) で ceramide を溶出し，C-M (90:10) で cerebroside より前に溶出される糖脂質を 20 m l fraction collector により分画した。各分画の一定量を silica gel 60 及び 3% borax 含有 silica gel 60 プレートで，それぞれ C-M-W (90:12:1) により展開し，spot は anthrone 及び cupric phosphoric acid 試薬によって検出した。各糖脂質については，メタノリーシス後，脂肪酸メチルエステルの GLC 分析とメチルグリコシドの TMS 誘導体の GLC 分析を行った。定量のために内部標準物質 (IS) として C21-脂肪酸と mannitol が用いられた。chimylalcohol のような alkyl ether glycerol や free glycerol は TMS-誘導体にして GLC 分析により同定，定量した。糖脂質のメチル化は dimysyl potassium によって行い，メタノリーシス後，得られるメチル化糖を GLC 分析によって同定し，糖と脂肪酸のエステル結合の位置を推定した。

〔結　果〕

Florisil column chromatography による溶出パターンはＴＬＣによって，Fig.1,2 に示されるような結果が得られた。Fig.1(a) のＴＬＣでは№6－12にかけて anthrone 陰性の ceramide が主として溶出され，№13－24に anthrone 陽性で cerebroside より非極性の糖脂質が溶出順にRf－値の高い方から低い方へ，一見４つの spots に分かれた。しかし，これらの spots は borax 含有プレートでは Fig.1(b) に見られるように様子が変った。№17－19は２つの upper spot と elongated lower spot に分離し，№20－24はほとんど elongated lower spot からなった。兎角，これら非極性糖脂質の分離精製はそう容易なことでなかった。そこで，№13－24までをプール〔Fig.3(a)〕し，borax 含有プレートで preparative TLC〔Fig.3(b)〕を行い，2 upper spots と elongated lower spot に相当する部分から溶出して，得られた糖脂質をメタノリーシス後，脂肪酸メチルエステルのＧＬＣ分析Fig.4,6）とメチルグリコシドーＴＭＳ誘導体のＧＬＣ分析（Fig.5,7)を行った。その結果はFig.4,5 に示されるように，upper spots は C16－C18 直鎖酸 50% と C20－C26 の直鎖酸 21%，オキシ酸 29% からなり，糖として galactose が同定された。脂肪酸と糖の定量値及び弱アルカリ処理によりＣ16－18酸の遊離と non-hydroxy, hydroxy cerebroside の確認によりcerebroside fatty acid ester が考えられた。№13－24のプール試料のメチル化後，メタノリーシスによって得られたメチル化糖のＧＬＣ分析（Fig.8）で，methyl-2,4,6-tri-O-methylgalactoside が認められ，また，borax の影響を受けないことからcerebroside(gal 3-)acyl ester と同定された。2 upper spots は non-hydroxy and hydroxy cerebroside(gal 3-)acyl ester によった。次に，lower spot の脂肪酸のＧＬＣ分析（Fig.6）はC16－C18酸63%，C20－C26

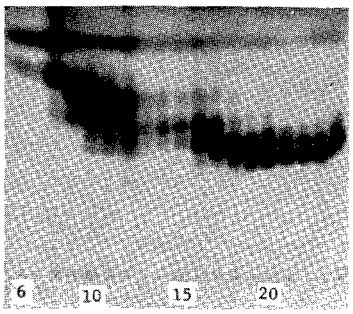


Fig. 1 (a)

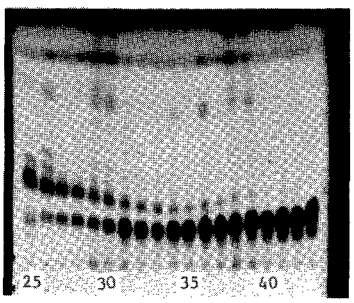


Fig. 2 (a)

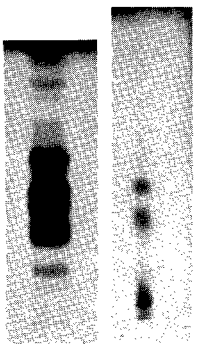


Fig. 3 (a)　(b)

Developing solvent :

C/M/W (90:12:1)

(a) : silica gel 60 plate

(b) : 3% borax impregnated silica gel 60 plate

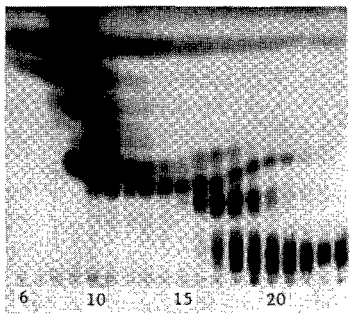


Fig. 1 (b)

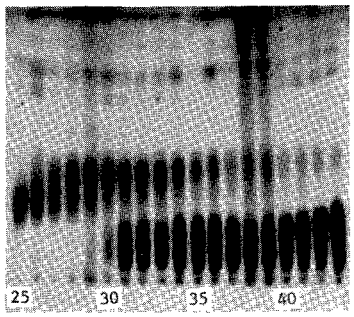


Fig. 2(b)

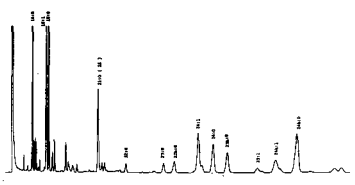


Fig. 4

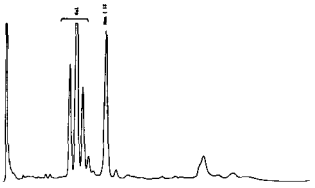


Fig. 5

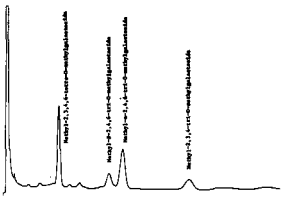


Fig. 8

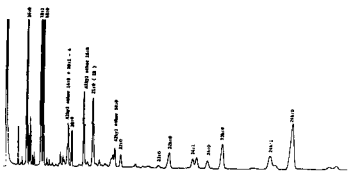


Fig. 6

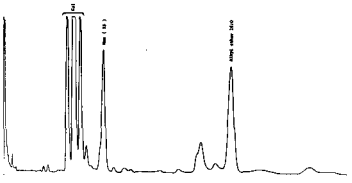


Fig. 7

Fig.4, Fig.6 : OV-101 capillary column at 260°

Fig.5, Fig.7 : OV-1 packed column 160 - 220° at 2°/min

Fig.8, Fig.10 : OV-1 packed column at 180°

Fig.9 : OV-101 capillary colum at 240°

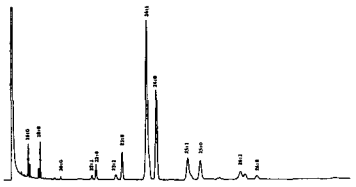


Fig. 9

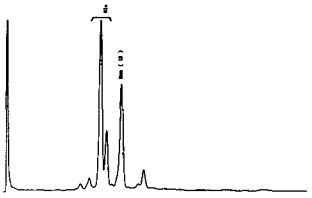


Fig. 10

の直鎖酸６％，オキシ酸２４％とalkyl ether glycerol　７％を認めた。メチルグリコシド－ＴＭＳ誘導体のＧＬＣ分析(Fig. 7)はgalactose の他にchimylalcohol を，また，別のＧＬＣ分析でfree glycerol をも同定定量できた。Fig. 8のメチル化糖のＧＬＣ分析でmethyl-2,3,4-tri-O-methylgalactosideの同定よりnon-hydroxy とhydroxy cerebroside(gal 6-)acyl ester が確認され，また，methyl-2,3,4,6-tetra-O-methylgalactoside のピークよりalkylgalactolipid とgalactosyl diacylglycerolの存在が明らかになった。各糖脂質の分析値より要約に述べられる非極性糖脂質の組成百分率が求められた。なお，Fig. 2(a), (b) に見られるように，Rf 25－30までにborax 含有プレートでgalactosylceramide とは明らかに違うglucosylceramide　が同定され，珪酸カラムで微量であるが純化できた。脂肪酸組成は予想に反し，non-hydroxy cerebroside(kerasine) やceramideのそれらに類似し(Fig. 9)，糖はglucose のみであった(Fig. 10)。

〔考　察〕

最近，Shimomura ら[1]はラット脳の成熟に伴う非極性糖脂質としてnon-hydroxy とhydroxy cerebroside(gal 6-)acyl ester, alkylgalactolipid, galactosyl diacylglycerolの変動をＨＰＬＣ分析によって報告している。彼らはnon-hydroxyとhydroxy cerebroside(gal 3-)acyl esterを同定していないが，本実験でborax 含有プレートによるＴＬＣとメチル化糖のＧＬＣ分析で明らかに同定できたので，今後，これらのＨＰＬＣ分析の再検討をする必要性を感じている。

〔文　献〕

1) Shimomura,K. and Kishimoto,Y. (1984) Biochim. Biophys. Acta 794, 162 - 164

12. PC12 細胞のガングリオシド，糖脂質，糖たんぱく質および全脂質合成に対する外来性ガングリオシド GM1 の影響

仙波りつ子・ S.D. Skaper*・ S. Varon*

（愛知県コロニー研・周生期，
カリフォルニア大・サンディエゴ校・生物*）

〔要　約〕

PC12 pheochromocytoma 細胞は神経成長因子（NGF）に反応して様々な形質変化をすると同時に神経様突起を伸長する．この突起形成は我々の系では血清濃度および外来性のガングリオシド（GGS）によって影響を受ける．PC12細胞の突起形成とGGS の合成との関係を知る目的でGGS，他の糖脂質，糖たんぱく質，全脂質の生合成に対する血清およびガングリオシドGM1（GM1）の影響を0.15 %あるいは1%血清存在下で，NGF 存在，非存在下，GM1 存在，非存在下で前駆体として ^{3}H-Galactose（^{3}H-Gal）および ^{14}C-Acetate を用いて検討した．NGF は血清濃度に関係なく4 つの物質への前駆体の取り込みを増加させた．GM1 は意外にもNGF の存在，非存在に関係なく1%血清存在下でのみ脂質への前駆体の取り込みを増加させたが糖たんぱく質へのそれには影響しなかった．高濃度の血清はGM1 存在下でも前駆体の脂質への取り込みを低下させた．一方高濃度の血清存在下における ^{3}H-Galの PC12細胞への取り込みはGM1 によって影響を受けないこと，GGS およびそれ以外の糖脂質の分解速度は外来性のGM1 によって影響されないことから，GM1 による前駆体のGGS およびその他の糖脂質への取り込みの増加は合成活性の増加と考えられる．

Key word： PC12, Gangliosides, Neuritic Growth

ガングリオシド（GGS）はシアル酸を含む酸性糖脂質で細胞膜外側に局在しコレラ毒素等のexotoxins と結合することから，細胞間認識に，あるいはまたホルモンや成長因子のリセプターとして重要な役割を果していると考えられている（1,6,9,11）．さらにGGS は神経系の発達に伴って増加することから，神経細胞の分化に深い関係があると推定されている（4,7,8,9,11）．ニューロブラストーマ細胞では血清存在下でも外来性GGS が突起形成を誘発することが知られており（7），我々もPC12細胞の突起形成が一定の条件下でGGS によって速くなることを明きらかにした（5）．外来性のGGS は細胞と結合すると報告されており（10），細胞膜のGGS 濃度はPC12の突起形成と何らかの関係があるかもしれないと考えられる．今回PC12細胞の突起形成とGGS 合成との関係について検討した．

（実験方法）　PC12細胞は熱処理した5%馬血清，10%牛胎児血清存在下でプラスチックディッシュに培養し，3-5 x 10^{6} に細胞数が達した時，N1を含むDMEM無血清培地で細胞を集め，ポリオルニチン処理した100mm の培養ディッシュに200,000/16mlの細胞密度で蒔いた．2 時間後に適当な培養メディウムに変換し，培養日数を追って細胞を集め，GGS その他の糖脂質（GL），糖たんぱく質（GP），全脂質合成の測定に供した．牛血清は0.15%，1%を用い，NGF は5 biological units（BU）/ml，ガングリオシドGM1（GM1）は0.15% 血清で 10^{-7} M，1%血清で 10^{-5} M を使用した．GGS，GL，GP の前駆体として ^{3}H-Galactose（^{3}H-Gal）を40μM（比活性15.6μCi/μmol），全脂質のそれには ^{14}C-Acetate（^{14}C-Ace）を100μM（比活性250nmol/μmol）で用いた．脂質の抽出，たんぱく質，GGS の分離はBligh とDyerの方法（2）に従い，GGSはSephadex G-25 で精製した（3）．^{3}H-GM1を用いたGGS の回収率は86.7%

であった．^{3}H-GalのPC12細胞への取り込みは1%血清存在下，NGF,GM1 存在，非存在下で40μMのGal(7.8μCi/μmole) と共に90分 incubateした後，細胞を洗浄後^{3}Hを10%TCAで抽出して測定した．分解速度は1%血清存在下40μM Gal(46.9μCi/μmol)でPC12細胞を3 日間培養後適当な培地に移し，GGS,GL,GP の各分画に残っている Hを日齢を追って測定した．

（結果と考察） PC12細胞は培養4 日まで血清濃度，NGFおよびGM1 の有無に依存せず，doubling time 約2 日で増加した．細胞分裂はNGF 非存在下ではその後も同じ速度で起きたが，NGF 存在下では 4日以降停止した．NGF存在下の突起形成は低血清(0.15 %)培地で速く，高血清(1%)培地で遅かった．GM1 は低血清培地におけるPC12細胞の突起形成には影響しなかったが高血清培地では血清によるlag を消失させることによってその形成を促進した．NGF はGGS,GL,GP,全脂質への前駆体の取り込みを低，高血清の両培地で増加させた．GM1 はNGF の有無にかかわらずGGS,GL, 全脂質への前駆体の取り込みを高血清培地でのみ増加させたが，低血清培地では変化させなかった．GPに対するGM1 の作用は用いられた 8つのいずれの条件においても見られなかった (図1,2)．この結果は外来性のGM1 が高血清培地で糖脂質を含むすべての脂質合成を促進することを示唆している．一方高濃度の血清はNGF,GM1 非存在下で前駆体のGGS, GL,全脂質への取り込みを低下させた (約35%)．NGF 存在下における^{3}H-GalのGGS,GLへの取り込みもまた同様の結果 (約35% の取り込み低下) を示したが，^{14}C-Ace の脂質への取り込みは低血清培地に比べ顕著に低かった (約30 %)．高血清培地における^{3}Hの取り込みはGM1 によって低血清培地のそれと同じレベルに戻ったが，^{14}C-Ace の取り込みはGM1 存在下でも依然として有意に低かった (約40% 低下)．^{14}C-Ace の脂質への取り込みと突起形成の割合は血清濃度と無関係に正の相関があることから (図3)，ここに見られる前駆体の取り込み低下は突起形成が高血清培地では遅いことに依存していると考えられる．高濃度の血清およびNGF 存在下での^{3}H-Galの

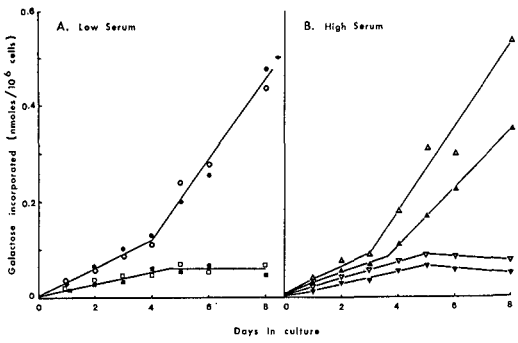


Fig.1 Temporal pattern of [6-3H]galactose incorporation into gangliosides.
(A) 0.15 % FCS: no additions ■ ;10^{-7}M GM1 □ ; with NGF ● ; with NGF and GM1 ○.
(B) 1 % FCS: no additions ▼ ;10^{-5}M GM1 ▽ ; with NGF ▲ ; with NGF and GM1 △ .

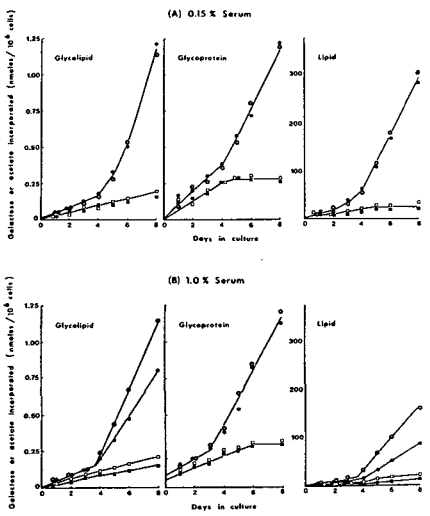


Fig.2 Temporal patterns of [6-3H] galactose incorporation into non-ganglioside glycolipids and glycoproteins,and of [1-14C] acetate into nonganglioside total lipids.
No addition ■ ; with NGF ● ; 10^{-7} & 10^{-5}M GM1 in 0.15 & 1 % FCS, respectively, without (□) or with (○) NGF.

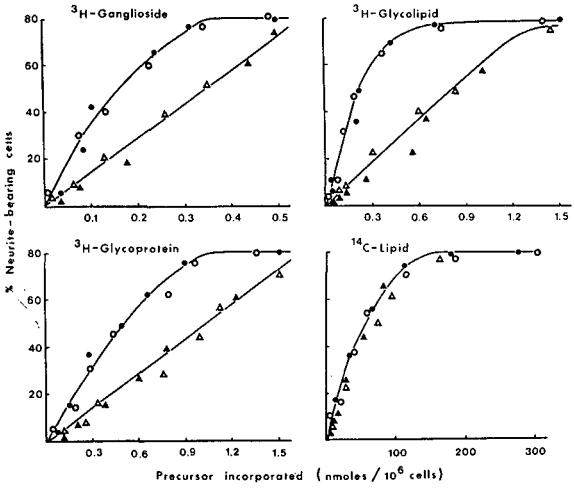


Fig.3 Relationship between neurite recruitment and 3H-galactose or 14C-acetate labeling of PC12 cells.
Cells were cultures in DMEM/N1 plus NGF and: 0.15 % FCS with (○) or without (●) 10^{-7}M GM1; 1 % FCS with (△) without (▲) 10^{-5}M GM1.

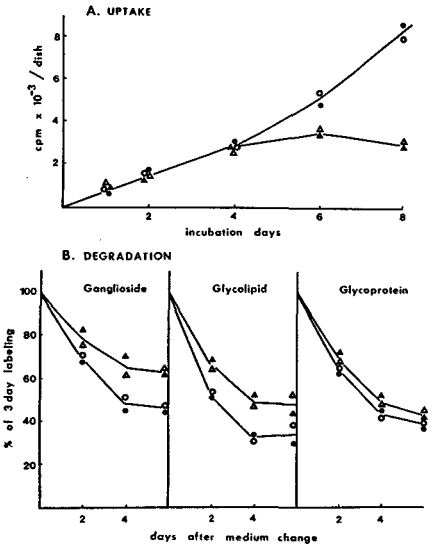


Fig.4 Uptake of 3H-galactose (A) and loss of incorporated 3H-galactose (B) in PC12 cells.
Control ● ; NGF ▲ ; 10^{-5}M GM1 ○ ; NGF and GM1 △ .

GGS,GLへの取り込みは突起形成に対するGM1の至適濃度と一致し，10^{-5} M で極大に達した．ここで調べられた4種の物質への前駆体の取り込みに対するNGF濃度曲線は突起形成と同じ濃度範囲のNFG (3-10 BU/ml)で最大値を示し，ED_{50}も0.2-0.4 BU/mlと突起形成のそれとほぼ一致した．^{3}H-Galの脂質への取り込み量は培養中の血清濃度に影響をうけるが，少なくともNGF存在下，低，高血清それぞれの培地では突起形成の割合と^{3}H-Galの取り込みは正の相関がみられることから，突起形成とGGS,GLの合成の間には何らかの関係があることを示唆している．次に高血清培地で見られるGM1の効果について検討した．^{3}H-GalのPC12細胞への取り込みはNGFの存在，非存在にかかわらずGM1の影響は観察されなかった（図4a).一方，GGS,GLの分解速度はNGF非存在下で速かった（GPのそれはNGFによる影響はなかった）が,GM1の有無による差異はみられなかった（図4b).以上の結果よりGM1による^{3}H-Galの取り込みの増加はGGS,GL合成活性の上昇のよるものと考えられる．個々のGGSをTLCで分離し^{3}H-Galの取り込みを調べた結果高血清およびGM1存在下でみられるGGS合成活性の増加はすべてのGGS種の合成上昇によるものであった．

文　献

1 Ankel H. et al. (1980) Proc. Natl. Acad. Sci. 77, 2528-2532. 2 Bligh E.G. and Dyer W.J. (1959) Can. J. Biochem. Physiol., 37, 911-917. 3 Dreyfus H. et al. (1980) Neurosci., 5, 1647-1655. 4 Gorio A. et al. (1980) Brain Res.,197, 236-241. 5 Katoh-Semba R. et al. (1984) J. Neurosci. Res., 12, 299-310. 6 Kohn L.D. (1977) Ann. Rep. Med. Chem., 12, 361-372. 7 Leon A. et al. (1982) Dev. Neurosci., 5, 108-114. 8 Obata K. et al. (1977) Nature, 266,369-371. 9 Rapport M.M. and Gorio A. (1981) Gangliosides in Neurological and Neuromuscular Function, Development and Repair. 10 Toffano G. et al. (1980) J. Neurochem., 35, 861-866. 11 Yamakawa T. and Nagai Y. (1978) TIBS, 3, 128-131.

13. *dw* マウス大脳のガングリオシドについて

杉崎哲朗・野口鉄也・佐藤　勇*

（東邦大・医・第二生理，総研*）

〔要　約〕

Snell 下垂体性小人症マウス（dw）の大脳ガングリオシド含量を各分画について，発育に伴う変化を検討した。

その結果，dw/dw マウス大脳において，15日齢以後のガングリオシド含量の増加が認められなかった。また15日齢以後の各分画のうち GM4，GM3，GM2，GM1，GD1a，GD3，GT1b，GQ1b の増加は認められず，40日齢でこれらの各分画は正常マウスの各分画より有意に低下していた。

Key word : Snell pituitary dwarf mouse, Cerebrum, Gangliosides.

〔緒　言〕

Snell 下垂体性小人症マウス（dw）は身体的発育遅滞に伴い，中枢神経系の発育の遅滞，すなわち，大脳のグリア細胞数の減少（4），ミエリンの低形成（5），神経細胞の発育不全（6），さらに行動の異常（5）などが示めされ，さらにこれらの変化は成長ホルモンと甲状腺ホルモンの併用投与により完全に回復されることが明らかとなった（5，7，9）。

今回，われわれはこれらの異常が生化学的段階のどのレベルで発生して来るかを検討する目的で，まず，発育過程での大脳ガングリオシドの分析と各分画の定量を行いミュータントマウス（dw/dw）と正常マウス（+/?）との間で比較を試みた。

〔材料と方法〕

動物：　dw マウスはジャクソン研究所より購入し，既報にしたがって自家繁殖を行った（5）。

生化学的手法：　脳よりのガングリオシドの抽出は Tettamanti らの方法（10）により行い，HPTLC を用いて各分画を展開した（8）。またガングリオシドのシアル酸の定量は Warren の方法（11）により行い，HPTLC 上の分画はデンシトメーターを用いて定量し，各分画の含量はシアル酸量をもって示した。

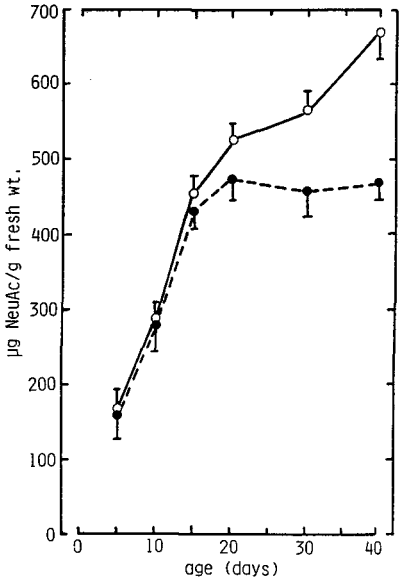
〔結　果〕

大脳ガングリオシド含量の発育に伴う変化：　正常対照群（+/?）では生後5日目からその含量が急激に増加し，40日齢まで増加を続け，約 680μg に至った。一方 dw/dw マウスでは，15日齢までは +/? マウスと同様の含量増加を示したが，以後その増加は停止し，40日齢で，

約480 μgにとどまった（図−1）。

大脳各ガングリオシド分画の発育に伴う変化：セラミドからGal−Cerを経て合成されるGM4は10日齢以後+/?マウスでは急激に増加するが，dw/dwマウスではその増加は緩徐で，40日齢で+/?マウスの26.5％にとどまった（図−2，表−1）。他方各ガングリオシドの合成の原料となるGM3は+/?マウスで30日齢までゆっくりと増加し，以後減少した。しかし，dw/dwマウスではそのピークが20日齢と早く，40日齢では+/?マウスの約70％の値であった（図−2，表−1）。次いでGM3より作られる各ガングリオシドについてみてみると，いわゆるB代謝系路では，dw/dwマウスでGT1b，GQ1bの15日齢以後の増加は全く認められず，40日齢でその含量は+/?の70％にそれぞれとどまっていた（図−3，表−1）。またGD3の減少の傾向が認められた。一方，A代謝系路を形成する分画についてみると，GD1a，GM1ともにdw/dwマウスで15日齢以後の増加が認められず，40日齢でGD1aは+/?マウスの77％，GM1は74％にとどまっていた。また，GM2含量の減少の傾向が認められた（図−4，表−1）。

Fig.1 Concentration of gangliosides of dw cortex at different developmental stage.

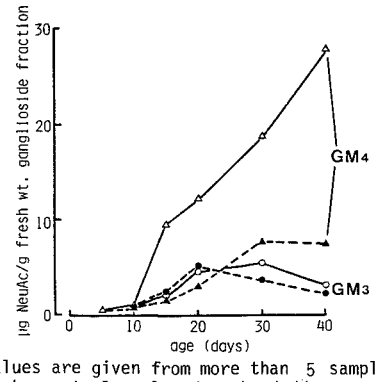


Mean values are given from more than 10 samples.
open mark: control, closed mark: dw/dw

〔考　察〕

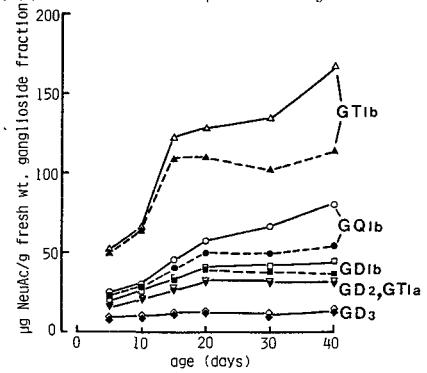
GM1とGM4はミエリン形成に伴って増加すること（1，2，12），GM2はミエリンとオリゴデンドロサイトに含まれていること（3），またGD3は細胞分裂と移動の指標に（1），GQ1bは神経細胞のSproutingとArborization（1）に，GD1aはシナプス形成（1）に関与することが知られている。これらの各ガングリオシドがdw/dwマウスで減少していたことは，

Fig.2 Changes in concentration (μg Neu Ac/g fresh weight) of single ganglioside fractions from dw cortex at different developmental stages.



Mean values are given from more than 5 samples.
open mark: control, closed mark: dw/dw

Fig.3 Changes in concentration (μg Neu Ac/g fresh weight) of single ganglioside fractions from dw cortex at different developmental stages.



Mean values are given from more than 5 samples.
open mark: control, closed mark: dw/dw

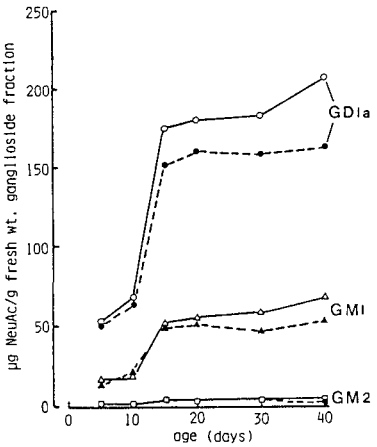
Table 1 Changes in concentration of single ganglioside fractions from dw cortex at 40 days of age.

	μg NeuAc/g fresh wt.			
	+/?	dw/dw	p	% of +/?
GM_4	28.3±3.0 (5)	7.50±1.00 (5)	<0.001	26.5
GM_3	3.38±0.75 (5)	2.36±0.82 (5)	<0.1	69.8
GM_2	3.79±0.85 (5)	2.39±0.55 (5)	<0.015	63.1
GM_1	69.7±8.2 (5)	51.7±5.3 (5)	<0.005	74.2
GD_{1a}	208±18 (5)	161±15 (5)	<0.002	77.4
GD_3	14.1±1.8 (5)	11.0±0.5 (5)	<0.015	78.0
GD_2,GT_{1a}	35.0±3.5 (5)	30.8±2.8 (5)	<0.1	88.0
GD_{1b}	46.5±5.1 (5)	37.7±3.8 (5)	<0.015	81.1
GT_{1b}	166±13 (5)	115±12 (5)	<0.001	69.3
GQ_{1b}	81.1±6.5 (5)	56.5±8.3 (5)	<0.001	69.7

Values are expressed as mean ± SD with the number of animals shown in parentheses. All differences between the control and dw mice were significant by Student's t-test.

既にわれわれが報告した dw/dw マウス大脳での生化学的変化と形態学的変化（4-7）と良く一致し，これらを支持するものであった。今後，成長ホルモンと甲状腺ホルモン投与による回復実験を行い，各ホルモンの作用点を解明する。

Fig.4 Changes in concentration (μg Neu Ac/g fresh weight) of single ganglioside fractions from dw cortex at different developmental stages.



Mean values are given from more than 5 samples.
open mark: control, closed mark: dw/dw

〔文　献〕

(1) Hilbig, R., Lauke, G. and Rahmann, H., Devl. Neurosci. 6, 260-270,(1983/84)
(2) Ledeen, R.W., Yu, R.K. and Eng, L.F., J. Neurochem. 21, 829-839, (1973)
(3) Mack, S.R., Szuchet, S. and Dauson, G., J. Neurosci. Res. 6, 275, (1981)
(4) Noguchi, T., Sugisaki, T., Takamatsu, K. and Tsukada, Y., J. Neurochem, 39, 1693-1699, (1982)
(5) Noguchi, T., Sugisaki, T. and Tsukada, Y., J. Neurochem, 38, 257-263, (1982)
(6) Noguchi, T., Sekiguchi, M., Sugisaki, T., Tsukada, Y. and Shimai, K., Devl. Brain Res. 10, 125-138, (1983)
(7) Noguchi, T., Sugisaki, T. and Tsukada, Y., Neurochem. Path. 2, 123-138, (1984)
(8) Rösner, H., Analyt. Biochem. 109, 437-442, (1980)
(9) Sugisaki, T., Noguchi, T. and Tsukada, Y., Neurochem. Res. 10, 767-778, (1985)
(10) Tettamanti, G., Bonali, F., Marchesini, S. and Zambotti, V., Biochem. Biophys. Acta, 296, 160-170, (1973)
(11) Warren, L., J. Biol. Chem. 234, 1971-1975, (1959)
(12) Yu, R.K. and Iqbal, K., J. Neurochem. 32, 293-300, (1979)

14. アフリカツメガエル坐骨神経における CMP－シアル酸並びにガングリオシドの軸索内輸送

五十嵐道弘・小宮義璋・黒川正則　（東京大・医・脳研・生化）

〔要　約〕

[^{3}H] N－アセチルマンノサミン（80μCi/0.4μl）をアフリカツメガエル第Ⅸ神経節に注入し、15℃で一定期間飼育後、坐骨神経を摘出して5mmの分節に切り、そのクロロホルム－メタノール可溶性分画の放射活性をＴＬＣ－フルオログラフィー及び液体シンチレーションカウンターにて解析した。フルオログラフィー上、少なくとも3つの異なるバンドが検出される。第一はＮ－アセチルマンノサミンそのものと考えられ、これは軸索内を輸送されているものとは考え難い。第二は、坐骨神経に存在するガングリオシドとＲ$_f$値において一致するものである。ガングリオシドの移動速度は2mm/日であり、糖鎖の差異によらず、一群として移動する可能性が示唆された。第三は最も極性の高い物質で、これはＴＣＡ可溶性分画に回収される。ＴＬＣ上の挙動、酸による易分解性、シアリダーゼ抵抗性などから、同物質はＣＭＰ－シアル酸と考えられる。移動速度は8mm/日であった。唯一のシアル酸供与体であるＣＭＰ－シアル酸が軸索内を輸送されることから、末梢側での同物質の利用、すなわちシアル酸転移酵素の神経終末部での存在が強く示唆される。また、ガングリオシド自身も軸索内輸送を受けるため、ガングリオシドは主に細胞体で合成されて軸索形質膜に供給されるが、局所的に終末部のシアル酸転移酵素により、その構造の修飾または修復がなされるものと考えられる。

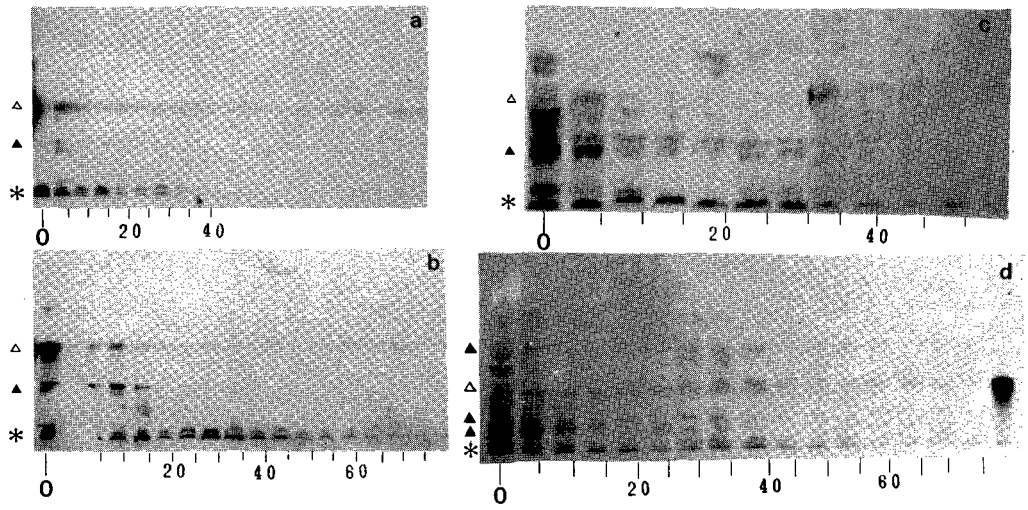
Key word：　Axonal transport / CMP-Sialic acid / Gangliosides

ガングリオシドは神経細胞形質膜に高濃度に存在することが知られてきたが、最近では神経細胞の機能にも重要な寄与をしうる可能性が示唆されている(2)。その生合成に関しては、主に軸索内輸送の解析により、細胞体（特にゴルジ装置）で生ずることが知られているが(5,6,8,12)、神経終末部の形質膜に存在するシアル酸転移酵素による局所的なシアル酸添加についての報告もあり(11,13)、未だこの点で定説を得ていない。今回、我々は、CMP-シアル酸（シアル酸供与体）とガングリオシドが異なる速度で、それぞれ軸索内を輸送されることを見出し、上記の論点に関して新しい知見を加えたので報告する。

（方法）1）軸索内輸送の解析：アフリカツメガエル（雌、体重100g程度）の第Ⅸ神経節に、[^{3}H]ManNAc(N-アセチル-D-[6-^{3}H] マンノサミン）を80μCi/0.4μl 注入し、15℃で一定期間飼育後、坐骨神経を摘出し、5mmの分節に切った。各分節より、クロロホルム－メタノール(C/M)=2:1,及びC/M=1:2(各0.6ml)で抽出し、遠心の後、その半量をHPTLC (Merck, 10×20cm) に添加し（A)C/M/5Nアンモニア／0.4%$CaCl_2 \cdot 2H_2O$=60:40:4:5又は（Ｂ）エタノール／1N酢酸アンモニウム＝3:2 を展開溶媒として展開した。展開後は、10% トルエンを含む、0.4%PPO (2-メチルナフタレン溶液）を噴霧して増感し、フルオログラフィーを作製した(3)。抽出液の残り半量は、液体シンチレーションカウンターにて放射活性を測定した。また、C/M 抽出に先立ち、ある系では5% TCA処理を各分節に行った(0℃、3hr)。

2)酸加水分解・酵素処理：1 分節の抽出液を半量に分け、一方のみを0.5mM H_2SO_4 で37℃、1時間処理した。同様にして、岩森・永井の方法に基づき、シアリダーゼ (V. cholerae) 処理を行った(7)。N-アセチルノイラミン酸アルドラーゼ(E.coli)処理は、pH7.3 で37℃、1時間行った。

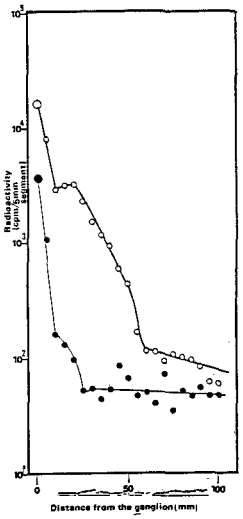
3)坐骨神経のガングリオシドの単離：カエル坐骨神経1gより、C-M 抽出、DEAE-セファデックス、Sep-Pak C_{18} カートリッジ、Unisil(200-325 mesh)カラムの各段階を経て、ガングリオシドを精製した(9)。



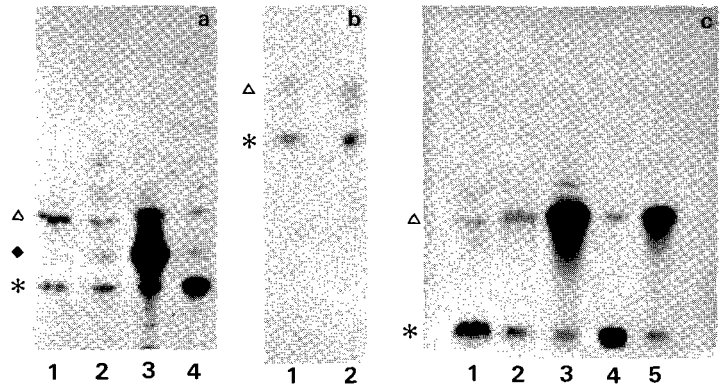
（図１）［^{3}H］ManNAc の第Ⅸ神経節内注入後、(a)5日、(b)8日、(c)14日、(d)29日のフルオログラフィー．（展開溶媒は(A)）［数字は神経節からの距離（単位：ｍｍ）］
＊：CMP-シアル酸；　△：ManNAc；　▲：ガングリオシド

（結果）フルオログラフィー上、３種のバンドが検出された（図1(a)-(d)）。第1は［^{3}H］ManNAcと、TLC 上で同一の挙動を示すもので、ManNAcそれ自身と考えられる。注入後、数日を経ても、フルオログラフィー上では末梢側までほぼ均一に分布するため、ManNAcは軸索内輸送を受けるものとは考え難い。第2のバンド群は、TLC 上のR_f値より、カエル坐骨神経に存在するガングリオシドと考えられる［カウントの多少により、最も多量に存在する分子種のみ（^{3}Ⅳ NeuNAc, ^{6}Ⅲ NeuNAc-GgOse$_4$）(10) が見出される場合もある］。図1(d)より、これらは糖鎖の差異に依らず、一群として輸送されている可能性が示唆される。移動速度は約 2mm/ 日であった(15 ℃)。
第3のバンドは、最も極性が高く、移動速度は約 8mm/ 日であった。図1(b)及び図2より、同物質はTCA 可溶性分画に主に回収されるため、ガングリオシドとは異なることが示される。酸加水分解による同物質の速やかな分解（図3(a)）、シアリダーゼ抵抗性（図3(b)）、TLC 上のR_f値は、同物質がCMP-シアル酸と同一の性質を有することを示している。更に、酸加水分解でシアル酸に一致するバンドが新たに出現し（図3(a)）、その後のN-アセチルノイラミン酸アルドラーゼ処理により、CMP-シアル酸に一致するバンドの減少とManNAcに一致するバンドの増加が見られる（図3(c)）ことより、同物質はCMP-シアル酸であると考えられる。
（考察）CMP- シアル酸は唯一のシアル酸供与体であり、その合成はほとんど核でのみ行われる(4,14)。同物質が神経の末梢側へ軸索内を輸送されることは、その神経終末部での利用、すなわちシアル酸転移酵素の神経終末部での存在を強く示唆する結果と考えられる。ガングリオシド自身も輸送されていることは、従来の報告を支持する結果であるが、その輸送速度に関しては、今回の我々の結果では、従来の報告よりもかなり遅い。この理由が15℃という温度条件や、カエルのガングリオシドの構造の特殊性に求められるか否かについては、現在検討中である。ガングリオシドそのものの輸送は軸索形質膜への同物質の直接の供給を担うのに対し、CMP-シアル酸の輸送に基づく局所的なシアル酸付加は、ガングリオシド（及び、おそらくはシアロ糖蛋白質）の構造の修復等に働くことが想定される。

[今回の実験に当り、貴重なご助言を賜った永井克孝教授、岩森正男博士(東大・医・第二生化)、大橋昌子博士(お茶大・生活環境センター) に深謝する。]



(図2) 8日後の放射活性.
○ :TCA 可溶性分画の放射活性;
● : TCA 不溶かつC-M 可溶性分画の放射活性.



(図3) (a) 酸加水分解処理 1:コントロール 2:酸処理後のサンプル 3:酸処理後の [^{14}C]CMP-シアル酸 4:[^{14}C]CMP- シアル酸 ◆ : シアル酸
(b) シアリダーゼ処理 1:コントロール 2:シアリダーゼ処理後のサンプル
(C) 酸処理後のアルドラーゼ処理 1:コントロール 2:酸処理後、N-アセチルノイラミン酸アルドラーゼ処理を行ったサンプル 3:2.と同様の処理を行った[^{14}C]CMP-シアル酸 4:[^{14}C]CMP- シアル酸 5:[^{3}H]ManNAc

(文献)

1. Abe T., Haga T. and Kurokawa M. (1973) Biochem. J. **136**, 731-740
2. Ando S. (1983) Neurochem. Int. **5**, 507-537
3. Bonner W.M. and Stedman J.D. (1978) Anal. Biochem. **89**, 247-256
4. Coates S.W., Gurney T., Sommers L.W., Yeh M. and Hirschberg C.B. (1980) J. Biol. Chem. **225**, 9225-9229
5. Forman D.S. and Ledeen R.W. (1972) Science **177**, 630-633
6. Gammon C.M., Goodrum J.F., Toews A.D., Okabe A. and Morell P. (1985) J. Neurochem. **44**, 376-385
7. Iwamori M. and Nagai Y. (1981) J. Biochem. **89**, 1253-1264
8. Landa C.A., Maccioni H.J.F. and Caputto R. (1979) J. Neurochem. **33**, 825-838
9. Ledeen R.W. and Yu R.K. (1982) Meth. Enzymol. **83**, 139-191
10. Ohashi M. (1982) Adv. Exp. Med. Biol. **152**, 83-91
11. Preti A., Fiorilli A., Lombardo A., Caimi L. and Tettamanti G. (1980) J. Neurochem. **35**, 281-296
12. Rösner H. and Merz G. (1982) Brain Res. **236**, 63-75
13. Tettamanti G., Preti A., Cestaro B., Venerando B., Lombardo A., Ghidoni R. and Sonnino S. (1980) Adv. Exp. Med. Biol. **125**, 263-280
14. Van den Eijnden D.H. (1973) J. Neurochem. **21**, 949-958

15. 脳ミクロソームにおける極長鎖脂肪酸伸長の部分反応の特徴

吉田　敏・竹下正純　　（大分医大・生化）

〔要　約〕

新たに開発したGC-MS法を用い、豚脳ミクロソーム(Ms)において外部基質である20:0-CoAと、内在性基質である16:0-CoAと20:4-CoAのmalonyl-CoAとの縮合反応を、詳細に検討した。縮合反応に対するmalonyl-CoAや20:0-CoAの濃度依存性を調べたところ、外部基質と内部基質についての反応様式に差が認められた。また、脳灰白質のMsの20:0-CoAの縮合活性は、白質のMsより顕著に低かったが、内部基質については大きな差は無かった。還元剤添加による3-keto中間体の減少を観察したところ、$Na_2S_2O_4$による還元で、20:0-CoA基質については、縮合生成物の変化は見られなかったが、内部基質の場合明らかな減少がみられた。これは、^2H化したNADPHからの^2Hの転移が、20:0-CoAの伸長による24:0の生成の場合と、内部基質である20:4-CoAからの24:4の生成とで、異なる様式によるものである事と関係があると考えられる。これらの結果は、脳Msにおける極長鎖脂肪酸伸長系は、脳の部位により異なり、伸長反応の中の縮合段階のみならず、還元段階においても、鎖長や不飽和度により異なった酵素系が働いていることを示唆する。

Key word :　Brain microsomes, Very-long-chain fatty acids, Elongation.

ミクロソーム（Ms）における長鎖脂肪酸伸長反応は、de novoの合成系とは異なり、独立した種々の膜酵素群が関与していると考えられており、特に脳Msにおける極長鎖脂肪酸伸長に関与する酵素系の調節機構を明らかにすることは、ミエリン形成の機序を知る上で重要である。伸長反応の中でmalonyl-CoAとの縮合反応に関与する酵素は、律速酵素と考えられており、その酵素の性状、作用機序を明らかにする必要がある。我々は、極長鎖脂肪酸の縮合活性の測定に対し生成物の同定を行うことができ、高感度に検出することができるmass fragmentographyの技術をルーチンに利用する方法を開発した。この方法によって従来の10％以下の量のMsを使っても定量的な測定が可能になり、微量成分の酵素活性を測定する事ができる。今回は、20:0-CoAと内部基質である16:0-CoAと20:4-CoAの縮合反応と、3-keto還元反応機構を明らかにし、極長鎖脂肪酸伸長反応への多様な酵素系の関与を報告する。

【実験方法】

(a) Adult及びnew bornの豚脳ミクロソームの調整及びラジオガスクロマトグラフィによる測定は、前に報告した方法（1,2）によって行った。Adult脳より白質と灰白質を氷冷した10 mM Na-Pi, pH 7.4, 10 % hexose中でナイフで注意深く分けた。

(b)GC-MSによる測定は、JEOL D-300 mass spectrometerにより行ったが、設定条件は、前に報告した（2,4）。また、^2H化したNADP^2Hよりのproductへの^2Hの転移はEI法及びCI法を用いたmass fragmentographyにより観測した(4)。

(c)縮合反応は、伸長活性測定時の条件からNADPHを除き、またBSAを除くか0.2 mg/ml程度加えた状態で反応させ、KOH-methanolで反応を止め、ケン化処理後、

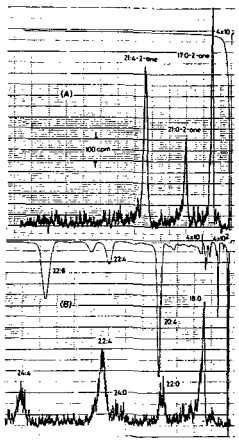


Fig.1. Condensation(A) and elongation(B) products detected by radio GLC for new born swine cerebral microsomes.

hexane で抽出し、遊離脂肪酸部分を TMTFTH(trimethyl trifluorotoyl ammonium hydroxide) 層に分けた。残りの上層 hexane (脱炭酸された生成物が含まれる) を移しさらに digitonine で処理した後、その hexane 層を移し、evaporate 後濃縮し測定にかけた。

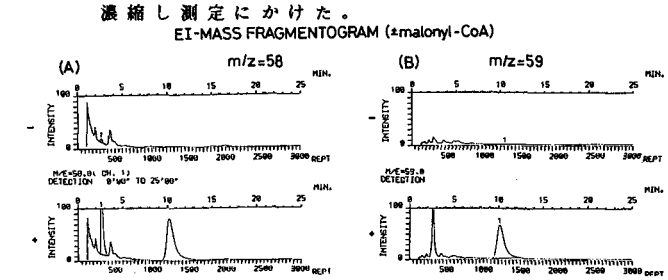


Fig.2. EI-mass fragmentography of condensation products obtained in the presence and absence of 40 μM malonyl-CoA. Products appeared with the retention time at 2.6, 10 and 17.5 min.

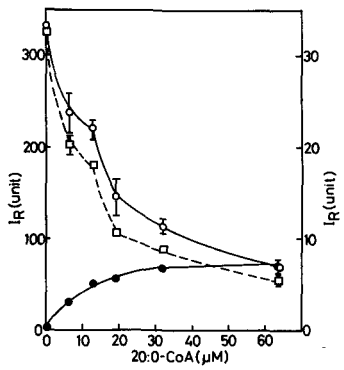


Fig.3. Dependence of condensation activity on 20:0-CoA added. ●, 21:0-2-one. ○, 17:0-2-one(scale on left). □, 21:4-2-one(scale on right). The internal standard(19:0-Me) was normalized to 20 units.

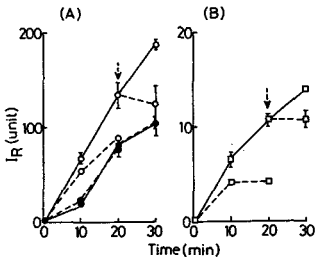


Fig.4. Effect of dithionite on the rate of condensation. Symbols are the same as Fig.3. Solid line, controle; broken line, + 22mM dithionite. (under N_2 gas atmosphere).

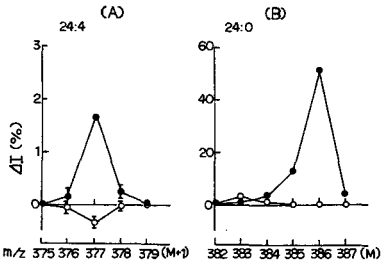


Fig.5. Stereospecific incorporation of ^2H from labelled NADPH(4S, ●; 4R, ○) to the products. (A) for 20:4→24:4. (B) for 20:0→24:0. Δ I, relative intensity difference from unlabelled NADPH.

【結果と考察】

図１に、new born の豚脳 Ms による 20:0-CoA 及び内部基質の、 malonyl-CoA との縮合反応生成物(A)とoverallの伸長反応生成物(B)の radio gas chromatography を示す。ケン化処理により縮合反応生成物である 3-keto中間体は、脱炭酸されて、各々、21:0-2-one 及び 17:0-2-one, 21:4-2-one の３本のピークが観測された。特に、20:4-CoA の伸長反応により、22:4 と 24:4 が生成する反応で、24:4 は、連続的に伸長されて出来た物であると考えられる。

図２には、EI法による縮合反応生成物の典型的な mass fragmentogram を示し、Ａ，Ｂ，Ｃは各々、m/z=58,59,80 でモニターしたもので、各々 17:0-2-one,21:0-2-one, 21:4-2-one の定量のために使用した。Malonyl-CoA が無い時、縮合反応生成物が出来ないことを示している。図３には、縮合反応の 20:0-CoA 濃度依存性を示すが、外部基質である 20:0-CoA の量が増加すると、内部基質の縮合反応活性が低下する。20:0-CoA に対する Km 値は、12 μM であった。また、malonyl-CoA の濃度依存性では、20:0-CoA が基質の時、malonyl-CoA に対する Km は 37 μM であったが、内部基質に対しては、一見 negative cooperativity を示すような profile になった。

一方、縮合反応を NADPH を除いて行わせた後（20分後）NADPH を加え、生成物の減少を見ることによって、次の段階からの反応（3-keto acyl reduction）を観察する事ができ、その結果、その還元活性は何れの基質でも縮合活性とほぼ同程度の大きさであった。しかし、過剰量の $Na_2S_2O_4$ を還元剤として用い、嫌気的条件で反応を行わせた場合、図４に示すように、外部基質である 20:0-CoA の場合には、還元剤添加による生成物の減少は見られなかったが、内部基質である 16:0-CoA, 20:4-CoA の場合、NADPH を使った時と同程度の減少がみられた。また、図５で示すように、20:0 → 22:0 → 24:0 の伸長反応では、3-keto reduction と enoyl reduction の両段階で、NADP^{2}H から ^{2}H の転移が見られた（24:0 生成については計４個の^{2}H）。しかし、20:4 → 22:4→ 24:4 の伸長反応では、24:4 の生成で計２個しか ^{2}H が、NADP^{2}H から転移していなかった。これは、3-keto reduction か enoyl reduction のどちらかで NADP^{2}H からの ^{2}H が溶媒の protonと交換したことを示し、NADPH から product への水素の転移を伴わない還元酵素が関与していることを示している。図４の結果は、20:4-CoA伸長における 3-keto reduction の段階において、$Na_2S_2O_4$ で還元された酵素からでも、反応が起こることを示しており、20:0-CoA についての還元酵素とは異なっていると考えられる。一方、adult脳より分離した白質と灰白質からMsを精製し、活性を測定した所、灰白質のMsにおいて 20:0-CoA の縮合活性が白質Msの場合の半分以下であった。しかし、内部基質の縮合活性は、両部位で殆ど同じであった。また灰白質より分離した神経細胞画分の Ms の活性も、20:0-CoA の縮合反応について顕著に低かった。この結果は、白質において、おそらくoligodendrocyteでの、ミエリン形成に必須な極長鎖脂肪酸(22:0, 24:0)の合成活性が高いことを意味する。今後縮合酵素の精製と特異抗体を作成して酵素化学的組織化学的研究を行う。

【参考文献】(1) 吉田 敏、竹下正純 (1984)神経化学 23,192-194. (2)Yoshida,S.and Takeshita,M. (1984)Biochim.Biophys.Acta 795,137-146.(3)Yoshida,S.,Takeshita, M. and Kawaguchi,A.(1984)Biochem.Biophys.Res.Comm. 124,322-328.

16. ブタ大脳皮質プロスタグランジン E_2 結合蛋白の可溶化

湯元　昇・畑中道代・渡辺恭良・早石　修
（新技術開発事業団・早石プロジェクト）

〔要　約〕

プロスタグランジン（PG）E_2の特異的結合蛋白をブタ大脳皮質より，活性を保った形で可溶化した。ブタ大脳皮質より調製したP_2フラクションを4℃，30分間3－〔（3－cholamidopropyl）dimethylammonio〕－1－propane sulfonate（CHAPS）とインキュベーションを行ない，103,000×g 1時間の遠心上清でのPGE_2結合活性をポリエチレングリコール法を用いて測定した。10 mM CHAPSを用いた場合に最も高い結合活性が上清に回収された（回収率，約30％）。可溶化上清でのPGE_2の特異的結合反応は37℃，1時間で平衡に達した。反応液を希釈することによって，結合したPGE_2の解離を調べると，PGE_2との反応時間に依存した解離反応速度の減少がみられ，1時間の反応後結合したPGE_2はほとんど解離しなかった。この反応液に10 μM程度のGTPを添加すると，結合反応の阻害及び解離反応の促進をひきおこした。この結合活性はPGEに非常に特異的であり，非標識PGによる阻害は次のような順でみられた。$PGE_2 > E_1 \gg F_{2\alpha} > E_2$ methyl ester $> A_2 > 13,14$－dihydro－15－keto－$E_2 > D_2$。Scatchard plot解析によりこの可溶化画分には，PGE_2に対して高親和性と低親和性の結合部位が存在することが判明した。

Key word： Prostaglandin E_2, Binding protein, Solubilization

中枢神経系において，プロスタグランジン（PG）E_2は発熱作用，食物摂取の調節，抗けいれん作用，LH分泌の亢進などの作用を示すことが知られている（9）。これらの作用の分子機構を明らかにする過程で，ウシ松果体（1），ラット脳（4），ヒト脳(8)の膜画分にPGE_2に対する結合活性が見出されている。また，*in vitro* labelingによるオートラジオグラフィー・画像解析法を用いて，サル脳におけるPGE_2の結合蛋白の局在を調べた結果（7），視床下部では，体温調節に関与する視束前野外側部及び内側部，食物摂取に関与する視床下部前核及び外側部に強い結合が見られ，PGE_2の作用と相関する結合蛋白の局在が示唆された。従って，このPGE_2結合蛋白が特異的受容体として機能している可能性が考えられる。PG受容体は多くの組織で検出されているが，その分子的性質に関してはほとんど研究がなされていない。精製に関しても，受容体を膜画分で〔^{3}H〕PGとプレラベルし，その後可溶化を行なった例のみいくつか報告されている（2，3，5，6）。しかし，プレラベルした受容体は活性を失っており，分子量以外の分子的性質は全く不明であった。今回我々は，PGE_2結合蛋白をブタ大脳皮質より，活性を保持した形で可溶化することに成功したので報告する。

＜実験方法＞

ブタ脳大脳皮質（約10 g）に対して10倍量の0.32 M Sucrose 溶液（5mM Tris－HCl pH 7.4，20μM Indomethacin，0.1 mM PMSF，0.1 mM Benzethonium chloride，2 mM Benzamidine hydrochloride，1 mM EDTA，0.02％NaN_3を含む)を加えてホモジェナイズし，常法に従いP_2フラクションを調製した。これにCHAPSを終濃度10 mMとなるように添加し，30分間攪拌した後，103,000×g 1時間の遠心分離を行ない，その上清を

可溶化画分として以下の実験に用いた。結合実験は100 mM NaCl を含む 50 mM Tris−−HCl, pH 7. 4(全容 0.2ml)中で可溶化画分(0.2−1.4 mg 蛋白)と 10 nM [^{3}H]PGE_2 を 37°C 1時間反応させた。

氷冷したウシγ−グロブリン(終濃度3 mg/ml)及びポリエチレングリコール(終濃度15%)を加え反応を停止し，5分間放置した後，GF/Bフィルターを通し，8%ポリエチレングリコール4mlで4回洗浄した。その後，フィルターにトラップしたPGE_2量を測定した。非標識PGE_2(100μM)共存下の結合量を非特異的結合として，双方の差を特異的結合量とした。

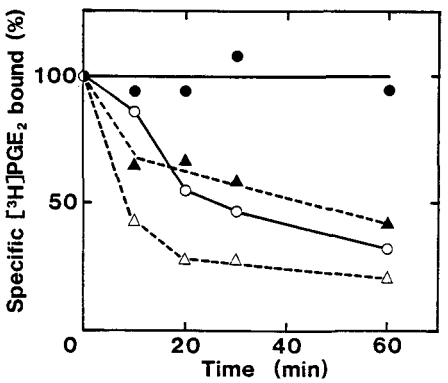


Fig. 1. Time courses of dissociation of [^{3}H]PGE_2 binding. The solubilized (●, ○) and P_2 (▲, △) fractions were incubated with 5 nM [^{3}H]PGE_2. After 5-min (○, △) or 60-min (●, ▲) incubation, the reaction mixture was diluted 10 times with the same buffer and the amount of specific [^{3}H]PGE_2 bound was determined.

＜結果及び考察＞

ラット，ウサギ，ブタ，ウシ，サルの脳を分画し，各部位のP_2フラクションにおけるPGE_2結合活性を調べたところ，ブタ大脳皮質において最も高い値(73 fmol/mg 蛋白)が得られた。サル扁桃体，視床下部，ウシ小脳，ブタ間脳，海馬にも比較的高い結合(30−60 fmol/mg 蛋白)がみられた。ブタ大脳皮質のPGE_2結合活性は主としてシナプス膜に局在していた。ブタ大脳皮質P_2フラクションを用いて可溶化を試みたところ，10 mM CHAPS を用いた場合に最も高い回収率が得られた(約30%)。可溶化画分での特異的PGE_2結合反応は37°C 1時間で平衡に達した。反応液を希釈することによって，結合したPGE_2の解離を調べると，インキュベーション時間に依存した解離反応速度の減少がみられた(Fig. 1)。特に可溶化画分の場合，1時間のインキュベーションで結合したPGE_2は希釈によってほとんど解離しなかった。反応液に10 μM 程度のGTPを添加すると，結合反応の阻害及び解離反応の促進がみられた。

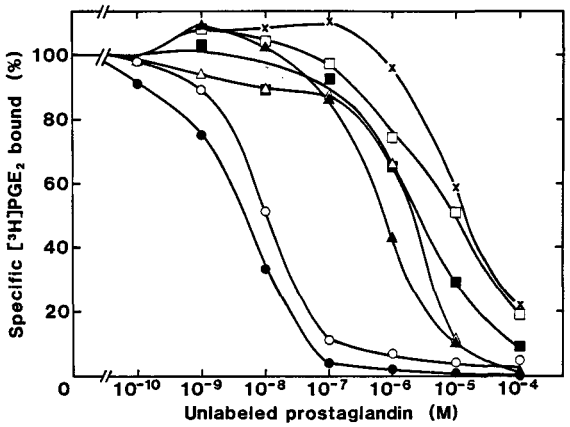


Fig. 2. Specificity of [^{3}H]PGE_2 binding to the solubilized fraction. Inhibition of specific [^{3}H]PGE_2 (5 nM) binding to the solubilized fraction by unlabeled PGs (●, PGE_2; ○, PGE_1; ▲, $PGF_{2\alpha}$; △, PGE_2 methyl ester; ■, PGA_2; □, 13,14-dihydro-15-keto-PGE_2; x, PGD_2) was determined.

結合部位の特異性を調べるために，結合反応に対する非標識PGの阻害をみた結果をFig. 2に示した。この結合反応はPGEに非常に特異的であり，非標識PGによる阻

害の順は次のようであった。$PGE_2 > E_1 \gg F_{2\alpha} > E_2$ methyl ester $> A_2 > 13, 14-$dihydro$-15-$keto$-E_2 > D_2$.

可溶化画分での〔^{3}H〕PGE_2の特異的結合の飽和曲線及びScatchard plotをFig. 3に示した。可溶化画分には高親和性結合部位（$K_d = 2.1$ nM, $B_{max} = 14$ fmol/mg 蛋白）と低親和性結合部位（$K_d = 32$ nM, $B_{max} = 110$ fmol/mg 蛋白）が存在することが判明した。しかし，高親和性部位と低親和性部位の量比は試料によって大きく異なり，高親和性部位のみが観察される場合もみられた。P_2 フラクションでは$K_d = 5-8$ nMの一種類の結合部位のみがみられた。

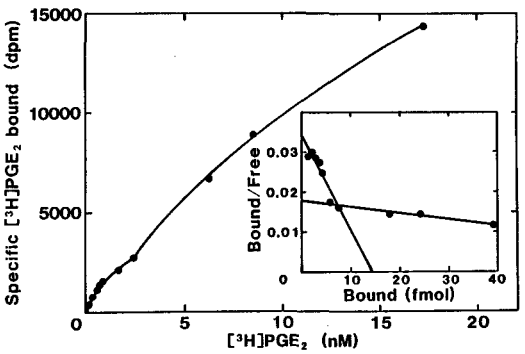


Fig. 3. Saturation profile of specific [^{3}H]PGE_2 binding. (Inset) Scatchard plot

可溶化画分でのPGE_2の特異的結合は100℃，5分間の熱処理で完全に消失したが，非特異的結合は1.4倍増加した。また，この特異的結合は低濃度のトリプシン及びプロティナーゼK処理で大きく減少した。この時同時に非特異的結合の減少もみられた。

可溶化画分を高速液体クロマトグラフィーを用いたイオン交換クロマト及びゲル沪過などを行なうと，特異的PGE_2結合活性が単一ピークを示した。

以上の結果は，この結合蛋白が(i)リガンドに対する高い特異性，(ii)高親和性，(iii)飽和性を満足し，受容体としての性質を備えていることを示している。さらにその結合及び解離反応にGTP感受性がみられたことから，他のホルモン受容体でよく知られている受容体－アデニル酸シクラーゼ系がこの場合にも関与している可能性を示している。

＜文　献＞

1. Cardinali, D. P. et al. (1979) Prostaglandins 18, 577−589.
2. Hammarström, S. et al. (1975) FEBS Lett. 50, 306−310.
3. Kyldén, U. and Hammarström, S. (1980) Eur. J. Biochem. 109, 489−494.
4. Melet, C. et al. (1982) Brain Res. 236, 227−233.
5. Rao, C. V. (1977) Life Sci. 20, 2013−2022.
6. Smigel, M. and Fleischer S. (1977) J. Biol. Chem. 252, 3689−3696.
7. 渡辺ら（1983）神経化学 22, 153−155.
8. Watanabe, Y. et al. (1985) Brain Res. in press.
9. Wolfe, L. S. (1982) J. Neurochem. 38, 1−14.

18. 両生類の変態に伴うミエリン脂質とタンパク質組成の変化

玉井洋一・斉藤信太郎*・小嶋久子・小松　博
（北里大・医・生化，山梨県立中央病院・精神*）

〔要　約〕

両生類の変態過程に伴うミエリンの成熟過程を化学物質の動態から把握することを目的とし，ウシガエル幼生の発生段階毎に，ミエリン性糖脂質の構成糖，脂肪酸，長鎖塩基組成，ミエリンタンパクの電気泳動像およびCNPase活性を調べた。また有尾類のアホロートルについてCMHの構成成分を幼形成熟型と変態型との間で比較した。ウシガエル幼生については1）各脂質成分は変態とともに増加するが，climax stageでplateauに達し，変態終了まで著しい変化はない。2）糖脂質の脂肪酸と長鎖塩基成分は，その最主要成分は成体とほとんど変らず，変態と共に不飽和脂肪酸の割合が増加する傾向にある。ハイドロオキシ酸の割合には顕著な変化はない。3）ミエリンのCNPase活性は変態開始前より検出され，その値は変態終了時と変らず，成体の約2分の1である。4）ミエリンのタンパク組成はLBP様バンドを最主要成分とし，変態の開始前と終期とでほぼ同じパターンであった。アホロートルの幼形成熟型と変態型との間には糖脂質構成成分について顕著な差は見出されなかった。以上の知見は両生類のミエリン成熟が甲状腺ホルモンの直接的な支配を受けていないことを示唆している。

Key word：　myelin proteins, myelin glycolipids, amphibian metamorphosis

脊椎動物神経組織のミエリンを構築する主要な化学物質，糖脂質とミエリンタンパクはミエリンの生理機能に関係があると考えられる。これらの組成は動物の個体発生や系統発生の段階により大きく変化することが知られている（1, 9）。また，ミエリン標識酵素，2', 3'-環状ヌクレオチド3'-リン酸水解酵素（CNPase）の活性は系統発生的には両生類から急激に高くなる（1, 7）。このように，これらの化学物質の動態を解明することはミエリン機能の物質的基礎解明への一資料となるであろう。本研究はこれ迄データの少ない無尾両生類の変態過程における中枢ミエリンの化学成分の変化を明らかにすることを目的とした。また変態という過程を経ずに成熟する有尾両生類について変態成熟の場合と比較した。得られた結果から，変態と神経組織の成熟との関係について考察したので報告する。

実験材料と方法

1. ウシガエル（*Rana catesbeiana*）幼生の脳はTaylorとKollros(10)に従い，表1に示すstageに分けた。アホロートル（*Ambistoma mexicanum*）は札幌医大・森谷常生博士より供興された。

2. 糖脂質の精製と分析　クロロホルム－メタノール混液

表1　カエル幼生の発生に伴う脳の主要化学成分の量的変化

stage	XI～XVI	XVII～XIII	XX～XXI	XXIII	XXIV	XXV	成体**
ミエリンタンパク (μg/g wet weight)					0.47	0.54	
CNPase 活性 (μmol/min/mg protein)	13.1				11.1 (11.3)*	12.7 (16.5)*	21.7
Cholesterol (C) (mg/g wet weight)	7.6				7.2		
Phospholipid (P) (mg/g wet weight)	17.9				17.2		
CMH (μg/g wet weight)	507.9	599.2	958.2	823.7	631.6	787.5	7900
CSE (μg/g wet weight)		106.3	189.2	197.6		182.1	700
P/C	1.17				1.17		1.16
CMH/CSE		5.6	5.1	4.2		4.3	11.3

* 低張処理により精製したミエリンタンパク

で総脂質を抽出後，DEAE－セファローズカラム，イアトロビーズカラム，調製用ＴＬＣなどにより，セレブロシド（CMH），スルファチド（CSE），モノガラクトシルグリセリド（MGG）を単離，精製した。各脂質の定量および構成成分の分析は既報（8）の通りである。

3. ミエリンの調製は既報に従った（4）。ミエリンタンパクの組成はSDS-PAGE（5），CNPase活性（3）はそれぞれ記載の方法に従った。

実験結果と考察

表1にカエル幼生の変態前後を中心とした脳組織の主要化学成分の量的変化を示した。各脂質成分は変態前（XI-XVI）から徐々に増量し，climax stage（XX-XXI）で上限に達し，以後変態終了（XXV）まで漸減する。しかし成熟成体に至るには更にある期間を経て，ミエリンの成熟が行われることが示唆される。この間P/C比，CMH/CSEがほぼ一定に保たれていることがわかる。一方CNPaseは変態開始前よりすでに活性を示し，変態前後での活性値の変化はほとんど見られない。これはカエルの幼生が，水生動物としての単なる系統発生の反復でないことを示す意味で興味深い。

糖脂質の脂肪酸組成を表2に示す。CMHの最主要脂肪酸は各段階とも18:1，24:0，24:1とそのハイドロオキシ型であり，CSEのそれは16:0，18:0，24:0，24:1とそのハイドロオキシ型である。このうち不飽和脂肪酸は変態の進行に伴いわずかに増加の傾向を示すが，長鎖脂肪酸の割合はほとんど一定である。MGGは16:0が50%以上を占めているが，変態に伴いやや減少し，18:1が軽度に

表2　糖脂質の脂肪酸組成（%）

Stage		XVII～XVIII		XX～XXI		XXIII		XXV		成体*	
		NOH	OH	NOH	OH	NOH	OH	NOH	OH	NOH	OH
CMH	16:0	8		5		6		5		5	
	18:0	23	14	20	10	23	14	17	7	12	4
	18:1	3		2		1		2		2	
	20:0	5	7	5	6	8	6	4	8	3	4
	22:0	3	8	4	10	3	9	3	7	2	
	22:1	6		6		5		8		7	3
	23:0				3		tr.		2		
	23:1	1		1		1		1		2	1
	24:0	6	15	12	20	7	16	6	13		1
	24:1	40	57	41	51	43	54	51	62	61	84
	25:1	5		3		3		3		2	
	飽和	45	43	47	49	47	46	34	38	24	11
	不飽和	55	57	53	51	53	54	66	62	76	89
	$<C_{20}$	21	21	16	16	20	20	16	27	8	22
	$>C_{20}$	79	79	84	84	80	80	84	84	92	74
CSE	16:0	23		18		15		15		2	
	18:0	23	27	17	17	23	15	23	16	8	5
	18:1	15		10		8		13		1	
	20:0	6	4	5	2	4	3	4	2	2	4
	22:0	2	4	2	6	2	6	2	4	1	3
	22:1	4		9		4		8		5	3
	23:0										1
	23:1	tr.		tr.						1	
	24:0	4	25	6	17	6	27	4	21	1	8
	24:1	22	40	31	59	35	49	30	57	78	75
	25:1	2		2		2		3		1	2
	飽和	58	60	49	42	50	51	48	43	14	20
	不飽和	43	40	52	59	49	49	54	57	86	80
	$<C_{20}$	67	31	50	20	50	20	54	21	13	20
	$>C_{20}$	34	69	50	80	50	80	46	80	87	80
MGG	14:0	5.4		2.3				2.2		1	
	15:0	2.9		1.1				0.8			
	16:0	61.3		59.7				53.8		58	
	16:1	0.7		1.8				4.5		8	
	17:0	1.4		0.4				0.2			
	18:0	14.3		12.2				9.5		4	
	18:1	3.6		11.1				17.8		19	
	20:0	1.9		2.0				1.2			
	20:1	3.2		6.4				8.3		9	
	22:1	5.3		3.1				1.7		1	
	飽和	87.5		77.7				67.7		63	
	不飽和	12.8		22.4				32.3		37	
	$<C_{20}$	95		97				98.3		99	
	$>C_{20}$	5.3		3.7				1.7		1	

NOH：直鎖脂肪酸，OH：ハイドロオキシ脂肪酸，tr：痕跡

表3　スフィンゴ糖脂質の長鎖塩基組成（%）

Stage		XI～XIV	XVII～XVIII	XXIII	XXIV	成体		
CMH	d16:0	7.4	5.4	2.4	2.7	1.9	3.5*	3.4
	d17:0	tr.	tr.	0.5	0.5	0.5	0.8	0.5
	d18:0	45.8	50.5	51.0	57.5	57.0	28.9	31.7
	d16:1	13.7	13.1	4.1	3.6	4.4	16.6	15.0
	Unidentified	tr.	tr.	2.1	1.6	1.9	4.2	3.7
	d17:1	—	—	0.3	0.3	0.5	0.8	0.9
	iso d18:1	tr.	tr.	—	—	tr.	0.3	0.2
	d18:1	25.7	24.6	38.5	32.3	33.3	44.3	41.8
	iso d19:0	7.3	6.4	0.6	0.2	tr.	tr.	tr.
	anteiso d19:0	—	—	0.5	1.2	0.6	0.5	2.7
CSE	d16:0		3.0	2.4	2.9	4.7	2.0	
	d17:0		0.6	0.5	0.6	1.0	0.2	
	d18:0		53.7	60.5	68.7	46.9	43.3	
	d16:1		6.6	3.7	4.9	5.7	9.3	
	Unidentified		3.3	1.9	2.1	3.1	4.0	
	d17:1		—	0.6	tr.	1.4	0.9	
	iso d18:1		tr.	—	tr.	tr.	0.6	
	d18:1		32.3	28.9	19.6	36.0	38.0	
	iso d19:0		tr.	0.8	—	tr.	1.1	
	anteiso d19:0		0.5	0.7	1.2	1.2	0.7	

増加する。

表4　変態に伴うCMH構成成分の変化（%）

Stage	XI~XIV	XVII~XVIII	XX~XXI	XXIII	XXIV	XXV	成体*
Galactose	83	86	89	91	91	90	98
Glucose	17	15	11	9	9	10	2
NOH FA		71	61	67		60	64
OH FA		29	39	33		40	36

CMHとCSEの長鎖塩基組成（表3）はd18:0，d18:1，d16:1が主要成分である他，成体ですでに検出されている（8）分枝成分がカエル幼生でも検出された。また成体と同様，飽和塩基に富むことが大きな特徴であったが，全体の組成比は変態過程中やや変動した。

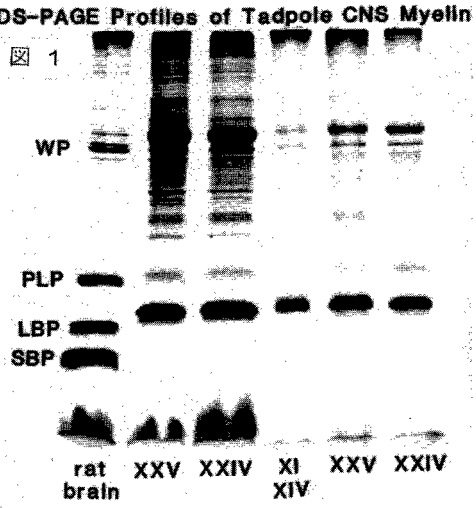


図1

CMH構成成分のうち，Gal/Glc比と脂肪酸のNOH/OH比を検討すると（表4），Glcの割合は変態開始前の17%から変態終了の10%へとわずかではあるが低下して行くことがわかる。OHFAの割合は29%から40%へと増加しているものの，この変化は必ずしも明らかでない。Okamuraらは*Xenopus*ミエリンの糖脂質のNOH/OH比は，変態期間中，一定であると報告している（6）。

図1はミエリンタンパクの電気泳動パターンを示している。すでにカエル中枢ミエリンで報告されているように（1, 7），DM−20はほとんど検出されず，LBP相当バンドは高等動物のそれに比べ移動度が異っている。全体のパターンは変態開始前と変態終期とでほとんど変化が観察されないことが注目される。

有尾類のアホロートルの幼形成熟型（ネオテニー）と変態型との比較は，変態とミエリン化学物質との関係を調べるもう一つのモデルである。糖脂質量は（表5）変態型の方がやや高い。有尾類はハイドロオキシ酸をほとんど含まないという特徴があるのでNOH/OH比を比較することは出来ないが，NOHについて見ると，CMH脂肪酸は24:1が70%を占め，ネオテニーと変態型との間に差はない。長鎖塩基組成についても（表6）両者の間に大きな変化はない。

表5

	CMH	CSE	MGG
		μmol/g 湿組織	
アホロートル 全脳			
幼形成熟	1.7	0.5	0.3
変態成熟	2.8	0.7	0.6

表6

	アホロートル	
	幼形成熟脳	変態成熟脳
長鎖塩基	CMH	CMH
d16:0	8	5
d17:0	痕跡	痕跡
d18:0	71	82
d16:1	6	2
Unident.	1	3
d17:1	−	−
iso d18:1	−	−
d18:1	13	7
その他	−	−

高等動物ではミエリン形成や脂肪酸のα−水酸化が甲状腺ホルモンにより促進されることが知られている（2）。ウシガエル幼生では血中甲状腺ホルモン量は変態開始前は極微量で変態始動期のXVより増加し，XXからXXVにかけて最大となることが知られている。これらの事実と甲状腺機能の欠如しているアホロートルの場合とを考えると，両生類の場合にはミエリン成熟は甲状腺ホルモンを必須の因子とはしていないことが示唆された。

REFERENCES 1. Franz, Y. et al. (1981) Brain Res. 226, 245-258. 2. Kishimito, Y. et al. (1979) Mol. Cell. Biochem. 28, 1-3. 3. Nishizawa, Y. et al. (1980) Biochem. J. 191, 71-82. 4. Norton, W.T. & Poduslo, S.E. (1973) J. Neurochem. 21, 749-757. 5. Laemmli, U.K. (1970) Nature 227, 680. 6. Okamura, N. & Kishimoto, Y. (1983) J. Biol. Chem. 258, 12243-12246. 7. Saito, S. et al. (1981) Proc. Japan. Neurochem. Soc. 20, 192-195. 8. Saito, S. & Tamai, Y. (1983) J. Neurochem. 41, 737-744. 9. Tamai, Y. (1982) Shinkei-Seishin-Yakuri 4, 785-795. 10. Taylor A.C. & Kollros, J.J. (1946) Anat. Rec. 94, 7-18.

19. 2′:3′-環状ヌクレオチド3′-フォスフォジエステラーゼのcDNAクローニング

栗原　正・高橋康夫　　（新潟大・脳研・神経薬理）

〔要　約〕

2′: 3′－環状ヌクレオチド3′－フォスフォジエステラーゼ（CNP）（EC 3.1.4.37）は中枢神経系ミエリン及びオリゴデンドログリア細胞のマーカーとして知られているが，一次構造はまだ解明されず，cDNAクローニングについてもまだ報告がない。我々は，エラスターゼで可溶化したウシCNPのC末端領域のアミノ酸配列に基づいて17マーのオリゴデオキシヌクレオチドを化学的に合成し，これをプローブにしてウシ脳cDNAライブラリーをスクリーニングした。その結果，cDNAライブラリー2×10^4クローンの中に陽性クローンが1個見いだされた。このクローンのcDNAは全長1250bpで，そのうち90bpがエラスターゼ可溶化ウシCNPのC末端30アミノ酸残基に対応していた。終結コドンは更に45bp下流にあり，ここが無傷のCNPのC末端であると推定された。このcDNAをポリA^+ RNAのノーザン・ブロットとハイブリッド形成させて，mRNAの長さを測定したところ，約3kbであった。

Key word：　2′: 3′- Cyclic nucleotide 3′- phosphodiesterase
cDNA cloning

2′: 3′－環状ヌクレオチド3′－フォスフォジエステラーゼ（CNP）（EC 3.1.4.37）は中枢神経系ミエリン及びオリゴデンドログリア細胞のマーカーとして知られているが，CNPタンパクの一次構造はまだ解明されていない。またCNPのcDNAクローニングについてもまだ報告がない。我々は，エラスターゼで可溶化したウシCNPのC末端領域のアミノ酸配列に基づいてオリゴデオキシヌクレオチドを化学的に合成し，ウシcDNAライブラリーをスクリーニングしたところ，CNPのcDNAクローンを見いだすことができたのでここに報告する。

〔実験方法〕

ポリA^+ RNAは，1才半のウシ小脳のミクロゾーム画分からSDS／フェノール／クロロホルム法又はグアニジニウムチオシアネート法でえたRNAを，オリゴdTセルロースに吸着溶離させて調製した。ウシ脳は屠殺後直ちに取り出してもらい，氷につけて実験室まで運んだが，屠殺後30分以内に遠心分画のためのホモジナイズを始めることができた。ポリA^+RNAからLandら（1981）の方法で両端にCテイルがついた2本鎖cDNAを調製しpBR 322のPst I部位に挿入した。cDNAライブラリーは大腸菌DH 1株で作製した。エラスターゼで可溶化したウシ脳CNP（西沢ら1980，栗原ら1981）のC末端領域のアミノ酸配列（栗原正・A. V. Fowler，未発表）に基づいて17マーのオリゴデオキシヌクレオチド2種を化学的に合成し，cDNAライブラリーをスクリーニングするためのプローブとした。両プローブとも32通りの可能なcDNA配列からなる混合物である。合成プローブは5′末端を^{32}Pで標識し，

ニトロセルロースフィルター上でアルカリ変性・固定したコロニーDNAと39℃でハイブリッド形成させ，オートラジオグラフィーで陽性クローンを検出した。cDNA断片のサザン・ブロットと合成プローブとのハイブリッド形成も同じ条件で行った。ノーザン・ブロッティングおよびハイブリッド形成はThomas（1980）に従った。プローブのPstⅠ断片750 bpはニックトランスレイションで^{32}P標識した。

〔実験結果及び考察〕

ウシ小脳cDNAライブラリー2×10^4クローンを図1のようにスクリーニングしたところ，2つの合成プローブの両方に反応するクローンが1個見いだされた。図2はこのクローンのcDNA制限地図の概略で，PstⅠ切断で750 bpと500 bpのcDNA断片が，HindⅢ切断でcDNA 320 bpを含む1100 bpがプラスミドから切り出された（図3a）。合成プローブによるサザン・ハイブリッド形成（図3b）ではPstⅠ断片750 bpとHindⅢ断片1100 bpが反応し，図2の制限地図でHindⅢから左側の320 bpにプローブに反応する配列が存在することがわかった。そこでこの320 bpの塩基配列を図4のように右側方向から決定した。その結果，GCテイルからFnu4HⅠの左側までの90 bpが，エラスターゼ可溶化CNPのC末端30アミノ酸残基に対応していた（図4）。エラスターゼ可溶化CNPのC末端はFnu4HⅠ部位の手前で終わっており，終結コドンは更に45 bp下流のDdeⅠ部位にあった。エラスターゼ可溶化CNPのC末端と終結コドンの間には15アミノ酸残基に相当する塩基配列があって，上述の30アミノ酸残基にこれを加えた45アミノ酸残基が無傷のCNPのC末端部分であると推定される。今回見いだされたcDNAクローンは全長1250 bpであったが，そのうち135 bpのみがCNPタンパクのC末端部分に対応していて，大部分はmRNAの3′非翻訳領域に相当すると考えられる。図5はPstⅠ切断750 bpをプローブにしてポリA^+RNAのノーザン・ブロットとハイブリッド形成させたものである。CNPのmRNAは約3 kbと算定された。ラットのポリA^+ RNAは反応せず，少なくとも用いたプローブの領域ではラットのCNPとはmRNA配列がかなり異なっていると推定された。

〔文献〕

T. Kurihara, Y. Nishizawa, Y. Takahashi and S. Odani (1981) Biochem. J. 195, 153–157.

H. Land, M. Grez, H. Hauser, W. Lindenmaier and G. Schütz (1981) Nucleic Acids Res. 9, 2251–2266.

Y. Nishizawa, T. Kurihara and Y. Takahashi (1980) Biochem. J. 191, 71–82.

P. S. Thomas (1980) Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A. 77, 5201–5205.

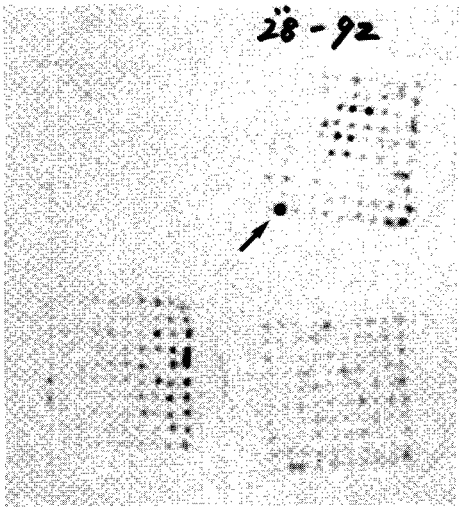


図1　スクリーニング
陽性コロニー（矢印）を寒天プレートにまきなおし，単一コロニーをひろって再び合成プローブとハイブリッド形成をさせて単一クローンによる反応であることを確認した。

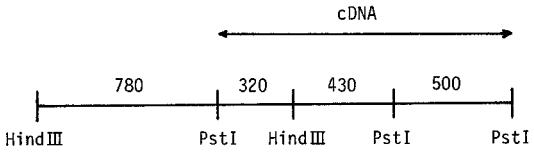


図2　cDNAの制限地図

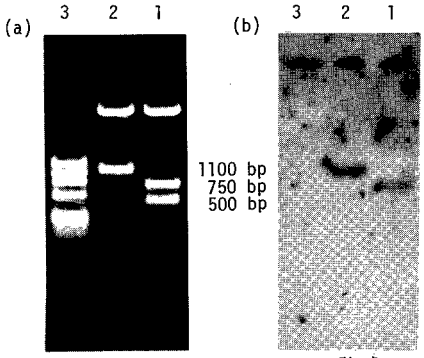


図3　サザン・ハイブリッド形成
a　電気泳動ゲル　b　サザン・ブロット
1 PstⅠ断片　2 HindⅢ断片　3 マーカー

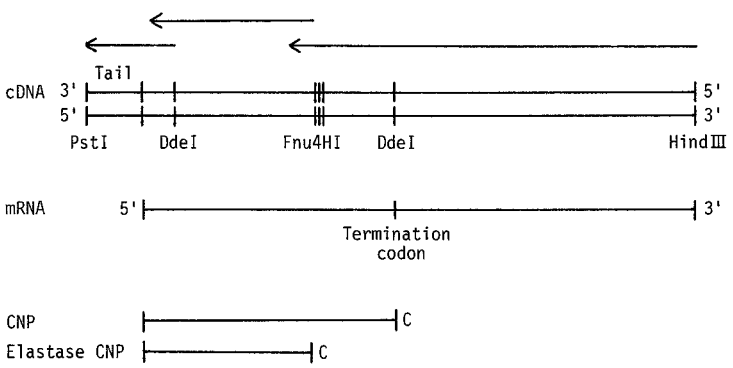


図4　合成プローブに反応した320bpの制限地図およびCNPとの対応
Fnu4HⅠ部位は3箇所重なって存在する。矢印の方向にcDNAの塩基配列を決定した（Maxam-Gilbert法）。

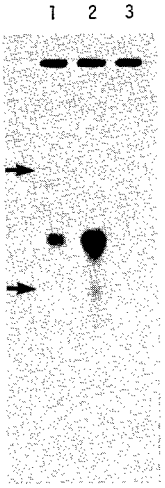


図5　ノーザン・ハイブリッド形成
1　ウシ小脳ポリA^+RNA 2.5 μg
2　同 5 μg
3　ラット全脳ポリA^+RNA 5 μg
矢印は28S RNAと18S RNAの位置を示す。

20. モノクロナール抗体による中枢神経系及び末梢神経系 CNPase の免疫組織化学的検索

藤城正敏・高坂新一・長池一博・塚田裕三
(慶応大・医・生理)

〔要　約〕

ミエリンの生化学的指標酵素である2′, 3′－cyclic nucleotide 3′－phosphodiesterase (CNPase)に対するモノクロナール抗体を作製し，生化学的，免疫組織化学的検討を行った。牛脳白質より部分精製したCNPaseを抗原として，Lewisラットを免疫した後，ラット－マウスハイブリドーマよりCNPaseモノクロナール抗体を作製した。得られたモノクロナール抗体は以下の性質を有していた。

1). モノクロナール抗体は特異的にCNPase分子と結合するが，CNPase活性に対する抑制効果はみられなかった。

2). イムノブロッティングの結果，Wolfgramタンパクのdoublet W1a，W1bの両者が特異的に認識された。　3). モノクロナール抗体はIgG_{2c}クラスに属していた。

4). 免疫組識化学的検索により，ウシ・マウス・ラット及びヒトの中枢神経系のミエリンが強く染色されたが，ウシ末梢神経系では染色されなかった。ウシの網膜では，視神経は強く染色されたが，網膜は全く染色されなかった。以上のことから，CNPase分子は中枢神経系と末梢神経系において，異なるアミノ酸組成を有しているか，あるいは立体構造に差異があることが示唆された。

Key word：　Monoclonal antibody, 2′, 3′－Cyclic nucleotide 3′－phosphodiesterase, Myelin.

2′, 3′－Cyclic nucleotide 3′－phosphodiesterase (CNPase)は，中枢神経系のミエリンに高濃度に局在していることが報告されている[1]。Drummond & Dean (1980)[2], Sprinkle et al (1983)[3], Kurihara & Takahashi (1984)[4]は，CNPase分子とWolfgramタンパクのdoubletとの関係を，アミノ酸組成ならびにポリクロナール抗体により免疫生化学的に検討してきた。しかしながら中枢神経系及び末梢神経系のCNPaseの差異についてはほとんど解析されていない。第62回生理学会大会で一部報告したように，CNPaseに対するモノクロナール抗体を作製し，中枢神経系及び末梢神経系のCNPaseについて免疫組織化学的に検索した。

＜実　験　方　法＞

CNPaseは，Suda & Tsukada (1980)[5]の方法に準じて，部分精製した。

モノクロナール抗体の作製：Lewisラットに100 μg proteinの部分精製CNPaseをcomplete Freund's adjuvantと共に，2週間毎に3回腹腔内投与した。最終免疫より3日後に，ラットよりspleen cellを摘出し，マウスミエローマSP2/0－Ag14と，常法に従い細胞融合させ，HAT選択後，クローニングを重ね，抗CNPaseモノクロナール抗体を作製した。スクリーニングは，1). anti-rat IgGを用いたELISA，2). 牛脳白質パラフィン切片による免疫組織化学，3). ウシミエリン分画のイムノブロッティング，4). CNPase活性を指標としたBinding assayを行い，最終的にCNPaseに対するモノクロナール抗体であることを同定した。

1). ELISA：Goat anti－rat IgG (50 μg / ml)を96ウェルプレートに50 μl/wellで4℃，一晩吸着，5％BSA－PBSでブロッキング後，培養上清を50 μl/wellで60 min,

室温で反応させた。HRP conjugated anti－rat IgG（1：2000）50 μl/well を，更に反応させ，呈色反応は0－フェニレンジアミンを用い，イムノリーダーNJ－2000 で吸光度を測定した。

2）．免疫組織化学：ウシ脳・末梢神経・網膜は10％ホルマリンもしくは，4％パラホルムアルデヒドで固定後，パラフィン切片を作製し，Sternberger[6]らの方法に準じてPAP染色した。

3）．ウシミエリン分画のイムノブロッティング：ミエリン分画は，Whittaker & Baker（1972）の方法[7]に準じて行った。10～20％－SDS－PAGEは，Laemmliの方法[8]に準じて行い，イムノブロッティングは，Towbinらの方法[9]に従った。

4）．Binding assay：anti－rat IgG（50μg/ml）/炭酸buffer（pH 9.6）を48ウェルプレート（100 μl/well）に4℃，一晩吸着させ，5％BSAでブロッキング後，培養上清100 μl を入れ，2 hr.室温でインキュベートした。コントロールとして，rat IgGを使用した。更に，100 μl の部分精製CNPase（30 μg/ml protein）を37℃，2 hr，インキュベートした後，プレート内で，直接酸素反応をTsukadaらの方法に従って行い，活性を測定した。タンパク量は，Lowry法[10]に従い行った。

モノクロナール抗体のサブクラスの同定：オクタロニー法[11]により，rat IgM，IgG_1，IgG_{2a}，IgG_{2b}，IgG_{2c} サブクラスに対する抗血清を用いて同定した。

＜ 結果及び考察 ＞

Fig 1－b に示した如く，プレート上でのBinding assayでは，モノクロナール抗体がCNPase分子と特異的に結合することが示された。しかしながら，部分精製CNPaseとモノクロナール抗体をミックスさせただけではCNPase活性には全く変化は見られなかった（Fig 1－a）。Kohsaka et al[12]は，ウシCNPase抗血清を用いて，免疫沈降反応を行っているが，今回の場合と同様，酵素活性を抑制しなかったことを報告している。従って，CNPaseの活性部位に対する抗体は極めて形成されにくいものと考えられた。イムノブロッティングにより，Fig2

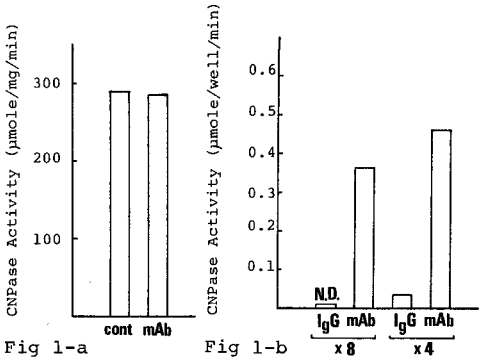


Fig 1-a　　Fig 1-b

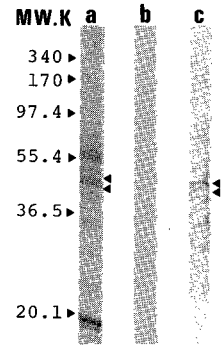


Fig 2
a: Amino Black staining
b: Control culture medium
c: Monoclonal antibody

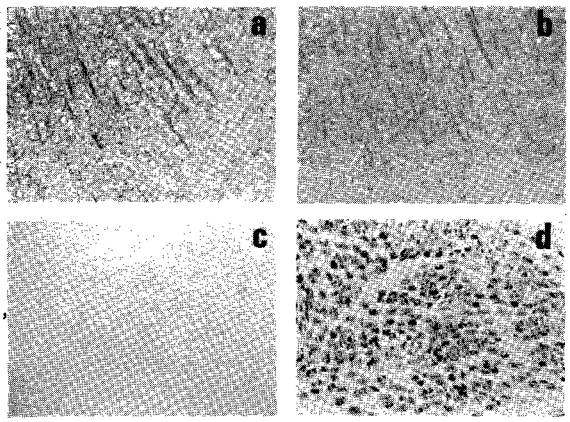


Fig 3　Bovine CNS & PNS myelin
a: CNS Monoclonal antibody
b: CNS Polyclonal antibody
c: PNS Monoclonal antibody
d: PNS Polyclonal antibody

に示した如く，Wolfgram タンパクの doublet W1a，W1b がそれぞれ，モノクロナール抗体により染色された。Drummond & Dean[2]，Sprinkle et al[3]，Kurihara & Takahashi[4]は，Wolfgram タンパクの doublet が，アミノ酸組成ならびに，免疫学的にも，非常に類似していると報告しているが，今回我々の作製したモノクロナール抗体でも，W1a（CNa），W1b（CNb）を識別することができなかったところからも，この doublet タンパクは，ほとんど同一の分子構造を有することが考えられた。

次に，免疫組織化学的にCNPase分子の局在を検索した。Fig 3 に示した如く，ウシ中枢神経系のミエリンは，ポリクロナール抗体ならびにモノクロナール抗体いずれにおいても陽性反応を示した。末梢神経では，ポリクロナール抗体を用いると弱いながらも，陽性反応を示したが，モノクロナール抗体では全く反応を示さなかった。Sprinkle et al（1983）[3]は末梢ミエリンのイムノブロッティングによる解析から，CNPase ポリクロナール抗体と反応する分子は，中枢ミエリンのCNPase 分子よりも，高分子であると報告している。従って我々の作製したCNPase モノクロナール抗体は，中枢神経系に局在するCNPase 分子を特異的に認識していることが考えられた。また，ウシ網膜系を同様に染色してみると，Fig 4 に示した如く，視神経はポリクロナール抗体同様，モノクロナール抗体でも強い陽性反応を示すが，網膜は全く染色されなかった。Giulian（1980）[13]，Giulian & Moore（1980）[14]は，金魚網膜の photoreceptor layer と optic nerve fiber layer に高CNPase 活性を報告している。また，Nishizawa（1982）[15]，Kohsaka（1983）[12]は，免疫組織化学的にこれを証明した。今回得られたモノクロナール抗体での結果は，網膜内CNPase 分子と中枢神経系のCNPase 分子の間には，microhetrogenityが存在する可能性を示唆するものである。

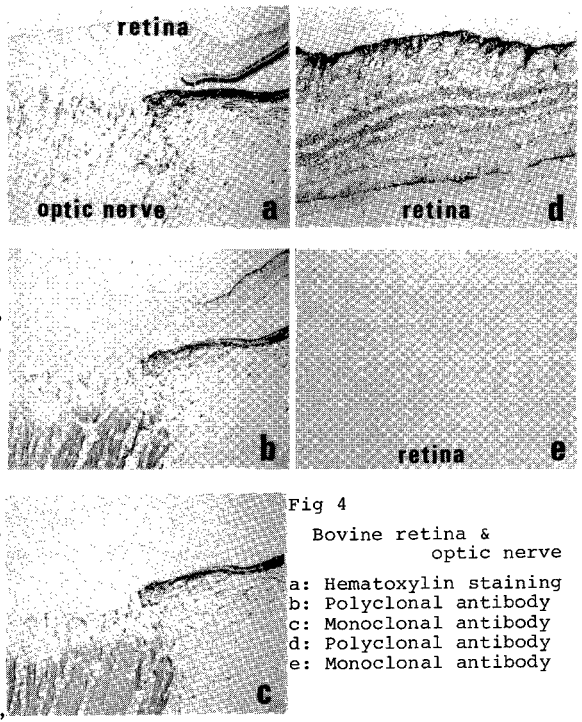


Fig 4
Bovine retina & optic nerve
a: Hematoxylin staining
b: Polyclonal antibody
c: Monoclonal antibody
d: Polyclonal antibody
e: Monoclonal antibody

＜ 文　　献 ＞

1) Kurihara T. & Tsukada Y. (1967) J. Neurochem. 14.1167. 2) Drummond R.J. & Dean G. (1980) J. Neurochem. 35.1155. 3) Sprinkle T.J. et al (1983) J. Neurochem. 41.1664. 4) Kurihara T. & Takahashi Y. (1984) 神経化学 41.225. 5) Suda H. & Tsukada Y. (1980) J. Neurochem. 34.941. 6) Sternberger L.A et al (1970) J. Histochem. Cytochem. 18.315. 7) Whittaker V.P. & Baker L.A. (1972) Methods of Neurochem. vol2 1-52 8) Laemmli U.K. (1970) Nature 227. 680. 9) Towbin H. et al (1979) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 76. 4350. 10) Lowry O.H. et al (1951) J. Biol. Chem. 193. 265. 11) Ouchterlony O. (1962) Progress in Allergy volVI 30-154 12) Kohsaka S. et al (1983) J. Neurochem. 41. 434. 13) Giulian D. (1980) Brain Res. 189. 135. 14) Giulian D. & Moore S. (1980) J. Biol. Chem. 255. 5993. 15) Nishizawa Y. et al (1982) Brain Res. 251. 384.

21. マウスにおけるβ-phenylethylamine 誘発行動発現機序の検討

多賀千明・辻　元宏・高橋三郎　　(滋賀医大・精神神経)

〔要　約〕

β－phenylethylamine(ＰＥＡ) 50mg/kg を、マウス腹腔内に投与後、行動変化と、脳内ＰＥＡ濃度、major amines 及びその代謝物濃度を測定し、それらの関連性からＰＥＡ誘発行動発現機序に関する考察を行なった。ＰＥＡ脳内濃度は、投与後7.5分で最大値10750±919ng/g(初期値4.6±1.2ng/g)を示し、30分で初期値に戻った。誘発行動のうち、head movement はＰＥＡ脳内濃度と相関する著明な増大を示し、exploratory activity も4~7分に有意な($p<0.01$)増加を示した。Dopamine (ＤＡ)、serotonin (５ＨＴ)は減少傾向を示すものの著明な変化がみられなかった。一方、homovanillic acid (ＨＶＡ)、3-methoxy-4-hydroxyphenylglycol (ＭＯＰＥＧ)、5-hydroxyindoleacetic acid (５ＨＩＡＡ) は、30~60分で有意な($p<0.01$)増大を示し、それぞれの増加率は、177%、44%、115% であった。3,4-dihydroxyphenylacetic acid (ＤＯＰＡＣ) は、5分で有意な減少($p<0.01$)を示した後、徐々に増大し、30分で、56%の増加を示した。以上の結果から、ＰＥＡ誘発行動発現機序として、①ＰＥＡの直接作用に基づく、②ＤＯＰＡＣの減少と関連して、ＰＥＡがＤＡ reuptake 阻害しシナプス間隙のＤＡを上昇させることに基づく可能性を示唆した。

Key word : β-phenylethylamine,　stereotyped behavior
biogenic amines and its metabolites

β-phenylethylamine (ＰＥＡ) は、微量アミンの一種で、amphetamineやmethamphetamine (ＭＡＰ) との化学構造類似性から、精神疾患の病因物質として議論されている(1)。著者らはＭＡＰ投与によるマウス、ラットの行動特性を検討してきた(7,8)が、ＭＡＰにより惹起される行動特性とＰＥＡによるそれとは、類似性がみられる。今回ＰＥＡにより惹起される行動特性が、ＰＥＡの直接作用によるものか、又は、その他の神経伝達物質を介して行なわれるか否かを検討する目的で、ＰＥＡ腹腔内投与後、誘発行動に関与すると考えられる脳内ＰＥＡ濃度、major amines 及びその代謝物濃度を経時的に測定したので報告する。

＜実験方法＞

実験は、Ｌ：Ｄ＝12:12で飼育したＪＣＬ－ＩＣＲ系15週令雄性マウス(40-45g)を用いた。またＰＥＡ投与は、予備実験で最も行動変化を明瞭に観察できた50mg/kgを腹腔内投与で行なった。

1)行動実験－Ellinwoodらの評価尺度(2)を参考にし、exploratory activity, sniffing, head movementの３項目について調べた。ＰＥＡ投与群とsaline 投与群(各６匹)の２群を比較し、exploratory activity は Automex(コロンバス製)にて測定し、sniffing, head movmentは、２点（著しい）、１点（あり）、０点（なし）の３段階評価にて毎分ごと測定した。

2) ＰＥＡ脳内濃度測定実験－ＰＥＡ投与後、0, 2.5, 5, 7.5, 10, 15, 20, 25, 30, 60分に各時刻６匹ずつ断頭後、全脳を摘出し、ＨＰＬＣ－ＦＤによる方法 (8,9)を用い測定した。

３）Major amines及びその代謝物測定実験－ＰＥＡ投与後、0，5，15，30，60，120，360分に、各時刻６匹ずつ断頭後、全脳摘出を行ない、dopamine（ＤＡ）、serotonin（５ＨＴ）、3,4-dihydroxyphenylacetic acid（ＤＯＰＡＣ）、3-methoxy-4-hydroxy-phenylglycol（ＭＯＰＥＧ）、5-hydroxyindoleacetic acid（５ＨＩＡＡ）の６種を、ＨＰＬＣ－ＥＣＤによる同時定量法(5)により測定した。

＜結果＞

１）行動実験－Exploratory activity は、ＰＥＡ投与群がsaline群に比し、投与後4~7分に有意な($p<0.01$)増加を示した。Head movement は、saline投与群では全くみられなかったが、ＰＥＡ投与群では投与後 2分より徐々に上昇し、5~9分で著明な増大を示した。その後、徐々に減少し、30分で消失した。Sniffing は、ＰＥＡ投与群とsaline投与群との間に有意差がみられなかった。

２）ＰＥＡ脳内濃度測定実験－結果をFig.1 に示した。脳内ＰＥＡ濃度は、投与前 4.6 ± 1.2ng/g(mean±S.E.M.)であったが、投与後7.5分で最大値10750±919ng/gに達した。以後急速に減衰し、30分で投与前値に戻った。みかけの半減期は、 $t_{1/2}=5.5$min.であった。

３）Major amines 及びその代謝物測定実験－結果をFig.2,3,4 に示した。ＤＡは、投与後 5分より減少し、30，60分にて有意な($P<0.05$)減少を認め、60分における減少率は、13%であった。ＤＯＰＡＣは、投与後 5分に有意な($P<0.01$)減少を示した後、徐々に増加し、30，60分($P<0.01$)及び120分($P<0.05$)に有意な増加を示した。ＨＶＡは、投与後15分より有意な($P<0.01$)増加を示し、60分には177%の増加をした。

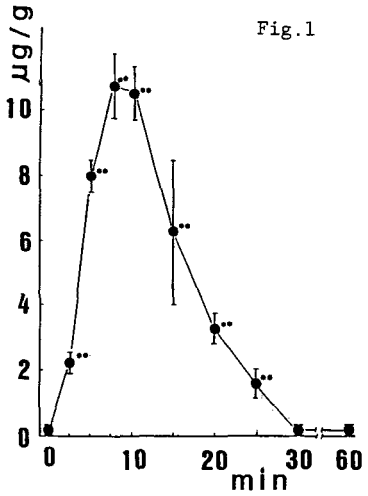


Fig.1

Concentration of PEA in brain after an injection of 50mg/kg i.p. Each point represents mean ± S.E.M. **:$p<0.01$ when compared with its control. (Student's t-test)

ＭＯＰＥＧは、投与後30分に最大値を示し、その増加率は44%であった。５ＨＴは、投与後15分より減少を始め、30分にて8%の減少を示したが有意差は認められなかった。５ＨＩＡＡは、投与後15分より上昇を始め、60分には115%の増加を示した。

＜考察＞

ＰＥＡ投与後の行動変化と、モノアミン及びその代謝物の変化について多くの報告(3,4)があるが、脳内ＰＥＡ濃度変化との関連について総括的に考察した報告は、いまだにみられない。著者らの実験結果では、ＰＥＡ脳内濃度は、投与後7.5分で最大値に達した。ＰＥＡ誘発行動特性のうち、exploratoy activity が4~7分で、head movement が5~9分で著明な増大を示した。しかし、ＤＡ，５ＨＴは、5~60分で減少傾向にあるものの著明は変化はなく、代謝物のＭＯＰＥＧ，５ＨＩＡＡ，ＨＶＡは有意な($p<0.01$)増大を示し、30~60分で最大値に達した。またＤＯＰＡＣは、5分で有意な($p<0.01$)減少を示し、15分で初期値に戻り以後増加した。

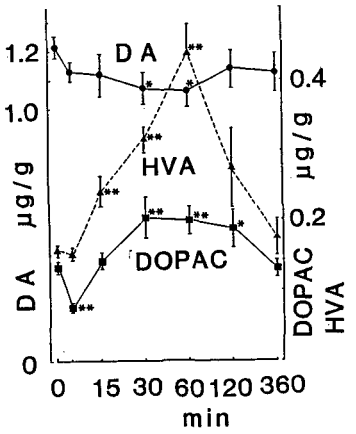


Fig.2

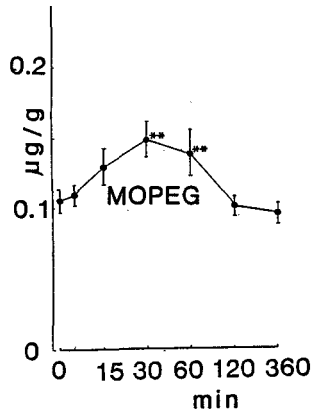


Fig.3

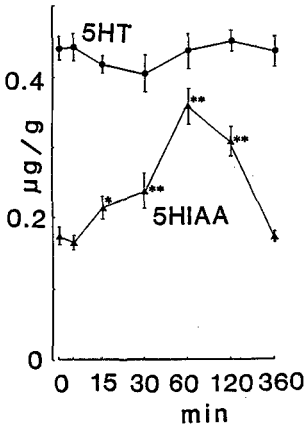


Fig.4

**:p<0.01 *:p<0.05 when compared with its control. (Student's t-test)

このことから、ＤＯＰＡＣの５分値での減少が、ＰＥＡ脳内高濃度によるＤＡ reuptake阻害によりもたらされたと推論すれば、ＰＥＡ誘発行動がシナプス間隙のＤＡの上昇により二次的にもたらされたという可能性はあるが、その直接的証拠はない。むしろＰＥＡ脳内濃度と、その誘発行動特性とが、強い相関を示すことから、ＰＥＡの直接作用により行動が誘発される可能性を示唆している。

＜文献＞

(1) Edwards, D.J. and Antelman, S.M. (1978) Noncatecholic phenylethylamine, part 1 (Mosnaim, A.D. and Wolf, M.E., ed), 21-46, Marcel Dekker, Inc. New York and Basel

(2) Ellinwood, E.H.Jr. and Balster, R.L.(1974) Eur. J. Pharmacol. 28, 35-41

(3) Jackson, D.M. and Smythe, D.B.(1973) Neuropharmacology, 12:663-668

(4) Jonsson, J., Grobecker, H. and Holtz, P. (1966) Life Science, 5: 2235-2246

(5) 唐沢忠彦；未発表

(6) 大井健、辻元宏、多賀千明、高橋三郎(1984)アルコール研究と薬物依存、19-4 Supple., 272-273

(7) 多賀千明、辻元宏、大井健、山田尚登、高橋三郎、増田義信、唐沢忠彦、門河敏明 (1984) 薬物・精神・行動 4:221-229

(8) 辻元宏、大井健、多賀千明、明神徹郎、高橋三郎(1984) 神経化学 23, 57-59

(9) Tsuji, M., Ohi, K., Taga, C., Myojin, T. and Takahashi, S. ; Anal. Biochem. (in press)

（なお本研究の一部は昭和６０年度文部省科学研究費奨励研究（Ａ）＃６０７７０８６９の助成によった。）

22. マウス脳の個体発生における β-phenylethylamine の変化

明神徹郎・大井　健・辻　元宏・高橋三郎
（滋賀医大・精神神経）

〔要　約〕

β-Phenylethylamine（ＰＥＡ）は微量アミンの一種であるが、その生理的役割は十分に解明されていない。著者らはその脳内での役割を明らかにする目的で、脳の分化・成長に伴うＰＥＡとその代謝酵素であるＭＡＯ活性の関連を検索した。その結果ＰＥＡは胎生16日より増加し、胎生20日で最大（成熟マウスの約25倍）となり、その後急速に減少して、生後２週齢で成熟マウスと同じレベルになった。ＰＥＡの代謝酵素であるＭＡＯ活性は、胎生期ほとんど変化なかった。一方生後２日目までにみられるＰＥＡの減少は、ＭＡＯ-Ｂ活性の増加に先んじていた。出生日のマウスと成熟マウスの脳について、それぞれ細胞分画を行ったが、両者のＰＥＡのP_2分画中での分布比は一定で、共にP_2Ｂ分画に有意に高く、約60%の高値を示したが、これはＭＡＯ活性の変化とは関連しなかった。胎生期16日目より生後１日目までに、脳内で多量のＰＥＡが見られ、主としてP_2Ｂつまりシナプトゾーム分画に出現しており、その機能が注目される。

Key word：　β-phenylethylamine(PEA), MAO, Ontogeny

β-Phenylethylamine(ＰＥＡ)は、Phenylalanineの脱炭酸によって生成される生理活性アミンで、1963年に哺乳類の脳内に発見されて以後、多くの種の神経組織内でその存在が確かめられてきた。系統発生学的にもOctopus, snail, locustなどの神経組織で存在が確かめられており、そのＰＥＡの機能について、多くの推察がなされている。今回、その生理的役割を明かにする目的で、特に脳におけるＰＥＡの存在を固体発生学的に考えるために、脳の発生・分化・成長に伴うＰＥＡとその代謝酵素であるmonoamine oxidase（ＭＡＯ）活性との関連を検索した。

＜方法＞

1) 標本の作製：成熟した雌のＩＣＲ-ＪＣＬ系マウスを交配し、妊娠14,15,16,17,18,20日に断頭し、ただちに胎仔脳を取り出した。出生後のマウスについても同様に全脳を摘出し、これを用いた。

2) ＰＥＡ分画の作製と定量：辻らの方法(4)で、10%ＴＣＡでホモジェナイズしDowex-50x8, 200~400 mesh, Amberlite ＣＧ50,100-200を用いて分画して、高速液体クロマトグラフィーで定量した。

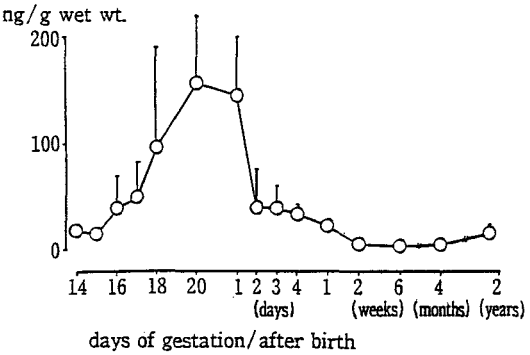
3) 細胞分画：操作はすべて低温室で行い、Whittakerらの方法(5)を一部変更して用いた。

4) ＭＡＯの定量：Axelrodの方法(6)を一部変更して用いた。β-phenylethylamine, serotonin, tryptamine を基質として用いて、Phosphate buffer (pH:7.4)中で37℃で30分間反応させて、抽出後液体シンチレーションカウンターを用いて測定した。

5) 蛋白の定量:Lowryの方法(2)で測定した。

＜結果＞

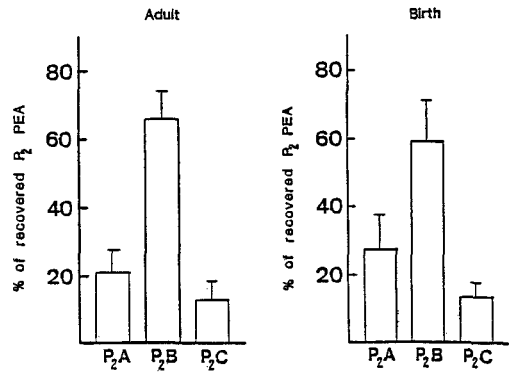
図１に、胎生14日から生後２年齢までのマウスの全脳ＰＥＡ量を示した。それによると、胎生14、15日のＰＥＡ量には変化がないが、胎生16日より増加しはじめ、胎生20日で最大量 150.5±78.3ng/g wet wt. となり、これは成熟した４ヶ月齢のマウス (6.2±3.5 ng/g wet wt.)の約25倍であった。これは出生後に急速に減少し、生後２週齢のＰＥＡ量は5.8±3.9 ng/g wet wt.でほぼ成熟マウスの量に落ちついていた。



β-phenylethylamine in mouse brain during ontogeny. Each plot represents mean value±SD for 8 animals.

＜図１＞

出生日と出生後４ヶ月齢のマウスについて細胞分画を行いP_2分画におけるＰＥＡの分布に両者の間で差がなく、P_2-ＰＥＡの約60%がP_2B分画に存在する事を得たが、これを図2に示した。P_2-ＰＥＡの約60%がP_2B分画に存在する事はBoultonらの報告(1)と一致した。つぎにＭＡＯ活性の変化を図3に示した。ＭＡＯ活性は胎生期に顕著な変化を示さなかったが、Serotonin (5-HT)を基質とするＭＡＯ-Ａ活性は出生後より急速に増加し、生後２週間で成熟マウスと同じレベルになった。一方ＰＥＡを基質とするＭＡＯ-Ｂ活性は、出生３日目以後に増加する傾向を認めたが、その増加はＭＡＯ-Ａ活性のそれと比べ、緩徐で、生後２週齢のＭＡＯ-Ｂ活性は成熟マウスの50%しかなかった。なお、ＭＡＯ-Ｂ活性の増加は生後６週齢まで続いた。細胞分画における５-ＨＴ，ＰＥＡ，Tryptamineを基質としたＭＡＯ活性の結果は表1に示したように、出生日のマウス脳と成熟マウス脳の両方で$P_2C>P_2B>P_2A$の順で高い活性値を示した。P_2AではP_2B,P_2Cに比べて、著しく活性は低かった。出生日のマウスと成熟マウスの比較では、ＰＥＡを基質とするＭＡＯ-Ｂ活性は、出生日のマウスで著しく低く、P_2B分画では成熟マウスの41%で、P_2C分画では22%であった。一方、Serotonin やTryptamineを基質にした場合にはP_2B,P_2C分画で、それぞれ65~80%の活性を示した。



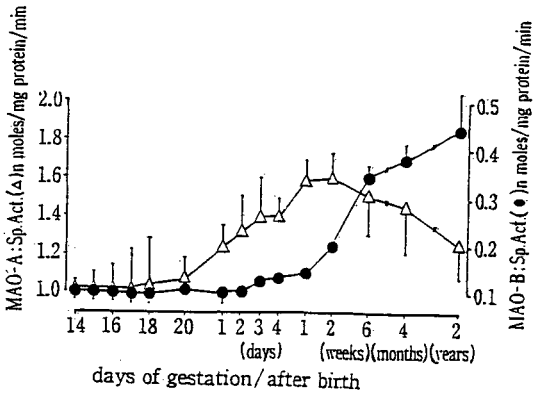
＜図２＞

＜考察＞

哺乳動物の脳におけるＰＥＡの存在を個体発生学的に考えたが、胎生期のＰＥＡの増加の時期に、ＰＥＡの異化に重要な酵素であるＭＡＯは、ほとんど変化していなかった。

又、出生日のマウスでＰＥＡのP_2分画中での分布はほぼ同じで、ＭＡＯ-Ｂ活性分布の変化とは対応していなかった。ＰＥＡの減少の時期もＭＡＯ活性増加の時期と一致せず、以上の事より、胎生期のＰＥＡの増加はＭＡＯよりも、ＰＥＡ合成経路が関与していると推察された。

Saavedraら(3)は、ＰＥＡのβ水酸化によって生成されるPhenylethanolamineやOctopamineが胎生期に多量に存在する事を報告しているが、これらのmicroamineがマウスの脳分化の時期、つまり増殖・発達期に一致して脳内に多量に存在し、またその分布がシナプトゾーム分画に集中している事は、ＰＥＡが原始的な神経伝達物質あるいは発達・分化の情報をコミュニケートする媒介として機能している可能性を示唆している。



MAO-activity in mouse brain during ontogeny. Each plot represents mean value ±SD for 6 animals.

＜図３＞

Specific activity of monoamine oxidase
(nmol/mg protein/min)

Enzyme(subfraction)	5-Hydroxytryptamine	Tryptamine	Phenylethylamine
Adult brain			
P2	2.23 ± 0.17	1.29 ± 0.17	0.74 ± 0.16
P2a	0.26 ± 0.07	0.19 ± 0.09	0.02 ± 0.01
P2b	1.59 ± 0.68	1.58 ± 0.34	0.53 ± 0.24
P2c	3.75 ± 0.85	2.83 ± 0.74	1.39 ± 0.45
Neonatal brain			
P2	2.25 ± 0.19	1.22 ± 0.33	0.17 ± 0.01
P2a	0.40 ± 0.07	0.40 ± 0.05	0.06 ± 0.01
P2b	0.95 ± 0.16	1.24 ± 0.26	0.22 ± 0.04
P2c	3.04 ± 0.16	1.70 ± 0.23	0.31 ± 0.07

＜表１＞

1) Boulton et al.: J. Neurochem. 25: 477-481, 1975
2) Lowry et al.: J. Biol. Chem. 193: 265-275, 1965
3) Saavedra et al.: J. Neurochem. 23: 511-515, 1974
4) 辻 元宏・他 : 神経化学. 23: 57-59, 1984
5) Whittaker : Prog. Biophys. mol Biol. 15,41, 1965
6) Wurtman & Axelrod : J.Biochem. Pharmacol. 12: 1439-1441, 1963

23. 高速液体クロマトグラフィー電気化学検出器による Phenolic Amines の定量

辻　元宏・増井　晃・多賀千明・高橋三郎
（滋賀医大・精神神経）

〔要　約〕

高速液体クロマトグラフィー電気化学検出器を用いたρ-Octopamine(Oct)とρ-Tyramine(Tyr)の高感度測定法を報告する。前処理として、Dowex 50, $[H^+]$とAmberlite CG 50$[NH_4^+]$の2段階のイオン交換樹脂を用いPhenolic amines の分画(PF)を精製した。これらの精製の回収率は、Oct(1ng, n=5),91.7±2.4%, Tyr(3ng, n=5),95.0±1.1%であった。マウス脳組織に一定量のOct, Tyrを加えた回収率も同様の結果を得た。高速液体クロマトグラフィー系では、PFをC18カラム上で分離し、電気化学検出器で測定した。定量感度は、25pg-5000pgの範囲で直線性を示した。マウス(n=7)脳内濃度は、Oct 1.15±0.24ng/g wet weight, Tyr 4.82±2.13ng/g wet weight であった。本法は既存の方法と比較し、簡便で、少量の資料(マウス脳1コ)を高感度に測定できる利点があり、今後Phenolic aminesの生理的病態的意義の解明に有力な手段になるものと考えられる。

Key word： HPLC techniques ; ECD ; Phenolic Amines

Octopamine,Tyramine はtrace amineの一種で、phenolic amineと言われ、KakimotoとArmstrong(3)との人尿における精力的な研究がある。これのアミンは哺乳動物脳に微量存在するゆえに定量法は困難なものであり、生理的病態的意義の解明は十分なされていない。現在の所、定量法はRadiochemical-Enzymic Assay, GC-MS法などがあるが前処理として、いずれも有機溶媒抽出をくりかえすため煩雑さを伴なった。(2) 著者らは、昨年の学会で2段階の陽イオン交換樹脂を用いたβ-phenylethylamineの分離定量法を報告した。(4) 今回もその方法を応用したOct, Tyrの簡便高感度定量法を報告する。

＜材料と方法＞

材料；① JCL-ICR系マウスを断頭後すみやかに全脳を取り出し、-80℃に貯蔵した。

② Pargyline 75mg/kg をマウスに腹腔投与後、経時的に脳を取り出し、Oct, Tyrの定量に供した。

方法；マウス脳はg当り10倍量の0.33N過塩素酸(1l当り0.2gのアスコルビン酸と2gのEDTAを含む)でホモジネートし、その一部をDowex 50 に通した。

① イオン交換樹脂：第一段階としてAtackとMagnusson(1)らの方法で活性化したDowex 50, x 8, 200~400mesh, $[H^+]$, $1cm^3$を用いた。第2段階としてAmberlite CG-50, 100~200 mesh, $[NH_4^+]$, $1cm^3$を用いた。カラムはいずれもBIO-RAD社製目盛り付きショートカラムを使用した。

② 高速液体クロマトグラフィーの操作：島津社製LC-3Aを用い、カラムはCosmosil（半井化学社製）$5C_{18}$-P, 4.6 I.D.X 150mm,プレカラムとして10 C_{18}, 4.6 I.D.X 50mmを用いた。

カラム恒温槽(LW-350)、循環器(TRC-C13)はいずれも柳本社製を用いた。移動層は、1mM Sodium Octanesulfonateをイオンペアーとし、0.1mM EDTA を含む10%アセトニトリール－0.05Mクエン酸緩衝液pH 6.0で、流速0.8ml/min カラム圧 82kg/cm^3, 恒温25℃で流した。検出器は柳本社製VMD-101Aで、Applied voltage 750mV, 4nA full scale で操作し、定量値の 解析は島津社製 Chromatopac C-R 2AX を用い、2ngの絶対検量線法で行なった。

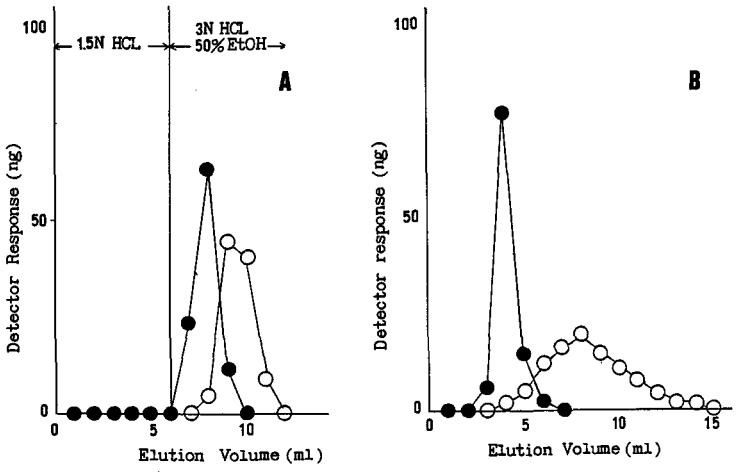


Fig1 A:Dowex 50,[H^+]上のPhenolic Ameinesの溶出パターン
B:Amberlite CG 50, [NH_4]上のPhenobic Ameinesの溶出パターン
いずれも Oct, Tyr各100ng を用い、液クロで定量
●－● Oct　　○－○ Tyr

Fig 1AにDowex 50, X8, 200~400 mesh上のPhenslic Aminesの溶出パターンを示した。Oct,TyrはDowex 50に中等度に吸着され、1.5N塩酸6mlでは溶出されず、6N 塩酸－50%エタノール6mlで溶出された。この分画を減圧乾固後、少量の水に溶解し一部を、Amberlite CG 50,100~200mesh.[NH_4^+]上で、0.1Nアンモニアで展開したのが、Fig 1Bである。2mlで洗浄し 13mlで溶出後、減圧乾固し、Phenolic Amine分画とした。これらの2段階イオン交換樹脂を用いた場合の回収率は、Oct(1ng, n=5), 91.7±2.4%, Tyr(3ng, n=5), 95.0±1.1%であった。これらのアミンをマウス脳に加えた回収率も同様の結果を得た。

液クロの条件設定のためクエン酸緩衝液 0.05MのPH(Fig2A). Applied Voltage (Fig 2B)おのおのを変化させ、PH 5.6 Applied voltage 750mV に VMD-101Aを設定した。Phenolic amine分画を600ulの移動層に溶解

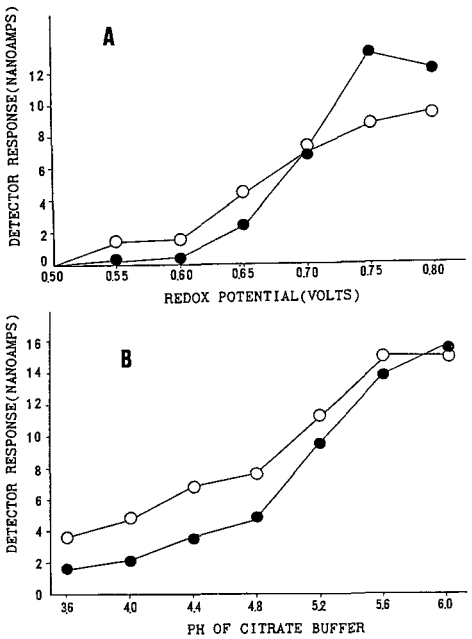


Fig 2 Applied VoltageとPHによる感度の変化

し、脳の分画の50~100ulを液クロに注入した。Fig 3に典型的なカラムパターンを示した。Fig 3Aは、Oct, Tyr 各500pg の溶出パターンであるが、Oct 5.9分、Tyr 12.1分に溶出され、分離係数k'は、Oct2.2, Tyr 5.6 であった。Fig 3Bは、マウス脳約40mgの分画100ulを注入したときのパターンであり、Fig 3CはPargyline 75mg/kg 腹腔内投与後90分の溶出パターンである。さらにPargyline 75mg/kg をマウス腹腔内に投与し、経時的に脳内Oct,Tyr の濃度変化を追跡したのが、Fig 4である。Oct,TyrのO分値は、それぞれ1.15±0.24ng/g wet weight,4.82±2.13ng /g wet weightであった。Octは経時的に有意な増加を認めなかったが、Tyr は90分後9.53±1.99ng /g wet weight, 240分後 8.43±2.69 ng /g wet weightとなり有意に増加した。

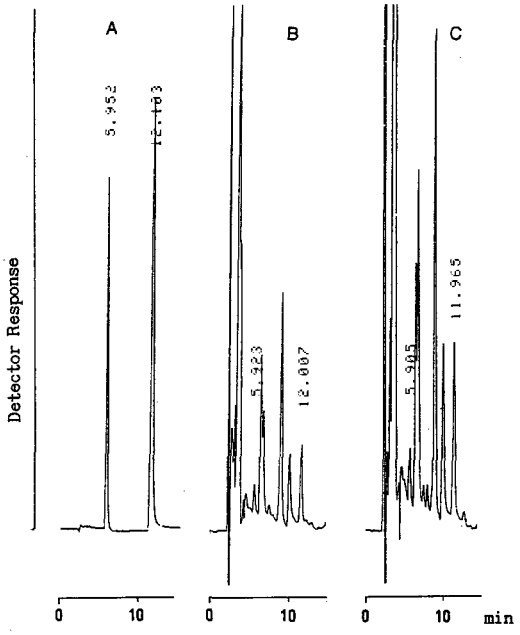


Fig 3 A：各 500pg の標準物質
B: 脳のPhenolic amine 分画
C: Pargyline 投与後の分画
Retention time 5.9分; Oct, 12.1分;Tyr.

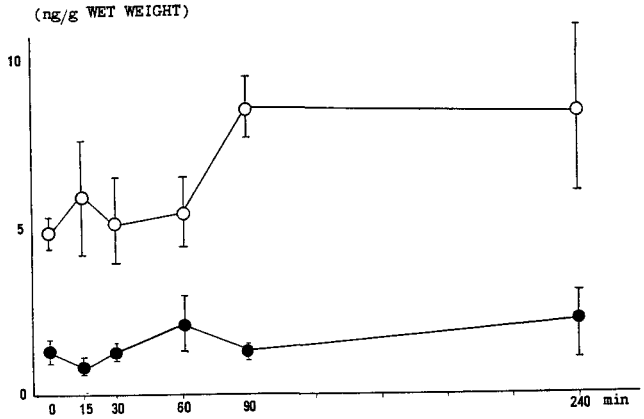


Fig 4. Pargyline 投与後のOct, Tyrの変動
● − ● : Oct ○ − ○ : Tyr

＜考察＞

今までのPhenolic amineの測定法は、感度や経費の面で一長一短があり、しかも煩雑な有機溶媒抽出をくりかえすので、多数のサンプルの測定を短時間でおこなうのは不可能であった。(2) 二段階のイオン交換樹脂を用いる方法は先年の学会でものべた様にMajor Aminesは完全に分離され、夾雑物が多く除かれる利点があり、(4) しかも簡便で、安価であるのでPhenolic aminesの分離定量にも有用であることを示した。

＜文献＞

(1)Atack, C., and Magnusson. T.(1978) Acta pharmacol.et Toxicol. 42,35-57

(2)Axelrod, J., and Saavedra, J.(1976) in Trace Amine and Brain (Uschin, E., and Sandler, M., eds) pp. 1-20. Marcel Dekker, Inc., New York and Basel.

(3)Kakimoto, y., and Armstrong, M.D.(1962) 237,208-214, 422-427

(4) Tsuji, M. etal., Anal Biochem. (in press)

24. ガスクロマトグラフィー／質量分析法による髄液中フェニル酢酸の定量

川端昌弘・小林清史・庄盛敏廉

（岡山大・医・脳研・病態生化）

〔要　約〕

ガスクロマトグラフィー／質量分析法を用いて、β－フェニルエチルアミンの代謝物であるフェニル酢酸（ＰＡＡ）の髄液中濃度測定について検討した。内部標準として用いたＰＡＡ－ｄ７とＰＡＡをペンタフルオロベンジルブロマイド（ＰＦＢ）で誘導体化し、ＰＡＡ－ｄ７－ＰＦＢピークのイオン強度に対するＰＡＡ－ＰＦＢピークのイオン強度の比から求めた検量曲線によって定量を行った。これらのピーク周囲には妨害ピークはなく、保持時間は約１分であり、さらに検量曲線は注入量５００ｐｇ－５ｎｇの範囲で極めて良好な直線性を示した。髄液を用いた際の変動係数は、ｗｉｔｈｉｎ　ｂａｔｃｈで１．４％、ｂｅｔｗｅｅｎ　ｂａｔｃｈｅｓで５．８％と安定した値が得られた。したがって、本測定法は迅速でしかも極めて信頼性が高い方法であるといえる。本法を用いて測定した対照群の髄液中ＰＡＡ濃度は２５．８±２．８ｎｇ／ｍｌであった。これに対してうつ病患者群では１２．２±１．９ｎｇ／ｍｌと有意に低値を示したが、分裂病患者群では３１．４±３．８ｎｇ／ｍｌと対照群との間に差は認められなかった。髄液中ＰＡＡには濃度勾配はなく、さらに年齢差や性差も認められなかった。さらに症例数を増して報告する予定である。

Key word： Phenylacetic acid, Gas chromatography/ mass spectrometry, Cerebrospinal fluid

内在性微量アミンの一つであるβ－フェニルエチルアミン（ＰＥＡ）は、アンフェタミンと構造が類似していること、アンフェタミンやカテコラミンの前駆物質であることや、カテコラミン神経系への機能促進作用を有することなどから、精神疾患の病因に関与している可能性が想定されている。これまでの臨床研究では、主として精神疾患患者におけるＰＥＡ尿中排せつ量が検討されてきたが、尿中物質の変化から脳における変化を類推することには、なお多くの問題点が残されている。私たちは最近、ＰＥＡの代謝物であるフェニル酢酸（ＰＡＡ）の髄液中濃度を、ガスクロマトグラフィー／質量分析（ＧＣ／ＭＳ）法によって極めて精度よく測定する方法を確立した。これによって、精神疾患患者髄液中のＰＡＡ濃度についての検討を進めているので報告する。

＜実験方法＞

ＰＡＡの定量にはＦｅｌｌｏｗｓら（２）の方法を改変して用い、測定機器として島津製ＧＣ／ＭＳ　９０２０－ＤＦを用いた。充填剤は３％ＯＶ－１　ｏｎ　Ｕｎｉｐｏｒｔ　ＨＰ　（８０－１００　ｍｅｓｈ）で、長さ２ｍ×０．３ｃｍのガラスカラムを用い、注入口温度２２０℃、カラム温度２４０℃、ヘリウムガス流量３０ｍｌ／分、セパレーター温度２２０℃、イオン源温度２４０℃、イオン化電圧２０ｅＶとした。採取後－２０℃に凍結保存した髄液０．５ｍｌに内部標準としてＰＡＡ－ｄ７（ＭＳＤ　ＩＳＯＴＯＰＥＳ社）２０ｎｇと６Ｍ塩酸２０μｌを加えて、塩化ナトリウムで飽和した。これに酢酸エチル６．５ｍｌを加えて１５分間振とう、遠沈したのち、有機層５ｍｌをとり、それにトリエチルアミン５０μｌを加えて５０℃で真空乾

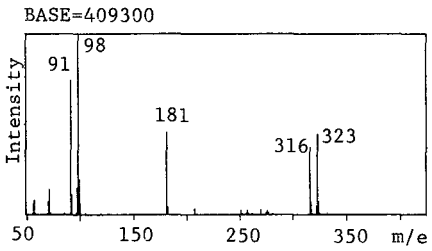


Fig.1 The compound was introduced via the GC inlet and the spectrum determined at 20 eV (EI mode)

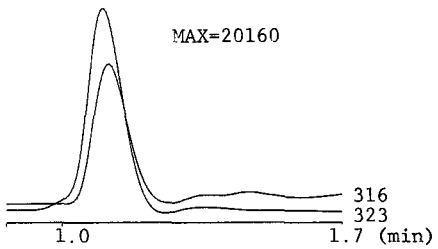


Fig.3 Typical mass fragmentogram of PAA-PFB(m/e 316) and PAA-d_7-PFB (m/e 323, 20ng/vial) in CSF.

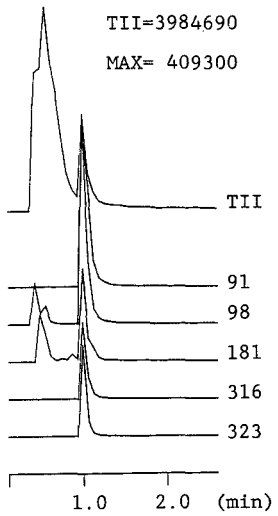


Fig.2 Mass chromatogram of PAA-PFB and PAA-d_7-PFB. Conditions as in Fig.1.

固した。この残さにエタノール０．１５ｍｌとトリエチルアミン１０μｌを加えて再溶解したのちミニバイアルに移し、窒素ガスで蒸発乾固したのち、１％水酸化カリウムーエタノール液１０μｌと２％ペンタフルオロベンジルブロマイド（ＰＦＢ、Ｐｉｅｒｃｅ社）ーエタノール液５０μｌを加えた。７５℃、４０分間反応させて再び窒素ガスにて蒸発乾固した。測定直前に残さに水１０μｌとｎーヘプタン２０μｌを加えて振とう、遠沈したのち、ヘプタン層２μｌをＧＣ／ＭＳに注入した。

＜実験結果＞

Ｆｉｇ．１にＰＡＡーＰＦＢとＰＡＡーｄ７ーＰＦＢのマススペクトルを示す。全イオン強度に対して前者（ｍ／ｅ　３１６）が８．１％、後者（ｍ／ｅ　３２３）が９．６％と比較的強い相対イオン強度が得られている。Ｆｉｇ．２にはマスクロマトグラムを示した。ｍ／ｅ　３１６および３２３のピーク周囲には測定の妨げとなるような妨害ピークは存在しておらず、保持時間も約１分であるので、迅速な測定が可能である。Ｆｉｇ．３は髄液を用いて得られたマスフラグメントグラムを示す。測定の障害になるような妨害ピークは存在しない。内部標準であるＰＡＡーｄ７ーＰＦＢピークのイオン強度（面積）に対するＰＡＡーＰＦＢピークのイオン強度の比から求めた検量曲線をＦｉｇ．４に示した。絶対注入量５００ｐｇー５ｎｇの範囲で相関係数０．９９７以上という極めて高い値が得られている。なお、髄液を用いて検討した変動係数は、ｗｉｔｈｉｎ　ｂａｔｃｈでは１．４％、ｂｅｔｗｅｅｎ　ｂａｔｃｈでは５．８％であった。　これまでに測定した対照群（神経疾患）と精神分裂病およびうつ病患者群における髄液中ＰＡＡ濃度をＴａｂｌｅ１に示した。症例数は少ないが

うつ病患者群では対照群に比べて有意に低い値が得られている。分裂病患者群と対照群との間には差が認められなかったが、前者には40ng/ml以上の高値を示したものが6例含まれている。しかし、病型による差は認められていない。なお、髄液中PAAには濃度勾配はなく、年齢や性による差も認められなかった

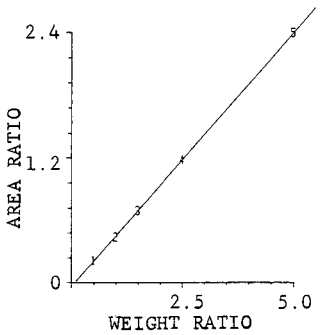


Fig.4 Calibration curve with observed ratio as ordinate and known ratio as abscissa.

Table.1 PAA concentrations in CSF (ng/ml)

Subjects	N	PAA
Control	15	25.8 ± 2.8
Schizophrenia	21	31.4 ± 3.8
Depression	4	12.2 ± 1.9*

Mean ± SEM * $p < 0.05$ vs. Control

＜考察＞

脳内のPEAはB型モノアミン酸化酵素により急速に分解される。したがって、脳内PEA代謝の検討にはPEA自体の変化とともに代謝物であるPAAの変化をも捕える必要があるものと考えられる。これは臨床研究における体液中濃度の検索の場合も同様であろう。上述したごとく、私たちが今回用いたGC/MS法は髄液中PAA濃度を測定するためには極めて優れた方法であると考えられた。本法は血液や尿中のPAA測定にも容易に応用可能である。　今回得られた対照群髄液中のPAA濃度は、Sandlerら（5）の報告値と極めてよく一致している。これに対してうつ病患者では、有意に低値を呈した。この成績は、うつ病患者髄液中PAA低値（5）および尿中PEA低値（3，4）などと合致する所見である。一方、分裂病患者群のPAA濃度は対照群との間に差が認められなかった。従来の報告では、対照群に比べて有意に高いとするもの（6）、逆に妄想型患者では低値であるとするもの（1）があって一定していない。尿中PEA排せつ量についても一致したデータは得られていない。しかし、本研究での分裂病患者はほとんどが抗精神病薬内服中のものであることや、かなり高い値を呈する者が含まれていることなどから、さらに詳細な分析が必要であると考えられる。髄液中PAAには濃度勾配が存在しないことや、血液からの直接移行の可能性が残されていることなどから、その測定意義についても解決すべき問題点は多いが、さらに多数症例での詳しい分析を行った上で報告したい。

＜文献＞

1) Beckmann H, Reynolds GP, Sandler M, Waldmeier P, Lauber J, Riederer P and Gattaz W (1982) Arch. Psychiatr. Nervenk. 232, 463　2) Fellows LE, King GS, Pettit BR, Goodwin BL, Ruthven CRJ and Sandler M (1978) Biomed. Mass Spectrom. 5, 508　3) Fisher E and Heller B (1972) Behav. Neuropsychiatry 4, 8　4) Mosnaim AD, Inwang EE, Sugerman JH, DeMartini WJ and Sabelli HC (1973) Biol. Psychiatry 6, 235　5) Sandler M, Ruthven CRJ, Goodwin BL and Coppen A (1979) Clin. Chim. Acta 93, 169　6) Sandler M, Ruthven CRJ, Goodwin BL, King GS, Pettit BR, Reynolds GP, Tyrer SP, Weller MP and Hirsch SR (1978) Commun. Psychopharmacol. 2, 199

25. PC12 サブクローンにおけるカテコールアミン含量と分泌量の増殖期依存性

高島明彦・小池達郎　　(佐賀医大・一般教育・化学)

〔要　約〕

ラットフェオクロモサイトーマPC12は，ノルアドレナリン，ドーパミンを生合成し分泌顆粒中に貯蔵し，脱分極刺激によってそれらを放出することが知られている．今回，我々はカテコールアミン含量に関するサブクローンPC12 subclone NO.1を用いてカテコールアミンの生合成と分泌の関係を細胞増殖の各時点で調べた．その結果ドーパミン含量は増殖期に依存し定常期で最大となった．ノルアドレナリンの増殖期依存性はドーパミンに較べて少なかった．高K^+刺激で放出されるドーパミン，ノルアドレナリンは共に対数期，定常期それぞれにピークが存在した．対数期では含量の増加は少ないにも拘らず分泌量の増加は大きかった．Caの細胞内への取り込みは対数期で増加し最大値をとっており，対数期では含量変化よりもCaの取り込み量によって分泌量が調節されていると考えられる．定常期ではCaの取り込み量は減少していたがドーパミン，ノルアドレナリン共に含量増加の割合と分泌量増加の割合がほぼ一致することから定常期ではCaの取り込み量よりも含量の変化によって分泌量が調節されていると考えられる．これらのことから，細胞内に貯蔵されているカテコールアミンの取り込まれたCa^{2+}に対する分泌応答性が対数期，定常期で異なることが示唆された．

Key word：PC12 subclone, Catecholamine content, Catecholamine secretion

ラットフェオクロモサイトーマPC12は副腎髄質由来の株細胞でありノルアドレナリン，ドーパミンを生合成し分泌顆粒中に貯蔵する(8,10)．細胞内に貯蔵されたカテコールアミンはコリン作働性アゴニスト又は高K^+刺激で脱分極させることによって細胞外に放出される(1-4,8,10)．この細胞はグルココルチコイド処理によってカテコールアミン生合成の律速酵素であるチロシン水酸化酵素活性を増大させる．これに伴いカテコールアミン含量及び高K^+刺激によって放出されるカテコールアミンの分泌量が増大することが示された(8)．LucasらによってPC12細胞のチロシン水酸化酵素活性は細胞密度に依存することが示された(7)．これらの結果は，この細胞の培養中におけるカテコールアミンの生合成と分泌調節機構を調べるうえで有用な系であることを示している．しかしPC12細胞では，この点に関して今まで十分な検討がなされていなかった．今回我々は，先にPC12細胞からカテコールアミン含量に関するサブクローンを単離しており(6)，その中からドーパミン，ノルアドレナリンを十分含有しているPC12 subclone NO.1を用いて培養の各時点でドーパミン，ノルアドレナリンの量及び分泌量を測定しそれぞれの増殖期依存性を調べた．又Caの取り込み量を培養のいくつかの時点で測定し，分泌量の調節との関連について検討した．

［実験方法］

PC12subclone NO.1は，小池らによってチロシン欠除培地で培養したものから得られた(6)．この細胞は5%CO_2,95%airで10%馬血清，5%準胎児牛血清を含むDME培地で培養した．培地には，50 unit/ml ペニシリン及び50μg/ml ストレプトマイシンを加え

て調製した．細胞を35mmプラスチックプレートに5x10⁵個まいて培養を行い各時点でいくつかの実験を行った．

カテコールアミン含量は細胞を0.1M PCAでホモジェネートした後，遠心し，その上清に含まれるカテコールアミンをアルミナで抽出した．カテコールアミン分泌はヘペスバッファー(pH7.2)を用いて行った．このバッファーは115mM NaCl，5.4mM KCl，1.8mM $CaCl_2$，0.8mM $MgSO_4$，5.5mM Glucose，1mM NaH_2PO_4，15mM Hepesより成っている．細胞は3回ヘペスバッファーで洗い37℃，15分間そのバッファー中にインキュベートした後，ヘペスバッファー中のKClを50mMにNaClを70.4mMに置き換えた高K^+バッファーで細胞を37℃，5分間脱分極刺激した．細胞から放出されたカテコールアミンを含むバッファーは遠心後アルミナによってカテコールアミンを抽出された．高K^+でないヘペスバッファー中に自発的に放出されるカテコールアミン量をコントロールとした．抽出されたカテコールアミンは高速液クロ／電気化学検出器を用いて分離定量を行った．定量にはDHBAを内部標準として用いた．移動相には0.1M リン酸，0.2mMオクタンスルホン酸ナトリウム，0.1mM EDTA，4% メタノールをNaOHでpH2.6として用いた．カラムはラジアルパックC18を使用し，流速を1.2 ml/minとした．

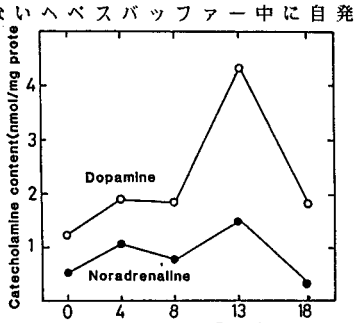


図 1

$^{45}Ca^{2+}$の取り込みはHoltz et al.又は Kilpatrick et al.の方法に準じて行った．細胞をヘペスバッファーで洗い37℃，15min間インキュベート後2.0x10⁻⁶Ci/mlの$^{45}Ca^{2+}$を含む高K^+ヘペスバッファー又はノーマルのヘペスバッファー中で37℃，2分間インキュベートして$^{45}Ca^{2+}$を細胞内に取り込ませた後，氷冷したCa,Mg free PBSで洗浄し1% Tritonx100で細胞を溶解した後細胞内に取り込まれた$^{45}Ca^{2+}$を液体シンチレータで測定した．

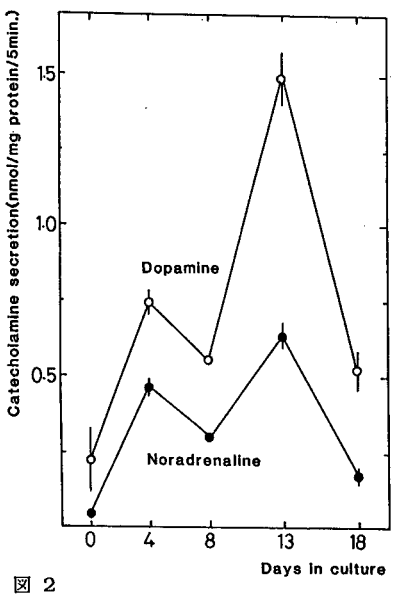


図 2

［結果と考察］

PC12subclone NO.1は35mmプレート上に5x10⁵個まかれ，培養後8日目に定常期となった．トリパンブルー染色による生細胞の割合は定常期で87%程度であった．Lucasらは PC12細胞のチロシン水酸化酵素活性は増殖期に依存することを示した(7)．図1ではドーパミン含量は対数期では徐々に増加するが定常期になると急激に増加し増殖期に依存することを示した．ノルアドレナリン含量の変化はドーパミンに較べて少なかった．サブクローニング行っていないPC12ではチロシン水酸化酵素，ドーパ脱炭酸酵素の比活性が増殖期に依存して増加した，それに伴ってドーパミン含量も増加することが示されている．又ドーパミンβ水酸化酵素活性は細胞増殖の間ほぼ一定でありノルアドレナリン含量も変化を示さなかっ

た（11）．PC12subclone NO.1でも同様にカテコールアミン含量の変化は生合成酵素の比活性変化に対応していると考えられる．

図２では高K⁺刺激により放出されるカテコールアミン量を示している．示された量は自発的に放出される量を差し引いて表してある．0-8日は対数期であり，ドーパミン，ノルアドレナリンの分泌量は共に0-4日の間増加し4日目にピークとなった．定常期では8-13日の間増加し含量が最大となる13日目で分泌量も最大となった．Ca-free,1mMCoCl₂を含む高K⁺溶液によって，ドーパミン，ノルアドレナリンの分泌量は共に培養期間中ほぼ90%以上が抑制された．このことは高K⁺刺激によるカテコールアミンの放出はほとんどCaに依存性であることを示している．

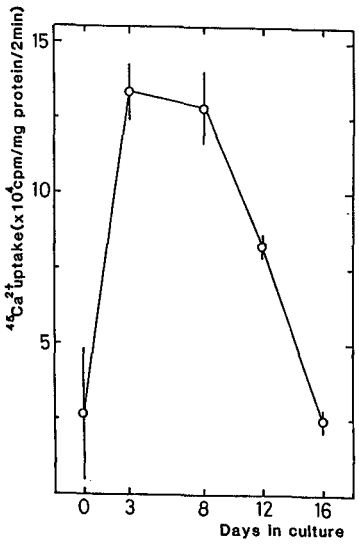


図３

図３は高K⁺によって細胞内に取り込まれた$^{45}Ca^{2+}$の量を表している．0-8日目は対数期であり3-8日で$^{45}Ca^{2+}$の取り込みは最大となり，8日目以降，定常期になると取り込みは減少した．対数期においてドーパミン含量は1.6倍の増加に対し分泌量は3.4倍に増加した．またノルアドレナリン含量2.1倍の増加に対し分泌量10.1倍の増加を示した．このことは対数期ではカテコールアミンの分泌量の増加は含量の増加よりもCaの取り込み量に依存していると考えられる．定常期ではCaの取り込みは減少しているにもかかわらず，分泌量は8-13日の間増加し最大となる．この時期でのドーパミン含量は2.4倍の増加に対し分泌量は2.7倍の増加を示した，又ノルアドレナリン含量は2.0倍の増加に対し分泌量は2.1倍の増加を示した．この時期カテコールアミンの分泌量増加の割合は，含量増加の割合をほぼ反映していた．このことは，定常期ではカテコールアミンの分泌量の増加は対数期と異なり，Caの取り込み量よりもむしろ含量の変化に依存していると考えられる．すなわち，これらのことから，細胞内に貯蔵されているカテコールアミンの取り込まれたCa^{2+}に対する分泌応答性が対数期，定常期で異なることが示唆された．

<Reference>

1 Greene L.A. and Tischuler A.S. (1976) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 73, 2424-2428
2 Greene L.A. and Rein G. (1977a) Brain Res. 129, 247-263
3 Greene L.A. and Rein G. (1977b) Brain Res. 138, 521-528
4 Greene L.A. and Rein G. (1978) J. Neurochem. 30, 549-555
5 Holtz R.W., Senter R.A., and Fry R.A. (1982) J. Neurochem 39, 635-646
6 Koike T. and Takashima A. (1984) J. Neurochem. 42, 1472-1475
7 Lucas C.A., Edgar D., and Thoenen H. (1979) Exp. Cell Res. 121, 79-86
8 Rebois R.V., Reynolds E.E., Toll L., and Howard B.D. (1980) Biochem. 19, 1240-1248
9 Kilpatrick D.L., Sleptis R.J., Corcoran J.J., and Kirshner N. (1982), J. Neurochem. 38, 427-435
10 Schubert D. and Klier F.G. (1977) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 74, 5184-5188
11 Takashima A. and Koike T. (1984) SEIKAGAKU 56,8, 926
12 Tischler A.S., Perlman R.L., Morse G.M., and Shearrd B.E. (1983) J. Neurochem. 40, 364-370

26. 各種遺伝的疾患マウスにおける脳内アミンの変化について

三田浩一・須田治彦・御子柴克彦*・塚田裕三
(慶応大・医・生理, 大阪大・蛋白研*)

〔要　約〕

HPLC/EC法により，BALB/C, Shiverer (Shi), Myelin deficient (mld), Weaver (Wv) の各マウス脳内アミン類 (NE, DOPAC, DA, HVA, 5HT, 5HIAA) を，大脳皮質，脳幹，後脳，小脳の4部位で測定した。30,60,75日令のBALB/Cマウス脳内アミンは，経日的に，NE, DA, 5HTが各部位で軽度の増加，HVAが脳幹での唯一明らかな減少，5HIAAが各部位で減少傾向を示した。すなわち，この時期において脳各部位の湿重量は一定であるが，経日的なアミン含量の変化を認めた。Shiマウスの30日令非発症群は，30日令BALB/Cとほぼ同様な値を得た。Shiマウスでは同腹非発症群に比べて，大脳皮質でDAが増加，脳幹でDAが減少傾向，及び，各部位でHVA, 5HIAAが増加傾向という結果を得た。mldマウスでは，同腹非発症群との間に全く差を認めず，mldと同様にミエリン形成不全を主徴とするShiマウスとは全く異なる結果が得られた。Wvマウスでは，NE, 5HT, 5HIAAが小脳当りで減少，組織湿重量当りで増加しており，DAの大脳皮質及び脳幹での著しい減少，HVAの脳幹での減少も認められ，逆に5HIAAは，脳幹，後脳において増加していた。

Key word： mutant mouse, catecholamines, indoleamines

各種遺伝性運動失調マウスには，ミエリン形成不全を伴うもの，神経細胞構築異常を伴うものなどが知られている。それらの運動失調と各種脳内アミン（カテコールアミン，インドールアミン）量の変化の相関を求めるため，前記アミン含量の測定を行った。今回の測定には，Shiverer (Shi), Myelin deficient (mld), Weaver (Wv), BALB/Cマウスを用いた。Shi及びmldはともに常染色体性劣性遺伝様式をとり，企図振戦，痙攣，運動失調等，極めて類似した症状を呈し，ミエリン形成不全を伴っている。さらに最近mldはShiのallelic mutantであることも明らかとされた。Wvは常染色体性不完全優性遺伝様式をとり，強度の運動失調を呈し，小脳の顆粒細胞の変性による著しい小脳低形成を特徴としており，小脳以外の部位においても神経伝達物質の異常が報告されている。

＜測定方法＞

実験動物としては当研究室にて飼育繁殖した30日令のShi, mld, Wv mutantマウスを用い，対照群には各々同腹非発症のものを使用した。各種mutantマウスの比較としてBALB/Cの30日令を用い，さらにBALB/Cでは経日的変化をみるために，60,75日令のものも用いた。アミン含量は，組織当りのng (ng/tissue) 及びg組織湿重量当りのng (ng/g. w. w.) で表わした。各動物は全て一定時刻（11：00am前後）に無麻酔下で断頭し，速やかに全脳を摘出し，大脳皮質，脳幹，後脳（橋，延髄），小脳の4部位に分け，重量測定後直ちに−70℃に凍結した。組織の凍結は1～2日以内とした。各組織は0.05M $HClO_4$

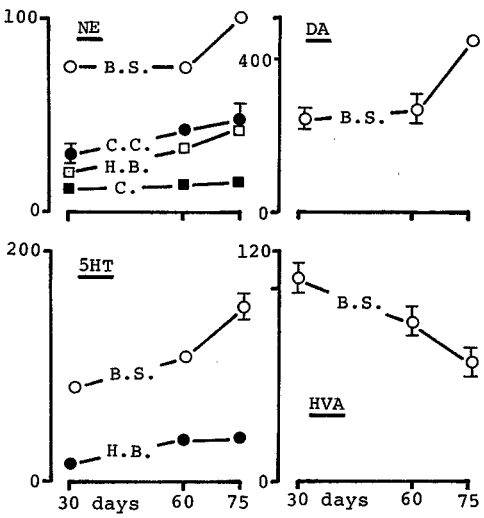
Abbreviation NE; Norepinephrine, DOPAC; 3,4-Dihydroxyphenl acetic acid, DA; Dopamine, HVA; Homovanillic acid, 5HT; Serotonin, 5HIAA; 5-Hydroxyindole acetic acid, C.C.; Cerebral Cortex, B.S.; Brain Stem, H.B.; Hind Brain, C.; Cerebrellum.

にてHomogenizeし，15.000 g 30 min. 遠心後，その上清を測定時まで－70 ℃に凍結保存した。上清の凍結保存は10日間を限度とした。測定は高速液体クロマトグラフィー(Waters社)/電気化学検出器(CHROMATOFIELD社，ELDEC 102)法〔HPLC/EC法〕により行い，カラムはChemco社7－ODS－Hカラム，移動相は0.1Mリン酸Buffer pH 4.8(EDTA, Na Heptane, Methanol含有)を用い，カテコールアミン，インドールアミン(NE, DOPAC, DA, HVA, 5HT, 5HIAA)を同一試料より同時測定した。[3] 異なる種類の試料には測定目的の標準物質を一定量加え，流出位置の確認と回収率を検定した。上記のアミン類の回収率は全て97～102％であった。

＜結果及び考察＞

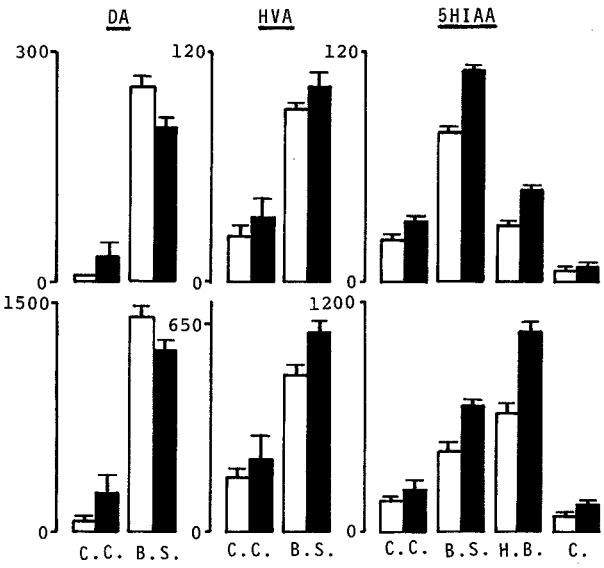
1. BALB/C：脳内アミン含量の経日的変化を30，60，75日令で見ると，NEは大脳皮質，脳幹，後脳，小脳の全ての部位で軽度に増加を認め，DAは小脳を除いた3部位で軽度に増加を認めた(図1)。しかし，HVAは大脳皮質，脳幹とも逆に減少の傾向を認めた(図1)。5HTは全ての部位で増加傾向を示した(図1)が，5HIAAは逆に各部位で減少傾向を示した。この様に，脳の各部位とも組織湿重量が一定に保たれているYoung Adultの時期に於ても，日数経過による脳内アミン含量の変化が認められた。このことから，組織構成細胞の成熟は完了しているにもかかわらず，アミン性シナプスの成熟は進行している可能性が示唆された。

図1. BALB/Cマウスの脳各部位アミン含量の経日的変化(ng/part)



2. Shiverer & mld：Shiマウスは，BALB/C系統種であるので，30日令Shiマウス非発症群と，30日令BALB/Cマウスとで脳内アミン含量を比較すると，ほぼ同様な数値を得た。Shiマウスの脳組織重量は各部位とも，同腹非発症群及びBALB/Cマウスと同様な値を示した。ShiマウスにおいてDAは大脳皮質で約3倍の増加，脳幹で逆に約20％の減少を認めた(図2)が，NEは各部

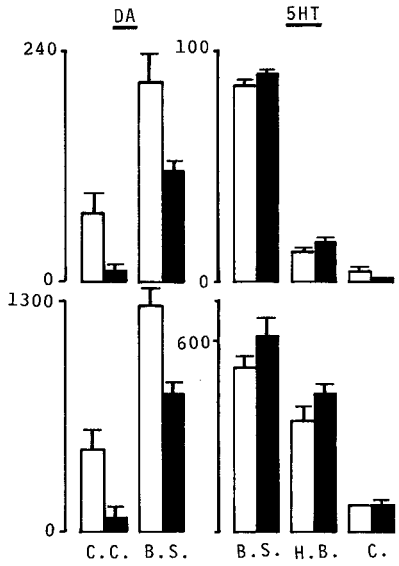
図2. 30日令Shiverer マウス(黒棒：発症群，白棒：非発症群)の脳各部位のアミン含量の比較(上段図：ng/part，下段図：ng/g. wet weight)



位とも変化を示さなかった。しかし，HVAは各部位で増加傾向を示した。mldマウスのアミン含量では，同腹非発症群との間に有意差を認めなかった。Shi，mld共，ミエリン形成不全が主徴であり[4][5]，しかも遺伝学的には同坐性[2]であるとされているにもかかわらず全く異った結果が得られ，このことからShiマウスでは，ミエリン形成のみならずアミン調節系にも異常をきたしていることが示唆された。

3. Weaver：Wvマウス小脳の湿重量は同腹非発症群の約40％で，著しい小脳低形成マウスであるが，他の3部位でも同腹非発症群の約90％に減少していた。小脳の5HTは組織湿重量当りで同腹非発症群と差は認められなかったが，小脳に線維を送っている後脳では，組織当りで約15％増加，湿重量当りでも約25％の増加を示した（図3）。DAは大脳皮質，脳幹で組織当り，湿重量当りとも低下していた（図3）。このことは塚田等の報告[1]の様にカテコールアミンとインドールアミンとが各アミン代謝系に相互に影響を与えあう結果かもしれないが，NEに大きな変化を示さなかったことからWvマウスに特異的な代謝変化であるとも考えられる。またDAアゴニスト投与によりWvマウスの行動が活性化される[6]とする報告もあり，これは，脳内アミン量の変化が各種mutantマウスの運動失調と関係がある可能性も考えられる。従って，各種運動失調mutantマウスについて脳内アミン含量の発育経過による変化と，アミン含有細胞の局在部位での測定，更に，蛍光法によるアミン作動性神経線維の走行についての検索は今後の課題である。

図3. Weaverマウス（黒棒：発症群，白棒：非発症群）の脳各部位のアミン含量の比較（上段図：ng/part，下段図：ng/g.wet weight）



＜文　献＞

(1) Kishimoto E. and Tsukada Y. et al.（1972）神経化学，11，13－16
(2) Lachapelle F. et al.（1980）in "Neurological Mutations affecting Myelination" Elsevier 27－32
(3) Mayer G. S. and Shoup R. E.（1983）J. Chromatogr. 225，535－544
(4) Mikoshiba K. et al.（1980）J. Neurochem. 35，465－470
(5) Mikoshiba K. et al.（1984）神経化学，23，288－290
(6) Schmidt M. J. et al.（1982）J. Neurosci. 2，376－380

27. 手綱脚路または線条体黒質路破壊後の，中脳皮質系ドーパミンニューロンのハロペリドールに対する反応性の変化

小川篤子・俣賀宣子・高嶋瑞夫・西川　徹・融　道男*
（国立武蔵療・神経センター・疾病3部，信州大・医・精神*）

〔要　約〕

中脳皮質系ドーパミン(DA)ニューロンの神経伝達調節における手綱脚路および線条体黒質路を経由するニューロンの果たす役割を調べる目的で、手綱核または線条体黒質路を両側破壊したラットにハロペリドール(HAL) を投与し、内側前頭葉皮質におけるDA，3,4-ジヒドロフェニル酢酸(DOPAC) 量を測定することによりドーパミン代謝の変化を検討した。手綱核破壊８日後にDAは偽手術群の 126％、DOPAC は 131％に上昇し、DA代謝の昂進を示唆していた。さらに HALを投与すると、偽手術群では DOPAC量が vehicle投与群の 149％に、破壊群では 153％に増大した。この HALに対する反応性には、破壊群と偽手術群で有意な差はなかった。一方、線条体黒質路破壊の８日後ではDA,DOPAC量は偽手術群と有意な差はなかった。HAL 投与により偽手術群は DOPAC量がvehicle 投与群の 191％に上昇したが、破壊群では有意な増加は認められず(107％)、HAL に対する反応性が抑制された。以上の結果より、中脳皮質系DAニューロンに対し緊張性に抑制性制御をおよぼすニューロンが手綱脚路に含まれること、さらに、HAL 投与によるDA代謝昂進に関与するフィードバックニューロンは、手綱脚路には含まれず、線条体黒質路に含まれている可能性が示された。

Key word： mesocortical dopamine neurone, habenular nuclei, striato-nigral pathway

中脳皮質系ＤＡニューロンは、線条体および中脳辺縁系ＤＡニューロンと比較して、ストレス負荷により活性化されやすく、また、ＤＡアンタゴニストである抗精神病薬の慢性投与後もその応答性に耐性が生じにくいなどの特徴を持っている。こうした反応性の差異は調節機構の違いに基づくと推測されており、最近では中脳皮質ＤＡニューロンは自己受容体を欠くという報告が注目されている (1)。しかし、その他のフィードバック機構、例えばＤＡアンタゴニストの中脳皮質ＤＡ系への作用に影響を与えるニューロンの存在などについては、充分な研究は行なわれていない。本研究では、脳内のＤＡ神経伝達を調節していると考えられている手綱脚路または線条体黒質路を破壊したラットに、ＤＡアンタゴニストのＨＡＬを投与し、中脳皮質系ＤＡニューロンの終末を多く含む内側前頭葉皮質におけるＤＡ、ＤＯＰＡＣ量の変化を測定し、これらの神経路を経由するニューロンの、中脳皮質ＤＡ系の神経伝達調節における役割を検討した。

［方法］

実験動物はＷistar 系雄性ラットを用いた。

手綱脚路、線条体黒質路の破壊：手綱脚路は、単極性ステンレス電極（長さ0.5mm，直径0.35mm）を手綱核へ挿入し3.5mA，15sec で両側性に電気凝固破壊した。線条体黒質路は電極（長さ１mm，直径0.35mm）を黒質の前方外側部へ挿入し3.0mA，10sec で両側性に破壊した（図１）。偽手術群では、破壊部位より３mm上方に電極を挿入し、通電はしなかった。手術後８日目に、ＨＡＬ(1mg/kg)またはvehicle を腹腔内投与し、30分後に断頭、内側前頭葉皮質を切り出し－80℃で凍結保存した。破壊が有効に行な

われたことを確認するために、手綱核破壊群では脚間核のコリンアセチル基転移酵素(CAT)活性をFonnumの方法(2)により測定した。活性値は偽手術群で530±10 nmol/h/mg prot、破壊群ではその7%以下に減少し手綱核から脚間核に至るアセチルコリンニューロンがほぼ完全に破壊されていることを確認した。また、HAL投与によるCAT活性の変化はなかった。線条体黒質路破壊群では、黒質のγ-アミノ酪酸(GABA)量をOkadaらの方法(7)に従って測定した。測定値は偽手術－vehicle投与群；64.9±1.6 (nmol/mg prot)，偽手術群－HAL投与群；67.4±1.9，破壊－vehicle投与群；32.2±1.5，破壊－HAL投与群；30.4±2.2であり、破壊群では黒質のGABA量が偽手術群の50%以下に減少していた。

DA，DAPACの測定：凍結した組織に0.4 N過塩素酸を加え超音波破砕し、クロロホルムで脱脂後、DA，DOPACをアルミナ抽出した(5)。定量は電気化学検出器付高速液体クロマトグラフィーにより行なった。

統計学的解析：Studentのt-testあるいはRyanの多重比較法を用いた。

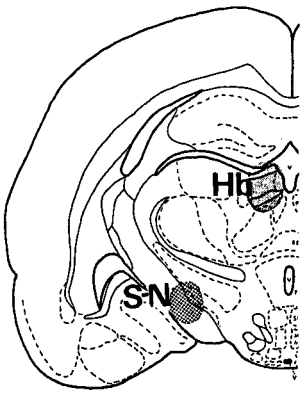


図1　手綱脚路及び線条体黒質路の破壊部位。　手綱脚路は手綱核(Hb)(A +4.0, V + 5.0, L ± 0.6)を線条体黒質路は黒質の前方外側部(S-N)(A +3.8, V +2.5, L±3.0 & ±2.7)を電気凝固破壊した。

［結果］

1）両側の手綱核を破壊された動物は、偽手術群に比し、内側前頭葉皮質のDA量

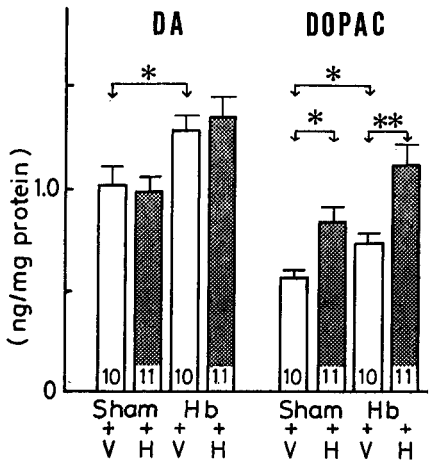


図2　HAL投与による内側前頭葉皮質のDA代謝の昂進に対する手綱脚路破壊の影響。　偽手術群(Sham)または手綱脚路破壊群(Hb)にvehicle (V)またはHAL(H) (1 mg/kg ip)を投与し内側前頭葉皮質のDA、DOPAC量を測定した。

*; p<0.05　　**; p<0.01

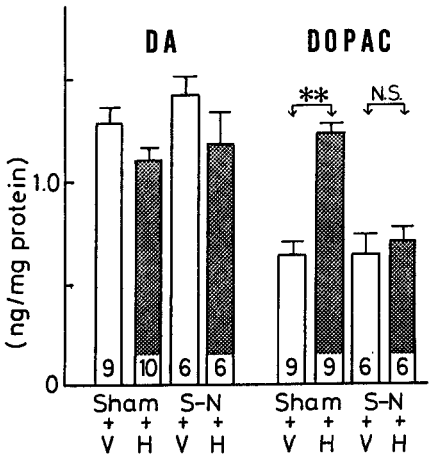


図3　HAL投与による内側前頭葉皮質のDA代謝の昂進に対する線条体黒質路破壊の影響。

S-N; 線条体黒質路破壊群　　**; p<0.01

およびＤＯＰＡＣ量が有意に増大した（ＤＡ 126％，ＤＯＰＡＣ 131％，　いずれも $p<0.05$）。さらに、ＨＡＬを投与すると、偽手術群では、ＤＯＰＡＣ量が vehicle投与群の 149％に、破壊群では 153％に増大した。このＨＡＬに対する反応性において、手綱核破壊群と偽手術群とで有意な差はなかった。（図２）

２）線条体黒質路破壊では、内側前頭葉のＤＡ，ＤＯＰＡＣ量の有意な変化は示されなかった。ＨＡＬ投与により偽手術群ではＤＯＰＡＣ量が vehicle投与群の 191％に上昇したが、破壊群では有意な増加は認められなかった(107％)。（図３）

［考察］

手綱脚路を破壊すると内側前頭葉皮質でのＤＡ，ＤＯＰＡＣ量がともに増大し、ＤＡ代謝の昂進が示された。この結果は Lisoprawskiら(4) の手綱核破壊により前頭葉皮質のＤＯＰＡＣ量が増加したという報告と一致した。また前報(6) で示したように、手綱脚路は中脳皮質系ＤＡニューロンを緊張性抑制性に制御しており、破壊によりこの抑制が解除されることでＤＡニューロンの活性が上昇したと考えることができる。また、手綱脚路破壊により、ＨＡＬ投与に対する反応性は変化しないことから、ＨＡＬ投与によるＤＡ代謝昂進に関与するフィードバックニューロンは手綱脚路には含まれていないものと考えられる。

線条体黒質路を破壊した場合、基礎的なＤＡ代謝は偽手術群と有意な差はなかった。さらにＨＡＬを投与すると、偽手術群でみられたＤＡ代謝の昂進が破壊群ではほとんどみられなくなった。この結果より線条体黒質路にはＨＡＬ投与時のＤＡ代謝調節に関与するニューロンの含まれることが示唆された。今回、黒質の前方外側部で線条体黒質路を破壊したが、内側前頭葉皮質から黒質の吻側で線条体黒質路と並行して中脳に至る下行性ニューロンが知られており(3)、このような神経回路が中脳皮質系ＤＡニューロンのフィードバック機構に関与している可能性がある。

さらに、内側前頭葉と同様に腹側被蓋野からのＤＡニューロンの投射を受ける側坐核などのＤＡ代謝についても解析し、中脳皮質ＤＡニューロンとの差異を明らかにする必要がある。これら脳部位によるフィードバック機構の特異性を明らかにすることは、精神神経症状の発現機構や治療薬の作用機序を明らかにするうえで重要な知見をもたらすものと思われる。

［文献］

1)Bannon,M.J.and Roth,R.H.(1983)Pharm.Rev.35,53
2)Fonnum,F.(1969) Biochem.J.115,465
3)Leonard,C.M.(1969) Brin Res.12,321
4)Lisoprawski,A. et al.(1980) Brain Res.183,229
5)三ッ汐　洋　ほか　(1985) 精神薬療基金研究年報　16,152
6)西川　徹、Scatton,B. (1984) 神経化学、23, 90
7)Okada,Y. et al.(1971) Exp.Brain Res.13,514

28. メタンフェタミン逆耐性現象に伴う脳内モノアミンニューロンの機能と神経活性アミノ酸含量の変化

橋本恒一・好田裕史・大熊誠太郎・栗山欣弥
(京都府医大・薬理)

〔要　約〕

メタンフェタミン(MAP)の連続投与により自発運動における逆耐性現象の出現したマウスを用いて，脳内モノアミンニューロンの機能と神経活性アミノ酸含量の変化について検討を行ない，以下の結果を得た．

1. MAP 5 mg/kg を1日2回，5日間連続投与し，1週間後のマウスに MAP 0.625 mg/kg を再投与すると1回投与の場合に比較して，有意な自発運動量の増加がみられた．
2. 上記の如く逆耐性現象の出現した時点においては，Dopamine, Norepinephrine 及び 5-Hydroxytryptamine の脳内含量には著変を認めなかったが，大脳皮質内 3-methoxy-4-hydroxyphenyletyleneglycol (MHPG)，3,4-dihydroxyphenylacetic acid (DOPAC), Homovanillic acid (HVA) 及び 5-hydroxyindoleacetic acid (5-HIAA) 含量は有意な低下を示した．
3. MAP逆耐性形成時には，大脳皮質シナプス膜への ^{3}H-spiperone 及び ^{3}H-dihydroalprenolol 結合が上昇を示した．
4. 大脳皮質内 γ-アミノ酪酸(GABA)含量はMAP再投与前に上昇し，アスパラギン酸含量は低下を示したが，MAP 0.625 mg/kg の再投与によりこれらの変化は抑制された．

Key word : reversetolerance to methamphetamine , cerebral monoamines , neuroactive amino acids

動物に覚せい剤を投与すると明らかな自発運動の増加を招来し，また多量の投与を行うと常同行動が出現して来ることはよく知られた事実である．またこれらの自発運動量の変化と常同行動の出現には逆耐性現象が出現することが確認されており，[1)2)3)] これらの動物は精神分裂病あるいは分裂病の再発の研究モデルとして有用であると考える人達が多い．しかしながら，覚せい剤に対する逆耐性現象を引き起こした動物の脳内における神経活性アミノ酸の変化についての研究は少ない．そこで今回我々は，MAPを連続投与し自発運動上明らかに逆耐性現象の出現したマウスを用いて，脳内モノアミンニューロンの機能変化と同時に脳内神経活性アミノ酸含量の変化について検討を行なった．

〔実験方法〕

(1)動物及び投与方法：STD-ddy 系雄性マウス(体重 20～25 g)に MAP·HCl 5 mg/kg を1日2回，5日間腹腔内に投与し，最終投与後1週間目に MAP·HCl 0.625～2.5 mg/kg の再投与を行なった．(2)行動量の測定：ANIMEX 及び立ち上りセンサーを用いて，投与直後から2時間測定を行なった．(3)脳内モノアミン及び代謝産物の含量測定：行動量測定直後のマウスをマイクロウェーブ照射(5 kw, 0.5 秒)により致死させ，摘出した脳を大脳皮質，脳幹部及

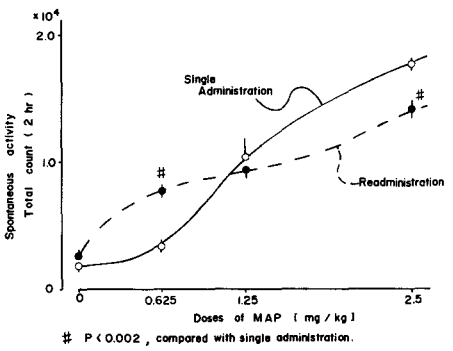


Fig.1 Effect of various doses of methamphetamine (MAP) on spontaneous activity of naive and repeatedly MAP-treated mice.

び小脳に分画して各々過塩素酸抽出後，ECD検出器を装置した高速液体クロマトグラフを用いて測定した．(4) ^{3}H-spiperone及び ^{3}H-dihydroalprenolol（^{3}H-DHA）結合能の測定：大脳皮質シナプス膜分画を用い，^{3}H-spiperone結合はPertらの方法[4]に準じて10 μMのbutaclamolの存在下で最終濃度1.85 nMの^{3}H-spiperoneを用いて，また^{3}H-DHA結合は，10 μMのpropranololの存在下で最終濃度1.5 nMの^{3}H-DHAを用いて，それぞれ測定を行なった．(5)脳内神経活性アミノ酸含量の測定：脳内モノアミンの場合と同様な方法で屠殺し分画した脳組織について，Idaらの方法[5]に準じて10％トリクロル酢酸で抽出後，高速液体クロマトグラフ・アミノ酸分析システムを用いて測定した．

〔実験結果〕

MAP·HCl（5 mg/kg，1日2回，5日間）を連続投与したマウスは，MAP 0.625 mg/kgの再投与により1回投与のマウスに比較して有意な自発運動の増加を示した（Fig 1）．この時点において，脳内モノアミン，すなわちnorepinephrine（NE），dopamine（DA）及び5-hydroxytryptamine（5-HT）含量は，いづれの脳内部位においても著変を示さなかったが，NEの主な代謝産物である3-methoxy-4-hydroxyphenylethyleneglycol（MHPG）含量，DAの代謝産物である3,4-dihydroxy-phenylacetic acid（DOPAC）及びhomovanillic acid（HVA），ならびに5-HTの代謝産物である5-hydroxyindoleacetic acid（5-HIAA）含量が大脳皮質においていづれも有意な低下を示した．しかしながら，脳幹部及び小脳

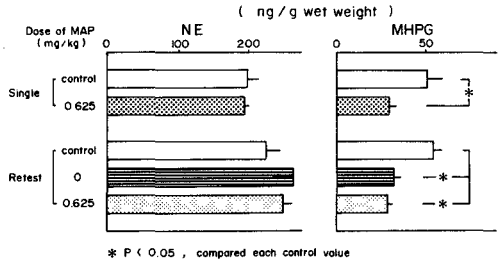


Fig.2 Effect of re-administration of MAP on cerebral contents of NE and MHPG in naive and reverse-tolerance-formed mice.

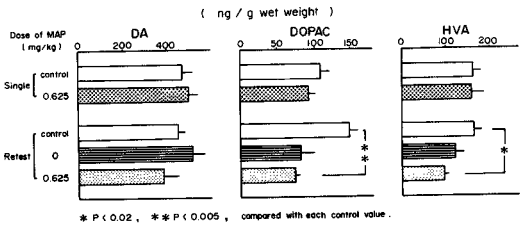


Fig.3 Effect of re-administration of MAP on cerebral contents of DA, DOPAC and HVA in naive and reverse-tolerance-formed mice.

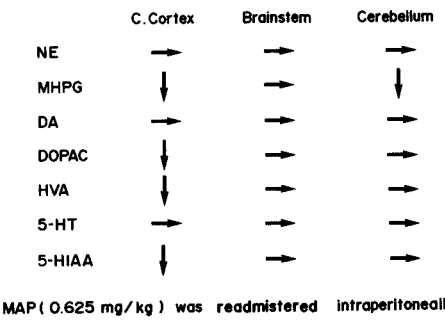


Fig.4 Changes in contents of monoamines and their metabolites in brains of reversetolerance-formed mice induced by MAP.

29. 老齢ラット脳内のモノアミン及び過酸化ラジカル反応に及ぼす小柴胡湯合桂枝加芍薬湯の影響について

平松　緑・枝松　礼・加太英明・森　昭胤
河野雅弘*・石毛　敦**
（岡山大・医・脳研・機能生化，日本電子・応用研*，津村薬理研・生理**）

〔要　約〕

老齢ラット脳内のノルエピネフリン（NE），ドーパミン（DA）及びセロトニン（5-HT）と

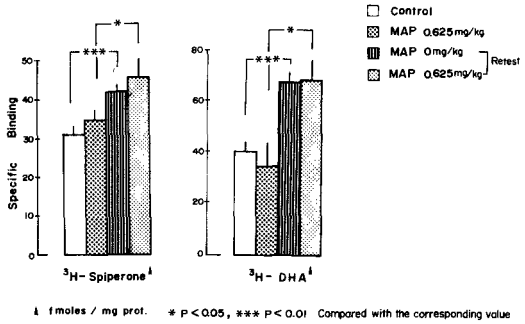


Fig.5 Alteration of synaptic receptor bindings in cerebral synaptic membranes from naive and reverse-tolerance-formed mice.

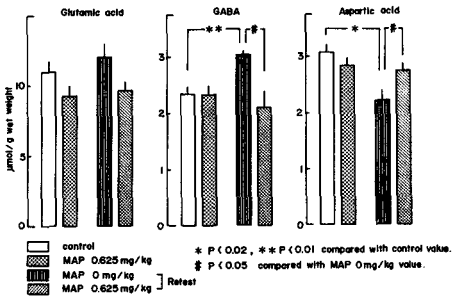


Fig.6 Effect of re-administration of MAP on cerebral contents of glutamic acid, GABA and aspartic acid in naive and reversetolerance-formed mice.

投与前）に対照群と比較して有意な含量上昇を示したが，0.625 mg/kg MAPの再投与はこの上昇を抑制した．一方興奮性神経伝達候補物質とされるアスパラギン酸（Asp）含量は，GABA含量の場合とは逆に再投与前には対照群に比して有意な低下を示したが，0.625 mg/kg MAP 再投与はこの減少を抑制した(Fig 6).その他の神経活性アミノ酸であるグルタミン酸，グリシン，タウリンなどの大脳皮質内含量には，1回投与及び再投与のいづれの時点においても著変は認められなかった．

〔考察〕

MAPの連続投与に伴う自発運動における逆耐性現象の出現には，特に側座核におけるNE[6]やDA[7]の変化が関与するとの報告がある．またその他の神経伝達物質に関しては，5-HT[8]やGABA作働系[9]による逆耐性現象出現の抑制を示唆する成績がみられる．本研究においてもMAPの連続投与後一定の休薬期間をおいて少量のMAPを投与した場合，自発運動面における明らかな逆耐性現象の出現を確認した．この時点においては，大脳皮質内のNE,DA及び5-HTのsteady state levelには変化を認めなかったが,MHPG,DOPAC,HVA及び5-HIAA含量は有意な低下を示すことを確認した．従って逆耐性形成時には，これら大脳皮質内モノアミンニューロンに代謝回転の低下が起っていることが考えられる．さらに同一条件下で，大脳皮質シナプス膜においてBmaxの増加に起因する^{3}H-spiperone及び^{3}H-DHAの結合増加がみられたことを考え合せると,自発運動におけるMAP逆耐性現象の出現には，MAP連続投与に伴う大脳皮質内DA,NE及び5-HTニューロンの代謝回転の低下と，それに伴うD_2受容体及びアドレナリン作働性β-受容体のsupersensitivityが関与している可能性が考えられる．またこれらの脳内モノアミン作働性ニューロンの代謝と機能の変化と共に，逆耐性形成時には大脳皮質内においてGABAの上昇とアスパラギン酸含量の低下を認めた．しかもこれらの変化はMAPの再投与により抑制されるものであったことを考えると，MAPに対する逆耐性現象成立の準備状態又は背景因子として，GABAやアスパラギン酸の脳内変化が重要な意義を持つのではないかと推測される．

〔文献〕1) Asher, I.M. and Aghajamian, G.H. (1974) Brain Res. 82, 1-12. 2) Muller, P. and Seeman, P. (1979) Eur. J. Pharmacol. 55, 149-157. 3) Segal D.S. (1976) Brain Res. 116, 267-276. 4) Pert, A., Rosenblatt, J.E. et al. (1978) Science 201, 171-173. 5) Ida, S. and Kuriyama, K. (1983) Anal. Biochem. 130, 95-101. 6) Handley, S.D. and Thomas, K.V. (1978) Psychopharmacol. 58, 283-288. 7) Pycock, C.J. and Horton, R.W. (1979) J. Neural Tansm. 45, 17-33. 8) Breese, G.R., Cooper, B.R. and Muller, R.A. (1974) Brit. J. Pharmacol. 52, 307-314. 9) Cott, J. and Engel, J. (1977) J.Neural Transm. 40, 253-260.

29. 老齢ラット脳内のモノアミン及び過酸化ラジカル反応に及ぼす小柴胡湯合桂枝加芍薬湯の影響について

平松　緑・枝松　礼・加太英明・森　昭胤
河野雅弘*・石毛　敦**
（岡山大・医・脳研・機能生化，日本電子・応用研*，津村薬理研・生理**）

〔要　約〕

老齢ラット脳内のノルエピネフリン(NE)，ドーパミン(DA)及びセロトニン(5-HT)とマロンジアルデヒド(MDA)及びperoxyl radical（$\cdot O_2H$）に対する小柴胡湯合桂枝加芍薬湯（津村順天堂TJ-960）の効果について検索を行った。TJ-960は5％溶液を老齢ラット（24ヶ月齢）に3ヶ月経口投与し，対照には水を投与後，大脳皮質，線条体，海馬，視床下部，中脳，橋延髄，小脳のモノアミンの分析を行った。その結果，TJ-960は視床下部のNEを増加させたが，DAには変化を与えなかった。5-HTは視床下部で低下し，小脳で増加していた。大脳半球のMDAと$\cdot O_2H$とは低下していた。TJ-960はマウス脳homogenateにFe^{2+}とascorbateを加えて発生する$\cdot O_2H$を完全に消去した。また，TJ-960は1-1-diphenyl-2-picrylhydrazyl radical (DPPH)を消去した。TJ-960のDPPH radicalに対する消去作用の度合はascorbateとビタミンEとほぼ同程度であった。以上の実験成績より，TJ-960はビタミンEやascorbateと同程度の強い抗酸化作用を有しており，膜を安定化させるために老化防止に有効であることが想定された。また，視床下部のNEを増加させることは，TJ-960が老化に伴なうNE reuroneの機能を改善するのに好都合であることが推定された。

Key word：Shosaikoto-Go-Keishikashakuyakuto, aging, free radical scavenger

老化に伴い，脳内のdecarboxylaseやtyrosine hydroxylaseの活性は低下し，ノルエピネフリン(NE)，ドーパミン(DA)及びセロトニン(5-HT)値が低下することが知られている。またこれらモノアミンのreceptor bindingやuptakeは老化に伴って減少することが報告されている[1,2,3]。これらの知見は，老化に伴いモノアミンニューロンの機能が低下することを示唆している。また一方，老化の原因として，ミトコンドリアやミクロソームにfree radical反応による過酸化物が生成されることが示されている。今回は，小柴胡湯合桂枝加芍薬湯（津村順天堂，TJ-960）の老齢ラット脳内のモノアミンと過酸化ラジカル反応に及ぼす影響について検索を行った。

実験方法

1. 実験動物：老齢ラット（24ヶ月，Wistar，雄）及びddYマウス（5週令，雄）を使用した。
2. TJ-960：サイコ7.0，ハンゲ5.0，オウゴン3.0，タイソウ4.0，ニンジン3.0，カンゾウ2.0，ショウキョウ1.0，シャクヤク6.0，ケイヒ4.0の割合で混合した生薬の抽出エキスを用いた。
3. TJ-960の投与方法：TJ-960を水に溶解（5％溶液）して吸水ビンに入れ，3ヶ月間連続投与を行った。対照には水のみを摂取させた。
4. NE, DA及び5-HTの測定：ラットを断頭後，氷上ですばやく脳を摘出し，大脳皮質，線条体，海馬，視床下部，中脳，橋延髄，小脳に部位別し，分析開始まで－80℃に保存した。脳組織中のNE, DA及び5-HTの分析は高速液体クロマトグラフィーによった[4]。
5. Malondialdehyde (MDA)とperoxyl radical（$\cdot O_2H$）の測定：MDAの測定はチオバルビツール酸法を用い，$\cdot O_2H$の測定はトラップ剤，5, 5-dimethyl-1-pyrroline N-oxide

(DMPO)を用い，電子スピン共鳴(ESR)装置を用いて行った[5]。

6. in vitroでの $\cdot O_2H$ の測定：マウスを断頭後，大脳半球を摘出し，脳組織に20倍量の0.1MKCl含有0.03M Tris-HCl(pH7.4) bufferを加え，テフロン棒付ホモゲナイザーで磨砕した。ついで磨砕液0.5 mlにbuffer 0.4 mlまたはTJ−960を溶解(20 mg／0.4 ml)したbuffer 0.4 mlと，20 μM Fe^{2+}, 20 μM ascorbateを含んだactivator 0.1 mlを加え，37℃で15分incubationした。ついでその溶液を直ちに氷冷し，その200 μlにDMPO20 μlを加え，$\cdot O_2H$をESR spectrometerで測定した。

7. 1−1−Diphenyl−2−picrylhydrazyl radical(DPPH)の還元反応測定：50 μMDPPHをエタノールに溶解し，その100 μlにエタノール100 μlまたは薬物を溶かしたエタノール溶液100 μlを加え，10秒間撹拌後，セルにとり，ESR spectrometerを用い，3350±100G，室温で測定した。Ascorbateは0.00176 μg〜1.76 mg／100 μlを，TJ−960は0.1〜2 mg／100 μlを，ビタミンEは0.05〜5 mg／100 μlを使用した。

Table 1 Effect of TJ-960 on brain catecholamine level of aged rat [ng/g tissue wet weight, m±SD, (n)]

	Dopamine		Norepinephrine	
	Control	Treated	Control	Treated
Cortex	653±163 (6)	655±298 (9)	410±122 (6)	507±145 (9)
Striatum	9755±2334 (6)	10051±3544 (9)	508±289 (6)	604±232 (9)
Hippocampus	25±9 (6)	30±10 (9)	470±101 (6)	681±262 (9)
Hypothalamus	193±49 (6)	243±70 (9)	1610±483 (6)	2570±606[a] (9)
Midbrain	325±152 (6)	261±88 (9)	937±253 (6)	1074±276 (9)
Medulla oblongata	55±12 (6)	58±11 (9)	873±209 (6)	938±187 (9)
Cerebellum	6.0±2.4 (5)	6.8±2.0 (9)	236±108 (6)	249±62 (9)

a. $p<0.025$, compared to control.

実験結果

1. カテコールアミン：TJ−960投与群では脳7部位のNEは対照群に比べて増加の傾向にあるが，統計的には視床下部のみ有意に($P<0.025$)増加していた(表1)。DAについては，TJ−960投与群では視床下部のDAが対照群に比べて増加の傾向にあり，中脳のDAは低下の傾向にあるが，統計的には有意ではなかった。

2. 5−HT：TJ−960投与群においては視床下部の5−HTは対照群に比べて有意に($P<0.05$)低下していたが，小脳の5−HTは逆に有意に($P<0.05$)増加していた(表2)。

3. $\cdot O_2H$とMDA：TJ−960投与群では脳内MDAは対照群に比べて有意に($P<0.05$)低下していた。また$\cdot O_2H$もTJ−960投与群では有意に($P<0.05$)低下していた(表3)。

4. *in vitro* の $\cdot O_2H$：マウス脳組織の磨砕液にFe^{2+}とascorbateを加えると，$\cdot O_2H$に特有なhexad radicalが検出されるが，この実験系にTJ−960を加えると，これらの$\cdot O_2H$ signalは完全に消去された(図省略)。

5. DPPH radical：50 μMのDPPH溶液ではDPPH radicalに特有なpentad signalが検出される。Ascorbate 5 μM (0.088 mg／100 μl)はこのDPPH radical signalを完全に消去した。またTJ−960溶液(2.5 mg／100 μl)は，DPPH radical signalを完全に消去した(図1)。TJ−960は5 mg／mlでDPPH radicalを完全に消去し，0〜5

Table 2
Effect of TJ-960 on brain serotonin level of aged rat [ng/g tissue wet weight, m±SD, (n)]

	Serotonin	
	Control	Treated
Cortex	380±62 (13)	354±50 (13)
Striatum	528±89 (13)	496±69 (13)
Hippocampus	462±54 (13)	430±59 (13)
Hypothalamus	1130±88 (13)	1050±92[b] (13)
Midbrain	715±77 (13)	691±71 (13)
Medulla oblongata	477±50 (13)	473±66 (13)
Cerebellum	60±14 (13)	85±28[a] (13)

a. $p<0.025$, b. $p<0.05$, compared to control

mg/ml の範囲では濃度依存性にDPPH radicalを消去した。Aacorbateは0～17.6 mg/mlの範囲で濃度依存性にDPPH radicalを消去し，ビタミンEは0～50mg/mlの範囲で濃度依存性にDPPH radicalを消去した。

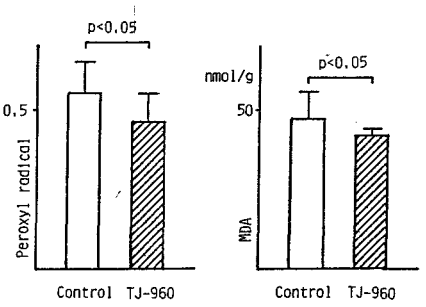


Fig 1.
Effect of TJ-960 on levels of peroxyl radical and MDA in left cerebrum of aged rats
Each group represents mean of 9-13 samples.
Vertical lines are the standard deviations.
Control, 5% TJ-960, 3 months

考察

老化に伴い脳内のDA, NE及び5-HTが低下することが明らかにされており[1,2,3]，特に視床下部のNEの低下が注目されている[6]。視床下部のNEは，脳下垂体前葉から分泌されるlutenizing hormoneとprolactinの調節に関与しており，老化による視床下部のNEの低下は，脳下垂体前葉からのこれらの分泌に非常に大きく影響することが想定される。またAlzheimer病のCSF中のDβH活性は低いことが示されており，又加齢と共にDβH活性も低下するようである。TJ-960が視床下部のNE量を増加させたことはこれらのことを勘案すると非常に興味深い。加齢に伴いDAや5-HT量ばかりでなくreceptor bindingが減少することが明らかにされているが，TJ-960はDAには変化を与えなかった。TJ-960は視床下部の5-HTを低下させ，小脳の5-HTを増加させたが，これらは5-HTのreleaseに反映しているのかもしれない。

一方，加齢と共に脳内MDAは増加し，老化の機構に膜のfree radical反応が関与することが知られている。今回TJ-960は脳内のMDAばかりでなく・O_2Hをも低下させたが，それは，TJ-960がradicalを消去させる作用を有するためであることがわかった。加齢による膜の過酸化による変質はneuroneあるいはsynapse局所の代謝応答の減弱や代謝容量の低下を招き，neuroneやsynapseの機能が低下して老化現象が現われると想定される。TJ-960がfree radical scavenging作用を有し，膜の安定化を保つことから，TJ-960の老化防止作用が期待される。

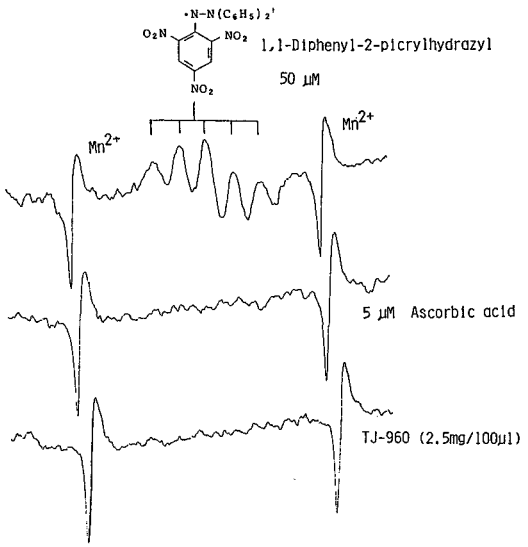


Fig 2.
Scavenging effect of ascorbate and TJ-960 on 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl radical

1) Estes et al. Brain Res. 298, 209-218, 1984. 2) Simpkins, J. W. et al. Endocrinology, 100, 1672-1678, 1977. 3) Roth, G. S. et al. Brain Res. 300, 27-32, 1984. 4) Hiramatsu, M. Folia Psychiat. Neurol. Jpn. 35, 261-266, 1981. 5) Hiramatsu, M. et al. Neurosciences, 10, 281-284, 1984. 6) Estes, K. S. et al. Brain. Res. 194, 556-560, 1980.

30. プトレスチンの脳内分布 －SIM 法を用いて－

能登　直・長谷川武史*・上村　宏・中尾純治
橋本泰道・中嶋照夫
（京都府医大・精神，GC-MS 研究室*）

〔要　約〕

ラット脳の微小組織中のプトレスチン量を測定する方法を GC－MS を用いて開発し，その方法を用いて脳内の20部位のプトレスチン（PUT）を定量した。組織中のプトレスチンは TCA を用いて抽出し，Amberlite CG 120，H^+ 型のカラムを用いて精製し，無水ペンタフルオロプロピオン酸（PFP）にてアシル化し，GC－MS に導入した。内部標準物質として1,6－ジアミノヘキサン（DAH）を用いた。PUT と DAH に特徴的な Fragment ion である m/z 217，m/z 232 を用いて，selected ion monitering method にてプトレスチンを定量した。

大脳皮質，視床下部，大脳基底核，Limbic System，および小脳の20部位におけるプトレスチン量には大きな差が認められ，その値は視床下部の anterior hypothalamic area で最も高く，小脳の paramedian lobule で最も低く，前者の約1/3であった。今回測定した20部位間のプトレスチン量を Student's t－test を用いて有意差検定を行ったところ，47部位間で有意差が認められた。

Key word：Putrescine, Central nervous system, GC－MS, SIM.

ジアミンであるプトレスチン（PUT）は核酸合成，蛋白合成，増殖細胞とくに癌との関連において多くの研究（2，3，6，7，9，10）がなされている。

しかし中枢神経系におけるプトレスチンの生理機能に関してはあまり研究がなされていない。中枢神経系におけるプトレスチンの役割を明らかにするため，昨年の本学会で，ラット脳内の12の部位で ^{3}H－プトレスチンから ^{3}H－GABA が生合成されること(4)および生合成された ^{3}H－GABA の遊離が high K^+ により促進されることを報告した(5)。プトレスチンの脳内での役割をさらに明らかにするため，プトレスチンの脳内分布を調べ，若干の知見を得たので報告する。

〔実験方法〕

＜実験動物＞　150－200 g のウイスター系雄ラットを12時間の明暗サイクル，室温23－26℃の条件下で飼育した。飼料と水は自由に摂取させた。

＜プトレスチンの抽出＞　ラット脳を取り出し，直ちに凍結させた後，厚さ1㎜の連続切片を作製した。ラット脳図譜に従って，直径500μm のステンレスパイプを用いて，切片より脳の20の部位を取り出した。取り出した脳組織に 0.1 N HCl を加えホモジナイズした。ホモジネートの一部は蛋白定量に用い，残りの部分には10％ TCA を加え，よく攪拌したのち，遠沈した。この操作を3回くり返し，上清を集め以下の実験に用いた。集めた上清に内部標準物質（I.S.），1,6－diaminohexane－2HCl（DAH）を300 ng 加えた後，ジエチルエーテルにて TCA を抽出した。水層を Amberlite CG 120，100－200 mesh，H^+ form のカラムに通し，水および 0.1 N HCl でカラムを洗った後，6N HCl・50％エタノールでプトレスチンを溶出した。溶出液はロータリーエバポレーターで乾

燥させ，少量の水を用いてリアクティバイアルに移した後，凍結乾燥した。

検量線作製には以下の4種類のPUTおよびI.S.の組み合せを用いた。25 ng（PUT）－1000 ng（I.S.），50 ng（PUT）－1000 ng（I.S.），100 ng（PUT）－1000 ng（I.S.）および500 ng（PUT）－1000 ng（I.S.）である。検量線作製のためのPUTおよびI.S.の抽出操作は，ジエチルエーテルによるTCA抽出の段階から始めた以外は組織からの抽出操作と同じであった。尚，I.S.を加えるまでのPUTの抽出効率は，^{3}H－PUTを用いて検討したところ99.4±1.1％（M±SEM，n＝9）であった。

＜プトレスチンの定量＞　PUTの定量はサンプルを無水ペンタフルオロプロピオン酸（PFP）を用いてアシル化した後，ガスクロマトグラフ質量分析計（島津GC－MS－6020）にて行った。プトレスチンのアシル化は凍結乾燥したサンプルに50 μlのアセトニトリルと50 μlのPFPを加え，室温下でスターラにて20分間攪拌して行った。反応溶液を乾燥した後，20 μlのアセトニトリルを加え，その内の0.5 μlをガスクロマトグラフ質量分析計に注入した。測定はselected ion monitering method（SIM）にて行った。ガスクロマトグラフ質量分析の条件は下記の通りである。

GC－MSの条件：カラム――ϕ 0.2 mm × 25 m ガラスキャピラリーカラムSE 30，キャリヤーガス――ヘリウム（30 ml／min），カラム温度――200度，ionizing法――EI法，electron加速電圧――20 V，イオン源温度――280度，monitering加速電圧――magnetic massをm／z 201に固定した後コンピューターにより制御，monitering ion fragments――m／z 217（PUT），m／z 232（I.S.）．

〔結果〕

＜PUTおよびI.S.のアシル化とそのGC－MS＞　PFPによるPUTおよびDAHのアシル化は定量的に行われ，かつ非常に安定した生成物が得られた(1)。PFP－プトレスチンのマススペクトルにおいて少量ではあるがm／z 380のM^{+}イオンそして最も大きな，特徴的なイオンとしてm／z 217が得られた。PFP－DAHにおいて少量のm／z 408のM^{+}イオンそして大きな，特徴的イオンとしてm／z 232が得られた。プトレスチンの定量は両物質に特徴的なイオンを用いて，SIM法にて行った。この方法で得られた検量線は直線を示し，安定したプトレスチン定量が行えた。

＜プトレスチンの脳内分布＞　プトレスチンを測定した部位は，大脳皮質で3カ所〔Frontal cortex，Frontoparietal cortex，motor area（Fr. Pa. M），Frontoparietal cortex，sensory area（Fr. Pa. SS）〕，視床で3カ所〔前内側核（AM），前腹側核（AV），腹後側核（VP）〕，視床下部で6カ所〔視索上核（SON），前視床下部領域（AHA），視交叉上核（SCN），側視床下部領域（LHA），室傍核（PVN），腹内側視床下部核（VMH）〕，大脳基底核で3カ所〔Caudate－Putamen（CPU），淡蒼球（GP），黒質（SN）〕，Limbic systemで3カ所〔扁桃核（AN），Ammon's horn（AH），Dentate gyrus（DG）〕および小脳で2カ所〔Vermis，Paramedian lobe（PM）〕の合計20部位である。その結果はTableに示したが，視床下部では高い値を示す部位が多くみられたが，部位間でその値は大きく異なっており，視床下部の多様な機能と関係があるのかもしれない。最も高い値を示したのはAHAであり，ついでLHA，PVN，SCN，SON，VMHであった。視床下部以外で値にバラツキのみられたのは大脳皮質においてである。Frontal cortexは高い値であったが，Fr. Pa. M.

および Fr. Pa. SS は低い値を示した。この差も大脳皮質の機能の違いを反映しているのかもしれない。大脳基底核，視床，Limbic system，小脳ではプトレスチン量に大きなバラツキは認められなかった。Table には示さなかったが，今回測定した 20 部位間のプトレスチン量を Student's t-test を用いて有意差検定を行ったところ，47部位間で有意差が認められた。

＜考察＞

今回用いたプトレスチン測定法は微量脳組織中のプトレスチン量を測定する上で非常に有用であった。過去に脳全体で測定されたプトレスチン量(8)に比較して高い値を示したのは抽出方法の改善，安定な PFP 誘導体を用いたことおよび感度の良い SIM 法を用いたことに因ると考えられる。

今回得られたプトレスチ量の脳内分布において，多くの部位間で有意差が認められたことは，プトレスチンが中枢神経系内で何らかの機能を果していることを推測させる。しかしながら前回我々が報告(4)した脳内 12 部位での ^{3}H-GABA の生成量と，今回測定したそれらの部位におけるプトレスチン量の間には有意な相関は認められなかった。前回，我々が報告したプトレスチンから生合成される GABA も神経伝達物質の可能性があるということも含め，今後さらに詳しくプトレスチンの脳内での役割を検討しなければならないと考えている。

〔文献〕

1. Änggård, E. and Sedavall, G., Ann. Chem., 41, 1250 (1969).
2. Dion, A. S. and Herbst, E. J., Proc. Nat. Acad. Sci., 58, 2367 (1967).
3. Fuchs, E., et al., Europ. J. Biochem., 3, 183 (1967).
4. 能登　直ら，神経化学，23, 360 (1984).
5. 能登　直ら，神経化学，23, 363 (1984).
6. Rudkin, B. B., et al., Biochem. J., 217, 731 (1984).
7. Russell, D. H., Biochem. Pharmacol., 20. 3481 (1971).
8. Seiler, N. and Lamberty, U., J. Neurochem., 24, 5 (1975).
9. Tabor, H., et al., Ann. Rev. Biochem., 30, 579 (1961).
10. Woo, K.B., et al., Cancer, 52, 1684 (1983).

Table The distribution of putrescine in rat brain(Mean±SEM,pg/μg protein,n=8)

Cerebral Cortex		Thalamus	
Frontal cortex	636.6±115.6	AM	374.6±50.7
Fr.Pa.M.	362.4±59.0	AV	376.7±71.1
Fr.Pa.SS.	381.6±59.5	VL	322.1±88.5
Hypothalamus		Limbic System	
SCN	663.8±176.5	Amygdala	450.7±69.0
AHA	841.7±291.9	AH(CA1)	436.0±56.1
SON	493.2±95.5	DG	499.0±109.0
LHA	818.1±148.2	Cerebellum	
PVN	779.0±146.1	Vermis	289.3±31.2
VMH	489.6±134.4	Cerebellar Lobe	256.6±27.8
Basal Ganglia			
CPU	481.3±95.0		
GP	464.6±26.7		
SN	468.1±125.9		

31. Conscious & freely moving ラットの大槽内髄液中モノアミン代謝物のレセルピン投与後の経時的推移

澤　温・大久保律子・鈴木義徳・奥山真司・中澤恒幸
(藤田学園保衛大・医・精神神経)

〔要　約〕

Conscious & freely movingの状態で、Sarnaらの方法に従ってラット大槽内より髄液を採取し、レセルピン(Res)(2mg/kg;i.p.)投与後1時間毎6時間目までの髄液内 DOPAC、HVA および5-HIAAの非抱合体およびtotal(非抱合体＋抱合体）の経時的推移について検討した。Res投与群、vehicle(7%プロピレングリコール）投与群の DOPAC 非抱合体および totalの Res投与前値に対する投与後値の変化率の推移を見てみると、非抱合体は Res投与1時間目から5時間目まで有意にRes 投与群が高値を示したが6時間目では有意差は認められなかった。一方 totalは Res投与1時間目から6時間目まで有意に Res投与群が高値を示した。このことより total値の方が DOPACに関しては感度が高いと考えられた。HVA は非抱合体、total 共に1時間目では有意差が認められなかったが、2時間目から6時間目まではRes 投与群が高値を示した。5-HIAAはそのほとんどが非抱合体であるので非抱合体についてのみ検討した。Res投与群の 5-HIAA は Res投与1時間目から6時間目まで有意に高値を示した。

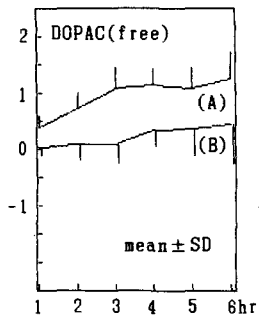
Key word：Conscious & freely moving rat, Reserpine, Monoamine metabolites in CSF

動物行動とその脳内生化学的変化を調べる上で、同一動物の conscious & freely movingな状態での行動と、その生体試料を経時的に測定することは困難とされてきた。これは特に使用動物数の限られた近交系の小動物を扱う上では開発されねばならない手法であった。最近 Sarnaら[1,2]はラットが conscious & freely movingな状態で、その大槽内より経時的に髄液を採取し、そのモノアミン代謝物のp-chlorophenylalanine 、D,L-monofluoromethyldopa 投与後の変化について報告した。そして代謝物の中で 3,4-dihdroxyphenyl-acetic acid (DOPAC)、homovanillic acid (HVA)は 5-hydroxyindole-3-acetic acid(5-HIAA)と異なり硫酸抱合体が多いため水解後の total（抱合体＋非抱合体）を測定して検討する必要があると報告している。われわれはこれまで育成してきた近交系ラット､レセルピン高感受性および低感受性ラットに本方法を適用する前に closed colonyラットにレセルピン（以下Res)を投与した時の髄液内 DOPAC、HVA、および 5-HIAA の経時的推移をその硫酸非抱合体および totalの変動を含めて検討した。

＜方法＞

実験は Wistar 系雄ラット(190.0＋7.3g) を用い、Res 投与群(5匹）、vehicle投与群(5匹）に2分した。6:00－18:00 の明期、18:00－6:00の暗期（赤色光）に順応させた後、Sarna ら[1]の方法に従ってラット大槽内にポリエチレンチューブを挿入した。手術3日後の 19:00に採取用チューブを装着し、1時間の順応後20:00より30分毎に髄液を30μl ずつ採取した。21:00 に Res投与群には Res(2mg/kg i.p.) を投与し、vehicle 投与群に7%プロピレングリコールを同様に投与し、その後

図1-a



1-b

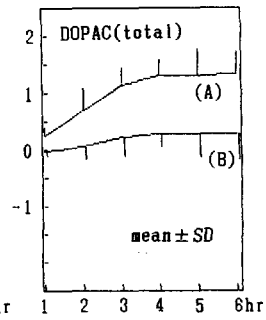
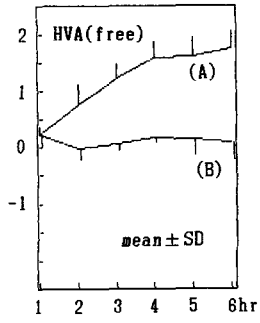


図2-a



2-b

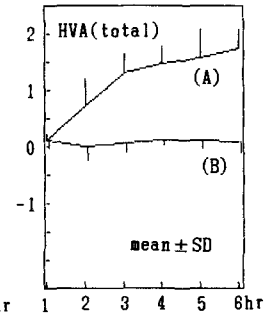


図3

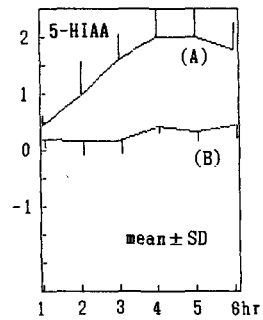


図1-a Res投与(A),vehicle 投与(B) 後の DOPAC－非抱合体－の時間的推移；1-b DOPAC －total －の時間的推移（縦軸は投与前値に対する変化率）

図2-a Res投与(A),vehicle 投与(B) 後の HVA－非抱合体－の時間的推移；1-b HVA－total －の時間的推移

図3 Res投与(A),vehicle 投与(B) 後の 5-HIAA の時間的推移

後1時間毎6時間目まで髄液を30μl ずつ採取した。採取した髄液は 0.1% システイン 5μl と混和後測定まで－75℃にて保存した。髄液中の DOPACと HVA（抱合体、非抱合体）および5-HIAA(非抱合体のみ）の測定は Sarnaら[2]の方法に従ってHPLC-ECDにて測定した。5-HIAAは抱合体が少ないので非抱合体の値のみを用いた。投与前値(3回）は算術平均し、その値に対する投与後6時間までの各時間の値の変動率を算出し、対数変換後、分散分析、t-検定を用いて検定した。

＜結果＞

投与前値3回の値の平均は、DOPAC は非抱合体 0.050±0.009 nmole/ml、total 0.064±0.011 nmole/mlであり、HVA は非抱合体 0.075±0.014 nmole/ml、total 0.083±0.016 nmole/mlであった。また 5-HIAA は 0.422±0.113 nmole/mlであった。 DOPAC 、HVA 、5-HIAAの非抱合体、total の投与前値に対する投与後値の％変化率の経時的変動については図1-a,b 、図2-a,b 、図3 に示した。

Res 投与群、vehicle 投与群の DOPAC非抱合体 (図1-a)、total(図1-b)の推移を見てみると、非抱合体は Res投与1 、2 、5時間目ではP<0.05で3 、4時間目ではP<0.01で有意に Res投与群が高値を示したが6時間目では有意差は認められなかった。一方 totalは Res投与2時間目のみP<0.05で、他の時間はP<0.01で有意に Res投与群が高値を示した。

HVAの推移については図2-a(非抱合体） 、図2-b(total)に示した。非抱合体、totalともに1時間目では有意差が認められなかったが、2時間目から6時間目の時間については totalの2時間目がp<0.05で有意差が認められた以外はすべてp<0.01でRes投与群が有意に高値を示した。

5-HIAAの非抱合体の推移については図3に示した。 Res投与1 、2時間目ではp<0.05で、3時間目から6時間目ではp<0.01で有意に Res投与群が高値を示した。

DOPAC 、HVA および 5-HIAA の抱合体／total 比は Res投与群、vehicle 投与群とも投与後６時間目までほぼ変動が認められなかった。

＜考察＞

Conscious & freely movingラットの髄液中のアミン代謝物を経時的に測定した報告は少なく、本実験の方法の原著者である Sarnaら[1,2]およびカーゾン グループの報告がみられるにすぎない。彼らは[1]p-chlorophenylalanine 投与後の 5- HT turnoverを probenecid を用いて測定し、全脳と髄液での値は比例すると報告している。また彼らは[2]D,L-monofluoromethyldopa (MFMD) 投与後 probenecid を投与してdopamineと 5-HT turnoverを測定し、非抱合体の変化より totalの変化の方がより大きく、硫酸抱合に関与する phenolsulphotransferase 活性に MFMD が影響を及ぼすと推測している。

これまで Conscious & freely movingラットの髄液について、 Res投与後のDOPAC HVA 、および 5-HIAA の変化を測定した報告は見られない。われわれの結果では Res投与後 DOPAC 、HVA 、および 5-HIAA はいずれも時間的経過とともに増大したが DOPAC は６時間後では非抱合体においては有意差は認められず、total においてのみ有意差が認められ total値の方が感度が高いことがわかった。

ラット髄液中の DOPAC、HVA の抱合率について、 Sarnaら[2]は DOPAC が67% 、HVA が53% であると報告しているが、われわれの実験での比率はやや低く、個体差が認められるものの Res投与によって各個体内での抱合率には変動がほとんど認められない点から、 Res投与は硫酸抱合に関与する phenolsulphotransferase 活性には影響を及ぼさないものと考えられた。

＜謝辞＞

本研究について示唆および本法習得の機会をお与え下さったロンドン大学神経研究所カーゾン教授および直接御指導下さったハトソン博士に感謝致します。

＜文献＞

1) Sarna, G. S., Hutson, P.H.,Tricklebank, M.D. and Curzon, G (1983) J.Neurochem. 40; 383-388.

2) Sarna, G. S., Hutson, P.H. and Curzon, G (1984) Eur.J.Pharmacol. 100; 343-350.

32. メトアンフェタミン断薬後におけるラット脳部位別モノアミン代謝の特徴

岡田尚志郎・盛政忠臣・池田正明・難波洋一郎*
金行孝雄**・庄盛敏廉
（岡山大・医・脳研・病態生化，脳神経外科*，岡山県立短大**）

〔要　約〕

メトアンフェタミン慢性投与後断薬したラット脳部位のドパミン（ＤＡ）代謝およびセロトニン（５ＨＴ）代謝について検討を加えた。ＤＡ量は、断薬群において、側坐核、嗅核、扁桃核背側、線条体の部位で有意に減少した。逆に、ＤＯＰＡＣ量、ＨＶＡ量は、側坐核を含む２－３の部位において有意な増加を示した。それに対して、ＤＡ、ＤＯＰＡＣ、ＨＶＡの３者をモル濃度で加算すると、嗅核を除く全ての脳部位において、有意な変化を示さなかった。以上の結果から、メトアンフェタミン断薬群においては、ＤＡの放出利用が昂進していること、さらに、生合成律速酵素の関与した代謝回転の昂進ではないことの二点が示唆された。一方、５ＨＴ代謝については、断薬群において、扁桃核を含む５部位で５ＨＴ量の有意な減少と、５ＨＩＡＡ量の有意な増加が認められた。５ＨＴと５ＨＩＡＡをモル濃度で加算すると、有意な変化を示す部位が認められた。以上の結果から、メトアンフェタミン断薬群において、５ＨＴの利用放出の昂進、および、生合成律速酵素の関与が示唆された。これらの結果から、メトアンフェタミン断薬ラットの神経終末において、ＤＡならびに５ＨＴは、放出されやすい（ｅａｓｉｌｙ　ｒｅｌｅａｓｉｎｇ）状態にあることが示唆された。

Key word：　MONOAMINES, METHAMPHETAMINE WITHDRAWAL, EASILY RELEASING

メトアンフェタミンを繰り返し投与した動物においては、断薬後長期間にわたって、脳内ドパミン過剰活動を反映した行動薬理学的な現象が認められている（10）。一方、精神分裂病においては、臨床薬理学的知見から、その病態は、ドパミン過剰活動に基づくものと推定されている（９）。前者は、後者の実験モデルとしての位置づけが試みられているが、動物実験、臨床のいずれにおいても、ドパミン過剰活動を証明する神経化学的な状況証拠は不充分なままである。従来のこのような動物実験の神経化学は、多くは、線条体と側坐核に関するものであった。本研究においては、辺縁系の関与に着目して、ドパミン過剰活動の状況証拠に検討を加えた。

材料と方法

実験動物には、ウィスター系雄ラットを用いた。動物は、１２時間毎の明暗周期、室温２１℃、飼料、水は、自由に摂取できる条件下で飼育した。メトアンフェタミンは、飲水ビンより投与し、その溶液濃度は、最初の１週間は、５０ｍｇ／Ｌ、第２週は、１００ｍｇ／Ｌ、第３、４週は、２００ｍｇ／Ｌとした。実際の薬物摂取量は、１日当り、約５ｍｇ／体重ｋｇから、１５ｍｇ／体重ｋｇに相当した。対照には、水を用いた。実験群は、４週間投与の最終日の群（Ａ群）、４週間投与後、断薬１週間目の群（Ａ－１群）、および、対照群（Ｃ群）の３群を作成し、いずれも第１６週令目で比較した。第１６週令において、明暗周期の明転、４時間目に、液体窒素中で、動物頭部を急速冷却し、断頭処理した。全脳は、すみやかに取り出し、ドライアイス上で急速冷凍し、－８０℃で保存した。冷凍状態の脳は、１．０ｍｍの厚さに、前額断し、Ｋönig and Ｋlippel（５）などのアトラスを参考にして、側坐

核、嗅核、線条体、黒質、扁桃核腹側、扁桃核背側、視床下部腹内側領野、視床下部外側領野：約５－１４ｍｇ湿重量／ラット脳をパンチアウトした（７）。パンチアウトして得た脳部位は、Ｅｐｐｅｎｄｏｌｆ型プラスチックｔｕｂｅ内で、ホモジナイズし、遠心分離の処理を行うことにより、上清を得た。これらの同一サンプルから、ＤＡは、アルミナ吸着法により、５ＨＴは、ＰＣＡによる除蛋白により、また、ＤＯＰＡＣ、ＨＶＡ、５ＨＩＡＡは、有機溶媒により抽出し、高速液体クロマトグラフィー電気化学検出器（医理化工業）を用いて測定した。組織ホモジネートの蛋白量は、Ｌｏｗｒｙら（６）の方法で測定した。得られた結果の統計学的処理には、ＯＮＥ－ＷＡＹ　ＡＮＯＶＡを用いた。

結果

１．ドパミン代謝の変化　（Ｔａｂｌｅ　１）

ＤＡ量は、断薬群（Ａ－１）において、側坐核、嗅核、扁桃核背側（Ｎ．ａ．ｃｅｎｔｒａｌｉｓを含む）、線状体の部位で、有意な減少を示した。また、黒質においても減少の傾向が認められた。逆に、代謝産物（ＤＯＰＡＣ＋ＨＶＡ）量は、断薬群（Ａ－１）において、側坐核を含む２－３の部位において、有意な増加を示した。線条体においても、増加の傾向が認められた。ＤＡ、ＤＯＰＡＣ、ＨＶＡの３者をモル濃度で加算すると、嗅核を除く全ての脳部位で、断薬群（Ａ－１）は、対照群（Ｃ）に対して、有意な変化を示さなかった。長期投与群（Ａ）では、断薬群（Ａ－１）に類似の傾向を示したが、大部分の部位で、有意な差異を認めなかった。

２・セロトニン代謝の変化（Ｔａｂｌｅ　２）

５ＨＴ量は、Ａ－１において、扁桃核を含む５部位で、有意な減少が認められた。逆に、５ＨＩＡＡ量は、Ａ－１において、扁桃核を含む３部位において、有意な増加を示した。５ＨＴ、５ＨＩＡＡを、モル濃度で加算すると、Ａ－１がＣに対して、有意な増加を認める部位があった。

考察

メトアンフェタミン慢性投与後断薬したラット脳部位のＤＡ代謝および５ＨＴ代謝について検討を加えた。ＤＡ量が、断薬群において、有意に減少し、逆に、ＤＯＰＡＣ、ＨＶＡ量が有意に増加したこと、および、ＤＡ、ＤＯＰＡＣ、ＨＶＡ量の３者をモル濃度で加算すると、断薬群が、対照群に対して変化を示さなかったことから、ＤＡの放出利用が昂進していること、さらに、生合成律速酵素であるチロシン水酸化酵素の関与した代謝回転の昂進ではないことの二点が示唆された。一方、５ＨＴも、ＤＡと同様に、その放出利用の昂進が示唆されたが、５ＨＴと５ＨＩＡＡをモル濃度で加算すると、対照群に対して増加しており、生合成律速酵素であるトリプトファン水酸化酵素の関与した代謝回転の昂進の可能性が示唆された。ＤＡ脳内濃度は、大量のメトアンフェタミン長期投与で、休薬後、長期にわたる減少が報告されている（３）。このことは、今回のわれわれが得た結果に一致した。チロシン水酸化酵素活性（２）、トリプトファン水酸化酵素活性（４）の変化に関する報告もあるが、今回の結果は、これらの報告とは、一致しなかった。ＤＡおよび５ＨＴの放出利用昂進の観点から、これらの動物脳内において、ＤＡと５ＨＴが放出されやすい（ｅａｓｉｌｙ　ｒｅｌｅａｓｉｎｇ）状態にあることが示唆された。このことは、西川ら（８）のい

		DA	DOPAC+HVA	DA+ DOPAC+HVA	5HT	5HIAA	5HT+ 5HIAA
caudate -putamen	C	456.0±27.7	167.9±14.9	629.1±31.3	8.4± 1.2	24.4± 3.1	32.8± 4.1
	A	371.0±28.9	123.6± 7.6↓	499.3±29.6↓	7.4± 1.0	27.2± 3.0	34.6± 3.8
	A-1	339.8±25.3↓	213.1±34.3	568.9±48.6	6.5± 0.6	29.5± 3.7	36.0± 4.0
s.nigra	C	26.8± 3.8	10.6± 0.5	37.4± 4.2	21.6± 1.6	49.9± 2.9	71.5± 3.1
	A	19.5± 1.4	17.0± 1.8↑↑	35.2± 2.2	17.6± 1.7	50.8± 4.3	68.4± 5.6
	A-1	18.4± 3.9	15.3± 3.7	34.2± 8.1	15.5± 0.5	62.5± 7.4	84.4± 2.0↑
N.acc.	C	221.6±17.6	95.0±10.0	316.0±23.4	14.4± 1.2	25.7± 1.9	40.1± 1.3
	A	167.5±31.6	165.8±19.3↑↑	341.6±47.0	10.6± 0.4↓	26.3± 1.5	36.9± 1.6
	A-1	138.9± 5.4↓↓	154.8±18.8↑	295.2±28.0	8.3± 0.9↓↓	32.3± 3.2	40.5± 3.4
N.olf.	C	127.3± 7.9	74.6±15.5	208.8±15.8	19.2± 2.3	23.7± 1.7	42.9± 3.4
	A	110.9±17.3	59.4±11.5	169.8±26.5	13.1± 2.2	22.7± 2.7	35.8± 4.6
	A-1	63.8±12.4↓↓	64.1±13.2	133.8±26.6↓	10.1± 0.9↓↓	24.7± 3.8	34.8± 4.3
v.amy.	C	6.4± 0.5	5.8± 1.3	12.0± 1.7	12.4± 1.0	31.5± 1.9	43.9± 2.4
	A	5.5± 0.8	9.2± 1.7	15.3± 1.9	8.8± 0.6↓↓	35.4± 2.1	44.1± 2.4
	A-1	5.3± 1.4	12.9± 2.7↑	18.8± 2.7	8.4± 0.6↓↓	42.2± 2.3↑↑	50.6± 2.7
d.amy.	C	22.1± 3.5	13.1± 3.2	36.2± 5.1	15.0± 0.7	33.3± 1.0	48.3± 1.4
	A	12.0± 0.9↓	15.0± 3.0	24.9± 5.1	10.9± 0.8↓↓	38.4± 2.2	49.2± 2.8
	A-1	13.1± 1.5↓	17.4± 3.9	28.6± 6.2	9.5± 0.3↓↓	44.5± 1.8↑↑	54.0± 2.1
VMH	C	12.6± 1.6	9.8± 1.6	23.0± 2.5	11.7± 0.8	34.0± 2.7	45.7± 3.2
	A	9.3± 2.4	13.6± 4.3	24.3± 5.8	6.8± 0.6↓↓	31.5± 1.7	38.2± 1.8
	A-1	7.4± 1.4	12.7± 2.5	21.5± 3.2	6.3± 0.4↓↓	39.1± 1.1	45.3± 1.5
LH	C	10.3± 1.7	9.8± 1.6	20.1± 3.3	13.1± 0.8	40.9± 1.5	54.0± 1.6
	A	8.3± 1.0	15.0± 3.3	24.1± 4.4	11.3± 0.8	48.0± 3.2	58.9± 3.1
	A-1	6.0± 0.5	10.4± 2.7	17.1± 4.0	11.4± 1.8	55.6± 2.4↑↑	67.0± 1.2↑↑

Table 1 Changes in monoamines and their metabolites during and after withdrawal of methamphetamine treatment

p moles / mg protein (mean ± sem) ↑↑ or ↓↓ : $p < 0.01$ ↑or↓ : $p < 0.05$

うrelative hyper-responsiveness および受容体側からの報告（1）の神経化学的な背景である可能性を示唆するものと考えられた。

文献

1. Akiyama.K., M.Sato and S.Otuki (1982) Biol. Psychiat. 17: 223-231
2. Bardsley,M.E. and Bacheland,H.S. (1981) Biochem. Pharmacol. 30: 1543-1549
3. Ellison,G.,Eison,M.S.,Huberman,H.S. and Daniel,F. (1978) Science, 201: 276-278
4. Hotchikiss,A.J.,Morgan,M.E. and Gibb,J.W. (1979) Life.Sci. 25: 1373-1378
5. Konig, J.F.R. et al (1970) The rat brain, A stereotaxic atras,Krieger
6. Lowry,O.H., Rosebrough,N.J.,Farr,A.L. and Randall,R.J. (1951) J. Biol. Chem. 193: 265-275
7. 盛政忠臣，庄盛敏廉，Kräuchi,K. and Wirz-Justice,A. (1984) 脳研究会誌，10: 68-69
8. Nishikawa.T., N.Magata, M.Takashima and M.Toru (1983) European J. Pharmacol. 88:195-203
9. Tatum,A.L. and Seevers,M.E. (1929) J. Pharmacol. Exp. Ther. 36: 401-410
10. Snyder,S.H.,Banerjee,S.P., Yamamura,H.I. and Greenberg,G. (1974) Science, 184: 1243-1253

33. 黒質線条体系におけるドパミン代謝の日内動態と加齢による変化

盛政忠臣・池田正明・岡田尚志郎・中野重行*・庄盛敏廉
（岡山大・医・脳研・病態生化，愛媛大・医・薬理*）

〔要　約〕

９週齢および６５週齢の雄性ウィスターラット線条体および黒質を、１２時間毎の明暗周期下４時間毎にパンチアウトし、ドパミン（ＤＡ）およびその代謝産物（ＤＯＰＡＣ、ＨＶＡ）ならびにＧＡＢＡ濃度を測定した。

線条体ＤＡは両群において明期に高値を示す有意な日内リズムを示した。逆に主要代謝産物［ＤＯＰＡＣ＋ＨＶＡ］濃度さらに代謝回転を反映する［ＤＯＰＡＣ＋ＨＶＡ］／［ＤＡ］比は共に暗期に高値を示す有意な日内リズムを示した。以上の結果から、ラット活動期に線条体ＤＡの利用が大であることが示された。

黒質においては逆に、ＤＡは暗期に高値を示し、ＤＡの利用は明期に大である有意な日内リズムを示した。黒質におけるＤＡの利用が、線条体に対して日内リズムが逆転していることは、黒質ＤＡが黒質線条体ＤＡ系における自己抑制機能を有するという従来の知見に一致するものと考えられた。

ＧＡＢＡ濃度は、９週齢群両部位において有意な日内リズムを示さなかった。

加齢によるＤＡ代謝の変化は、量的な変化ならびに日内リズムの変化に認められたが、その意義についてはさらに検討を要するものと考えられた。

Key word：ｄｏｐａｍｉｎｅ　ｍｅｔａｂｏｌｉｓｍ，ｃｉｒｃａｄｉａｎ　ｒｈｙｔｈｍ，ａｇｉｎｇ

行動薬理学ならびに時間薬理学的な多くの知見から、黒質線条体ＤＡ系に日内リズムの存在が確信されているにも拘わらず、神経化学的には明確な知見は得られていない。線条体は黒質以外からもＤＡ終末の投射を受けていることから、本研究においては黒質のみから投射を受けている線条体背外側領野（１）ならびに黒質をパンチアウト法によって採取し、モノアミンの分析を行った。また、加齢ラットにおいては行動リズムが平坦化することが知られているので加齢の影響を合わせて検討を加えた。

－実験方法－

１２時間毎の明暗周期、恒温恒湿の恒常条件下で飼育されている９週齢（ｎ＝２４）ならびに６５週齢（ｎ＝３６）のウィスター系雄性ラットを用いた。暗転後２時間目より４時間毎に動物を液体窒素中で固定した後断頭して脳を得た。脳は冷凍状態（－２０℃）で前額断し、脳アトラス（２）を参考にして線条体背外側領野ならびに黒質をパンチアウトした。脳標品のホモジナイズ遠心後の上清を用いて、ＤＡ，ＤＯＰＡＣ．ＨＶＡは高速液クロ・電気化学検出器（医理化工業）によって、またＧＡＢＡはＯｋａｄａら（４）の方法を用いて測定した。統計学的解析には分散分析を用いた。

－結果と考察－

結果をＦｉｇ．１に示す。

１．線条体：本研究においては、黒質だけによってＤＡ終末の投射を受けているとされる線条体背外側領野を用いて分析した。ＤＡ濃度は、両群において明期後半に高値を示す有意な日内リズムを示した。［ＤＯＰＡＣ＋ＨＶＡ］（モル濃度による加算）

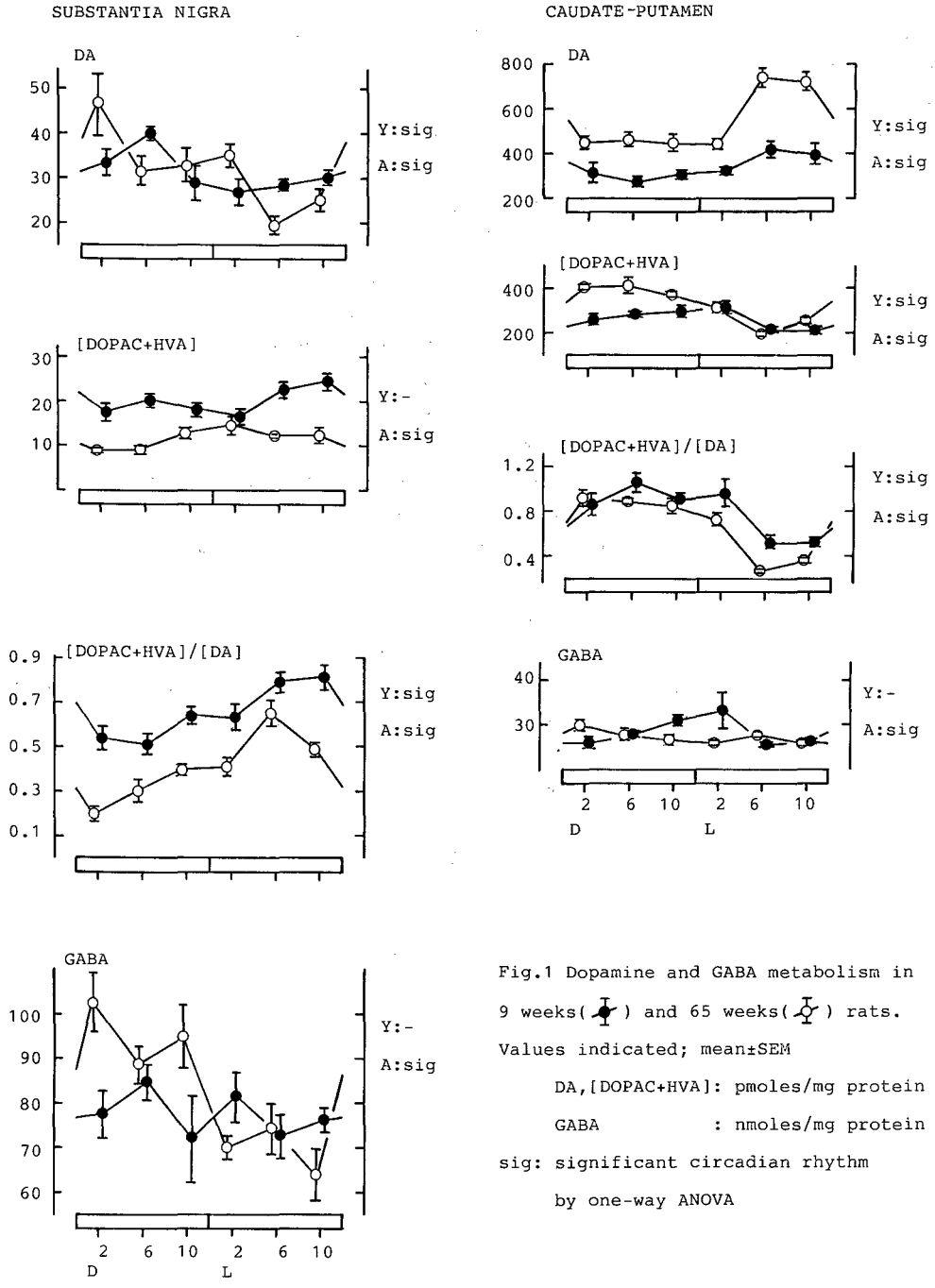


Fig.1 Dopamine and GABA metabolism in 9 weeks( ) and 65 weeks( ) rats.
Values indicated; mean±SEM
DA,[DOPAC+HVA]: pmoles/mg protein
GABA : nmoles/mg protein
sig: significant circadian rhythm by one-way ANOVA

は、動員利用されたＤＡ量を反映するものと考えられる。また［ＤＯＰＡＣ＋ＨＶＡ］／［ＤＡ］（モル濃度）はＤＡの代謝回転ないし利用率を示すものと考えられる。その両者共に、暗期を通じてさらに明転直後にわたって高値を示す有意な日内リズムを示した。このことは、ラットが夜行性動物であること、線条体ＤＡ活動は行動量と密接な関係のあることなどと一致した所見であると考えられた。［ＤＯＰＡＣ＋ＨＶＡ］は量的には大半がＤＯＰＡＣである。この日内リズムのパターンは、ｉｎ　ｖｉｖｏ　ｖｏｌｔａｍｍｅｔｒｙ法によって得た筆者ら（３）の報告と一致するものである。ＤＡ量自体は、従って、ＤＡ活動を直接反映しないことが示された。

線条体におけるＧＡＢＡは、細胞体とその終末が共に線条体に存在しているニウロン由来とされている。そのＧＡＢＡ濃度に日内リズムは認められなかった（９週齢群）が、ＤＡ活動に対する役割についてはさらに検討を要するものと考えられる。

２．黒質：ＤＡ濃度は、両群において暗期に高値を示す有意な日内リズムを示した。［ＤＯＰＡＣ＋ＨＶＡ］は、９週齢群において有意な日内リズムが示されなっかたが、［ＤＯＰＡＣ＋ＨＶＡ］／［ＤＡ］比は、明期に高値を示す有意な日内リズムを示した。このことは、黒質におけるＤＡ活動が明期に高いことを示すものと考えられる。黒質におけるＤＡは黒質線条体ＤＡ系の自己抑制的に機能していることが知られている。ここで得られた結果は、黒質線条体ＤＡ活動を明期で抑制し、暗期において相対的に脱抑制していることを示唆しているものと考えられる。これは、線条体で得られたＤＡ代謝ないし活動の日内リズムと合致した所見であると考えられた。

黒質におけるＧＡＢＡは、黒質線条体ＤＡ活動に由来して黒質ＤＡニウロンに対して抑制的に作用しているものと考えられている。９週齢群においては、黒質ＧＡＢＡ濃度に有意な日内リズムは認められなかった。しかしながらＧＡＢＡにおいて、その代謝産物量を測定し、その動員された量ないし代謝回転についても検討を要するものと考えられた。

３．加齢による変化：線条体ＤＡ、黒質［ＤＯＰＡＣ＋ＨＶＡ］／［ＤＡ］において、加齢によるレベルの変化は明らかである。また、線条体［ＤＯＰＡＣ＋ＨＶＡ］、黒質ＤＡにおいて、加齢に伴うリズムの変化が認めたれた。これらの加齢に伴う変化の意義についてはさらに検討を要するものと考えられた。

－文献－

１．Kemp,J.M. and Powel,T.P.S. (1971) Philos.Trans.R.Soc.London.Ser.B., 262,441-457

２．König , J.F.R. and Klippel,R.A. (1970) The Rat Brain,Stereotaxic Atlas, Krieger,Huntington,NY

３．Okada,Y.,Nitsch-Hassler,C., Kim,J.S.,Bak,I.J. and Hassler,R.(1971) Exp.Brain Res. 13,514-518

４．盛政忠臣、池田正明、庄盛敏廉、池田正人、永津俊治、(1974) 神経化学、23,111-113

34. 心理的ストレスによるラット脳内ノルアドレナリン代謝回転亢進に及ぼす diazepam と morphine の作用の差

田中正敏・津田　彰・辻丸秀策・佐藤洋美
白尾一正・小口雅申・長崎信行　（久留米大・医・薬理）

〔要　約〕

心理的ストレス(直接に電撃は受けないが、周囲のラットが電撃を受けるたびに示す鳴き声、跳び上り、臭いなどの情動刺激に曝される)によって引き起こされる脳内noradrenaline(NA)代謝回転の亢進に及ぼすdiazepam(DZP)、morphine(MOR)、naloxone(NAL)の影響について、視床下部、扁桃核、青斑核部のNA含量及びその主要代謝産物である3-methoxy-4-hydroxyphenylethyleneglycol sulfate(MHPG-SO4)含量を定量することにより検討した。薬物はいずれもストレス負荷5分前に皮下投与した。1時間の心理的ストレスにより、3部位のMHPG-SO4含量は有意に増加し、NA代謝回転が亢進することが示された。これに対して、DZP 5 mg/kgは3部位すべてで、ストレスによるMHPG-SO4含量の増加を抑制したが、MOR 6 mg/kgではMHPG-SO4含量の増加は抑制されず、視床下部、扁桃核のMHPG-SO4含量はストレスのみの群より、有意な高値を示した。NALはストレスによるMHPG-SO4含量の増加に有意な変化を与えなかった。これらの結果から、拘束ストレスのような身体的要因が大きく関与したストレスによるNA代謝回転の亢進がDZP、MORの両者で抑制されるのとは異なり、心理的ストレスによるNA代謝回転の亢進は代表的抗不安薬であるDZPのみで抑制されることが明らかとなった。

Key word： Psychological stress, Brain noradrenaline turnover, Diazepam

拘束ストレスによってラットの広範な脳部位でnoradrenaline(NA)の代謝回転が亢進する(2,6-9)。この拘束ストレスによるNA代謝回転の亢進は、視床下部、扁桃核ではopioidsの拮抗薬であるnaloxone(NAL)で増強され(7)、強力なopiateであるmorphine(MOR)(9)やβ-endorphinやMet-enkephalin(10)で抑制され、また代表的抗不安薬であるdiazepam(DZP)でも抑制される(2)。しかし、拘束ストレスには心理的要因もさることながら、身体的要因の関与が大きい。そこで今回は、身体的要因の関与しない心理的ストレスによって生じるNA代謝回転の亢進に対して、これらの薬物がどう影響するかを検討した。電撃そのものを自分自身は受けないが、周囲のラットが電撃を受けるたびに示す鳴き声、跳び上り、もがき、臭いなどの情動刺激に曝される状態を心理的ストレスとして設定した。この状況下では、選択的に視床下部、扁桃核でNAの代謝回転が亢進することは既に報告した(3,11)。

【方　法】

体重170－190 gのWistar系雄性ラットを対象とした。透明なアクリル板で25の区画に仕切られた箱を装置として用いた(図1)。図の横線の区画のラットには、電撃を床面のステンレス格子より与えたが、図の斜線が交叉した区画にはアクリル板が敷かれており、この区画に置かれる"心理的ストレス"ラットは電撃を受けずに、横線の区画のラット(データの対象外)が示す種々の刺激(音や臭い)に曝される。ストレス負荷5分前にsaline(SAL)、DZP 5 mg/kg、MOR 6 mg/kg、NAL 5mg/kg、NAL 10 mg/kgのいずれかを皮下投与し、1時間の心理的ストレスを負荷した。DZP以外の薬物はSALに溶解し、DZPは0.3%CMC溶液に懸濁して用いた。

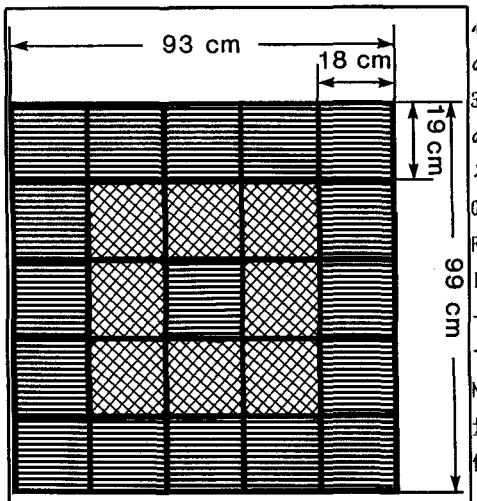


Fig. 1. A floor plan of the apparatus.

心理的ストレス負荷中には、図1の横線の区画のラットには肢電撃(5-sec-on, 30 sec-off, 3.5 mA)が与えられた。対照群のラットは周囲のラットに電撃を加えることなく、装置に入れるのみとした。各操作終了後、脳を摘出し、Gispen ら(1)の方法で視床下部と扁桃核とを、ReisとRossの方法(5)で青斑核(locus coeruleus、LC)部を切り出した。視床下部、扁桃核については、NA及びMHPG-SO4含量を、LC部については6群でMHPG-SO4含量を、図2に示す3群でNA含量を、演者らの方法(4)で蛍光法により定量した。統計的解析にはStudent's t-test(両側検定)を適応した。

【結　　果】

図2に結果をまとめて示す。心理的ストレスにより、検討した3部位、つまり視床下部、扁桃核、LC部のいずれの部位でもMHPG-SO4含量は対照群に比べて有意に増加した。この増加に対してDZPは3部位すべてで有意な抑制を示した。DZPとは異なり、MORは抑制を示さず、視床下部、扁桃核ではストレスのみの群のMHPG-SO4含量より有意な高値を示した。NALでは 5 mg/kgでも10 mg/kgでもストレスによるMHPG-SO4含量の増加には有意な影響を及ぼさなかった。NA含量はストレスによって3部位とも有意な変化はみられず、それに対していずれの薬物も有意な変化を与えなかったが、MORでは扁桃核で対照群に比べてNA含量が有意に減少した。

【考　　察】

心理的ストレスで3部位のMHPG-SO4含量が有意に増加したことから、心理的ストレスではこれらの部位のNA代謝回転が亢進することが示された。これは、心理的ストレスで選択的に視床下部、扁桃核のNA代謝回転が亢進するという従来の演者らの結果(3, 11)と一致するものである。今回、さらにLC部でもNA代謝回転の亢進が示されたことは、従来身体的ストレスで示されていたように、心理的ストレスでも同部が重要な役割を果たしていることを示唆するものである。ところで、拘束ストレスによる視床下部、扁桃核のNAの代謝回転の亢進に対しては、MOR及びDZPの両者とも抑制作用を示し(9)、NALは増強作用を示した(7)。今回の結果はこれと異なっており、心理的ストレスによるNA代謝回転の亢進に対して抑制作用を示したのはDZPのみであり、MORは抑制作用を示さず、NALも増強作用を示さなかった。このことは、拘束のような身体的ストレスと異なり、心理的ストレスで生じるNA代謝回転の亢進やその減弱には脳内のopioid peptide系がほとんど関与しないことを示すものと考えられる。視床下部と扁桃核ではMOR処置群のMHPG-SO4含量の値の方がストレスのみの群のそれより有意な高値を示したが、MORは非ストレス状況下(この場合のストレスは拘束ストレス)ではこれらの部位のNA代謝回転を著しく亢進させるので(9)、今回の実験ではMORはむしろ非

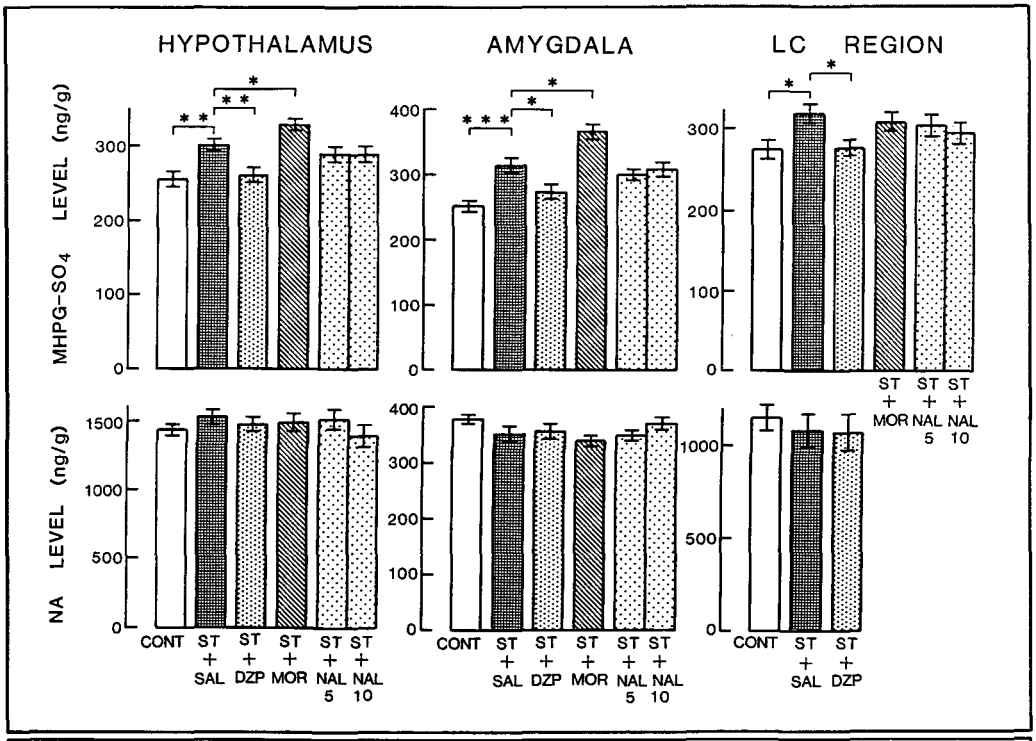


Fig. 2. Changes in levels of noradrenaline (NA) and 3-methoxy-4-hydroxyphenylethyleneglycol sulfate (MHPG-SO4) in the hypothalamus, amygdala and locus coeruleus (LC) region caused by 1-hour psychological stress and their modifications by diazepam (DZP) 5 mg/kg, morphine (MOR) 6 mg/kg and naloxone (NAL) 5 mg/kg or 10 mg/kg injected s.c. 5 min before stress. Abbreviations are: CONT; control, ST; psychological stress, SAL; saline. Statistical significance: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$

ストレス状況のような作用を示したと考えられる。今回の結果から、ストレスによるNA代謝回転の亢進に対してDZPとMORはストレスの状況により異なった抑制作用を示すこと、その際心理的ストレスによるNA代謝回転亢進に対してはDZPが抑制作用を示すこと、が明らかになった。

【引用文献】

1. Gispen,W.H., Schotman,P. and de Kloet,E.R. (1972) Neuroendocrinology, 9:285-296
2. 井田能成、田中正敏、津田　彰、帆秋善生、長崎信行(1983) 神経化学, 22:357-359
3. Iimori,K., Tanaka,M., Kohno,Y., Ida,Y., Nakagawa,R., Hoaki,Y., Tsuda, A. and Nagasaki,N. (1982) Pharmacol. Biochem. Behav., 16:637-640
4. Kohno,Y., Matsuo,K., Tanaka,M., Furukawa,T. and Nagasaki,N. (1979) Anal. Biochem. 97:352-358
5. Reis,D.J. and Ross,R.A. (1973) Brain Res., 57:307-326
6. Tanaka,M., Kohno,Y., Nakagawa,R., Ida,Y., Takeda,S. and Nagasaki,N. (1982) Pharmacol. Biochem. Behav., 16:315-319
7. Tanaka,M., Kohno,Y., Nakagawa,R., Ida,Y., Iimori,K., Hoaki,Y., Tsuda,A. and Nagasaki,N. (1982) Life Sci., 30:1663-1669
8. Tanaka,M., Kohno,Y., Nakagawa,R., Ida,Y., Takeda,S., Nagasaki,N. and Noda,Y. (1983) Pharmacol. Biochem. Behav., 19:543-547
9. Tanaka,M., Kohno,Y., Tsuda,A., Nakagawa,R., Ida,Y., Iimori,K., Hoaki, Y. and Nagasaki,N. (1983) Brain Res., 275:105-115
10. 田中正敏、井田能成、津田　彰、辻丸秀策、長崎信行 (1984) 神経化学, 23:397-399
11. 津田　彰、田中正敏、井田能成、辻丸秀策、長崎信行 (1984) 神経化学, 23:96-98

35. ラット脳内部位別セロトニン代謝の日内変動と加齢による変化

池田正明・盛政忠臣・岡田尚志郎・中野重行*・庄盛敏廉
（岡山大・医・脳研・病態生化，愛媛大・医・薬理*）

〔要　約〕

９週齢（Ｙ群）および６５週齢（Ａ群）のウィスター系雄ラットについて、明暗周期下６時点で、パンチアウトによってえられた脳部位（側座核、（新）線条体、黒質、視床下部外側領野、背側縫線核、松果体）のセロトニン（５ＨＴ）およびその主代謝産物（５ＨＩＡＡ）を測定し、日内変化と加齢による変化に検討を加えた。

Ｙ群において、線条体、視床下部外側領野における５ＨＴは明期後半に高値を示す有意な日内変動を示した。側坐核においても有意ではないが同様に明期後半に高値を示す傾向を示した。５ＨＩＡＡならびに［５ＨＩＡＡ／５ＨＴ］から５ＨＴの放出利用を推察すると、これらの部位においては暗期後半から明期前半にかけて５ＨＴの利用が昂進していることが示された。これら部位と同様に背側縫線核から５ＨＴの投射を受けているとされる黒質においては、暗期後半から明期全体にわたる５ＨＴの利用昂進が認められ、前３者とは異なった日内リズムの存在が示唆された。背側縫線核においては、以上の如く５ＨＴ利用の日内リズムは確認できなかった。松果体においては、５ＨＴが伝達物質として利用されていることを示唆する結果をえた。加齢に伴う５ＨＴ利用の変化は、量的変化、リズムの変化共に認められた。

Key word：　circadian rhythm, serotonin, aging

Ｊｏｕｖｅｔの睡眠仮説（１）以来、５ＨＴはサーカディアンリズムに密接な役割を有する神経伝達物質としてとらえられてきた。しかしながら、そのリズム制御の詳細は不明の部分が多い。５ＨＴニューロンの細胞体は脳幹縫線核群に局在し、その終末は脳全体に分布し、５ＨＴ濃度に部位差があまりみられないことも知られている。本研究においては、背側縫線核およびその支配領域ならびに松果体における５ＨＴ代謝の日内変動、脳部位別の特徴、さらに加齢に伴う変化について検討を加えた。

〈実験方法〉

９週齢（Ｙ群）ならびに６５週齢（Ａ群）のウィスター系雄性ラットを用いた。12時間毎の明暗周期（午前６時点灯）に順化させた後、暗転後２時間目から４時間毎６時点において、ラットを液体窒素中で固定し（５）、断頭開頭し全脳をドライアイス上で急速冷凍し、－８０°Ｃで保存した。－２０°Ｃにおいて脳を前額断し、ラット脳アトラス（３）を参考にして、側坐核（Ｎ．ａｃｃｕｍｂｅｎｓ）、線条体（ｃａｕｄａｔｅ－ｐｕｔａｍｅｎ）、視床下部外側領野（ｌａｔｅｒａｌ　ｈｙｐｏｔｈａｌａｍｉｃ　ａｒｅａ）、黒質（ｓ．ｎｉｇｒａ）、背側縫線核（ｒａｐｈｅ　ｄｏｒｓａｌｉｓ）をパンチアウトすることによって採取した。脳標品は、５０ｍＭトリス（ｐＨ７．５）中でホモジナイズし、遠心分離後の上清をそのまま高速液クロ・電気化学検出器（医理化工業）に注入し、５ＨＴならびに５ＨＩＡＡを分析した。分析条件は、ＯＤＳカラムを用い、移動相には0.087 Ｍリン酸１カリ（ｐＨ３．４）にオクタンスルフォネート、アセトニトリルを含む溶媒を用いた。荷電電圧は０．７５Ｖとした。統計学的解析には一元および二元配置分散分析を用いた。

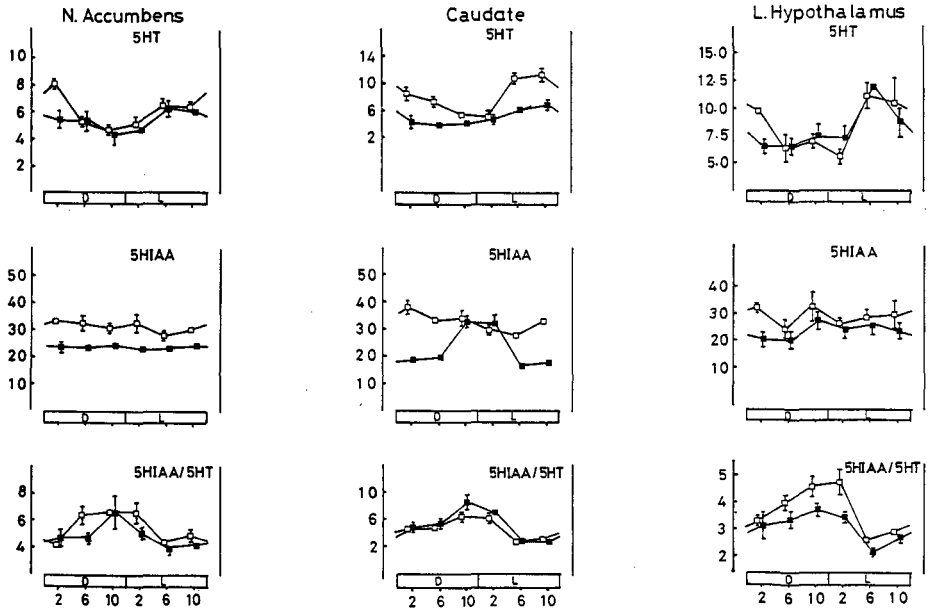


Fig.1 The diurnal variations of 5HT, 5HIAA content (pmoles/mg protain, mean±SEM) and 5HIAA/5HT ratio in the different brain regions of young (, n=6) and aged (, n=4) rats.

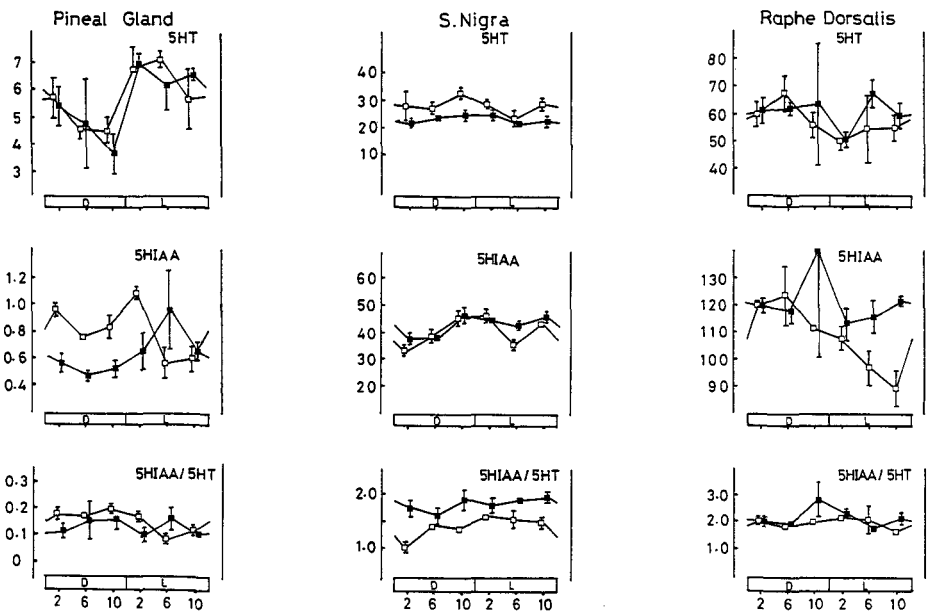


Fig.2 The same legends as noted in Fig.1.
(pineal gland : pmoles/gland)

〈結果と考察〉

実験結果をＦｉｇ．１，２に示す。

５ＨＴ濃度の日内リズム：　Ｙ群において、５ＨＴ濃度は線条体ならびに視床下部外側領野において、明期後半に高値を示す有意な日内リズムを示した。側坐核においても統計学的には有意ではないが、同様に明期の後半に高値を示した。黒質においては前３者と同じく背側縫線核からの５ＨＴ終末を得ているにも拘わらず、このような日内変化は認められなかった。背側縫線核においては統計学的に有意な日内リズムを認めなかった。松果体においては、５ＨＴは大部分メラトニンに代謝されており、統計学的には有意ではないが従来の知見に一致した日内変化を示した。

５ＨＴ利用の日内リズム：　５ＨＩＡＡ濃度は実際に利用された量を反映し、［５ＨＩＡＡ］／［５ＨＴ］は代謝回転ないしは利用率を反映するものと考えられる。この両者から５ＨＴ放出利用の日内リズムを検討すると、Ｙ群において、側坐核、線条体、視床下部外側領野において、いずれも暗期後半から明期前半にかけて５ＨＴ利用の昂進が認められた。統計学的には有意ではないが、背側縫線核においても同様の傾向が認められた。黒質においては以上４部位とは異なり、暗期後半から明期を通じて、５ＨＴ利用の昂進を示す有意な日内リズムを認めた。松果体においては、５ＨＴの利用率［５ＨＩＡＡ］／［５ＨＴ］比も他の部位の約１／１０と低く、日内変動も統計学的に有意な変動を示さなかったが、松果体における５ＨＴの神経伝達物質としての存在（４）を支持する結果と考えられた。５ＨＩＡＡ濃度ならびに［５ＨＩＡＡ］／［５ＨＴ］比は、以上の如く、５ＨＴの利用ないし役割・機能を論ずる場合重要な指標であると考えられた。５ＨＴの各部位における生理的役割・機能に関しては、その他の神経伝達系の日内リズムとの関与についてもさらに検討を要するもと考えられる。

加齢による変化：　５ＨＴ濃度、５ＨＩＡＡ濃度、［５ＨＩＡＡ］／［５ＨＴ］比、いずれにおいても、Ａ群はＹ群に対して、その量的変化、リズム制御の変化に変化のあることが示された。このような加齢にともなう５ＨＴの変化の意義については、各脳部位の加齢に伴う機能変化など（２）を含めた検討が必要であると考えられた。

〈文献〉

1. Jouvet,M. (1969) 163,32-41
2. Renner,K.J.and Luine,V.N. (1984) Life Sci. 43,2193-2199
3. Konig,J.F.R.and Klippel,R.A. (1970) The Rat Brain,Stereotaxic Atlas,Krieger, Huntington,NY
4. Matsuura,T.and Sano,Y. (1983) Cell Tissue Res. 234,519-531
5. Takahashi,R.and Aprison,M.H.(1964) J.Neurochem. 11,887-898

36. アデニレートシクラーゼ調節機構に及ぼすデシプラミン，ACTH，リチウムの効果

岡田文彦　　（北海道大・保健管理センター）

〔要　約〕

デシプラミン（DMI），ACTH，あるいはリチウム（Li）を急性あるいは慢性投与したラット大脳皮質膜画分を用いてβ受容体—アデニレートシクラーゼ（AC）系に出現する変化を検索した。

(1) DMI投与3日目にβ受容体数が有意に減少した。一方，βアゴニストであるイソプロテレノール（Iso）添加によるAC活性応答はDMI投与1日目ですでに抑制された。GTP結合蛋白質を直接刺激するGTP，Gpp(NH)p，NaFではAC応答に差が認められなかった。Gpp(NH)p 添加によるタイムコースの検討では対照群ではIso同時添加によりタイムラグなしに直線的にAC応答が上昇するが，DMI 1日投与ですでにタイムラグが出現した。フォルスコリンによるAC応答に差は認められない。以上の結果はDMI投与初期にβ受容体数が減少する以前にIsoによるAC応答が減弱しており，この減弱は受容体とGTP結合蛋白質間の共役に変化が出現している可能性を示す。(2) ACTH投与ではβ受容体数は変動しなかったが，Iso添加によるAC応答は減弱した。(3) Li投与では2週目にGTP，Gpp(NH)pによるAC応答が減弱し，Iso添加によるAC応答も減弱した。β受容体数は有意に変動しなかった。この結果の意味について種々の観点より検討を加えた。

Key word： desipramine, ACTH, lithium

抗うつ薬慢性投与によりラット脳β受容体—アデニレートシクラーゼ（AC）系に一定の変化，すなわち，β受容体数減少（down regulation)—AC活性低下（subsensitivity）が出現することが確認されている[3]。ACTHはこのdown regulation—subsensitivityを促進すると報告され[2]，リチウム（Li）もAC活性を抑制するという報告が多い[1]。しかしながら，臨床効果の異なる3種の薬物がβ受容体—ACの連関機構のいかなる部位に作用して，最終的にAC応答を抑制するのか充分解明されていなかった。本研究の目的はデシプラミン（DMI），ACTH，Liをそれぞれ慢性投与したラット大脳皮質膜画分を用いてβ受容体—AC系機構に認められる薬物効果の差異を検討することである。

雄性ドンリュウ系ラットを用い，1）DMI 10mg／kg　1日2回，急性および1，2，3，5，7，10日間投与，2）ACTH 50単位／kg　1日1回，急性および1，3，5日間投与，3）Li：急性投与；塩化Li 10 mM／kg，慢性投与；100 gr 中 Liを110mg 含むエサを投与後，2，4，7週後に断頭，それぞれのラット大脳皮質膜画分を作製し，−75℃に冷凍貯蔵した。1）膜画分^{125}ICYPとの結合実験によりβ受容体数を測定した。2）AC活性は膜画分に添加したイソプロテレノール（Iso）による環状AMP生成を求めることにより測定した。その際，GTPによるAC活性の用量作用曲線を検討した。

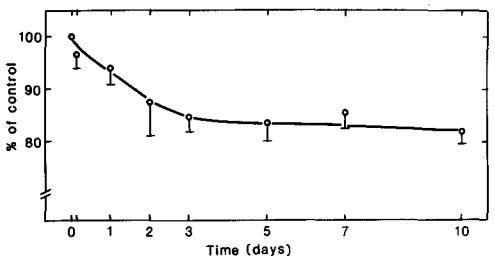


図1. DMI投与によるβ受容体数の変化

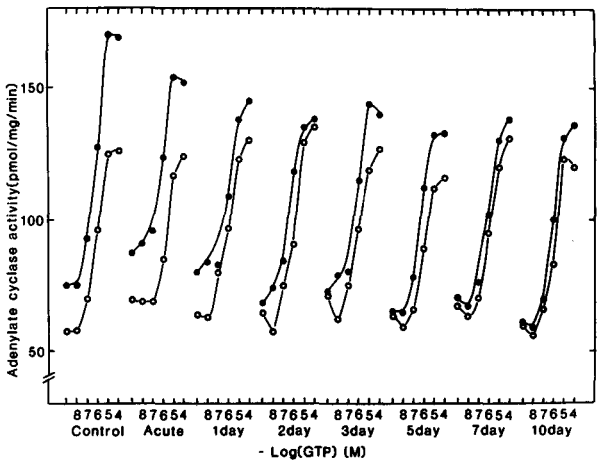


図2. DMI投与によるＡＣ活性の変化

なお，環状AMP測定はRIAによった。３）GTPの非水解性アナローグの一つであるGpp(NH)pによるAC活性の用量作用曲線を検討した。４）Gpp(NH)pによるＡＣ活性のタイムコースの検討。５）フォルスコリン，NaF添加によるＡＣ活性の応答の検討

(1) DMIのβ受容体－ＡＣ系に及ぼす効果：ａ）β受容体数の検討（図１）。膜画分と^{125}ICYP結合実験により，Bmaxは DMI ３日投与後約15％有意に減少，以後10日までその減少を保った。２日目までは有意の減少を認めなかった。なお，Kd値にはDMI 投与後変化を認めなかった。ｂ）ＡＣ活性の検討（図２）。GTPの用量作用曲線では実験群と対照群とでＡＣ活性に差がみられなかった。しかし，βアゴニストであるＩｓｏを同時に添加すると，対照群ではGTP 10μM濃度でGTP単独よりＡＣ活性は40％上昇するが，DMI投与１日目で20％以下にしか上昇しなかった。この傾向は10日目までに増強した。ｃ）Gpp(NH)pによる活性応答。GTPアナローグのGpp(NH)pはGTPアーゼにより水解されないのでＡＣ活性は著明に賦活される。対照群ではGpp(NH)pの用量作用曲線は100μMでほぼ最大応答（基礎値の8.6倍）を示す。DMI 1－10日間投与により，この作用曲線には有意差は認められなかった。ｄ）Gpp(NH)pによるＡＣ活性のタイムコースの検討。膜画分を15分まで30℃でインキュベートするとアデニレートシクラーゼの基礎値は直線的に上昇し，Gpp(NH)pを添加すると５分ほどのタイムラグの後にＡＣ活性は直線的に上昇した。この０－５分間のゆるやかな曲線的なＡＣ活性の増加はGTP結合蛋白質に結合しているGDPにGpp(NH)pが入れ替わるに要する時間を意味するといわれている。これに対してGpp(NH)pにＩｓｏを同時に添加するとGDPが即時にGpp(NH)pに入れ替わるため，ＡＣ活性はタイムラグなしに直線的に上昇する。DMI投与群では投与１日目で，この対照群の所見とは異なるパターンを示した。Gpp(NH)p単独のパターンは対照群と同様であるが，Ｉｓｏを同時に添加しても，GDPにGpp(NH)pが即時に入れ替わらず，３－５分のタイムラグが認められた。すなわち，受容体を介するホルモン作用が対照群と異なり，充分出現しない結果を

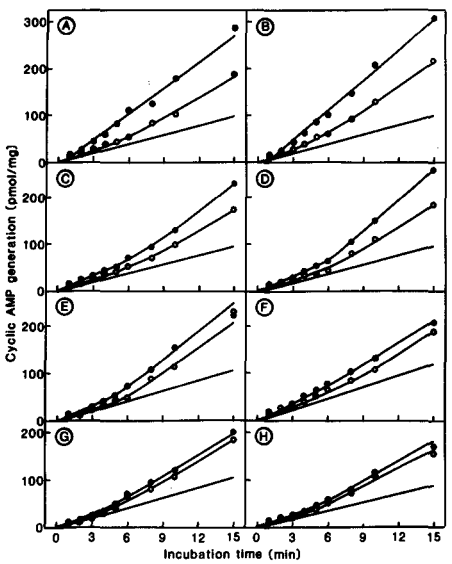


図3. ＡＣ活性のタイムコース

示した。この傾向はDMI投与3日目に顕著となり以後10日目まで同様の傾向を認めた。タイムラグの変化を数量的に表現するために，Gpp(NH)p単独ならびにGpp(NH)p + Isoの直線部分を横軸（x軸）まで延長し　接する点をそれぞれx_1, x_2（0点からの時間）とし、x_2-x_1を計算した。対照群では平均1分25秒であるが、DMI 1日投与で39秒と著明に減少した。以後10日目までほぼ同様の短縮を示した。e）フォルスコリンおよびNaFによるAC活性の応答。10 mM NaF 添加により対照群ではAC活性は基礎値の7.9倍まで上昇した。DMI投与群でも1－10日目にかけて有意の変動は認められなかった。10μMフォルスコリン添加により対照群ではAC活性は基礎値の13倍まで上昇した。DMI投与群でも1－10日目にかけて有意の変動は認められなかった。

(2) ACTHのβ受容体－AC系に及ぼす効果：a）β受容体数の検討。ACTH投与によりBmax，Kd値ともに変動しなかった。b）AC活性の検討。GTPの用量作用曲線では実験群と対照群とでAC活性に差がみられなかった。しかし，Iso添加ではACTH1日投与以降5日目まで漸次AC応答が減少した。c）Gpp(NH)pによる活性応答。100 μM Gpp(NH)pに対する応答では実験群と対照群とでAC活性に差がみられなかった。d）Gpp(NH)pによるAC活性のタイムコースの検討。ACTH投与1日目で対照群と異なりIso添加でもタイムラグが認められた。フォルスコリンおよびNaFによるAC活性の応答。実験群と対照群とでAC活性に差がみられなかった。

(3) Liのβ受容体－AC系に及ぼす効果：a）β受容体数の検討。Li 2週投与によりβ受容体数が減少する傾向があったが有意ではなかった。Li 4週投与では逆に増加する傾向があった。b）AC活性の検討。GTPの用量作用曲線ではLi群でAC応答が低下する傾向があった。Iso添加ではLi 2週投与でAC応答が有意に減少したが，4週投与では有意差がなかった。c）Gpp(NH)pによる活性応答。Li 2週投与でAC応答が有意に減少したが，4週投与では有意差がなかった。d）フォルスコリンおよびNaFによるAC活性の応答。Li 2週投与でNaFによるAC活性応答が低かった。フォルスコリンによる応答には差が認められなかった。

以上の結果より，DMI投与では投与初期にまだβ受容体数が減少しないが，βアゴニストによるAC活性応答が減弱し，Gpp(NH)pによるタイムコースの検討からもβアゴニストの作用が減弱しており，またGTP結合蛋白質以降に対照群と差が認められないことから，β受容体とGTP結合蛋白質の共役に何らかの変化が出現する可能性がある。ACTHではこの共役の変化がβアゴニストによるAC活性応答の減弱をもたらすと考えられる。一方，Liは2週間投与でGTP結合蛋白質の機能を直接抑制すると思われるが，4週目にはこの抑制が失われており，Liの生体内濃度や薬物耐性の観点からも検討を必要とすると考えられる。

文　献

1. Belmaker, R.H. (1981) Biol. Psychiat. 16, 333－350
2. Kendall, D.A., Duman, R., Slopis, J., and Enna, S.J. (1982) J. Pharmacol. Exp. Ther. 222, 566－571
3. Sulser, F., Janowsky, A.J., Okada, F., Manier, D.H., and Mobley, P.L. (1983) Neuropharmacol. 22, 425－431

37. ラット脳における α-adrenoceptor と Ca 拮抗剤結合部位の相互作用

松林弘明・鬼頭昭三・片山禎夫・三好理絵
（広島大・医・第三内科）

〔要　約〕

私共は radioreceptor assay を用いてラット脳の α－adrenoceptor binding を Ca 拮抗剤，特に verapamil が顕著に抑制する事実を報告し，中枢神経系における α－adrenoceptor と Ca 拮抗剤結合部位の密接な関連を示唆した。本研究では従来から Ca 拮抗剤結合部位の検索に用いられてきた ^{3}H－nitrendipine とは化学構造の異なる Ca 拮抗剤である ^{3}H－verapamil 及び ^{3}H－diltiazem の脳内結合部位を検索するとともに，それらの Ca 拮抗剤結合を α－adrenergic agents がどのように修飾するかを検索した。ラット大脳皮質の synaptosome 分画を用いた radioreceptor assay より次の結果を得た。1) ^{3}H－verapamil binding site は Kd 1.26 nM，Bmax 19.4 fmol/mg protein の single binding site であった。^{3}H－diltiazem binding は検出できなかった。2) yohimbine 及び prazosin は ^{3}H－verapamil 及び ^{3}H－nitrendipine binding に対し著明な抑制効果を示したが，clonidine は ^{3}H－verapamil binding を軽度抑制するのみであった。3) verapamil 及び diltiazem は ^{3}H－yohimbine binding を Kd を変化させることなく Bmax を減少させた。4) nifedipine が adenylate cyclase 活性を軽度抑制した。以上により脳内には数種の Ca 拮抗剤結合部位が存在し，それらは互いに相互作用を示すとともに α－adrenoceptor とも密接な関連が存在すると結論した。

Key word： Ca antagonists　α－adrenoceptor　radioreceptor assay

〔目的〕

従来，Ca 拮抗剤は血管系作用薬として研究が進められてきたが，Ehlert，糸賀等により Ca 拮抗剤が神経細胞それ自体にも結合することが明らかにされ，Ca 拮抗剤の中枢への作用が注目されている。私共は radioreceptor assay を用いてラット大脳皮質の synaptosome 分画における α－adrenoceptor binding ことに α_2－radioreceptor binding に対する Ca 拮抗剤の影響を検索した結果，α_2－adrenergic agonist である ^{3}H－clonidine 及び antagonist である ^{3}H－yohimbine binding に対して Ca 拮抗剤である verapamil 及び diltiazem が顕著な抑制作用を示す事実を報告し，中枢神経系における α－adrenoceptor と Ca 拮抗剤結合部位の密接な関連を示唆した。本研究では，従来から Ca 拮抗剤結合部位の検索に用いられてきた ^{3}H－nitrendipine とは化学構造の異なる Ca 拮抗剤である verapamil 及び diltiazem の ^{3}H－標識物質を用いてラット脳内の結合部位を検索するとともに，^{3}H－nitrendipine も含めて，それら Ca 拮抗剤結合を α－adrenergic agents である clonidine，yohimbine，prazosin がどのように修飾するかを観察することで，逆に Ca 拮抗剤結合に対する α－adrenergic agents の影響から Ca 拮抗剤結合部位と α－adrenoceptor の関連を検索することを目的とした。また ^{3}H－yohimbine binding を Ca 拮抗剤が抑制することを報告したが，その抑制作用を saturation study より検索したので報告した。さらに Ca 拮抗剤の脳内 adenylate cyclase 活性に対する影響もあわせて報告した。

〔方法〕

ウィスター系雄ラット（300 g）を断頭し，大脳皮質より synaptosome 分画を調整して receptor 標品とした。最後にできる pellet を radioreceptor assay には incubation buffer で攪拌

し，10％ homogenate とした。 adenylate cyclase 活性測定には30％ homogenateを用いた。

^{3}H－verapamil 及び ^{3}H－diltiazem を用いた結合実験は 50 mM Tris/HCl，pH 7.4 （含 0.1％ bovine serum albumin ）を incubation buffer とし，60 min， 25℃の条件下でおこなった。Inhibition study では clonidine, yohimbine, prazosin を assay 系に加えることにより α－adrenergic agents の影響を観察した。B/F 分離は 0.3％ polyethylenimine で前処置した Whatman GF/C フィルターペーパーを用いた。

^{3}H－nitrendipine を用いた結合実験は， incubation buffer 50 mM Tris/HCl，pH 7.4 とし 60 min，25℃の条件下でおこない，上述の3種の α－adrenergic agents の影響を inhibition study で観察した。B/F 分離は Whatman GF/B フィルターペーパーを用いた。

^{3}H－yohimbine を用いた saturation study は， 50mM Tris/HCl， pH 7.7， 30min ， 25℃の incubation 条件下でおこない，この assay 系に 10^{-5}M の verapamil 及び diltiazem を加えることによりCa拮抗剤の影響を観察した。

Adenylate cyclase 活性は， 50mM Tris/HCl，11mM creatine －phosphate， 10mM $MgCl_2$ ． 8mM theophylline，0.035 units/$\mu\ell$ creatine － phosphokinase ，0.1 mM ATP， 0.19 μM ^{3}H－ATP 及びラット大脳皮質 synaptosome 分画を 10min，30℃で incubation したのち， Salmon 等の方法を用いて測定した。

Dihydropyridine 系Ca拮抗剤は，光に不安定であるため nitrendipine, nifedipine, nicardipine を用いる実験はすべてNaランプ下でおこなった。

［結果］

^{3}H －verapamil 及び ^{3}H－diltiazem の結合実験に際し， ^{3}H－nitrendipine binding の B/F 分離に用いる Whatman GF/B フィルターペーパーを用いたが，非特異的結合が高く特異的結合の検出が困難であった。しかし， incubation buffer を 50mM Tris/HCl，pH 7.4，（含 0.1％ bovine serum albumin ）とし， Whatman GF/C フィルターペーパーを 0.3％ polyethylenimine で前処置することで非特異的結合が低下し，特異的結合の検出が可能となった。そこで，ラット大脳皮質の ^{3}H－verapamil binding site を検出した結果， Kd 1.26 nM，Bmax 19.4 fmol/mg protein の single binding site を示した。しかし ^{3}H－diltiazem binding site は検出できなかった。

^{3}H－verapamil binding に対して，3種のCa拮抗剤は diltiazem ＞ nicardipine ＞ nifedipine の順で抑制作用を示し， IC_{50} はそれぞれ 3.7×10^{-7}, 1.9×10^{-6}, 2.6×10^{-4} (M) であった(Fig.1)。また α_1－antagonist である prazosin, α_2－antagonistである yohimbine はそれぞれ IC_{50} 3.3×10^{-5}, 3.5×10^{-5} (M)で抑制を示した。 ^{3}H－nitrendipine binding に対して prazosin, yohimbine はそれぞれ IC_{50} 7.9×10^{-4}, 7.0×10^{-5} (M)で抑制を示した。 α_2－agonist である clonidine は ^{3}H－verapamil binding を 10^{-4}M で30％抑制するのみで， ^{3}H－nitrendipine bindingには無影響であった(Fig.2-a,b)。

^{3}H－yohimbine を用いた saturation study で， ^{3}H－yohimbine binding は Kd 9.5 nM, Bmax 129.2 fmol/mg protein の single binding site であった。この assay 系に 10^{-5}M verapamil を加えると Kd 9.5 nM, Bmax 27 fmol/mg protein, 10^{-5}M diltiazem では Kd 9.1 nM, Bmax 53 fmol/mg protein を示し，Kd を変化させることなく Bmax を減少させた。

また adenylate cyclase 活性は nifedipine のみが 10^{-3}M で20％抑制した。

［考察］

今回の実験より私共は， ^{3}H－nitrendipine とは化学構造の著明に異なる ^{3}H－verapamil の

ラット中枢における binding site の検出に成功した。一方，^{3}H−nitrendipine binding は，化学構造の異なる数種の Ca 拮抗剤によって抑制を受けることが知られているが(1)，^{3}H−verapamil binding に対しても構造の異なる Ca 拮抗剤が抑制を示すことが知られた。これらのことから，脳内には数種の Ca 拮抗剤結合部位が存在し，それらは互いに相互作用を示すことが推定された。

Ca 拮抗剤と α_1− adrenoceptor との相互作用は多く報告されているが(2)，ラット脳において結合実験より Ca 拮抗剤と α_2− adrenoceptor との相関を報告したものは少ない。私共は α_2 − agonist である ^{3}H − clonidine binding を verapamil 及び diltiazem が high 及び low affinity site を共に Kd を変化させることなく Bmax を減少させることを明らかにしているが(3)，α_2 − antagonist である ^{3}H−yohimbine binding も同様に Kd を変化させることなく Bmax を減少させた。このことは，^{3}H−verapamil 及び ^{3}H−nitrendipine binding を yohimbine が抑制する事実を考えあわせると，Ca 拮抗剤結合部位は α_2 − adrenoceptor と密接な相互作用を示すことが推定できる。さらに ^{3}H−verapamil 及び ^{3}H−nitrendipine binding を α_1 − antagonist である prazosin が抑制することから，α_2のみならず α_1−adrenoceptor とも相互作用することが知られた。Ca 拮抗剤結合部位が必ずしも，Ca イオンチャンネルそのものではありえないが，これらのことより中枢神経系内の α − adrenergic agents はその receptor を介して Ca イオンチャンネルの開閉に関与している可能性が考えられるとともに，逆に Ca 拮抗剤結合部位に結合する内因性物質が α − adrenegic agents の作用を調節している可能性がある。

さらに Cachelin 等は cyclic AMP が Ca イオンチャンネルの閉鎖を遅延させると報告したが(4)，私共の実験では nifedipine のみではあるが adenylate cyclase 活性を抑制した。nifedipine は cyclic AMP を低下させることで Ca イオンチャンネルをブロックすることが推定できる。

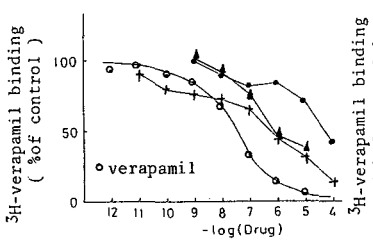


Fig.1 Inhibition of ^{3}H-verapamil binding by various Ca antagonists. ● ;nifedipine, ▲ ;nicardipine, + ;diltiazem.

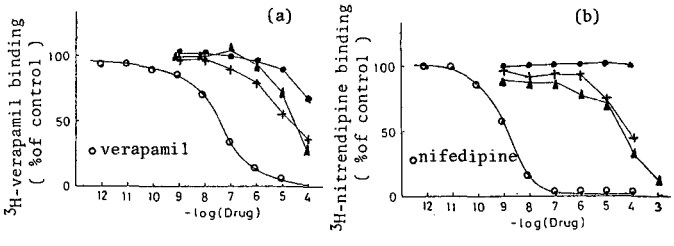


Fig.2 Inhibition of ^{3}H-verapamil (a) and ^{3}H-nitrendipine (b) bindings by α-adrenergic agents. ● ;clonidine, ▲ ;yohimbine, + ;prazosin.

1) Ehlert,F.J., Itoga,E., Roeske,W.R. and Yamamura,H.I.(1982) Biochem.Biophys.Res.Comm., 104,937-943.
2) Atlas,D., and Adler,M.(1981) Proc.Natl.Acad.Sci.USA,78,1237-1241.
3) Matsubayashi,H., Kito,S. and Itoga,E.(1985) Neuroscience Research,suppl.1,S117.
4) Cachelin,A.B., de Peyer,J.E.,Kokubun,S. and Reuter,H.(1983) Nature,304,462.

38. ラット脳 α_2－アドレノセプター系機能に及ぼす百日咳毒素（IAP）の影響

川田恵子・北村佳久・野村靖幸

（富山医薬大・和漢薬研・生物試験）

〔要　約〕

ラット脳α_2-アドレノセプター（α_2-レセプター），特にシナプス前α_2-レセプター機能への抑制性ＧＴＰ結合調節タンパク（Ｎｉ）の関与、およびα_2-アドレノセプター－Ｎｉ共役系の運動統御に果す役割について、特異的にＮｉを失活させる百日咳毒素（islet activating protein：ＩＡＰ）を用いて検討した。ラット大脳皮質切片からの高K^+刺激による[^{3}H]noradrenaline（ＮＡ）の遊離に対して、1 μM clonidine は有意な抑制を示したが、ＩＡＰを前処置すると抑制を示さなかった。このことからシナプス前α_2-レセプターにＮｉが共役し神経伝達物質の遊離を調節していることが示唆された。次に、ＩＡＰを側脳室へ投与してその影響を運動量と[^{3}H]clonidine結合実験より検討した。ＩＡＰ処置すると、ほとんどの動物に攻撃行動が見られるようになり、5 μg ＩＡＰ処置ラットでは有意に運動量の増加が認められた。対照群と比較して、clonidine を100 μg/kg (s.c.) 投与すると鎮静効果を引き起こしたが、ＩＡＰ前処置はその用量に依存して clonidineの鎮静効果を抑制した。一方、同様の処置ラットを同様の時間経過で断頭し、大脳皮質と脳幹の２部位の粗シナプス膜に対する[^{3}H]clonidine結合を検討するとＩＡＰ処置は大脳皮質α_2-レセプターに低親和性状態を引き起こすことが認められた。このことから中枢神経系においてＮｉによるα_2-レセプター親和性の調節が行動に影響を及ぼすことが推定された。

Key word： α_2-adrenoceptor, clonidine, inhibitory GTP binding regulatory protein, noradrenaline release, locomotor activity

Ⅰ．緒言

Clonidine はα_2-レセプターアゴニストとして中枢性に降圧作用（１）や鎮静作用（２，３）を引き起こし、また、シナプス前α_2-レセプターを刺激してＮＡの遊離を抑制すること（４，５，６）が知られている。さらに、中枢α_2-レセプターの神経化学的性質について、β－レセプターとの相互作用（７，８）やNa^+，Mn^{2+}（９），ＳＨ基（10）のレセプター結合への関与が認められており、最近では、大脳皮質でもアデニル酸シクラーゼ活性を抑制するＮｉがα_2-レセプターにリンクしていることが明らかになった（11，12）。しかし、中枢α_2-レセプターの動態と clonidineの薬理効果との関連性についてはほとんど知られていない。そこで今回、脳α_2-レセプター－Ｎｉ共役系がＮＡ遊離に関与するかどうか、clonidine の鎮静効果に影響するかどうかをラットを用いて検討し、新知見を得たので報告する。

Ⅱ．方法

すべての実験において動物はWistar系雄性ラット（体重：200～300 g)を使用した。また、ＩＡＰは北海道大学の宇井理生教授より分与されたものを使用した。

（１）Ｌ－[^{3}H] ＮＡ遊離実験：　ラット大脳皮質切片（300 μ以下のサイズ，30～40 mg 湿重量）を用い、ＩＡＰ処置は、10～20μg/ml ＩＡＰ，1 mM ＮＡＤ，1 mM ＡＴＰ，10 mM thymidine を含む Krebs-Ringer 液1 ml で、無処置は正常 Krebs-Ringer 液1 ml で、37℃，30分インキュベートした。その後、10μM niaramide 存在下、Ｌ－[^{3}H] ＮＡ（最終濃度 20 nM）を負荷し、表面灌流法で1 μM clonidine 存在下または非存在下、20 mM KCl 液にて刺激して、Ｌ－[^{3}H] ＮＡの遊離を検討した。

（２）ＩＡＰ脳室内投与と運動量測定：　ラットをネンブタール（50 mg/kg, i.p.）麻酔下、脳固定装置に固定し、ＩＡＰ（1 μg または5 μg/ラット）またはvehicle を5 μl/min で側脳室へ投与し

た。各動物において、投与後４日に saline、５日に 100μg/kg clonidineを皮下注射し、AUTOMEX 運動量測定装置により運動量を測定した。

（３）[^{3}H]clonidine結合実験：　ＩＡＰ（１μg)または vehicleの脳室内投与後４～５日に断頭し脳を摘出した。これを大脳皮質（海馬を含む）と脳幹（間脳と中脳を含む）の２部位に分け、各々の P_2 画分を調製し、0.05 M Tris-HCl buffer (pH 7.7) に懸濁（タンパク量 0.7～1.0 mg/ml)させて使用した。この膜標本に、1 nM [^{3}H]clonidineおよび 0.3～10 nM 非放射性clonidine を加え、25℃，30分間インキュベートした後、全結合より 10 μM clonidine 存在下での非特異的結合を差し引いて特異的結合を求め、Scatchard 解析をした。

III.　結果

（１）ＩＡＰのＬ－[^{3}H]ＮＡ遊離に及ぼす効果：大脳皮質切片において、ＩＡＰ10μg，20 μg 処置は 20 mM K^+ による脱分極性の遊離に対して96.4±2.5%，97.4±5.3 % といずれもほとんど影響を及ぼさなかった。しかし、1 nM clonidineの75.2±6.4 % という遊離抑制効果に対しては、ＩＡＰ（20μg)処置切片で、107.1±27.6% とこの抑制効果を遮断する結果が得られた（Fig.１）。

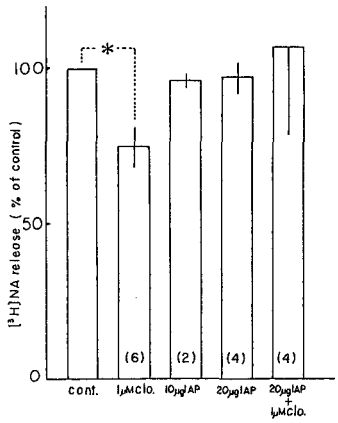


Fig. 1. The effects of IAP on [^{3}H]NA release with or without 1μM clonidine. * p<0.05 in paired t-test.

（２）ＩＡＰ脳室内投与の運動量に及ぼす効果：Vehicle 群では、100 μg/kg clonidineにより運動量が減少し、１μg、５μg ＩＡＰは用量依存的にこの効果を抑制した（Fig.２）。投与後10～70分の総運動量に関しては、vehicle 群のみに clonidineによる有意な抑制が見られた。ＩＡＰ投与群には全般的に攻撃態勢が観察されており、特に５μg ＩＡＰは有意な運動量の増加を示した。また、ＩＡＰは１～５μg で clonidineの引き起こす鎮静作用に用量依存的に拮抗した（Fig.３）。

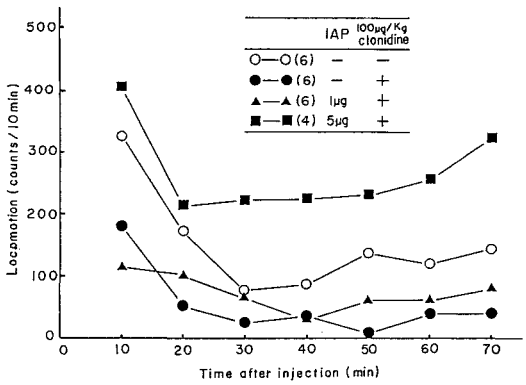


Fig. 2. The time course of influence of clonidine on locomotion in IAP-treated and control rats.

（３）ＩＡＰ脳室内投与ラット脳シナプス膜に対する[^{3}H]clonidine結合実験：１μg ＩＡＰ処置で大脳皮質の結合親和性が有意に低下した。レセプター数減少の傾向も見られた（Fig.４）。

IV.　考察

脱分極に伴なうＮＡの遊離は、シナプス前α_2-レセプターによって調節されていることが言われている（５，13）。今回の実験で、この調節機構にＮｉが関与していることが示唆された。このＮｉが神経終末部のｃＡＭＰおよび／またはCa^{2+}の動態に影響を与えるか否か、さらにそれがＮＡの遊離に関係してくるか否かは今後の課題である。脳内ＩＡＰ投与で（１）動物の攻撃態勢が観察されたこと、（２）clonidine の鎮静効果が抑制されたことは、中枢神経系のもつ行動抑制機能が、ＩＡＰにより一部失われたことを示唆する。ＩＡＰ処置群の大脳皮質粗シナプス膜でα_2-レセプターの[^{3}H]-

clonidine 結合親和性に低下が見られたが、これはＩＡＰがこの部位にあるＮｉを特異的にＡＤＰ－リボシル化しレセプターとＮｉが脱共役を起こしたためと考えられる。従って、このＮｉは抑制的な行動機能に関与していることが推察される。ただしα_2-レセプターのみでなく、ドーパミン-2レセプター、オピエートレセプターなどに共役するＮｉの関与も否定できない。　以上より、シナプス前α_2-レセプターのＮＡ遊離調節機構を含めた大脳皮質α_2-レセプター－Ｎｉ共役系の機能が行動に影響を及ぼしていることが示唆された。なお予備的成績ではあるがＩＡＰ前処置動物の大脳皮質シナプス膜で、α_2-レセプターアゴニストによるアデニル酸シクラーゼ活性抑制が減少した。このことは、α_2-レセプター－Ｎｉ－アデニル酸シクラーゼ系機構が行動に密接に関連することを示唆する。

謝辞：　ＩＡＰを御恵与いただいた宇井理生教授（北海道大学）ならびに矢島基之、野木森克己先生（科研製薬）に感謝致します。

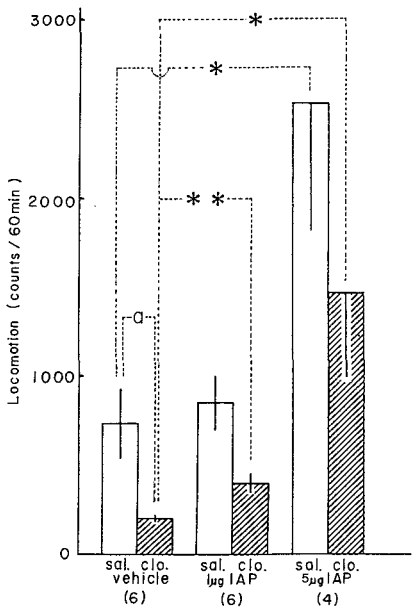


Fig. 3. The effect of IAP on clonidine-induced locomotor hypoactivity in rats. * p<0.05, ** p<0.01 vs. vehicle. a p<0.05 in paired t-test.

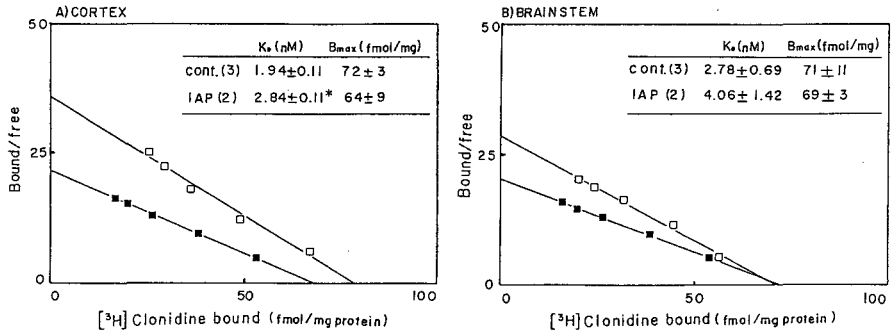


Fig. 4. Scatchard analysis of [^{3}H]clonidine binding to membranes prepared from cerebral cortex (A) or brainsrem (B) of rats treated with 1 μg IAP (■) or vehicle (□). * p<0.05

V.　参考文献

(1) 小沢光，植松利男 (1975) 日薬理誌 71, 3-284.
(2) Nomura,Y., Oki,K. and Segawa,T. (1980) Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol. 311, 41-44.
(3) Nomura,Y. (1980) Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol. 313, 33-37.
(4) Nomura,Y., Yotsumoto,I. and Segawa,T. (1979) Japan J. Pharmacol. 29, 847-854.
(5) Langer,S. (1974) Biochem. Pharmacol. 23, 1793-1800.
(6) Nomura,Y., Yotsumoto,I. and Nishimoto,Y. (1982) Dev. Neurosci. 5, 198-204.
(7) Nomura,Y., Yotsumoto,I., Motomori-Suzaki,E., Kawai,M. and Segawa,T. (1983) Dev. Brain Res. 9, 381-384.
(8) Nomura,Y., Kawai,M. and Segawa,T. (1984) Brain Res. 302, 101-109.
(9) Nomura,Y., Kawai,M., Mita,K. and Segawa,T. (1984) J. Neurochem. 42,1240-1245.
(10) Kawai,M. and Nomura,Y. (1983) Eur. J. Pharmacol. 91, 449-454.
(11) Nomura,Y., Kitamura,Y. and Segawa,T. (1985) J. Neurochem. 44, 364-369.
(12) Kitamura,Y., Nomura,Y. and Segawa,T. (1985) J. Neurochem., in press.
(13) Patel,S., Patel,U., Vithalani,D. and Verma,S. (1981) Gen. Pharmac. 12, 405-422.

39. ラット大脳皮質における α_2- と β-adrenoceptor の相互作用
—clonidine による β-adrenoceptor high affinity state の減少

中村豊紀・太田深雪・辻村良太郎・野村純一
（三重大・医・精神）

〔要　約〕

ラット大脳皮質を用い α_2- と β-adrenoceptor の相互作用を検討した。(1)^{3}H-dihydroalprenolol (^{3}H-DHA) binding を阻害しない濃度である 1 μM の clonidine 存在下では，非存在下と比較して，^{3}H-DHA binding の ℓ-isoproterenol による阻害曲線は右方移動し，Hill 係数は 0.63 から 0.76 に増加（$P<0.01$）し，β-adrenoceptor の high affinity state は 28％から 13％に減少（$P<0.001$）した。しかし 200 μM の GTP 存在下ではこの clonidine の効果は認められなかった。(2)^{3}H-para-aminoclonidine (^{3}H-PAC) binding を阻害しない濃度である 200 nM の ℓ-isoproterenol 存在下及び非存在下で，^{3}H-PAC binding の Kd と Bmax に変化は認められなかった。(3) ^{3}H-DHA binding の clonidine による阻害曲線の Hill 係数は 0.45 であったが，^{3}H-PAC binding の ℓ-isoproterenol による阻害曲線の Hill 係数は 0.97 であった。以上の所見より，clonidine による β-adrenoceptor の調整機構が存在し guanine nuclotide binding regulatory protein (N protein) の関与が示唆された。しかし従来から報告されているような ℓ-isoproterenol による α_2-adrenoceptor の調整機構は認められなかった。

Key word：α_2-adrenoceptor, β-adrenoceptor, receptor-receptor interaction

《緒　言》

抗うつ剤の慢性投与による，中枢 β-adrenoceptor の down regulation はよく知られた事実であるが，α_2-adrenoceptor への影響は一定の結論が得られていない(4)。近年 α_2- と β-adrenoceptor の相互作用の解析が進み，高濃度（100－200 μM）の ℓ-isoproterenol 前処置により，ラット脳における α_2-adrenoceptor の Bmax が増加し，β-adrenoceptor の Bmax が減少することが報告され(2)(3)，またラット腎臓においては，α-adrenergic agonist による β-adrenoceptor の affinity の減少が報告されている(5)。このような α_2- と β-adrenoceptor の相互作用の事実は，抗うつ剤慢性投与による adrenoceptor への影響を検討する時，adrenoceptor 間の相互作用も考慮しなければならないと思われる。今回はその基礎的な検討のために，ラット大脳皮質を用いて，clonidine 存在下での ^{3}H-DHA binding の変化及び ℓ-isoproterenol 存在下での ^{3}H-PAC binding の変化を検討した。

《実験方法》

(1)受容体標品：Wistar 系雄ラット（200－250 g）の大脳皮質を，20－30 容量の氷冷 1mM EDTA, 20 mM HEPES-tetramethylammonium buffer (pH 7.6) にて，Ultra-Turrax を用い 25 秒ホモゲナイズし，43,000×g で 15 分間遠心分離した。得られた沈渣を同一の buffer 溶液で 3 回洗浄し，最終沈渣を 50 mM Tris-acetate buffer (pH 7.6) に懸濁し受容体標品とした。(2) ^{3}H-DHA 及び ^{3}H-PAC 結合実験：組織懸濁液，1 mM ℓ-ascorbic acid, 5 mM Mg acetate, 50 mM Tris-acetate buffer (pH 7.6), ^{3}H-DHA (SP.A. 92.4 Ci/m mol, NEN) あるいは ^{3}H-PAC (SP. A. 40.5 Ci/m mol, NEN) 及び種々の薬物を加え，最終容量を 500 $\mu\ell$ とし，^{3}H-DHA binding は 37 °C で 10 分間，^{3}H-PAC binding は 37 °C で 45 分間インキュベートした。^{3}H-DHA は阻害実

験には 0.8 nM, 飽和実験には 0.2－7 nMを使用し，^{3}H-PACは阻害実験には0.5 nM, 飽和実験には0.1－10nMを使用した。非特異的結合の測定は，^{3}H-DHA bindingでは100 μM ℓ-isoproterenol 存在下で，^{3}H-PAC bindingでは10 μM clonidine 存在下で行なった。Assay内容はWhatmann GF/Bフィルター上に吸引ろ過し，洗浄後β線を測定した。蛋白量はBensadonn and Weinstein 法で測定した(1)。

《結　果》

(1) ^{3}H-DHA bindingの clonidineによる阻害実験：複雑な阻害曲線を示し，Hill係数は0.45 ± 0.05 (mean ± S.E.M., n = 3)で *clonidine* は ^{3}H-DHA binding siteに対し，multiple binding sites あるいは allosteric interactionの存在が示唆された（図1）。(2) ^{3}H-DHA bindingのℓ-isoproterenolによる阻害実験：図1より明らかな如く，^{3}H-DHA bindingを阻害しない濃度である1 μM clonidine存在下及び非存在下での，ℓ-isoproterenolによる^{3}H-DHA bindingの阻害実験を行なった（図2）。clonidine存在下では，非存在下と比較して，阻害曲線は右方移動し，Hill係数は0.63から0.76に増加（$P < 0.01$）した。この実験より得たデータを非線型最小2乗法で解析し，high と low affinity stateの割合（%R_H, %R_L）及びそれぞれのdissociation constant（K_H, K_L）を求めた（表1）。1 μM clonidine 存在下では，非存在下と比較して，%R_Hが28.4%から12.6%に減少（$P < 0.001$）し，%R_Lが71.6%から87.4%に増加（$P < 0.001$）したが，K_HとK_Lには変化が認められなかった。200 μMのGTP存在下では，非存在下と比較して，阻害曲線は右方移動し，Hill係数は0.63から0.93に増加し（図3），%R_Hは28.4%から0%に，%R_Lは71.6%から100%になり，β-adrenoceptor は low affinity stateのみとなった（表1）。K_Lは200 μM GTP 存在下及び非存在下で変化はなかった（表1）。200 μM GTPに1 μM clonidine を加えても，200 μM GTPのみの時と比較して，Hill係数，%R_L並びにK_Lに有意差は認められず，その効果はadditive ではなかった（図3，表1）。(3) ^{3}H-DHA の飽和結合実験におけるclonidineの影響：1 μM clonidine存在下及び非存在下において，Scatchard解析より求めた^{3}H-DHA bindingのKd と B max に有意差は認められず（表2），clonidineはβ-adrenergic antagonist bindingには影響を与えなかった。

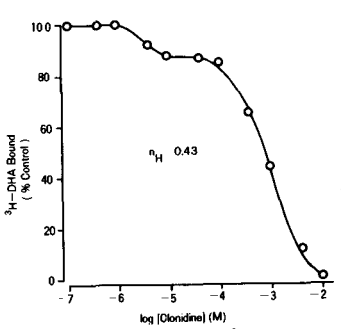


Fig. 1 Clonidine inhibition of ^{3}H−DHA binding

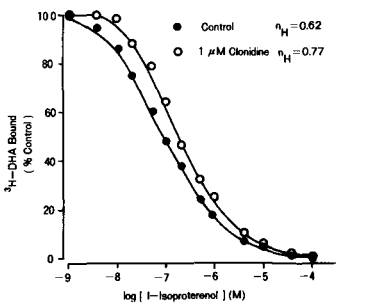


Fig. 2 l−Isoproterenol inhibition of ^{3}H−DHA binding in the absence (●) or the presence (○) of 1 μM clonidine

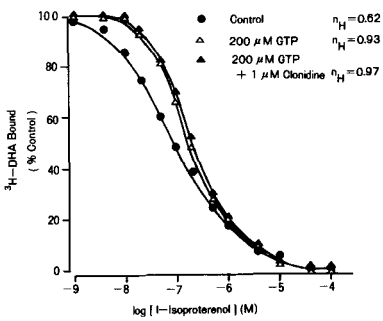


Fig. 3 l−Isoproterenol inhibition of ^{3}H−DHA binding

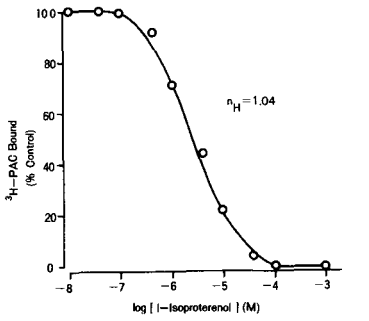


Fig. 4 l−Isoproterenol inhibition of ^{3}H−PAC binding

(4) ^{3}H-PAC binding の ℓ-isoproterenol による阻害実験：steep な competitive な阻害曲線を示し，Hill 係数は 0.97± 0.07 (mean ± S.E.M., n=3) で，ℓ-isoproterenol は ^{3}H-PAC binding site に対し allosteric interaction を示すとは考えられなかった（図 4)。(5) ^{3}H-PAC の飽和結合実験における ℓ-isoproterenol の影響：図 4 より明らかな如く，^{3}H -PAC binding を阻害しない濃度である 200 nM の ℓ-isoproterenol 存在下及び非存在下において，Scatchard 解析より求めた ^{3}H -PAC binding の Kd と Bmax に有意差は認められず（表 2），ℓ-isoproterenol は α_2-adrenergic agonist binding に影響を与えなかった。

Table 1 Effect of Clonidine and/or GTP on l-Isoproterenol Inhibition of ^{3}H-DHA binding

Additions	% R_H	% R_L	K_H(nM)	K_L(nM)	Hill coefficient	N
None	28.4 ± 1.89	71.6 ± 1.89	18.5 ± 5.5	224 ± 3.5	0.63 ± 0.02	5
1 μM Clonidine	12.6 ± 1.50**	87.4 ± 1.5**	23.9 ± 5.8	230 ± 25	0.76 ± 0.03*	5
200 μM GTP		100		216 ± 2.0	0.93 ± 0.08	4
200 μM GTP + 1 μM Clonidine		100		250 ± 28	0.98 ± 0.04	4

Individual competition curves were analyzed by a computer modeling technique. Values are mean ± S.E.M..
Significantly different from none addition values at * $P<0.01$, ** $P<0.001$ (Student's t-test).

Table 2 Effect of Clonidine and l-Isoproterenol on ^{3}H-DHA and ^{3}H-PAC binding, respectively

Ligand	Additions	Saturation Parameters	
		Kd (nM)	Bmax (fmol/mg protein)
^{3}H-DHA	None	2.71 ± 0.19	150.2 ± 5.6
	1 μM Clonidine	2.26 ± 0.07	142.6 ± 3.9
^{3}H-PAC	None	3.03 ± 0.25	171.4 ± 2.2
	200 nM l-Isoproterenol	3.41 ± 0.35	188.6 ± 8.4

The Kd and Bmax values were estimated by Scatchard analysis. Each values show the mean ± S.E.M. from three independent experiments.

《考　察》

^{3}H-DHA binding の clonidine による阻害曲線の Hill 係数が 0.45 であり，clonidine が β-adrenoceptor の high affinity state を減少させる所見は，α_2- と β-adrenoceptor の allosteric な相互作用の存在を示唆している。また 200 μM GTP 存在下では，clonidine の効果が認められないので，この相互作用には N protein が関与していると考えられる。一方，実験結果(4)，(5)より，ℓ-isoproterenol による α_2-adrenoceptor の調整機構は存在しない可能性があるが，これは Maggi, A. 及び Nomura, Y. らの報告と異なる。彼らの実験では 100—200 μM という高濃度の ℓ-isoproterenol を使用しているが，この濃度では ℓ-isoproterenol は β-adrenoceptor と 100 % 結合するのみならず，α_2-adrenoceptor ともほぼ 100 % 結合するので，adrenoceptor 間の相互作用の解析が複雑となる。そのため今回の実験では，ℓ-isoproterenol が α_2-adrenoceptor と結合しない濃度である 200 nM という低濃度を使用したことが，この差異を生じたのかもしれない。

《文　献》

(1) Bensadonn, A. and Weinstein, D. (1976) Anal. Biochem., 70, 241—250
(2) Maggi, A., U'Prichard, D. C. and Enna, S.J. (1980) Science, 207, 645—647
(3) Nomura, Y., Kawai, M. and Segwa, T. (1984) Brain Res., 302, 101—109
(4) 高橋　良 (1982) 神経精神薬理，4, 149—167
(5) Woodcock, E.A. and Johnston, C.I. (1980) Nature, 286, 159—160

40. ラット脳 α_2－アドレナリン受容体のフォトアフィニティラベリング

松井宏晃・朝倉幹雄・塚本　徹・今福　淳・伊野美幸
宮村智子・斉藤典子・長谷川和夫
（聖マリアンナ医大・神経精神）

〔要　約〕

(1) α_2－アドレナリン受容体アゴニストp-aminoclonidine誘導体でアジド基を有する p-azidoclonidine(AZC)を用いラット脳α_2－受容体のフォトアフィニティラベリングを試みた。

(2) 暗条件下、AZC は[^{3}H] clonidine 結合を高親和性に阻害し（IC50 = 12 nM)、[^{3}H] AZC は脳膜分画に飽和性、可逆性に結合した。[^{3}H] AZC 結合がマンガンにより増加しナトリウム及びGTP により阻害されること、さらに各種薬物の結合阻害実験から[^{3}H] AZC はアゴニストとしてα_2－受容体に結合しているものと考えられた。

(3) 暗条件下、AZC 結合が平衡に達したのち 254 nm の紫外線を照射すると、AZC はα_2－受容体に非可逆的に結合し（pseudo IC 50 = 20 nM)、この非可逆的結合は各種アドレナージックリガンド共存下では認められなかった。

以上の結果より、AZC を用いたフォトアフィニティラベリングはα_2－受容体の分子性状を明らかにする上で有用であると考えられる。

Key word : α_2－adrenergic receptor　p-azidoclonidine　photoaffinity labeling

[緒言]

我々は、イミプラミン、デシプラミン、ミアンセリン等の抗うつ剤やクロカプラミン、カルビプラミン等の抗精神病薬の中枢α_2－アドレナリン受容体に及ぼす影響について、膜内共役物質（抑制性グアニンヌクレオチド結合調節タンパク（Ni））との関連において検討した[1,5]。

中枢α_2－受容体機能に関しては、伝達物質遊離阻害作用、アデニル酸シクラーゼ活性への抑制性関与等が示唆されているが、その分子機構は明らかにされておらず、β1、β2 及びα1－アドレナリン受容体に比してその生化学的研究は遅れている[6]。

今回我々は、中枢α_2－アドレナリン受容体の分子性状を明らかにし、抗うつ剤の作用機構を分子レベルで捉える目的で　p-aminoclonidine（α_2－agonist）誘導体でアジド基を有する光親和性標識化合物 p-azidoclonidine(AZC) を用いα_2－アドレナリン受容体のフォトアフィニティラベリングを試みた。

[方法]

結合実験：既報の方法により調製したラット脳膜分画を [^{3}H] -clonidine([^{3}H] -CLO) と 25℃、30分間インキュベート後、ポリエチレンイミン前処理GF/Bガラス繊維ろ紙を用いる方法により反応を停止させた[4]。全結合から1 μM CLO 存在下での値を差し引いたものを特異的結合とした。[^{3}H] AZC を用いる結合実験は暗条件下同様の方法で行なった。結合実験のデータはコンピュータを用いた非線形最少二乗法により解析した[2]。

フォトアフィニティラベリング：暗条件下、ラット脳膜分画をAZC あるいは[^{3}H] AZC とインキュベート後4 ℃に保ち、 254 nm の紫外線ランプを用いて 5 cm の距離から2 分間照射した。未反応のリガンドを除くため、50,000 x g 10 分間の遠心及び50 mM トリス塩酸緩衝液による洗浄を3 回繰り返し、得られた最終沈さを以後の実験に用いた。

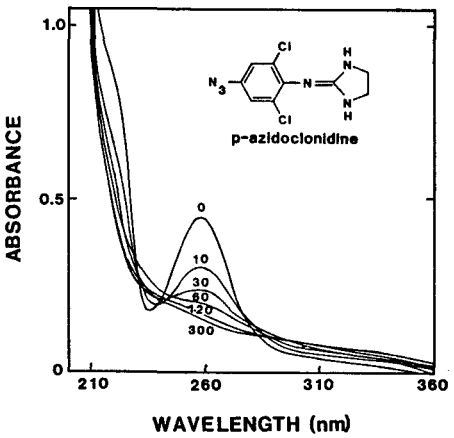


Fig. 1. Effects of ultraviolet irradiation on the absorption spectrum of p-azidoclonidine. The ultraviolet absorption spectrum of p-azidoclonidine (20 μM in 50 mM Tris-HCl buffer containing 1 % ethanol) was recorded before and after irradiation for several seconds with short-wavelength (254 nm) ultraviolet light. The inset shows the structure of p-azidoclonidine.

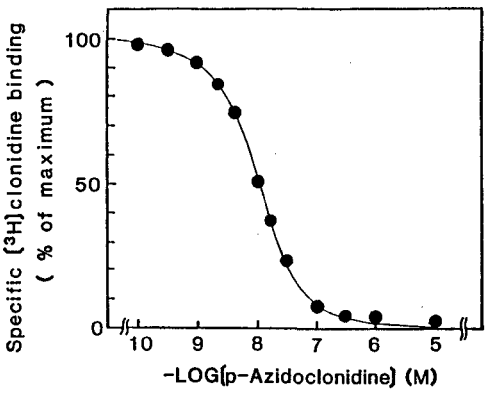


Fig. 2. Interactions of non-radioactive p-azidoclonidine with the α_2-adrenergic receptor of rat cerebral cortical membranes. Membranes were incubated with [^{3}H]clonidine in the presence of varying concentrations of p-azidoclonidine at 25 °C for 30 min under non-photolyzing conditions. The IC_{50} value was determined to be about 12 nM.

[結果と考察]

AZC の性質：AZC の紫外部吸収スペクトルは 256 nm 付近にピークを有し、254 nmの紫外線照射でピークは著しく減少した（図 1）。[³H] clonidine 結合阻害実験から、AZC はα_2－受容体に高親和性に（IC50 = 12 nM)結合すると考えられた（図 2）。

[³H] AZC 結合：暗条件下、[³H] AZC 結合は約 20 分で平衡に達し、1 μM CLO 添加により解離する可逆的な結合であった。結合は飽和性であり Scatchard解析するとリガンド濃度0.5 - 32 nM の範囲ではほぼ直線となった（Kd = 14 nM, Bmax = 100 fmoles/mg protein）。

[³H] AZC 結合部位の薬理学的性質：　各種薬物による阻害実験から、[³H] AZC 結合部位はアゴニストでは p-aminoclonidine > oxymetazoline > CLO > epinephrine > norepinephrine > dopamine >> isoproterenol の順に、アンタゴニストでは yohimbine >> phentolamine >> prazosine の順に高い親和性を有した。さらに、[³H] AZC 結合は[³H] CLO 結合と同様にマンガンにより増加し、ナトリウム及び GTPにより抑制され（図 3）、[³H] AZC はアゴニストとしてα_2－受容体に結合しているものと考えられた。

アフィニティラベリング：暗条件下、 AZC 結合が平衡に達したのち、254 nmの紫外線を照射すると[³H] CLO 結合は濃度依存性に非可逆的に阻害され、見かけの IC 50 値は約 20 nMであり、CLO 10μM 存在下ではこの反応は完全に抑えられた（図 4）。さらに、CHAPS を用い紫外線処理標品を可溶化[4] した場合でも[³H] CLO 結合は阻害されていた。反応液中に加えた radical scavengerの dithiothreitol(1 mM) や p-aminobenzoic acid (1 mM) は紫外線照射による AZCの非可逆的結合には何ら影響せず、この反応は真の特異的なα_2－受容体のフォトアフィニティラベル[3]であると考えられた。

以上の結果より、AZC を用いたフォトアフィニティラベリングはα_2－受容体の分子性状の解明、単離精製に有用であると考えられる。

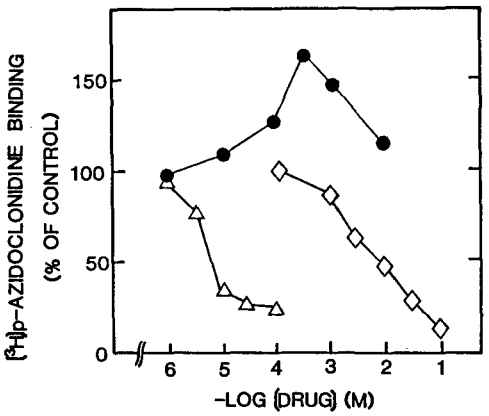


Fig. 3. Effects of Mn^{2+}, GTP and Na^{+} on the specific [^{3}H]p-azidoclonidine binding to rat cerebral cortical membranes. Membranes were incubated with [^{3}H]p-azidoclonidine in the presence of varying concentrations of Mn^{2+} (●—●), GTP (△—△) and Na^{+} (◇—◇) under the non-photolyzing conditions.

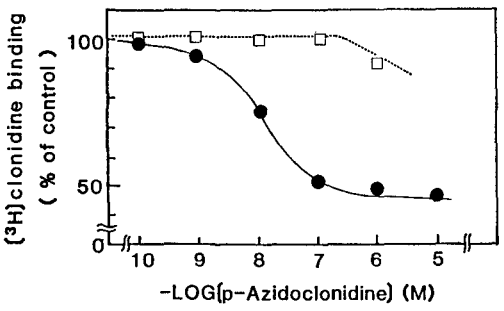


Fig. 4. Dose-responce curve for the photo-induced inactivation of α_2-adrenergic receptors by p-azidoclonidine. Cerebral cortical membranes were incubated with increasing concentrations of p-azidoclonidine (10^{-10} - 10^{-5} M) for 30 min at 25 °C under the reduced light in the presence (□-□) or absence (●-●) of 10 μM clonidine. Then the mixture was irradiated, and washed to remove non-covalently bound ligands. α_2-Receptors remaining after photolysis were measured using [^{3}H]clonidine. Incubations of p-azidoclonidine without irradiation was defined as the control.

[文 献]

1 Asakura, M., Tsukamoto, T., and Hasegawa, K. (1982) Brain Res. 235, 192-197

2 Asakura, M., Tsukamoto, T., Imafuku, J., Matsui, H., Ino, M., and Hasegawa, K. (1984) Eur. J. Pharmacol. 106, 141-147

3 Fedan, J.S., Hogaboom, G.K., and O'Donnell, J.P. (1984) Biochem. Pharmacol. 33, 1167-1180

4 Matsui, H., Asakura, M., Tsukamoto, T., Imafuku, J., Ino, M., Saitoh, N., Miyamura, S., and Hasegawa, K. (1985) J. Neurochem. 44, 1625-1632

5 Tsukamoto, T., Asakura, M., Hirata, N., Imafuku, J., Matsui, H., and Hasegawa K. (1984) Biol . Psychiat. 19, 1283-1291

6 Venter, J.C., and Fraser, C.M. (1983) Trends in Pharmacol. Sci. 4, 256-258

41. 下垂体 D_2 ドーパミン受容体の Mg^{2+} イオンと Na^+ イオンによる調節

渡辺雅幸・P. Seeman*
(藤田学園保衛大・医・精神，トロント大・医・薬理*)

〔要　約〕

ブタ下垂体前葉膜を用いて dopaminergic antagonist である ^{3}H-spiperone と agonist である ^{3}H-NPA の結合実験を行ない，cations の下垂体前葉D2ドーパミン受容体の調節について検討した。^{3}H-spiperone と cold agonist の競合実験の結果からD2受容体には agonist high affinity site（D2 high）と agonist low affinity site (D2 low) の2つの sites が存在する事が示された。^{3}H-NPA はこの D2 high site のみをラベルすると考えられる。Mg^{2+} は D2 受容体を agonist high affinity site へと shift させる一方，antagonist の D2受容体に対する affinity を減少させる。他方 Na^+ は agonist low affinity site へ shift させる反面，antagonist の affinity を増加させる。それゆえに Mg^{2+} は hormone-receptor-guanine nucleotide regulatory protein complex を stabilize させるが，Na^+ はこの ternary complex を destabilize させると考えられる。こうして Mg^{2+} と Na^+ は D2 受容体の ternary complex の共通要素に対して相反する効果を発揮している事が示唆された。

Key word：anterior pituitary D2 dopamine receptors, ternary complex, cations,

〔緒　言〕

ドーパミン受容体は D1（dopamine stimulatory adenylate cyclase と couple している）と，D2（おそらく dopamine inhibitory adenylate cyclase と couple している）の2種類に大別する事ができる（2，6）。ドーパミン受容体は脳線状体に多く含有されているが，脳内には D1，D2 受容体に加えて S2 セロトニン受容体も混在しているために dopaminergic antagonist や agonist の結合実験の結果をどのように解釈するかについて議論の多い所となっている。これに反し下垂体前葉には D2 のみが存在し（2），また S2 の存在も知られていない。したがって下垂体を実験材料として用いると，D2 ドーパミン受容体に関する結合実験の結果を解釈する事が比較的容易になる。そこで我々はブタ下垂体前葉膜を材料として，cations による D2 受容体の調節について検討した。

〔実験方法〕

既報の如き方法（7）でブタ下垂体前葉から膜分画を得，これを結合実験に供した。膜成分は 200 mg 原湿重量 /mℓ の割合で buffer（50 mM Tris-HCl，1 mM EDTA acid，pH 7.4 at 37 ℃）に suspend し，37 ℃ 10分 preincubate 後，結合実験に用いるまで氷冷した。

^{3}H-spiperone（dopaminergic antagonist）と ^{3}H-NPA（N-n-propylnorapomorphine, dopaminergic agonist）の結合実験は 50 mM Tris-HCl，1mM EDTA acid，pH 7.4 at 20 ℃ の buffer 5 mℓ 中で行なった。調整した膜分画 100 μl（20 mg 原湿重量）を加える事により結合実験を開始し，75分 20 ℃ incubate 後，cell harvester（Skatron Co., Lier, Norway）

を用いて，filtration を行なった。全実験は triplicate で行ない，(+) - butaclamol 1 μM で阻害される結合を特異的結合とした。cations は incubation medium 中に共存させ，その効果を観察した。検討した条件は以下の4種類である。control (no Na^+ or Mg^{2+})，NaCl 100mM 存在下，$MgCl_2$ 10mM存在下，NaCl と $MgCl_2$ の両イオンの存在下。

Data 解析は LIGAND program(4)を用い，Digital Systems DEC-10 computer により行なった。各値の統計処理には Student's t-test (two-tailed)を用いた。

【結果と考察】

^{3}H-spiperone の Scatchard 実験におよぼす cations の効果を Table 1に示した。Mg^{2+} は control (no Na^+ or Mg^{2+})に比して有意に K_D 値を増加させ，したがって ^{3}H-spiperone の D2 受容体に対する affinity を減少させる。一方 Na^+ は control に比して K_D 値を有意に減少させ，したがって affinity を増加させる。Mg^{2+}と Na^+ の両イオンの存在下で Na^+ は Mg^{2+}の効果を打ち消し，その結果 K_D 値は Na^+単独存在下の値に近いものとなる。一方 Bmax 値は cations により影響されない。こうして下垂体 D2 受容体において Mg^{2+}と Na^+ は antagonist の affinity に対して拮抗的に作用している。

cations の ^{3}H-NPA Scatchard実験におよぼす効果を Table 2 に示した。Mg^{2+}は control に比して著明かつ有意に Bmax値を増加させる。一方 Na^+は control に比して有意に K_D 値を減少させ，また Bmax 値も減少させた。この Na^+ 効果は Na^+と Mg^{2+} の両イオン存在下でも保持され，かつ増強されている。こうして両イオン存在下での K_D 値は Mg^{2+} 単独存在下よりも減少し，また Bmax 値も有意に減少した。

さらに cations の ^{3}H-spiperone 対 cold agonist の競合実験におよぼす効果について Table 3 にまとめ，実験の代表例を Figure 1 に示した。agonist である dopamine は antagonist である ^{3}H-spiperone との競合実験において，検討した cations の4条件全てにおいて，agonist high affinity site (D2high) と agonist low affinity site (D2 low) の2つの sites を識別する。しかしな

TABLE 1 Cation regulation of [^{3}H]-spiperone binding to anterior pituitary D_2 dopamine receptors

Conditions	No. of experiments	K_D (pM)	Bmax (pM)
Control (no Na^+ or Mg^{2+})	3	63 ± 4	6.58 ± 0.18
NaCl 100 mM	3	45 ± 3*	6.35 ± 0.23
$MgCl_2$ 10 mM	4	112 ± 6**	6.86 ± 0.18
NaCl + $MgCl_2$	4	58 ± 7+	6.37 ± 0.10

* $p < 0.05$ compared with control
** $p < 0.01$ compared with control
\+ $p < 0.001$ compared with $MgCl_2$

TABLE 2 Cation regulation of [^{3}H]-NPA binding to anterior pituitary D_2 dopamine receptors

Conditions	No. of experiments	K_D (pM)	Bmax (pM)
Control (no Na^+ or Mg^{2+})	4	268 ± 30	1.75 ± 0.06
NaCl 100 mM	3	121 ± 14*	1.27 ± 0.06**
$MgCl_2$ 10 mM	3	310 ± 29	3.92 ± 0.05***
NaCl + $MgCl_2$	4	100 ± 14+	2.91 ± 0.06+

* $p < 0.02$ compared with control
** $p < 0.01$ compared with control
*** $p < 0.001$ compared with control
\+ $p < 0.001$ compared with $MgCl_2$

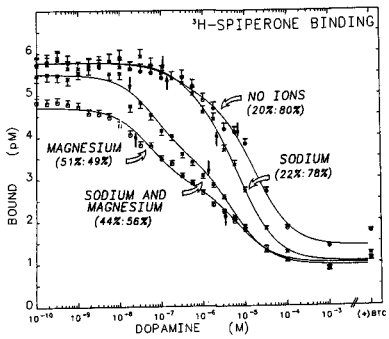
TABLE 3 Regulation of [^{3}H]-spiperone vs. dopamine competition experiments by cations

Conditions	No. of experiments	K_D (D_2^{high}) (nM)	K_D (D_2^{low}) (nM)	$\%D_2^{high}$	$\%D_2^{low}$
Control (no Na^+ or Mg^{2+})	3	181 ± 43	6299 ± 142	27 ± 3	73 ± 3
NaCl 100 mM	3	120 ± 20	2443 ± 77	20 ± 2	80 ± 2
$MgCl_2$ 10 mM	3	31 ± 6	3329 ± 160	55 ± 2	45 ± 2
NaCl + $MgCl_2$	3	16 ± 3	1451 ± 28	46 ± 1	54 ± 1

Dopamine competition of [^{3}H]-spiperone (200 pM) binding experiments were done with anterior pituitary membranes, and no addition, 100 mM NaCl, 10 mM $MgCl_2$, or both 100 mM NaCl and 10 mM $MgCl_2$. K_D (D_2 high) represents the K_D value of agonist high affinity state, and K_D (D_2 low) is the K_D value of agonist low affinity state. $\%D_2^{high}$ and $\%D_2^{low}$ are the percentage of sites in agonist high affinity form and percentage of agonist low affinity form, respectively. Values shown are means ± S.E.M.

がらこの2つのsitesの割合とK_D値は各cationによって大きな影響を受ける。control条件下でD2受容体のD2high siteの割合は少なく全体の27%にすぎないし，またD2 high siteとD2 low siteのK_D値はそれぞれ181 nM，6299 nMでありきわめて高い。この下垂体D2受容体のagonist high affinity siteはagonistである^{3}H-NPAによって選択的，かつ直接的にラベルされる事はすでに他の研究者によって立証されている(5)。それゆえにここに示した我々の結果において，競合実験のcontrol条件下でD2 high siteの割合が少ないものであった事は，^{3}H-NPAのScatchard実験において同条件下でBmax値が小さいものであった事と相応してくる。

Figure 1



さらに競合実験においてMg^{2+}が加わるとcurveが左にshiftし，D2 highとD2 lowの2つのsitesのK_D値は共にcontrol条件下よりも有意に減少する（$p<0.05$ for D2 high，$p<0.001$ for D2 low）。Mg^{2+}はまたD2 highの割合をcontrol下の27%から55%へと有意に増加させる（$p<0.01$）。この競合実験におけるMg^{2+}のD2 highの割合を増加させる効果は，^{3}H-NPAの実験においてMg^{2+}がBmax値を増加させた効果に相応してくる。かくしてMg^{2+}はD2受容体において，hormone-receptor complexからhormone-receptor-guanine nucleotide regulatory proteinから成るternary conplex側へ平衡をshiftさせると考えられる。このternary complexがagonist high affinityを示すものと考えられている(1)。

一方Na^+は競合実験においてMg^{2+}の存在下でD2 highからD2 lowへの部分的転換を引き起こし，D2 highの割合を55%から46%へと有意に減少させる（$p<0.05$）。この競合実験におけるNa^+の効果は，^{3}H-NPA実験においてNa^+が特にMg^{2+}の存在下でBmax値を減少させた事と相応する。この結果はまたNa^+が，Mg^{2+}によって形成されたternary complexをdestabilizeさせる事を示唆している。このように下垂体D2受容体がNa^+による調節を受ける事は，adenylate cyclaseとnegativeにcoupleしている受容体の特徴はNa^+による調節を受ける事であるとの最近の仮説(3)とも一致する。

〔文　献〕

(1) De Lean, A., Stadel, J.M. and Lefkowitz, R.J. (1980) J. Biol. Chem. 255, 7108-7117
(2) Kebabian, J.W., and Calne, D.B. (1979) Nature 277, 93-96 (3) Limbird, L.E. (1981) Biochem. J. 195, 1-13 (4) Munson, P.J., and Rodbard, D. (1980) Anal. Biochem. 107, 220-239 (5) Sibley, D.R., De Lean, A., and Creese, I. (1982) J. Biol. Chem. 257, 6351-6361 (6) Stoof, J.C., and Kebabian, J.W. (1984) Life Sci. 35, 2281-2296
(7) Watanabe, M., George, S.R., and Seeman, P. (1985) Biochem. Pharmacol. 34, 2459-2463

42. ラット中枢 D-2ドーパミン受容体における［^{3}H］sulpiride 結合部位の特性

今福　淳・朝倉幹雄・塚本　徹・松井宏晃
伊野美幸・宮村智子・斉藤典子・長谷川和夫
（聖マリアンナ医大・神経精神）

〔要　約〕

中枢D-2 ドーパミン受容体に対する[^{3}H] sulpiride および[^{3}H]spiperoneの結合特性を検討した。[^{3}H]Sulpiride の特異的結合はNaイオン濃度依存性に増加し、100-200mM Na 存在下で最大の効果を示した。100mM Na 存在下での[^{3}H]sulpiride結合飽和実験ではScatchard plotは直線を呈し、[^{3}H]sulpirideの結合部位は単一であることが示された。20mM Na 存在下でも同様に直線を呈し、最大結合数の有意な変化は示さなかったが、結合親和性の低下が認められた。この[^{3}H]sulpiride結合部位は、[^{3}H]spiperone特異的結合部位の約75% にあたり、残りの25% は5-HT$_2$ アンタゴニストのミアンセリンで高親和性に阻害されることから、5-HT$_2$ 受容体である可能性が示唆された。[^{3}H]Sulpirideにたいするアゴニストの阻害曲線は、Hill係数が 1 以下となり、アゴニスト高親和性、低親和性の二つの状態が存在することが認められ、GTP によりアゴニストの親和性が低下し、逆に二価陽イオンによりアゴニストの親和性は増加した。以上の結果より、[^{3}H]sulpiride結合部位はアデニル酸シクラーゼ(AC)系と共役し、ACに抑制性に関与する他の受容体特性に認められる様にNaイオンによりアンタゴニストの親和性が増加することから、D-2 受容体アゴニスト低親和性状態であることが示唆された。

Key word :　D-2 dopamine receptor　[^{3}H]sulpiride　sodium ion

［ 緒言 ］

近年、中枢ドーパミン受容体は、D-1 受容体及びD-2 受容体の二つに大きく分類されている。D-1 受容体は、アデニル酸シクラーゼ(AC)活性に対して促進的に作用し(3)、D-2 受容体は、抑制的に作用する(2)。

一方、D-2 受容体は、抗精神病薬の主な作用部位とされ、[^{3}H]spiperoneを用いた結合実験が広く行なわれている。しかし、[^{3}H]spiperoneは5-HT$_2$ 受容体も標識しているため、これを除外しないと正確なD-2 受容体の解析ができない。そこで今回我々は、D-2 受容体に対し選択的アンタゴニストの[^{3}H]sulpirideを用いて、D-2 受容体との結合特性を検討し、[^{3}H]spiperone結合特性との比較を行なった。

［ 方法 ］

(1) 受容体標品の調製：　Wistar系雄性ラット（体重180-250 g ）を用いた。分割した線条体を 20 容の 50mM Tris-HCl buffer (pH 7.5, 25°C)にて Brinkman polytron によりホモジナイズし50,000 g 10 分間遠心分離した。 沈さは同 buffer で洗浄ののち、再び遠心し、得られた最終沈さを同bufferに懸濁したものを受容体標品とした。

(2) [^{3}H]Sulpirideおよび[^{3}H]spiperone結合実験：　[^{3}H]sulpiride結合実験は、最終濃度 2nMとなる[^{3}H]sulpirideと 100mM NaCl を含む 50mM Tris-HCl buffer(pH 7.5,25°C)、[^{3}H]spiperone結合実験は最終濃度 0.3nM の[^{3}H]spiperoneと 50mM Tris-HCl buffer(pH 7.5,37°C) を用い、各種薬物と膜標品(0.2 - 0.4mg protein)を加え、最終容量 1.5-2mlとし、25°C 60 分間又は 37°C 15 分間インキュベートした。非特異的結合は、10 μM(-)sulpiride 及び 1 μM(+)butaclamolを用い同様におこなった。

インキュベーションは、試験管内容を Whatman GF/B filter 上に吸引ろ過し、同 buffer で洗浄の後液体シンチレーションカウンターで計測した。データはコンピュータを用い、非線形最小二乗法により解析した(1)。

Table 1 Inhibition of binding of [³H]spiperone or [³H]sulpiride to striatal membranes

	IC50(nM)	
Drug	[³H]Spiperone	[³H]Sulpiride
(-)Sulpiride	510	26
Metoclopramide	650	22
Butaclamol	1.7	3.5
Haloperidol	5.0	5.0
Chlorpromazine	36	14
Levomepromazine	27	17
Flupentixol	24	10
Dopamine	440	240
Apomorphine	60	30
Mianserin	2330	1040
Yohimbine	5710	180
Prazosin	>10000	>10000

The IC50 is the concentration of drug required to displace 50% of [³H]spiperone(0.3nM) or [³H]sulpiride(2nM) specific binding.Results are expressed as the mean for 2-4 separate experiments. The SE values were less than 5% in each experiment.

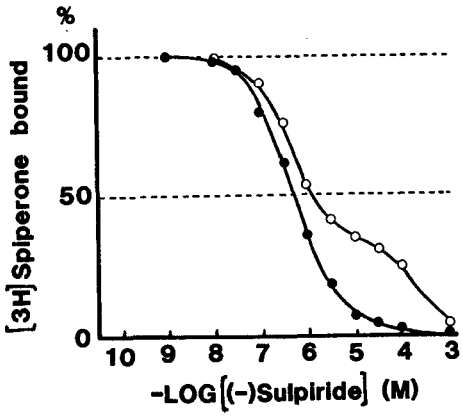


Fig. 1. Computer-modeled curves for (-)sulpiride/[³H]spiperone competition experiments in the absence (○) or presence (●) of 60nM mianserin.

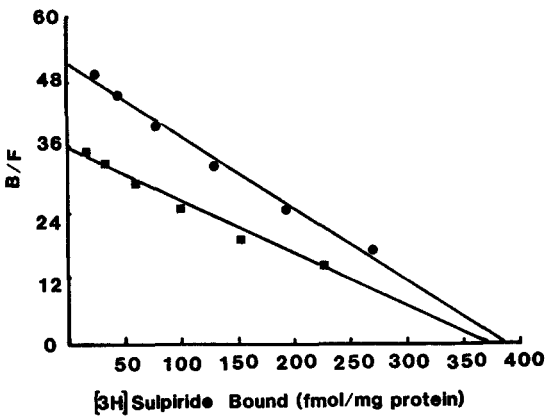


Fig. 2. Scatchard plots of [³H]sulpiride in the presence of 100mM NaCl (●) or 20mM NaCl (■). In the presence of 100mM NaCl, Scatchard plots were linear with Kd of 7.5 nM and Bmax of 385 fmol/mg protein. In the presence of 20mM NaCl, Scatchard plots represented also linear with Kd of 9.8nM and Bmax of 351fmol/mg protein.

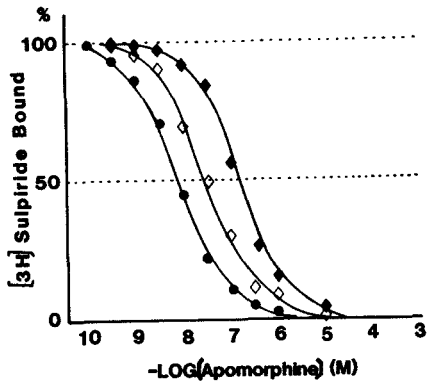


Fig. 3. Computer-modeled curves for apomorphine/[³H]sulpiride competition experiments in the absence(◇) and presence of 300μM GTP(◆) or 10mM Mg (●).

[結果及び考察]

(1) [³H]Sulpiride特異的結合に対する一価陽イオンの効果： [³H]sulpirideの特異的結合は Na イオン依存性であり、Naイオン濃度上昇とともに特異的結合は増加し、100mM Naイオン存在下で最大の効果が認められた。Liイオンも同様に[³H]sulpiride特異的結合を増加させたが、Naイオンの半分の効果であった。K イオンは、[³H]sulpiride特異的結合に有意な変化を与えなかった。

(2) 結合阻害実験： 各種抗精神病薬やドーパミンアゴニストは、[³H]sulpiride結合部位に対して高い親和性で阻害し、アンタゴニストによる阻害曲線の Hill 係数は 1 に近い値となった。[³H]Spiperone結合に対するミアンセリン（5-HT_2 アンタゴニスト）の阻害曲線は、二相性となり、高親和性成分が約25-30%であった。これは、[³H]spiperone結合に対する(-)sulprideの阻害曲線で約25% の阻害されない部分があることに一致し、[³H]spiperoneが標識している5-HT_2 受容体と思われる。このことより[³H]spiperone結合阻害実験は、5-HT_2 受容体を除外する目的で60nMミアンセリン存在下で行なったところ、(-)sulprideは[³H]spiperone結合部位をほぼ100%阻害し(Fig.1)、典型的抗精神病薬とアゴニストの親和性(IC50)は[³H]sulpiride阻害実験より得られた結果と相関が認められた(Table 1)。

(3) 飽和結合実験： [³H]Sulprideの濃度 0.5nM-16nM の範囲で、Scatchard plotはほぼ直線を示し、結合親和性(Kd)が 7.5nM、最大結合数(Bmax)は 385 fmol/mg proteinであった。 低濃度のNaイオン(20mM)存在下でも Scatchard plot は直線を示し Kd の増加が認められたが、有意な Bmax の変化は認められなかった(Fig.2)。[³H]SpiperoneのScatchard 解析は、0.05nM-6.4nMの濃度範囲で、それぞれアイソトープの200 倍濃度のミアンセリン存在下、非存在下で行なった。ミアンセリン非存在下でのScatchard plotは曲線を示し高親和性、低親和性成分の二つの状態に分かれた。ミアンセリン存在下では、直線となり、ミアンセリン非存在下での高親和性成分と一致した(data not shown)。

(4) アゴニスト阻害曲線に対する二価陽イオン及び guanine nucleotide の効果： アゴニストである apomorphine による阻害曲線は二相性となり、アゴニストに対し高親和性、低親和性の二つの状態に対応し、Hill係数は 1以下となった。 300μM GTP 存在下では、阻害曲線は右に移動し、Hill係数はほぼ 1 になりアゴニスト低親和性状態のみとなった。二価陽イオンのMg 10mM 存在下では、逆に阻害曲線は左に移動し、アゴニスト高親和性状態の増加が認められた(Fig.3)。これらの効果は、[³H]spiperone結合特性にも同様に認められるが、上述[³H]spiperoneは同時に 5-HT 2 受容体を標識していることを考慮しなければならない。

以上の結果より、[³H]spiperoneの特異的結合部位の約25% は5-HT_2 受容体で、75% はD-2 受容体であると思われる。このD-2 受容体の部位に対する[³H]sulprideの結合親和性は、Naイオンによって特異的に増加した。Naイオンによりアンタゴニストの親和性が増加する特性は、ACに抑制的に関与するα_2アドレナリン受容体やオピエート受容体においていわれており[4] 、 [³H]sulpiride結合部位は、D-2 受容体のアゴニスト低親和性状態であることが示唆された。

[文献]

(1) Asakura, M., Tsukamoto, T., Imafuku, J., Matsui, H., Ino, M. and Hasegawa, K. (1984) Eur. J.Pharmacol.,106, 141-147

(2) Cote, T.E., Grewe, C.W. and Kebabian, J.W. (1981) Endocrinolology , 180, 420-426

(3) Kebabian, J.W. and Calne, D.B. (1979) Nature, 277, 93-96

(4) Makman, M.H., Dvorkin, B. and Klein, P.N. (1982) Proc. Natl. Acad. Sci.USA, 79, 4212-4216

43. ラット肝ヒスタミン H_1 受容体の可溶化，部分精製及びその性質

福井裕行・王　乃平・渡辺建彦*・和田　博
（大阪大・医・第二薬理，東北大・医・第一薬理*）

〔要　約〕

ラット肝は非常に高いメピラミン結合活性（約２pmoles/mg protein）が報告されているが、[1] 我々は界面活性剤（10mM CHAPS、0.2% Tween60）安定化剤(30% Glycerol)を用いてメピラミン結合活性を指標にしてヒスタミンH_1受容体の可溶化に成功した。可溶化H_1受容体はゲル濾過(Sepharose CL-4B)により67万、ショ糖密度勾配遠心により80万の分子量を示した。またメピラミンの可溶化H_1受容体にするK_DはK_{D1}＝2.9 nM、K_{D2}＝12nMであった。可溶化H_1受容体とメピラミンの結合に対してH_1拮抗薬はKiが10^{-9}～10^{-6}Mオーダーで阻害した。可溶化H_1は４℃において２０日で約７５％の活性を保持しゲル濾過(Sephacryl CL-4B)、ヒドロキシアパタイト(Bio Gel HTP)、Octyl Sepharose 4B、ヒドロキシアパタイトHPLC の各カラムクロマトグラフィーにより約30倍部分精製された。

Key word： Histamine H_1 Receptor, Mepyramine, Rat Liver, Detergent

我々の教室ではヒスチジン脱炭酸酵素の抗体を用いるヒスタミン神経線維の同定を行なってきたが、[2] 今回ヒスタミンの作用点であるヒスタミンH_1受容体の分子機構を明らかにする目的で最近非常に高いメピラミン結合活性が報告されたラット肝を精製の出発材料としてH_1受容体の可溶化、部分精製を試み、その性質を検討した。

（方法）

ウイスター系ラット(200～250g)の肝より膜分画を得、これを10mM CHAPS、0.2% Tween 60、30% グリセリンを含む50mMリン酸緩衝液(pH 7.4)を用いてホモゲナイズし氷上にて1時間放置後100 x g、60分間遠心し上清に可溶化受容体を回収した。可溶化H_1受容体のメピラミン結合活性の測定はTotal Bindingとして2nM［^{3}H］メピラミン及びNon-specific Bindingとして2nM［^{3}H］メピラミンと20μMトリプロリジンと共に25℃、30分間インキュベーションを行い、可溶化H_1受容体に結合した〔^{3}H〕メピラミンをセルロファインGC 200mによるゲル濾過カラム（φ7.5 x 50mm）を用いて非結合〔^{3}H〕メピラミンと分離し、Total BindingとNon-specific Bindingの差により結合活性(Specific Binding)を求めた。（図１）

（結果）

（１）H_1受容体の可溶化：　CHAPS及び、グリセリンの濃度と可溶化の程度を調べた。10mM CHAPS及び 20%以上のグリセリンが至適であった。（図２）

（２）可溶化H_1受容体のサイズの測定：　可溶化H_1受容体の分子量はSepharose CL-4Bを用いるゲル濾過により67万（図３）ショ糖密度勾配遠心により80万（図４）が測定された。

（３）　可溶化H_1受容体のメピラミンに対する親和性及びメピラミン結合に対する種々のリガンドによる阻害：　Scathard Plot Analysisにより可溶化H_1に対するメピラミンのK_Dは２種存在し、それぞれK_{D1}＝2.9 nM、　K_{D2}＝12 nMと測定された。（図５）更に種々のリガンドによるメピラミンの可溶化H_1受容体への結合の阻害（Ki）を調べた。（表１）メピラミンは10^{-9} Mオーダーの Kiを示したが他のH_1拮抗薬のKiは10^{-7}－10^{-6} Mオーダー、H_2拮抗薬、ヒスタミン自信のKiはそれぞれ10^{-5} M、10^{-4} Mであり、ヒスタミンと無関係のクラーレ、カテコラミン、セロトニンは更に高いKi（10^{-3} M)を示した。

（４）可溶化H_1受容体の安定性：　可溶化H_1受容体を４℃、及び－80℃で保存しメピラミン結合活性の変化を調べた。４℃では２０日後で約75％、－80℃では約90％の活性が残存した（図６）。

（５）可溶化H_1受容体の部分精製：　可溶化H_1受容体をSepharose CL－4Bを用いるゲル濾過（図７）、ヒドロキシアパタイト（図８）、Octyl Sepharose 4B（図９）ヒドロキシアパタイトHPLCの各カラムクロマトグラフィーにより約30倍の部分精製ができた（２）。

（考察）

ヒスタミンは平滑筋収縮、血管透過性亢進、胃酸分泌、神経伝達物質などの生理作用を有しており、その作用点においてH_1とH_2の二種類の受容体が存在する。H_1受容体の刺激によりCa^{++}の細胞内流入、イノシトールリン酸の代謝回転の亢進などがおこるが分子レベルではほとんど調べられていない。そこでH_1受容体の可溶化精製が是非必要である。可溶化についていくつかの報告があるがその後進展はしていない。[3]我々は最近コール酸の誘導体として化学合成し開発された界面活性剤CHAPS を用いて可溶化に成功した。可溶化H_1受容体の分子量は二種類の方法により、それぞれ87万80万と測定された。予備実験としてTarget Size AnalysisによりH_1受容体の分子量は約20万の値を得ており、界面活性剤と受容体の複合体形成により見かけの分子量の増加がおこっていると考えられる。

可溶化H_1受容体に対するメピラミン結合において２種類のK_Dが存在すること及びそれぞれの値は膜結合性の受容体に対するK_D値とよく一致した。このことから可溶化は受容体を変性させることなく行なわれたと考えられる。各種のH_1拮抗薬のメピラミン結合に対するKiは10^{-9}～10^{-6} Mオーダーでありまたヒスタミンのメピラミン結合に対するKiは10^{-4}オーダーであり脳などで報告されている値より高い。[4]このことから肝におけるH_1受容体は他の組織のものと異なる可能性があり今後検討していく必要がある。可溶化H_1受容体は比較的安定で精製に耐えると考えられた。多種のカラムクロマトグラフィーにより部分精製がなされたが、今後更にメピラミンをリガンドとする効率のよいアフィニティーカラムの開発が必要である。

（文献）

1) M. Imoto et al., Biochem. Biophys. Res. Commun., 127, 885-889 (1985)

2) T. Watanabe et al., Brain Res., 295, 13-25 (1984)

3) L. Toll and S. H. Snyder, J. Biol. Chem., 257, 13593-13601 (1982)

4) R. S. L. Chang et al., J. Neurochem., 32, 1653-1663 (1979)

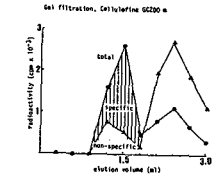


図 1

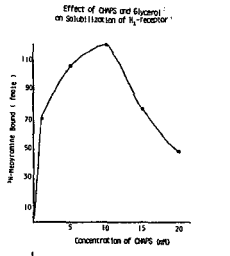


図 2

図 3

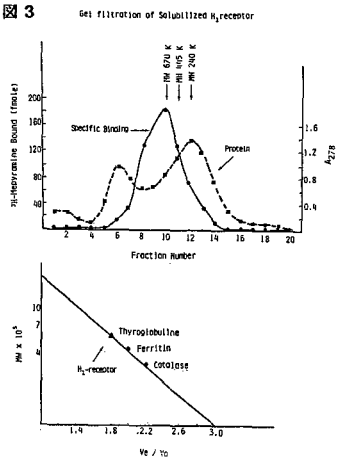


図 4

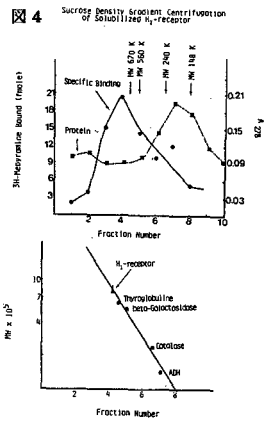


図 5

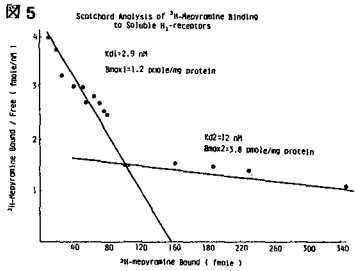


表 1 Drug Influences on ^{3}H-Mepyramine Binding to Soluble H_1-Receptors

Drug	Ki (M)
Mepyramine	7.4×10^{-9}
Triprolidine	1.1×10^{-6}
Diphenhydramine	1.1×10^{-6}
Chlorpheniramine	1.1×10^{-6}
Meguitazine	1.8×10^{-6}
Terfenadine	3.0×10^{-7}
Astemizole	1.1×10^{-6}
Cimetidine	7.4×10^{-5}
Histamine	1.5×10^{-4}
Curare	1.5×10^{-3}
Noradrenaline	3.3×10^{-3}
Adrenaline	3.3×10^{-3}
Serotonine	3.3×10^{-3}

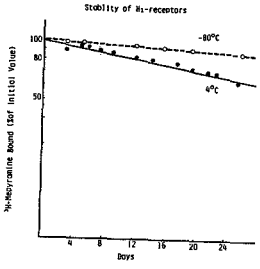


図 6

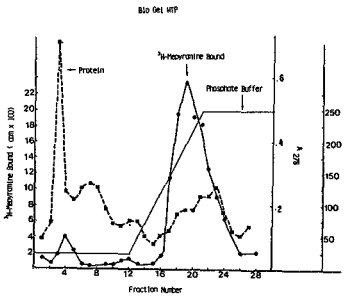


図 8

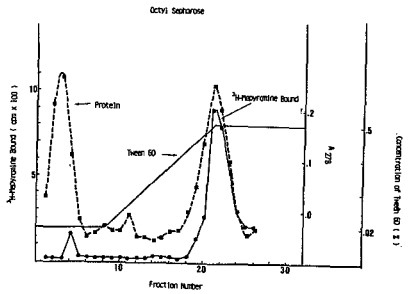


図 9

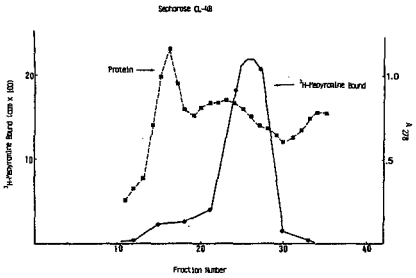


図 7

表 2 Purification of Histamine H_1-Receptorfrom Rat Liver Membrane

	Total Activity (pmole)	Total Protein (mg)	Specific Activity (pmole/mgprot.)	Yield (%)
Crude Soluble	373.2	373.0	1.0	100
Sepharose CL-4B	265.3	78.0	3.4	71.1
Bio Gel HTP	124.0	20.7	6.0	33.2
Octyl Sepharose	39.7	2.5	15.8	10.6
Hydroxyapatite HPLC	24.6	0.82	30.0	6.6

44. アセチルコリン伝達系のシナプス小胞マーカー，プロテオグリカンに対する抗血清の検討

山口知子・ D.V. Agoston*・ V.P. Whittaker*
（東京女医大・生化，マックスプランク研・Abteilung Neurochemie*）

〔要　約〕

生理的条件において，シナプス小胞がどのように形成され，伝達物質を貯蔵し放出したあと再利用されるかという問題を検討する上にシナプス小胞の特異的なマーカー分子として近年ヘパラン硫酸型プロテオグリカンが注目されている．われわれは，Torpedo marmorata の電気器官からゾーン密度勾配法でシナプス小胞を分画しシナプス小胞から部分精製したプロテオグリカンに抗原性があるためにウサギを免疫して得た抗血清を用いてDot-blot－免疫分析法を導入してシナプス小胞の定量を試みた．ゾーン分画で分離される可溶画分および膜構造をもったミクロゾームにも非特異的免疫反応が認められるがシナプス小胞のピーク分画では免疫反応がシナプス小胞の量比と直線関係が得られるがその他のゾーン分画では直線がすぐ飽和し，非特異的反応が示唆された．アセチルコリンを内蔵していないシナプス小胞の検索にはこのような小胞の特異成分による分析が望まれ，部分精製抗原とはいえDot-blot－免疫分析法は小胞のheterogeneity の検索に必須の手段と思われる．この方法を用いて神経切断したあと又は電気刺激したあとの電気器官内におけるシナプス小胞の動態を検討することが可能と思われるので報告する．

Key word：

Cholinergic vesicles, Proteoglycan, Torpedo marmorata

アセチルコリン系シナプス小胞にあるプロテオグリカンはヘパラン硫酸抱合体（1—2）であり，かつグリコスアミノグリカンのvesiculin は高分子プロテオグリカンから容易に切断され，かつ抗体を作らず抗原性はプロテオグリカンにのみ限られることが知られている（3）．シナプス小胞に特有と思われるプロテオグリカンは他のbasal laminaのような膜構造にみられるようなプロテオグリカンとは組成が異なる一方，シナプス小胞のどの構成成分より抗原性が強いため従来のマーカーであるATP やAch よりは安定かつ信頼性の高いシナプス小胞の鋭敏なマーカーになりうるものと思われる．われわれはTorprdo marmorataの電気器官から調製したコリン作動性シナプス小胞から部分精製したプロテオグリカンをウサギに投与して得た抗血清を用いてDot-blot－免疫分析法によってゾーン遠心法で分画してえたシナプス小胞の定量を試みて生理的条件によって異なるシナプス小胞の動態の検索を試みたので報告する

〔方法〕

シナプス小胞の調製：Osawa （4）らの方法によって液体窒素凍結した電気器官を乳鉢で破砕し0.4MNaClを加えてpaste として4層のガーゼで絞り出し調整したホモジネートを10,000Ｘｇ30分遠心した上清をゾーンローター中の蔗糖密度勾配層の上に重ねて50,000 rpm3時間遠心して分画を採取した．

ATP の定量：Luciferin-Luciferase法によって測定（5）

アセチルコリンの定量：leech の背筋の小片によるbioassay法を用いた（6）

抗体の調製：シナプス小胞に対する抗血清はWaker （7）らによって精製したシナプス小胞をウサギに免疫して得た抗血清を用いた．

Dot-blot－免疫分析法：抗原としてのシナプス小胞は次の2方法によって処理し分析試料に供した．

（a）ゾーン遠心分画法で得た小胞分画（タンパク量として約80ug/ml）の50ulに10％SDS を10ul加え30秒煮沸して冷却後．12ulの50％TCA を加え遠心して得た沈査に0.2 ％SDS を含む0.5Mリン酸緩衝液pH6.8 に可溶化する．

（b）ゾーン遠心分画100ul に80ulの水を加えBeckman Airfuge にて160,000Xg 30分遠心して得た試料に25ulのSDS-PAGE試料用試薬を加える．上記試料1ulをニトロセルロース膜にblotしKirmartin ら（8）の方法によって第1抗体は抗シナプス小胞プロテオグリカンウサギ抗血清を用い第2次抗体にはロバの抗ウサギIgl25I-F(ab)2 を用いて免疫学的にシナプス小胞をプロテオグリカンをマーカーとして定量した

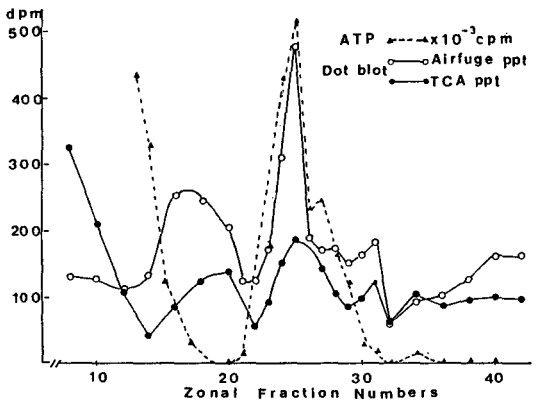


Fig. 1 Profiles of zonal fractionation of vesicles detected by dot immunoassay using antiserum of vesicle PG from electric organ of Torpedo marmorata.

〔結果及び考察〕

図1にはゾーン遠心法による電気器官の10,000Xg supの分画像が示されている．点線はATP の分布パターンで上層の可溶分画に局在する他分画20-30 番のシナプス小胞の密度に鋭敏なピークがあり更にミクロゾームに小さいピークが認められる．このカーブはアセチルコリンの局在とよく一致しシナプス小胞の分画のマーカーになるが不安定な分子であるため製後直ちに測定しなければならない．一方Dot-blot－免疫分析法でゾーン分画を分析した結果が実線で示されている．即ち黒丸は（a）法によって調製したDot-blotであり白丸は（b）法によって調製したサンプルのblot像である．両者の相違は小胞の含量としてbはaの4倍単位ul当たり懸濁してあるが，bは試料の濃度のみならずAirfuge によってゾーン分画に混

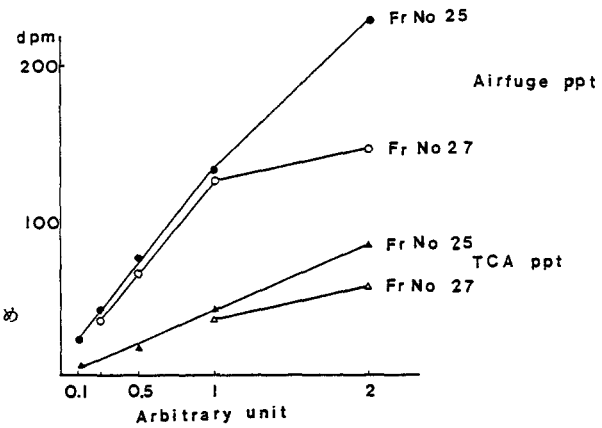


Fig. 2 Correlation between the amount of vesicles and the immunoreactivity of the vesicle's antigen by two different methods.

入してくる可溶成分を除去してあり （a）はTCApptとして小胞を集める際に可溶分画のタンパクも沈澱して混入してくる．非特異的免疫結合がシナプス小胞以外にも認められ必ずしも小胞特異反応ではないが，（b）による試料の調製がより望ましいことがこの図から認められる．Dot-blot－免疫分析の定量性については2図に示したカーブによって小胞の量と免疫反応の程度の量比が小胞の最も多く含まれるATP のピーク（分画25）から得た試料で分析すると直線性がよく保たれているが小胞の少なくなる分画27の試料でかいたカーブは飽和されていることがわかる．即ち特異的な免疫反応が他の非特異的分子の共存によって妨害されるものと思われ，この見地からも試料調製に当たっては小胞以外の成分を除外できる（b）が望ましい．生理的条件（電気器官の神経切断によるAxonal transportの遮断や器官の刺激による伝達物質の放出実験）によつてシナプス小胞がどのように作られ運ばれ再利用されるかという研究の一手段に密度がわずかに異なる小胞の分布の検索にこのDot-blot－免疫分析法はより有効な手段になりうると思われる．ATP は非特異的でありAch は内蔵していない小胞のマ―カ―にはなりえないので，このプロテオグリカンに対する免疫法の導入はより鋭敏なシナプス小胞のマ―カ―になると思われるが，まだ抗原の化学的特異性についてはプロテオグリカンであるということ，糖の組成が他の器官のプロテオグリカンと異なるヘパラン硫酸型であり分子量も約20,0000 ということ以外にはよく解明 されていないために小胞の特異的マ―カ―であるという根拠は薄いが少なくともAch を保有していない小胞のマ―カ―として，生理的に異なった条件でのシナプス小胞の動態を知る方法として推挙される．

REFERENCES:

1 Stadtler H,Whittaker VP: Identification of vesiculin as a glycosaminoglycan. Brain Res. 153,408-413'78

2 Stadtler H ,Dowe GHC: Identification of a heparan sulfate containing proteoglycan as a specific core component of cholinergic synaptic vesicles from Torpedo marmorata. EMBO J. 1.1381-1384'82

3 Walker JH,Obrocki J,Zimmermann CW: Identification of a proteoglycan antigen characteristic of cholinergic synaptic vesicles. J.Neurochem 41,209-216'83

4 Osawa K,Dowe GHC,Morris SJ,Whittaker VP: The lipid and protein content of cholinergic vesicles from the electric organ of Torpedo marmorata purified to constant composition: Implication of vesicle structure. Brain Res. 161,447-457 '79

5 Stanley PE, Williams SG: Use of liquid scintillation spectrometer for determinig adenosine triphosphate by the luciferase enzyme. Analyt Biochem 29,381-392 '69

6 Whittaker VP, Baker LA: The subcellular fractionation of brain tissue with special reference to the preparation of synaptosomes and their component organelles, Methods Neurochem. 2,833-846 ' 72.

7 Walker JH,Jones RT,Obrocki J,Richardson GP, Stadtler H : Presynaptic plasma membranes and synaptic vesicles of cholinergic nerve endings demonstrated by means of specific antisera. Cell Tissue Res. 223,101-116 '82

8 Kilmartin JV, Amos WB : personal communication.

45. 抗躁病薬の中枢セロトニン受容体に及ぼす影響

山脇成人・内富庸介・堀田和泉・柳川耕作
長尾正嗣*・更井啓介*
（国立呉病院・臨床研究部・精神，広島大・医・神経精神*）

〔要　約〕

抗躁効果を有するリチウム(Li)、ゾテピン(ZTP)、およびカルバマゼピン(CBZ)の長期投与による中枢セロトニン(5HT)受容体機能の変化を調べ、抗躁病薬の薬理機序について検討した。In vitro実験でZTPは^{3}H-5HT(5HT$_1$受容体)結合能および^{3}H-ケタンセリン(5HT$_2$受容体)結合能に強力な阻害作用を示したが、LiとCBZの阻害作用は軽度であった。In vivo実験で薬物を長期投与した場合、前大脳皮質における5HT$_1$受容体はLi，ZTP，CBZのいずれの投与でも変化しなかったが、海馬ではLi投与群のみで最大結合数(Bmax)が減少していた。これに対し、5HT$_2$受容体は前大脳皮質においてLi群およびZTP群でBmaxが有意に減少していた。また、ZTP+Li群およびCBZ+Li群でもBmaxの減少が認められたが、CBZ投与群では変化していなかった。さらに、5HT$_2$受容体の生理機能の指標とされる5HTPによるhead twitch反応もLi群およびZTP群で減少しており、受容体結合実験の結果と一致していた。つまり5HT$_2$受容体の機能低下がLiとZTP長期投与後の共通した変化であった。以上の結果からLiとZTPの抗躁作用に5HT$_2$受容体が関連していることが示唆される。

Key word：　Anti-manic drugs, 5HT receptors, Down regulation

躁うつ病のセロトニン(5HT)仮説が提唱されて以後、その病態と中枢5HTに関する多くの研究がなされてきたが、その中心はうつ病研究であり、躁病研究は非常に少ない。躁病治療薬として最も使用されているのはリチウム(Li)であるが、その薬理作用と5HTに関する報告は多い。抗てんかん薬のカルバマゼピン(CBZ)にも抗躁作用を有することが報告され、Postらによりその基礎研究が行われている。さらに、最近抗精神病薬として開発されたゾテピン(ZTP)にも抗躁効果が認められているが、その薬理機序は不明である。本実験では、Li、CBZおよびZTPの脳内5HT受容体に及ぼす影響を調べ、これらの薬理作用を比較し、抗躁作用の機序について考察を加えた。

［材料と方法］　恒温恒湿で飼育したWister系雄性ラット(150－200g)を用いた。

5HT受容体結合実験：In vivo実験ではZTP(ロドピン®、藤沢薬品)、CBZ(テグレトール®、チバガイギー)および塩化リチウム(LiCl)をそれぞれ5 mg/kg、20 mg/kgおよび3 meq/kgの用量で1日1回2週間腹腔内投与し、ZTPとCBZを投与したラットは最終投与48時間後に、またLiClを投与したラットは最終投与1時間後に断頭し前大脳皮質と海馬を取り出した。5HT$_1$および5HT$_2$受容体結合実験はPeroutkaら[1]の方法を一部改変して行った。5HT$_1$受容体結合実験はリガンドとして、1.0～10nM(in vitro実験では4.0 nM)の^{3}H-5HTを用い、100 μMの非標識5HTで置換されうる量を特異的結合量とした。5HT$_2$受容体結合実験はリガンドとして、0.2～2.0nM(in vitro実験では1.0nM)の^{3}H-ケタンセリンを用い、1.0 μMのスピペロンで置換されうる量を特異的結合量とした。それぞれScatchardの方法で解析し、解離定数(Kd)および最大結合数(Bmax)を求めた。

Head twich反応の測定：ZTP(5mg/kg)、CBZ(20mg/kg)およびLiCl(3meq/kg)を急性投与群では1回投与1時間後に、慢性投与群では1日1回2週間投与し、最終投与1時間後、3日後、7日後にカルビドーパ(25mg/kg)を前処置後、5HT前駆物質の5-ヒドロキシトリプトファン(5HTP,150mg/kg)を腹腔内投与し、投与30分後から30分間のhead twich反応を測定した。

［結　果］ In vitro実験：$5HT_1$受容体結合に対するIC_{50}が、ZTPは1×10^{-6} M、Liは1×10^{-2} eq/Lで、CBZはほとんど阻害作用は認められなかった。また、$5HT_2$受容体結合に対するIC_{50}はZTPが5×10^{-8} M、Liが1×10^{-1} eq/L、CBZが1×10^{-4} Mであった。つまり$5HT_1$、$5HT_2$両受容体結合に対してZTPは強力な阻害作用を有するが、LiとCBZの阻害作用は軽度か、全く阻害しなかった（図1）。

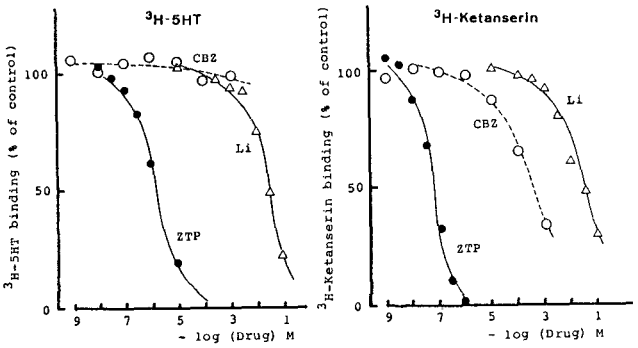


Fig. 1

Effects of anti-manic drugs on monoamine receptor binding in the rat cortex in vitro
CBZ: Carbamazepine, ZTP: Zotepine, Li: Lithium

長期投与による受容体の変化：ラット前大脳皮質における$5HT_1$受容体結合能に対しては、Li、ZTP、CBZ各々単独投与群でも、またZTP+Li群でもKd、Bmaxともに変化が

Table 1

Effects of anti-manic drugs on (^{3}H)-5HT ($5HT_1$) binding in the rat frontal cortex

Drug	(n)	Kd (nM)	Bmax (pmol/mg)
Control	(5)	2.22 ± 0.20	0.180 ± 0.014
Li	(6)	2.30 ± 0.21	0.191 ± 0.006
ZTP	(5)	1.91 ± 0.11	0.192 ± 0.019
ZTP+Li	(6)	2.34 ± 0.22	0.193 ± 0.175
CBZ	(4)	2.90 ± 0.45	0.164 ± 0.007
CBZ+Li	(3)	2.89 ± 0.53	0.182 ± 0.057

Each value represents mean ± S.E.

Table 2

Effects of anti-manic drugs on (^{3}H)-5HT ($5HT_1$) binding in the rat hippocampus

(A)

Drug	(n)	Kd (nM)	Bmax (pmol/mg)
Control	(6)	3.98 ± 0.21	0.331 ± 0.011
Li	(6)	3.91 ± 0.29	0.259 ± 0.016*
ZTP	(6)	4.45 ± 0.25	0.365 ± 0.017
ZTP+Li	(6)	3.31 ± 0.40	0.279 ± 0.034

(B)

Drug	(n)	Kd (nM)	Bmax (pmol/mg)
Control	(4)	3.23 ± 0.11	0.246 ± 0.320
CBZ	(4)	3.08 ± 0.38	0.276 ± 0.046
CBZ+Li	(3)	3.74 ± 0.29**	0.284 ± 0.048

Data(A) and (B) were obtained from the different series of experiments.
Each value represents mean ± S.E..
*P<0.05, **P<0.01

Table 3

Effects of anti-manic drugs on (^{3}H)-Ketanserine ($5HT_2$) binding in the rat frontal cortex

Drug	(n)	Kd (nM)	Bmax (pmol/mg)
Control	(6)	0.689 ± 0.078	0.254 ± 0.004
Li	(6)	0.621 ± 0.059	0.215 ± 0.005**
ZTP	(5)	0.951 ± 0.102*	0.120 ± 0.017***
ZTP+Li	(6)	0.923 ± 0.193	0.112 ± 0.005***
CBZ	(5)	0.620 ± 0.078	0.238 ± 0.013
CBZ+Li	(5)	0.599 ± 0.161	0.181 ± 0.008***

Each value represents mean ± S.E..
*P<0.05, **P<0.01, ***P<0.001

認められなかった（表１）。海馬における$5HT_1$受容体結合能に対する作用はLiの長期投与によりBmaxが有意に減少し、また、CBZとLiの併用によりKdが有意に上昇していた（表２）。しかし、ZTP、CBZおよびZTP+Li群ではKd、Bmaxともに有意差は認められなかった。これに対して、前大脳皮質における$5HT_2$受容体結合能はLi、ZTPの単独投与群でBmaxが有意に減少していた（表３）。さらにZTP群ではKdも有意に増加していた。ZTPあるいはCBZとLiを併用した群ではBmaxの減少がさらに増強された。

長期投与によるhead twitch反応の変化：5HTPによるhead twich反応は１回投与ではZTP群のみが抑制され、２週間投与ではLi群とZTP群で有意に抑制されたが、CBZ群では変化を認めなかった。薬物投与中止３日目でLi群で認められたhead twitch反応抑制は回復したのに対し、ZTP群では中止７日目でも抑制されていた（表４）。

［考　察］　5HT受容体に及ぼすLiの作用について、Treiser & Keller[2]は慢性Li投与により海馬の$5HT_1$受容体のBmaxが減少することを報告し、筆者ら[3]はさらに^{3}H-スピロペリドールによる$5HT_2$受容体も慢性Li投与により減少することを認めた。今回の実験でも、Li群では海馬で$5HT_1$受容体が、前大脳皮質で$5HT_2$受容体のBmaxが減少していた。しかし、ZTP群では$5HT_2$受容体のBmaxのみが減少していた。$5HT_1$受容体と$5HT_2$受容体の精神機能における役割はまだ明らかにされていないが、抗うつ薬の長期投与により$5HT_2$受容体が変化するという報告が多いことから、うつ病の精神症状と$5HT_2$受容体の関連性が示唆されている。今回の実験でLiとZTPに共通の変化として$5HT_2$受容体のdown-regulationが認められたことから、これらの薬物の抗躁効果に$5HT_2$受容体が重要な役割を演じていることが示唆される。Liによる5HT受容体のdown-regulationの機序については、Liの前シナプスへの作用が介在することが報告されてている[4]。ZTPはin vitroで$5HT_2$受容体に強い阻害作用を示すにもかかわらず、なぜその長期投与でdown-regulationをひきおこすかは不明である。一方、CBZは$5HT_1$および$5HT_2$受容体のいずれにも影響しなかった。CBZの抗躁効果については Marangos ら[5]によりアデノシン受容体との関連が報告されており、LiやZTPとは異なった薬理作用から抗躁効果を示すと思われる。

Table 4

Effects of anti-manic drugs on 5HTP-induced head twitch responses

Drug	Treatment		Withdrawal	
	1 day	14 days	3 days	7 days
Control	74.6 ± 13.2 (8)	85.1 ± 11.5 (10)	78.6 ± 12.6 (5)	78.2 ± 10.1 (9)
Li	76.3 ± 11.7 (8)	38.2 ± 8.9 (10)**	75.9 ± 10.2 (8)	55.0 ± 15.5 (6)
ZTP	2.0 ± 1.5 (8)***	3.6 ± 2.0 (7)***	25.7 ± 9.4 (9)**	32.4 ± 11.8 (8)**
CBZ	75.8 ± 6.6 (8)	72.5 ± 8.6 (11)	62.3 ± 8.0 (7)	50.0 ± 9.2 (3)

Each value represents mean ± S.E.. **P<0.01, ***P<0.001

参　考　文　献

1) Perontka.S.J. and Snyder,S.H.:Mol.Pharmacol.16;687-699,1979.

2) Treiser,S.,Cascio,C.O Donohne,T.et al.: Science 213;1529-1531,1981.

3) 堀田和泉，山脇成人：神経精神薬理　7：121-123,1985.

4) Hotta,I.and Segawa T.: Neuroscience Letter suppl.13;S63,1983.

5) Marangos,P.J.,Post,R.M.,Patel,J.et al.: Eur.J.Pharmacol.93;175-182.1983.

46. 高血圧自然発症および脳卒中易発症ラットの脳内カテコールアミンと回転運動変化

野村正彦・岡村邦博　　(藤田学園保衛大・医・生理)

〔要　約〕

高血圧発症におよぼす中枢神経の機構解明に高血圧自然発症ラット（ＳＨＲ）および脳卒中易発症ラット（ＳＨＲＳＰ）は人の高血圧症患者の疾患モデル動物として非常に重要である。カテコールアミン作働神経系の調節をうけている昇圧神経中枢のある視床下部および降圧神経中枢のある弧束核を含む脳組織のアミン含有量を、ミリポアフィルターで直接ろ過し、ＨＰＬＣで分離、定量する微量測定方法を検討した。高血圧発症以前である４週令時のＳＨＲおよびＳＨＲＳＰの視床下部を含む間脳と弧束核を含む延髄では、対照であるWistar Kyoto（ＷＫＹ）に比べてNorepinephrin（ＮＡ）およびEpinephrin（Ａ）含有量が有意に高かった。しかし高血圧発症後の１２週令の３群間ではいずれの脳部位においても有意差は認められなかった。

高血圧ラットの活動性は過多な事が知られているが、無刺激条件下で回転カゴ（Wheel Running）による自発運動量を上記３群間で比較した。１２週令のＳＨＲの回転数は特に多く、１時間に3,８００回にも達した。ＳＨＲＳＰはむしろ重症高血圧のため回転数は少なく、ＷＫＹにほゞ等しい値であった。以上の実験成績から血圧変化ならびに運動量の変化は脳内カテコールアミン量の異常に起因している可能性が考えられる。

Key word：Norepinephrin,SHR and SHRSP,Wheel running.

高血圧自然発症ラット（ＳＨＲ）は高血圧症の血圧調節機構の病態を調べる上に、非常に有用な疾患モデル動物で、遺伝的に血圧調節の異常を来たし[12]、生後成長とともに血圧が高くなり、３ケ月令では高血圧が２００ｍｍＨｇ前後にまで上昇する[10]。また脳卒中易発症ラット(ＳＰＲＳＰ）はＳＨＲよりも血圧が更に高く容易に脳卒中を起すラットである。高血圧発症の原因はなお不明であるが、中枢神経系における神経伝達物質のうち血圧調節に直接関与すると考えられるカテコールアミン作働神経系の異常が指摘されている[7,8]。今回はＷＫＹ、ＳＨＲおよびＳＨＲＳＰ３群間の脳内カテコールアミン含有量を血圧発症の前段階である４週令と発症後の１２週令で測定した。また、高血圧症の特徴である活動性の過多を回転ケージ[6]で測定し、高血圧症の生理学的動態の一端を解明しようと試みた。

方法　モノアミン測定には、４週令と１２週令のＷＫＹ、ＳＨＲ、ＳＨＲＳＰを用いた。以上３群のラットは、脳摘出断頭時のストレス負荷を均一にするために、実験使用の１週間前から１日約５分間のハンドリングを実験当日まで続けた[1]。ラット脳はGlowinski and Iversen[2]らの方法に準じて７部位に分けた。すなわち大脳皮質（Cortex A.B.）、線状体（Str）、橋＋延髄（PM）、中脳（MB）、間脳（IB）、および小脳（Ce）の各脳組織は0.1ＭＰＣＡ（Perchloric acid）３ｍｌで、ホモゲナイズして、４℃　３０,０００ｇで１５分間遠心して上清を得た。この上清はミリポアフィルター（0.４５μｍ）でろ過後、ＨＰＬＣにて分離、定量した。ＨＰＬＣはBioanalytical system社のもので、カラムはBiophase ODS 5μｍを使い３０℃の恒温下で行なった。移動相は0.1Ｍリン酸緩衝液ｐＨ3.3、メタノール８％、Tetrahydrofurane１％、１－Octanesulfonic sodium 1.８５×10^{-3}Ｍ、ＥＤＴＡ（２Ｎａ）1.００×10^{-4}Ｍのものを用いた。ポンプの流速は

1.0ml／min、検出器の設定加電圧は＋800mV、2nAフルスケール、そしてカラム温度は30℃の設定条件下で測定を行なった。(3,14,15)

12週令ラットの3群間の自発運動量（Wheel running）を回転ケージの回転数として1時間おきにマイクロコンピューターで計数させて30日間測定した。(13)明期は午前7時から午後7時までの12時間と、暗期は午後7時から午前7時までとした。餌および水は自由摂取として与えた。

結果　4週令および12週令ラットの脳内カテコールアミン量を測定し、12週令のWKYの間脳のHPLCクロマトグラムを図－1に示した。変化の見られたものは、4週令のNA含有量でSHRおよびSHRSPの橋＋中脳、間脳でWKYに比較して有意に高く、SHRSPの延髄で高かった（図－2）。A含有量はSHRおよびSHRSPの橋＋延髄、間脳で有意に高かった（図－3）。しかし、12週令ではいずれの脳の部位においても有意差はなかった。

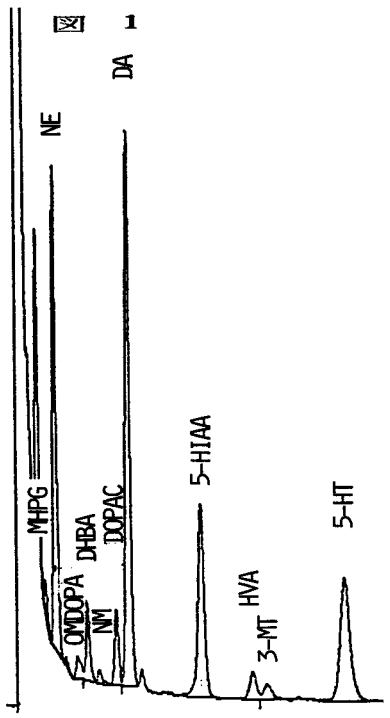
つぎに、3群間の回転ケージによる回転数を図－4に示した。3群のラットの回転数は明期および暗期の2相性パターンに分かれる運動量の差を認めた。しかし、SHRは特に回転数が多く、暗期の開始7時間にわたり1時間あたり3,000回転以上を記録した。そして、10匹平均の1日回転数は39,000回転に達した。一方、SHRSPは明期には1時間あたり10回から120回で、暗期には400回から600回であり、1日回転数は7,000回で、WKYの8,400回よりも低かった。

考察　高血圧ラットは脳内カテコールアミン作働性神経の血圧調節機構に異常があり、高血圧を発症するものと考えられる。(5,16)特に、今回の実験では高血圧発症以前の4週令で既に昇圧神経中枢のある視床下部(11)を含む間脳と降圧神経中枢のある弧束核(4)を含む延髄部位で、WKYと比べてNAとAの増加を認めたことは興味深い。

また、回転ケージによる回転数の変化は血圧の高いSHRでは有意に増加し、SHRSPではむしろ低下したことは、Skinner箱での定率強化学習課題FR－50で認めた結果とよく一致した。(9)すなわち、高い頻度のレバー押しを要求されるFR－50課題では、極度に血圧が上昇するとむしろ反応数が低下し、活動量の減少する事を裏ずけるものである。

以上の結果はいずれも生理学的環境下において認めた現象である。今後は高血圧ラットに電気刺激などのストレスを負荷したり、薬物投与による血圧を変動させた時の脳内アミンや運動量の変化がどの様に影響を受けるかを、併せ検討したい。

図　1



文献

図 2

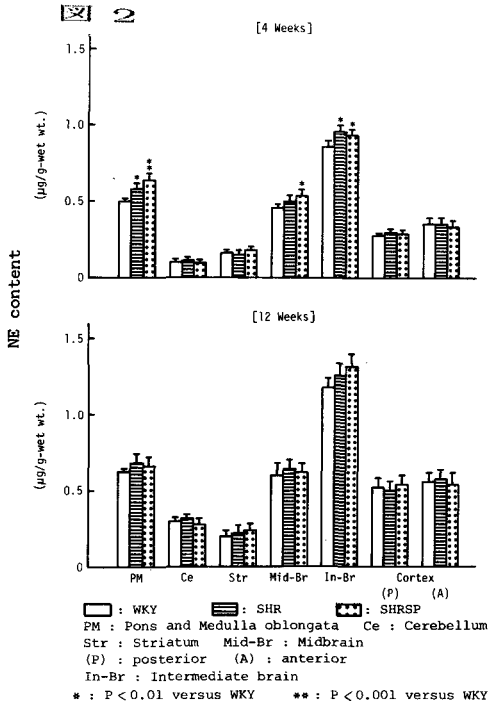


図 3

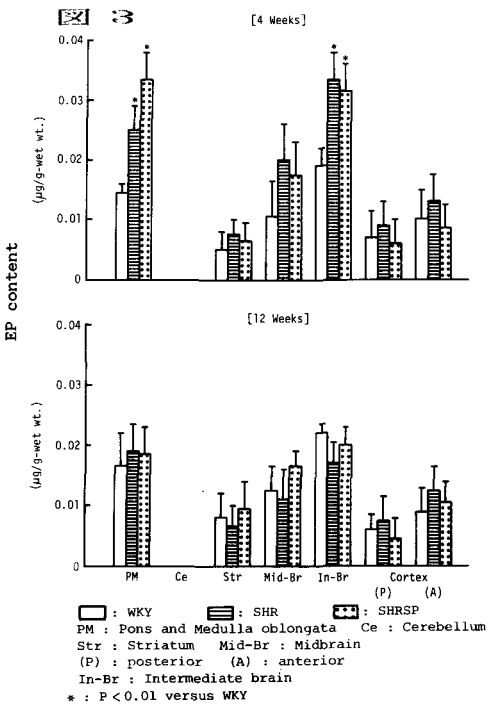
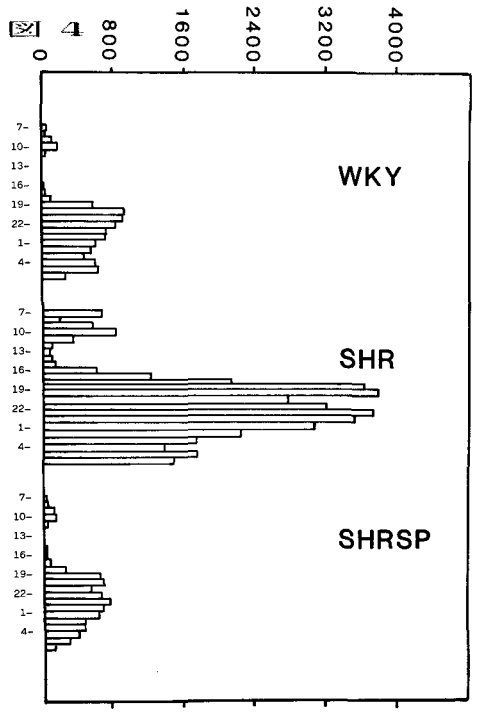


図 4



1. Cine,B.M.,and Winick,M. (1979) Dev. Psychobiol. 12;381-389.
2. Glowinski,L.,and Iversen,L.L. (1966) J. Neurochem.13;655-669.
3. Goto,M.,Zou,G.,and Ishii,D. (1893) J. Chromatog. 275;271-281.
4. Gurtu,S.,Sinha,J.N.,and Bhargava,K.P. (1982) N.S.Arch.Pharmacol.321;38-43.
5. Howe,P.R.C.,West,M.J.,Provis,J.C.,and Chalmers,J.P. (1981) Europ.J.Pharmacol.73;123-129.
6. Knardahl,S.,and Sagvolden,T. (1979) Behavio.& Neural Biology.27;187-200.
7. Nagatsu,T.,Kato,T.,Hashimoto,Y.,Numata,Y., Yamori,Y.,and Okamoto,K. (1978) Experimentia. 34;305-306.
8. Namura,K.,and Nakamura,K. (1977) Nature. 226;265-266.
9. Nomura,M.,and Ohtsuji,M. (1982) Hypertensive Mechanisms (Rascher,W.,Clough,D.,and Ganten,D. eds) PP.658-661.
10. Okamoto,K.,and Aoki,K. (1963) Jap.Circul.J. 27;282-293.
11. Przuntek,H.,and Philippu,A. (1973) N.S.Arch. Pharmacol.276;119-122.
12. Trippodo,N.C.,and Frohlich,E.D. (1981) Circul. Research.48;309-319.
13. Sykes,S.M.,and Henton,W.W. (1982) Physiol.& Behavior.29;965-970.
14. Wagner,J.,Vitali,P.,Palfreyman,M.G.,Zraika,M.,and Huot,S. (1982) J.Neurochem.38;1241-1254.
15. Warnhoff,M.(1984) J. Chromatog.307;271-281.
16. Wijnen,H.J.L.M.,Palkovits,M.,W.De Jong,and Versteeg,D.G. (1978) Brain Research. 157;191-195.

47. ラット脳虚血モデルにおける hydroxylase cofactor と monoamines の変化

飯島　節・原　健二*・須賀博文*・中村重信*・亀山正邦*
（滋賀県立成人病センター，京都大・医・神経内科*）

〔要　約〕

Pulsinelli らのラット脳虚血モデルにおいて，水酸化酵素補酵素活性（BH_4活性），モノアミン伝達物質とその代謝産物を測定した。60分間の虚血によりBH_4活性は大脳皮質のみで軽度減少した。dopamine（DA）は30・60分間の虚血により脳幹で有意に増加し，3，4－dihydroxyphenylacetic acid と homovanillic acid は全脳で著明に増加した。Norepinephrine（NE）は30・60分間の虚血により全脳で有意に減少した。Serotonin（5HT）は30・60分間の虚血により大脳皮質で有意に減少し，逆に5－hydroxyindoleacetic acid（5HIAA）は同部で増加した。BH_4活性の変化とモノアミンの変化との間には明らかな相関はなく，虚血時のモノアミンの異常に対するBH_4の関与は小さいと考えられる。DAとその代謝産物の変化はDAの合成と代謝回転の亢進を示唆しており，不完全虚血によるチロシン水酸化酵素の活性化が推定される。NEの減少はドパミンβ水酸化酵素の活性低下や神経終末からの放出の増大，再取り込みの減少等を反映している。5HTの減少はトリプトファン水酸化酵素の酸素に対する低親和性を反映し，5HIAA の増加は搬出障害や5HTの放出増大によると考えられる。

Key word：experimental brain ischemia，hydroxylase cofactor，monoamines

Tyrosine hydroxylase（TyH）と tryptophan hydroxylase（TrH）は tetrahydrobiopterin（BH_4）を補酵素として必要とする（8，10）。近年このBH_4が水酸化酵素活性を調節している可能性が示唆されている（4）。またパーキンソン病をはじめとする神経疾患でBH_4の異常が指摘されている（9）。しかし，虚血に伴う脳内BH_4の変化については不明である。脳虚血に伴い脳内モノアミンに多くの変化を来たすことはよく知られているが，従来の実験結果には多くの食い違いがみられる。そこで我々はPulsinelli らによって近年開発された再現性の高いラット脳虚血モデル（12）において，脳内の水酸化酵素補酵素活性（BH_4活性）と dopamine（DA），norepinephrine（NE），serotonin（5HT），3，4－dihydroxy－phenylacetic acid（DOPAC），homovanillic acid（HVA），5－hydroxyindoleacetic acid（5HIAA）を測定し，脳虚血に伴うBH_4活性の変化とモノアミン代謝に与える影響を検討した。

＜方法＞体重250－300 g のWistar 系雄性ラットの両側椎骨動脈をペントバルビタール麻酔下で電気焼灼し，同時に露出した両側総頸動脈を48時間後にクリップにより遮断した。遮断後60秒以内に完全四肢麻痺を呈したもののみを測定に供した。虚血時間は30分間と60分間とし，断頭後直ちに脳を取り出し，大脳皮質，深部灰白質，脳幹に分割した。BH_4活性はLevine ら（5）の酵素アイソトープ法により測定した。すなわち1NHCl でホモジュネートし，上清を凍結乾燥後，ラット肝より精製した phenylalanine hydroxylase，ラット脳より精製した quinonoid dihydropterin reductase，〔4－^{3}H〕phenyla－lanine を含む反応液を加え，30℃にて45分間反応させた。反応停止後 iodosuccini－mide を加え生成したトリチウム水をイオン交換カラムにて分離し放射能を測定した。標準試料には6－MPH_4を用いた。DA・NE・5HT・DOPAC・HVA・5HIAA は Zaczek ら

(13)の方法に従い電気化学的検出器つき高速液体クロマトグラフィーを用いて測定した。逆相分配カラム(ODS−1262, エルマ光学)を用い，移動相はヘプタンスルフォン酸(500〜700mg/L)とアセトニトリル(6.5%)を含む酢酸ナトリウム溶液(0.01M)とした。試料は0.1NPCAにてホモジュネートし，上清を注入した。なお，対照群として同一ケージにて飼育し，両側椎骨動脈焼灼のみを行ったラットを用い，Wilcoxon符合付き順位検定法により有意差検定を行った。

<結果> BH_4 活性は60分間虚血後に大脳皮質で対照の82%に低下したが($P<0.02$)，他の部位および30分虚血後には変化はなかった(Fig.1)。DAは脳幹で30分後に168%に($P<0.05$)60分後に196%に($P<0.02$)増加した(Fig. 2A)。DOPACは脳幹を中心とする全脳で135〜274%に著明に増加した(Fig. 2B)。HVAはDOPACとほぼ同様に全脳で137〜250%に増加した(Fig. 2C)。NEは30〜60分間の虚血により全脳で73〜89%に有意に減少した(Fig. 3)。5HTは大脳皮質で30分後に71%に($P<0.02$)60分後に72%($P<0.01$)に減少した。5HIAAは同じ大脳皮質で30分後に132%に($P<0.02$)60分後には113%に($P<0.01$)にそれぞれ増加した。

<考察>今回の実験では，四動脈遮断により70%以上のラットが完全四肢麻痺となり，Pulsinelliらの方法(12)が再現性が高く，生化学的検討に適していることが明らかとなった。BH_4 活性は60分間虚血後に大脳皮質のみで有意に低下した。一方，同時に測定したモノアミンとその代謝産物は全脳で著明に変化しており，BH_4 活性とモノアミンの変化との間には明らかな相関はなかった。したがって虚血に伴うモノアミンの異常に対する BH_4 の関与は小さいものと考えられる。DAおよびその代謝物DOPAC・HVAの増加はDAの合成と代謝回転の亢進を示唆している。TyHは酸素に対し高い親和性を持つため(11)，不完全虚血には耐えられる。一方，虚血に伴うcAMPの増加(6)，Ca^{++} の細胞内への流入(3)，NEの減少，BH_4 の保存はTyHを活性化する可能性があ

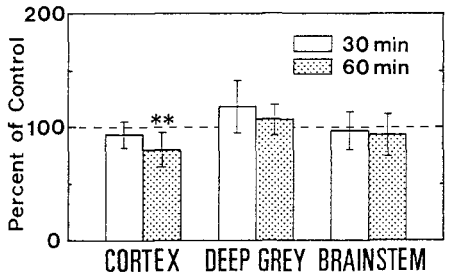
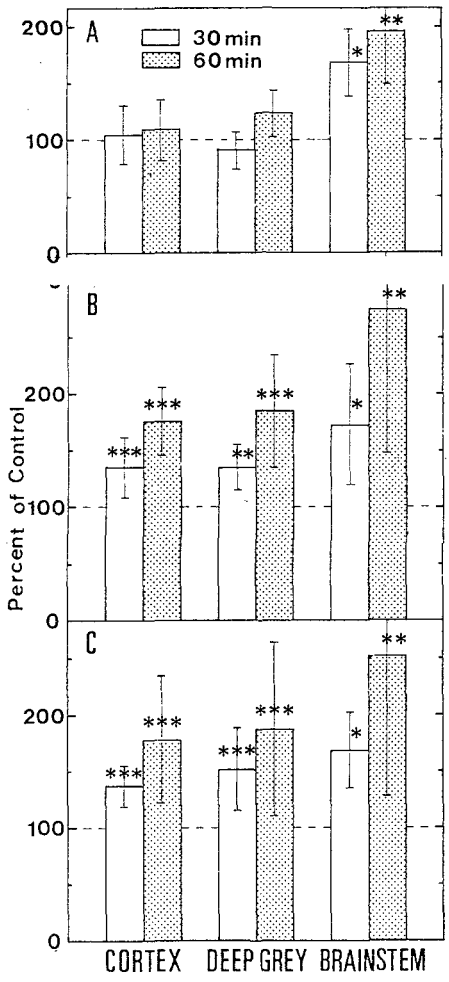


Fig.1 The activity of hydroxylase cofactor in the cerbral cortex, deepgrey matter and brainstem, after 30 and 60 min of ischemia.

Fig.2 The concentration of dopamine (A), DOPAC (B) and HVA (C).



る。DOPAC・HVAの増加は主としてDAの合成と代謝の亢進を反映し，DAの放出の増加やHVAの搬出の障害も一部関与しているものと考えられる。NEの全脳における著明な減少は神経終末からの放出の増大と再取り込みの減少(7)，酸素に対する親和性の低い dopamine－β－hydro－xylase (2)による合成の低下等により説明しうる。大脳皮質における5HTの減少と5HIAAの増加は，5HT合成の減少と放出の増大および5HIAAの搬出の障害を示唆している。TrHは酸素に対する親和性が低いため(1)虚血により障害されやすい点がTyHの場合(11)と異っている。

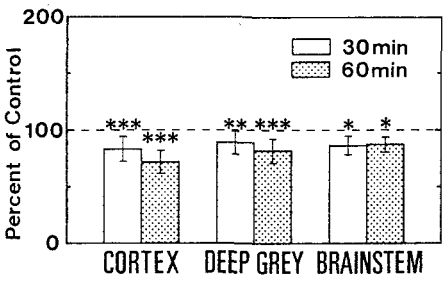


Fig.3 Norepinephrine

＜文献＞

1. Davis J. N., Carlsson A., MacMillan V. Siesjo B. K. (1973) Science 182, 72－74.
2. Goldstein M., Joh T. H. (1967) Biochim. Biophys. Acta. 146, 615－617.
3. Harris R. J., Symon L., Branston N. M., Bayhan M. (1981) J. Cereb. Blood Flow Metab. 1, 203－209.
4. Kettler R Bartholini G., Pletscher A. (1974) Nature 249, 476－478.
5. Levine R. A., Kuhn D. M., Lovenberg W. (1979) J. Neurochem. 32, 1575－1578.
6. Lust W. D., Mrsulja B. B., Mrsul ja B. J., Passonneau J. V., Klatzo I. (1975) Brain Res. 98, 394－399.
7. Mrsulja B. B, Mrsulja B. J, Spatz M, Klatzo I. (1976) Brain Res. 104, 373－378.
8. Nagatsu T., Levitt M., Udenfriend S. (1964) J. Biol. Chem. 239, 2910－2917.
9. Nagatsu T., Yamaguchi T., Kato T, et al. (1981) Clin. Chim. Acta 109, 305－311.
10. Nakamura S., Ichiyama A., Hayashi O. (1965) Fed. Proc. 24, 604.
11. Oka K., Ashiba G., Sugimoto T., Matsuura S., Nagatsu T (1982) Biochim. Biophys. Acta 706, 188－196.
12. Pulsinelli WA Brierley J B (1979) Stroke 10, 267－272
13. Zaczek R., Coyle J.T. (1982) J. Neural Transmission 53, 1－5.

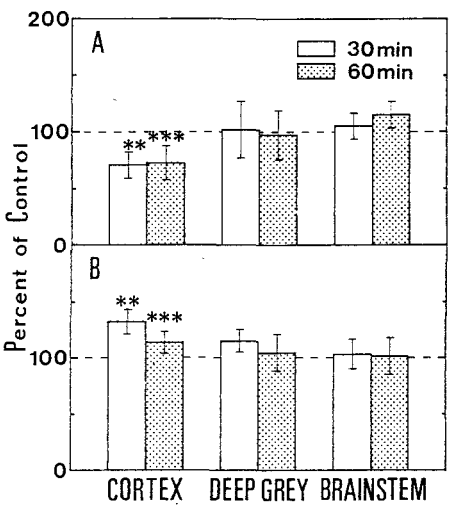


Fig. 4 The concentration of serotonin (A) and 5-HIAA (B).

48. MPTP による Parkinson 病モデルマウスにおける神経伝達物質と受容体の変化ならびに L-DOPA の効果

小川紀雄・広瀬由起子・小原節子・渡辺洋子・小野　剛
（岡山大・医・脳研）

〔要　約〕

ヒトに特発性パーキンソン病と同じ病態を生じさせる神経毒，1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine（ＭＰＴＰ）をマウスに注射して，生化学的並びに薬理学的検討を行った．ＭＰＴＰ（３０mg／kg，i.p.，１日２回，５日間）注射は線条体のdopamineを著減（－７５％）させたが，その他の脳部位では不変ないしは微減に過ぎなかった．norepinephrineも線条体で半減したが，substance Pは変化しなかった．ＭＰＴＰ処置マウスの線条体のＤ２受容体結合とmusucarinic ACh 受容体結合はそれぞれ増加および減少していたが，ＤＯＰＡ注射で回復した．これらの変化はヒトのパーキンソン病脳の変化に酷似していた．更にＭＰＴＰ処置マウスのakinesiaを検出できる方法を案出したが，ＤＯＰＡ注射により用量反応的にakinesiaは改善した．以上からＭＰＴＰ処置マウスはパーキンソニズム研究に有用な実験モデルと考えられる．

Key word：　MPTP, parkinsonism, recptor binding

はじめに

従来，ヒトの特発性パーキンソン病に相当する動物実験モデルを作成することは困難であった．　しかし，１９８３年に1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine（ＭＰＴＰ）が特発性パーキンソン病と同じ生化学的，病理組織学的，治療反応的病態をヒトに惹起することが判明し（４），サルを用いた実験的パーキンソン病の研究が始まった（１）．　当初，ＭＰＴＰは下等な動物にはパーキンソン病（パーキンソニズム）を惹起出来ないとされていたが，最近，マウスで「生化学的」パーキンソニズムがこのＭＰＴＰによって生ずることが報告された（３）．今回，私達はマウスを用いて，ＭＰＴＰ投与後のdopamine（ＤＡ），norepinephrine（ＮＥ）およびsubstance Ｐ（ＳＰ）濃度の変化を調べると共に，種々の受容体結合の変化，さらには受容体結合に及ぼすＤＯＰＡ注射の影響について検討した．加えて，ＭＰＴＰによるパーキンソニズム・モデル・マウスのakinesiaを定量出来る方法を開発したので報告する．

方法

実験動物として体重２２ｇのＣ５７ＢＬマウスを用いた．ＭＰＴＰ　３０ｍｇ／ｋｇを１日２回，５日間注射（i.p.）し，終了後１週間目，２週間目にマウスをマイクロウエーブ照射（３ＫＷ，0.2 秒）で屠殺し，脳を取り出し７部位にわけた．脳部位中のＤＡとＮＥの濃度をMaruyamaらの方法（６）で定量した．ＳＰ濃度は酸・エタノール抽出し radioimmunoassay（７）で定量した．

受容体結合の検討にはＭＰＴＰ注射終了８週間後に断頭屠殺し，７脳部位に分け粗膜分画を作成した　（７）．　ＤＯＰＡ注射（２００ｍｇ／ｋｇ，i.p.，１４日間）を７－８週目に行いその影響もみた．　ＳＰ受容体結合と muscarinic cholinergic （ｍＡＣｈ）受容体結合（ＱＮＢ結合）はすでに報告した radio-labeled receptor assay（７，８）で調べた．ＤＡ受容体結合はCreeseらの方法（２）に従って，spiperone をリガンドとして120 mM NaCl，5mM KCl，1mM $MgCl_2$，1mM $CaCl_2$ を含む50mM Tris-HCl 緩衝液中で，３７°C，２０分間incubateした．１０μM sulpiride存在下の放射活性を非特異結合として（５），いわゆるＤ２受容体結合を検出した．

マウスのakinesiaを調べるためには，ＭＰＴＰ注射２週間後に，直径８mm　長さ55cmの，表面が粗の鉄棒を垂直に立て，その上端に下向きにマウスを摑まらせ，完全に下向きになるまでの時間（T turn）と，下の床に下りるまでの時間（T LA）を測定した．さらに，ＤＯＰＡ（100-400 mg／kg，i.p.）注射後６０分に同様のテストを施行し治療効果をみた．

結果と考察

ＤＡ，ＮＥ，ＳＰ濃度の変化（図１）：ＭＰＴＰによりＤＡは線条体で著減し，その他の脳部位では微減ないしは不変であった．ＭＰＴＰの投与量を半量（１日１回，５日間）にすると，ＤＡの減少は小さかった．ＮＥの減少したのは線条体，視床／中脳，大脳皮質のみであった．ＳＰ濃度はすべての脳部位で変化しなかった．線条体でＤＡ，ＮＥが著減することはヒトのパーキンソン病脳の所見と同一であったが，ＳＰ濃度の所見は異なっていた．

受容体結合の変化（図２）：ＭＰＴＰ投与８週後では，ＳＰ受容体結合は増加傾向にあり，ＤＯＰＡ投与により再び減少した．Ｄ２受容体結合も同様で，ＭＰＴＰ

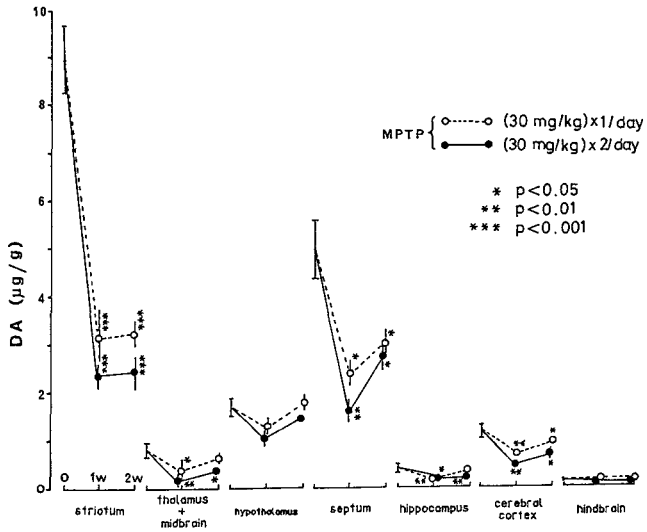


図１．　ＭＰＴＰのマウス脳内ドパミン濃度に及ぼす影響

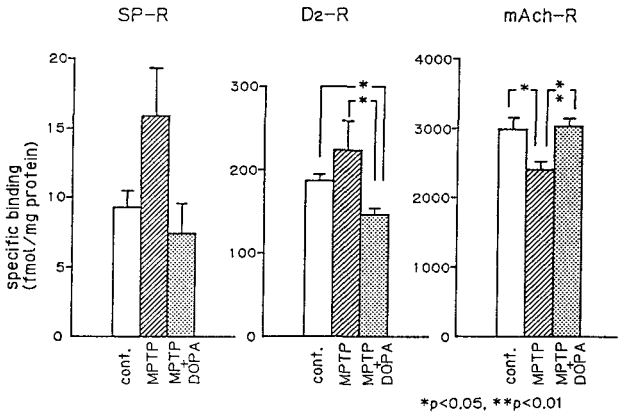


図２．　ＭＰＴＰ処置およびＭＰＴＰ処置＋ＤＯＰＡ注射の線条体の受容体結合に及ぼす影響

処置によって増加傾向にあるがＤＯＰＡ投与により有意に低下した．ｍＡＣｈ受容体結合はＭＰＴＰ群で有意に減少するが，ＤＯＰＡ投与で回復した．ヒトのパーキンソン病脳におけるＳＰ受容体の報告はまだないので，比較は困難であるが，その他の受容体結合の成績は両者で酷似している．

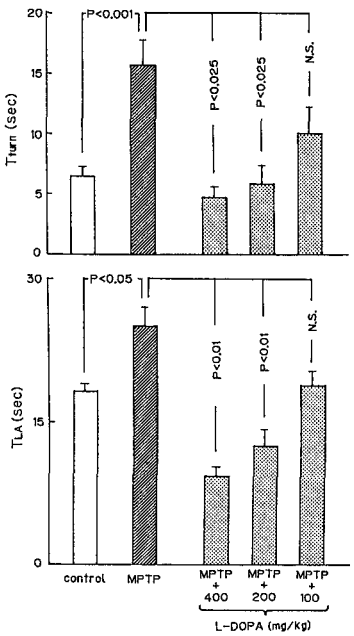


図３．　ＭＰＴＰによるakinesiaとＤＯＰＡによる改善

ａｋｉｎｅｓｉａの定量（図３）：ＭＰＴＰ処置マウスではＴturn　が２倍以上に延長し，ＴLA も有意に延長していた．これらの変化はＤＯＰＡ注射で用量反応的に改善した．従来，四つ足の動物でパーキンソニズムの症状を検出するのは困難であるとされてきたが，本法を用いれば，akinesia　を検出できるばかりでなく，薬剤の治療効果を定量することが可能である．

以上のように，ＭＰＴＰ処置マウスは，生化学的にも，ＤＯＰＡに対する反応からも，ヒトのパーキンソン病のモデルとして用いうるものと考えられる．このモデルはパーキンソン病の病態生理や病勢伸展の研究，新しい治療剤の開発，副作用を少なくする治療剤の使用方法の研究などに応用されよう．

文献

1. Burns, R. S., Chiueh, C. C., Markey, S. P., Ebert, M. H., Jacobowitz, D. M., and Kopin, I. J. (1983) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 80, 4546-4550
2. Creese, I., Schreider, R., and Snyder, S. H. (1977) Europ. J. Pharmacol. 46, 377-381
3. Heikkila, R. E., Hess,A., and Duvoisin, R. C. (1984) Science 224, 1451-1453
4. Langston, J. W., Ballard, P., Tetrud, J.W., and Irwin, I. (1983) Science 219, 979-980
5. List, S. J., and Seeman, P. (1981) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 78, 2620-2624
6. Maruyama, Y., Iida, N., Kusaka, M., Horikawa, A., Mori, J., and Munekiyo, K. (1978) Proc. Neuro-Psychopharmacol. 2, 73-78
7. Ogawa, N., Hirose, Y., and Nomura, M. (1985) in Neurotransmitters in Disease (Yoshida, H. ed) in press, Excepta Medica, Amsterdam
8. Ogawa, N., Mizuno, S., Nukina, I., Tsukamoto, S., and Mori, A. (1983) Brain Res. 263, 348-350

49. パーキンソン病惹起物質 MPTP の類似化合物と脳内 MAO との相互作用

荒井裕一朗・杵鞭宏育　　(昭和大・医・第二薬理)

〔要　約〕

MPTPのDAニューロンに対するneurotoxicityの作用機序を解明する一手段としてMPTP、MPP+の化学構造類似物質とラット脳内MAOとの相互作用を検討した。実験に使用した化合物のうち、4 - phenyl - 1, 2, 3, 6 - tetrahydropyridine (Ⅲ)、4 - phenylpiperidine (Ⅳ)、4 - phenylpyridine (Ⅴ)はMPTP、MPP+と同様に脳内MAO活性を濃度依存的に阻害した。前二化合物によるMAO阻害作用はいずれもMAO - Bに比しMAO - Aに対して高い選択性を示したが、化合物Ⅴは反対にMAO - Bに高い選択性が認められた。化合物ⅢのMAO - B阻害作用はMPTPと同様にpreincubation timeに依存してより増加し、阻害様式もcompetitiveからnon - competitive typeの阻害作用へと変化した。しかし、他の二化合物による両タイプMAOの阻害作用はpreincubationの有無にかかわらず、いずれもcompetitiveで阻害様式の変化は認められなかった。これら三化合物がMAOの基質となるか否かを検討した結果、化合物Ⅲのみがこれにより酸化され、その割合はMAO - Bの特異的基質benzylamineの約40%の活性を示した。これらの結果は化合物ⅢがMPTPと同様に最初MAOの基質として作用し、続いて阻害剤へと変化する“suicide inhibitor”である可能性を示唆している。

Key word : MPTP and MAO, neurotoxicity, 4 - phenyl - 1, 2, 3, 6 - tetrahydropyridine.

MPTP (1 - methyl - 4 - phenyl - 1, 2, 3, 6, - tetrahydropyridine, Fig. 1, Ⅰ)はヒトを含む各種動物の黒質 - 線状体 DA ニューロンを破壊しヒトでのパーキンソン病ときわめて類似した症状を惹起する物質として注目されている(1)。MPTPによる“parkinsonian animal model”はヒトでのパーキンソン病の発病究明や、抗パーキンソン薬のスクリーニング、また治療薬の副作用などの研究の恰好なモデルとしての有用性が指摘されている(1)。この“neurotoxicity”はMPTP自身によるのではなくこの物質の脳内MAO - Bによる酸化物(“代謝活性物質”)のMPP+ (1 - methyl - 4 - phenylpyridinium ion, Fig. 1, Ⅱ)によることが報告されている(1)。しかし、MPTPは脳内両タイプMAOの基質となると同時に両タイプMAOを阻害することが明らかになり(2－5)、また代謝活性物質のMPP+にもMAO阻害作用が認められ(5)、neurotoxicityとMAO阻害作用との関連性も論議されている。すでにわれわれもMPTP、MPP+によるラット脳内両タイプMAOの阻害作用を報告し、特にMPTPはMAO - Bの“suicide inhibitor”となること、またMPP+はextraneuronで生成されintraneuronに取り込まれる可能性を指摘した(6)。今回、われわれはMPTPのDA neuronへのneurotoxicityを解明する一手段としてMPTP、MPP+の化学構造類似物質を用いMPTPのどの構造が脳内MAOとの相互作用に重要か検討した。

実　験　方　法

酵素標品の作成　実験には体重約250gの雄性Sprague - Dawleyラットを使用した。酵素標品はラットを断頭後forebrainを素早く摘出し、0.32M sucrose - 0.1M phosphate buffer (pH 7.4)で10%ホモジネートを作成した。

MAO活性の測定　MAO - A活性の測定には最終濃度100 μM [^{14}C] 5 - HT、MAO - Bでは100 μM

[^{14}C] benzylamine (Bz) を基質として使用し、37℃、5分間のincubationで生成されるproductを抽出、測定するradiometric assay法にて行った(7)。 また、本実験に用いた化合物がMAOの基質となるか否かを検討した際には酵素反応で生成するH_2O_2をperoxidaseとHVAでcouplingさせfluorometricに測定するcoupling assay法(8)にて行った。

実 験 成 績

Fig. 1には本実験に使用した各化合物の化学構造式を示した。 そのうちMPTP、MPP+を含め化合物Ⅰ－Ⅴはいずれも濃度依存的にラットforebrain MAO-AとMAO-Bを阻害した。 しかし、Ⅵ－Ⅺの化合物では10^{-3}Mの高濃度にもかかわらずわずかにMAO活性を阻害するか、または全く阻害作用を示さなかった。 この傾向はⅥ－Ⅺと酵素標品を37℃、60分間pre-incubationを行ってもほぼ同様であった。 Table 1にはMPTP、 MPP+も含め著明なMAO阻害作用の認められた化合物(Ⅰ－Ⅴ)のIC_{50}値、Ki値を示した。 著明なMAO阻害作用を示した化合物MPTP(Ⅰ)、MPP+(Ⅱ)および化合物Ⅲ－ⅤはIC$_{50}$値より明らかなごとくⅤを除きいずれも両タイプMAOのうちMAO-Aに高い選択的阻害作用を示した。 これら化合物によるMAO阻害作用の様式をLineweaver-Burk plot法より検討した結果、preincubationを行なわ

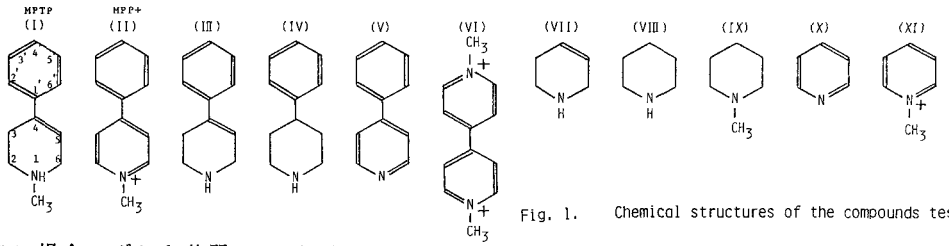


Fig. 1. Chemical structures of the compounds tested

ない場合いずれも基質5-HT(MAO-A)、Bz(MAO-B)に対してcompetitiveな阻害作用を示した。 しかし、MPTPと化合物Ⅲ(4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine)によるMAO-B阻害作用はpreincubationによりmixed type (MPTP) またはnon-competitive type(化合物Ⅲ)へと変化した。 しかし、他の化合物ではこの様な阻害様式の変化は認められなかった。

Table 1 IC_{50} and K_i values for inhibition of rat forebrain MAO-A and MAO-B

		IC_{50} value(μM)		K_i value(μM)		*IC_{50} value(μM)	
		MAO-A	MAO-B	MAO-A	MAO-B	MAO-A	MAO-B
I	1-Methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP)	8.6	260	4.5	110	3.5	2
II	1-Methyl-4-phenylpyridinium ion (MPP+)	4.3	400	2	180	4.3	400
III	4-Phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine	30	200	9	100	30	30
IV	4-Phenylpiperidine	80	300	45	560	80	300
V	4-Phenylpyridine	100	10	38	4.5	100	10
VI	1,1'-Dimethyl-4,4'-bipyridinium (Paraquat)	n.i.	n.i.	—	—	—	—
VII	1,2,3,6-Tetrahydropyridine	n.s.	n.s.	—	—	—	—
VIII	Piperidine	n.s.	n.s.	—	—	—	—
IX	1-Methylpiperidine	n.s.	n.s.	—	—	—	—
X	Pyridine	n.s.	n.s.	—	—	—	—
XI	1-Methylpyridine	n.s.	n.s.	—	—	—	—

*IC_{50} values determined after preincubation at 37°C for 60 min. n.i. and n.s.: not inhibitory and not significantly inhibitory at 10^{-3}M.

阻害様式の変化を示したMPTPと化合物 IIIによるMAO－B阻害作用は37℃、60分間のpre－incubationにより阻害曲線は約10倍低濃度側に移動した。 しかし、MAO－Aに対する阻害ではこの様な移動は全く認められなかった。 Coupling assay法によりMAO活性を求めた結果化合物Ⅰ－ⅤのうちMPTP(Ⅰ)とIIIのみがMAOの基質となり酸化され、この際の活性(基質濃度1mM) はそれぞれ基質tyramineの場合の約20%と17%でこの値は基質benzylamineの約 50%と40%に相当した。

考　察

すでに前報(5.6)でわれわれは 1) MPTPはラット脳内ニューロン外に主として存在するMAO－Bの基質として酸化されるが、 2) 酸化と共にMAO－Bをpreincubationに依存してirreversibleに阻害すること。 3) この2つの作用はラットstriatumを用いてもforebrainでもほぼ同様の結果であり、 4) neurotoxicityの原因物質MPP+はMAO－Bによる酸化で生じ、DA－uptake機構でニューロン内にuptakeされ、そこのMAO－Aを選択的に阻害することを報告した。 これらの成績からこのニューロン内MAO－Aの阻害がMPTPのneurotoxicityと何らかの関連性を持つ事を推測した。 また、これらの成績はMPTPに高い感受性を示すヒト、サルと感受性の低いマウス、ラットではニューロン外のMAO－A／MAO－B活性比の相違が主な原因である事を示唆している。

今回、われわれはMPTPでみられた“MAOによる酸化”と“MAO阻害作用”を指標にMPTPとMPP+の化学構造類似物質とラット脳内MAOの相互作用を検討しMPTPによるneurotoxicity発現機序の解明を試みた。 Langstonら(9)はMPTPのN－含有ringの4－5位に二重結合のない物質1－methyl－4－phenylpiperidineではneurotoxicityは全く認められないと報告している。 これは恐らく二重結合の欠除によりこの物質はMAOにより酸化されず、従ってMPP+へと変化しないのが原因と考えられる。 本実験ではこの二重結合の有無にかかわらず化合物III－ⅤにMPTPと同様のMAO阻害作用が認められた(Fig.1)。 しかし、このうちMAOの基質となるのは4－5位にのみ二重結合を持つIIIのみで、この化合物はさらにMPTPと同様にpre－incubationによりMAOの“基質”から“阻害剤”へと変化した。 また、この二重結合が存在してもphenyl ringのない化合物VIIではMAOとの相互作用は全く認められなかった。 これらの成績からMPTP類似化合物のうちN－含有ringの4－5位のみの二重結合とphenyl ringの存在がMAOによる酸化とirreversibleなMAO阻害作用に必須と思われる。 もし、MPTPのneurotoxicityの発現にMAOによる酸化(MPP+への変化)とこれに続くirreversibleなMAO－Bの阻害が不可欠であるとすれば、これら類似化合物がneurotoxinであるためにはまずMAOの基質となる必要がある。 従って本実験に用いた化合物のうち、化合物IIIにのみ認められた“MAOによる酸化”と“time－dependentなMAO活性の阻害”作用はこの物質がMPTPと類似した機序でDAニューロンを破壊しneurotoxicityを示す可能性を示唆している。 目下、われわれはこの物質の投与によるneurotoxicity発現の有無を検討中である。

References: 1) Langston, J.W. (1985) Trends in NeuroSci. 8, 79-83 2) Salach J.I. et al (1984) Biochem. Biophys. Res. Commun. 125, 831-835 3) Fuller, R.W. and Steranka, L.R. (1985) Life Sci. 36, 243-247 4) Fuller, R.W. and Hemrick-Luecke, S.K. (1985) J. Pharmacol. Exp. Ther. 232, 696-701 5) Kinemuchi, H. et al. (1985) Neurosci. Lett. in press 6) Kinemuchi, H. et al. (1985) Drugs and Trace Amines, in press 7) Fowler, C.J. et al. (1979) Biochem. Pharmacol. 28, 3063-3068 8) Tipton, K.F. (1969) Anal. Biochem. 28, 318-325 9) Langston, J.W. et al. (1984) Neurosci. Lett. 50, 289-294

50. MPP^+ 及び MPTP の誘導体によるラット線条体スライス チロシン水酸化酵素系の阻害

平田洋子・永津俊治　　(名古屋大・医・第一生化)

〔要　約〕

1-Methyl-4-phenylpyridinium ion の誘導体及びそれらの還元体を合成し、ラット線条体スライスチロシン水酸化酵素系に対する影響を調べた。チロシン水酸化酵素活性は、線条体スライスを NSD-1055(芳香族 L-アミノ酸脱炭酸酵素阻害剤)を含む Krebs-Ringer液中で反応後、生成した DOPA を定量することによって測定した。　4位のフェニル基は MPP^+ の DOPA 生成阻害作用に重要であった。しかしその位置は4位である必要はなく、またフェニル基の p 位をメチル基やメトキシ基で修飾したピリジニウムイオンも阻害作用を示した。N-メチルイソキノリニウムイオンも線条体チロシン水酸化酵素系を阻害した。しかし、これらの還元体の阻害作用は非常に弱く、MPTP の場合とは異なっていた。マウスに 1,2,3,4-tetrahydroisoquinoline を慢性投与した結果、線条体のチロシン水酸化酵素活性及び 3,4-ジヒドロキシフェニル酢酸含量が減少した。以上の結果より種々のピリジニウムイオンが、ラット線条体スライスチロシン水酸化酵素系においてチロシンから DOPA の生成を阻害することが明らかとなった。また、イソキノリン骨格を有する化合物が、外因性あるいは内因性にパーキンソン病を起こす物質の候補の1つであると推定された。

Key word :　tyrosine hydroxylation, pyridinium ions, MPTP

1-Methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP) はヒトやサルの黒質線条体系ドーパミン神経を変性させ、ドーパミン含量を減少させて、パーキンソン病様の症状を起こすことが知られている (1,2,3)。我々は、ラット脳線条体スライスチロシン水酸化酵素系 (4) において MPTP が選択的にチロシンから DOPA の生成を阻害することを見出し、さらに MPTP のモノアミン酸化酵素による代謝物 (図 1) 1-メチル-4-フェニルピリジニウムイオン (MPP^+) が実際の阻害物質であることを報告した (5,6)。今回種々の MPTP 及び MPP^+ の誘導体(図 2)を合成し、ラット脳線条体スライスチロシン水酸化酵素系に対する影響を検討した。さらに、これらの誘導体の中で自然界に広く分布しているイソキノリンの誘導体をマウスに慢性投与し、MPTP の効果と比べた。

〈実験材料及び方法〉

ラット線条体切片の作製：Wistar 雄性ラット(200-300 g)を断頭後、ただちに線条体を McIlwain tissue chopper にて厚さ約 0.2 mm のスライスを作製した。

スライス中のチロシン水酸化酵素活性の測定：線条体スライスを NSD-1055 (脱炭酸酵素阻害剤)を含む Krebs-Riger 液中で薬物とともに 1 時間 incubation した後、超音波破砕によりホモジナイズし、除たんぱく後、内在性チロシンから生成した DOPA を HPLC (Yanaco L-2000)-ECD (Yanaco VMD-501) により測定した。

慢性実験：C57BL/6N 雄性マウス (20-25 g)に MPTP(30 mg/kg) あるいは 1,2,3,4-tetrahydroisoquinoline (60 mg/kg) を 8 日間皮下投与した。最終投与の 4 日後に線条体を、取りだし 0.32 M sucrose 中でホモジナイズし、チロシン水酸化酵素活性、ドーパミン (DA) 含量及び 3,4-ジヒドロキシフェニル酢酸 (DOPAC) 含量を Nagatsu らの方法 (7) により測定した。

〈結果〉

MPP^+の4位のフェニル基を水素(A)、メチル基(B)、あるいはメトキシカルボニル基(C)で置換したピリジニウムイオンは10^{-5}Mで阻害活性を示さなかった。またMPP^+と構造の非常によく似ているパラコート(D)も10^{-7}M~10^{-3}Mで全くDOPA生成を阻害しなかった。MPP^+の1位のメチル基をエチル基(E)で置換した場合はMPP^+と同程度の阻害作用をもち、プロピル基(F)またはイソプロピル基(G)で置換した場合

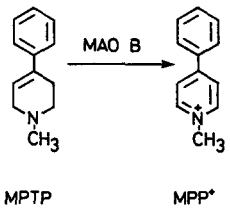


図 1

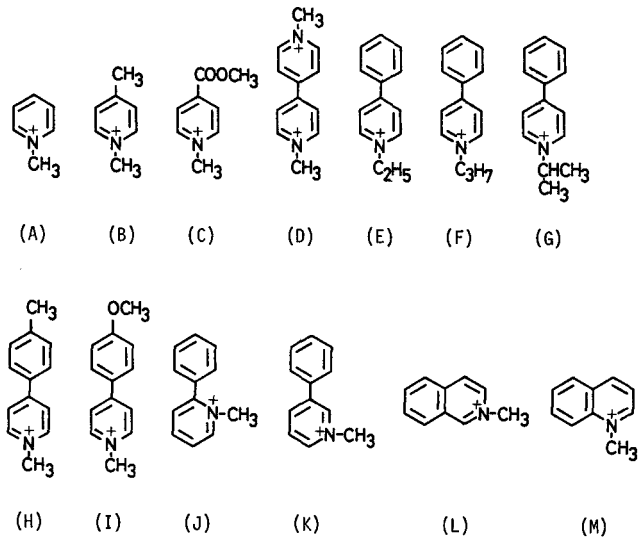


図 2

はMPP+に比べて阻害作用は弱くなった(図3)。しかしこれらの還元体である1-エチル-4-フェニル-1、2、3、6-テトラヒドロピリジンおよび1-プロピル-4-フェニル-1、2、3、6-テトラヒドロピリジンは10^{-3}Mでも有意な阻害を示さなかった。MPP+のフェニル基のp位にメチル基(H)やメトキシ基(I)を導入した場合もMPP+と同程度の阻害作用を示した。4位のフェニル基を2位(J)あるいは3位(K)に動かした場合でもMPP+よりは弱いがDOPA生成を濃度依存性に阻害した。しかしこれらの還元体ではDOPA生成の阻害活性は著しく弱かった。N-メチルイソキノリニウムイオン(L)は10^{-5}M~10^{-3}MでDOPA生成を濃度依存性に阻害したが、N-メチル-キノリニウムイオン(M)は10^{-5}Mで有意な阻害作用をもたなかった。

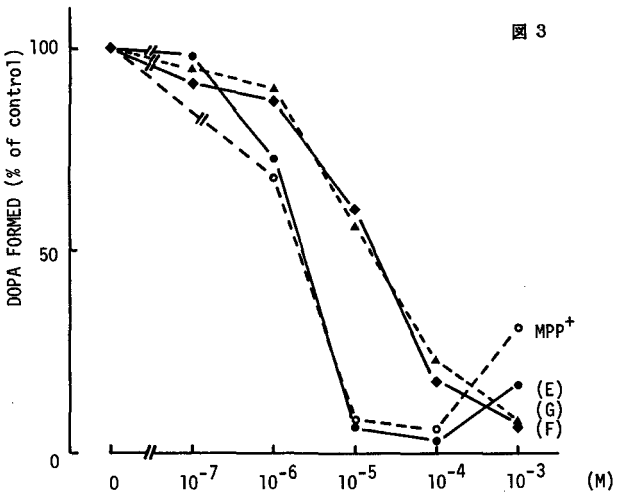


図 3

以上の結果より種々のピリジニウムイオンがDOPA生成を阻害することが明らかとなった。これらの中でN-メチルイソキノリニウムイオンに注目し、1,2,3,4-tetrahydroisoquinolineをマウスに連続投与し、神経毒性の有無を検討した。1,2,3,4-tetrahydroisoquinoline

慢性投与により線条体のTH活性とDOPAC含量が対照に比べて有意に減少した(図4)。今回の投与スケジュールではDA含量の低下は認められなかった。

〈考察〉

化合物(A),(B),(C)が阻害活性を示さなかったことから4位のフェニル基はDOPA生成の阻害作用に重要であると考えられる。(E),(F),(G)のように1位のメチル基は炭素鎖を長くすることによって阻害作用は弱くなる傾向を示した。また化合物(J),(K)も阻害作用を示すことからフェニル基の位置は4位である必要はないと考えられる。しかし(E),(F),(J)及び(K)の還元体はDOPA生成の阻害作用が著しく弱くいずれも1 mM程度で阻害作用を示した。この結果はこれらの還元体がMAOの基質になりにくいためと考えられる。 HeikkilaらはMPP+及びMPTPがマウス線条体シナプトゾームへの[^{3}H]DAの取り込みを阻害し、化合物(E)及び(F)もMPTPと同程度の取り込み阻害を示すことを報告している(8)。またMPP+はドーパミンの取り込み機構によってドーパミン神経に選択的に取り込まれ蓄積することが報告されている(9、10)。従って今回阻害活性を示した種々のピリジニウムイオンも同様の機構でドーパミン神経に取り込まれる可能性が推定される。また1,2,3,4-tetrahydroisoquinolineの慢性投与により線条体のTH活性及びDOPAC含量が低下したことは、イソキノリン骨格をもつ化合物が生体内に蓄積し外因性にパーキンソン病を起こす可能性を示している。またイソキノリンがDOPAから生合成されることは、イソキノリンの類似物質が内因性にドーパミン神経内に生成される可能性もあり興味深い。

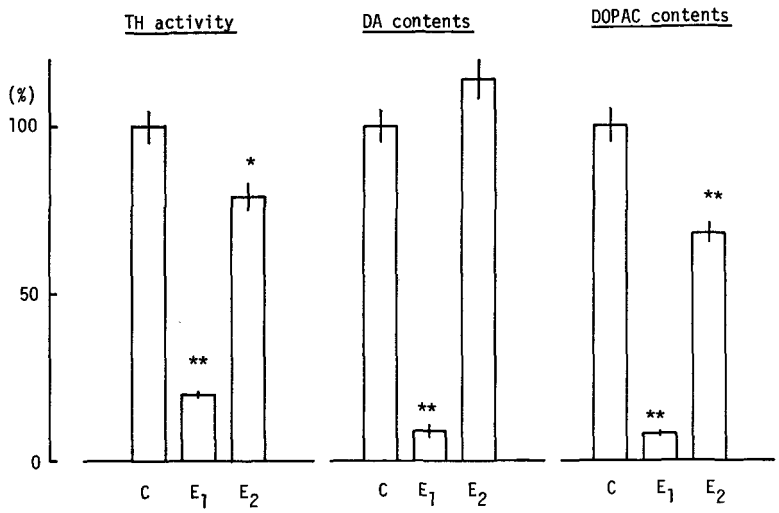


図 4

C : saline
E_1: MPTP (30 mg/kg, 8 days, s.c.)
E_2: 1,2,3,4-tetrahydroisoquinoline (60 mg/kg, 8 days, s.c.)

〈謝辞〉

本研究は東京工業大学大学院総合理工学研究科 武井 尚博士、杉村秀幸博士との協同研究であり、MPP+誘導体を合成していただいたことを感謝します。

〈文献〉

1) Langston, J. W. et al.; Science 219, 979-980 (1983).
2) Burns, R. S. et al.; Proc. Natl. Acad. Sci. USA 80, 4546-4550 (1983).
3) Langston, J. W. et al.; Brain Res. 292 390-394 (1984).
4) Hirata, Y. et al.; J. Neurochem. 40, 1585-1589 (1983).
5) Hirata, Y. and Nagatsu, T. ; Brain Res. 337 193-196 (1985).
6) Hirata, Y. and Nagatsu, T. ; Neurosci. Lett. (in press).
7) Nagatsu, T. et al.; J. Chromatogr. 163, 247-252 (1979).
8) Heikkila, R. E. et al.; J. Neurochem. 44 310-313 (1985).
9) Javitch, J. A. et al.; Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82 2173-2177 (1985).
10) Chiba, K. et al.; Biochem. Biophys. Res. Commun. 128 1228-1232 (1985).

51. アニオンチャンネル依存性 Ca 刺激性グルタミン酸受容体について

米田幸雄・荻田喜代一・中牟田弘道・小井田雅夫

（摂南大・薬・薬理）

〔要　約〕

ラット脳シナプス膜標品への ^{3}H－グルタミン酸結合に対するＣａイオンの作用について検討した。

塩化カルシウム（０.１－５ｍＭ）は３０℃反応条件下では著明に結合を増強したが、２℃では結合に対して著しい影響を及ぼさなかった。一方、酢酸カルシウムは反応温度にかかわらず結合に著変を与えなかったが、Ｃｌイオンの存在下では３０℃においてのみ有意な結合増強作用を発揮した。このＣａイオンによる結合増強は、アニオン輸送阻害薬のＤＩＤＳやエタクリン酸およびアニオンチャンネル拮抗薬のピクロトキシニンにより消失した。グルタミン酸受容体の各サブタイプのアゴニストのうち、キスカル酸がＣｌ依存性結合およびＣａ刺激性結合をともに強く阻害した。さらに、コンピューターによる Scatchard 解析では、両イオンはいずれも結合部位の数を増加させる作用を持つことが判明した。また、Ｎ－ethylmaleimide 処理に対してＣａ依存性結合は感受性が高いことが見出された。

以上の結果より、Ｃａイオンはアニオンチャンネルを介してグルタミン酸受容体に作用する可能性が高いことが示唆される。

Key word：

Anion channel, Ca ion, Quisqualic acid

種々の神経組織におけるシナプス伝達に、Ｃａイオンが重要な役割を演じていることは周知の事実であるが、それらはもっぱら情報伝達物質の放出等の前シナプス部に関する事象が殆んどである。一方、哺乳動物中枢神経系の興奮性情報伝達物質と考えられているＬ－グルタミン酸（ＧＬＵ）により、後シナプス部のＮａイオンおよびＣａイオンの膜透過性亢進が招来され、これがＧＬＵのシナプス後電位発生のイオン的背景をなすことが近年明らかにされている（２）。さらに、シナプス膜への ^{3}Ｈ－ＧＬＵ結合がＣａイオンにより著明に増強されることが発見（１）されて以来、後シナプス部、特にシナプス受容体に対するＣａイオンの作用が注目されているのが現状である。したがって本研究では、^{3}Ｈ－ＧＬＵをリガンドとするレセプターアッセイにより、Ｃａイオンの効果を再検討するとともにその作用発現機序について検索を進めた。＜実験方法＞シナプス膜の調製法およびレセプターアッセイは前報（４）の通り行った。N-ethylmaleimide（ＮＥＭ）および p-chloromercuribenzoic acid（ＰＣＭＢ）による前処理は、各濃度の薬物とシナプス膜懸濁液を３０℃で３０分間反応させて行った。反応は５０，

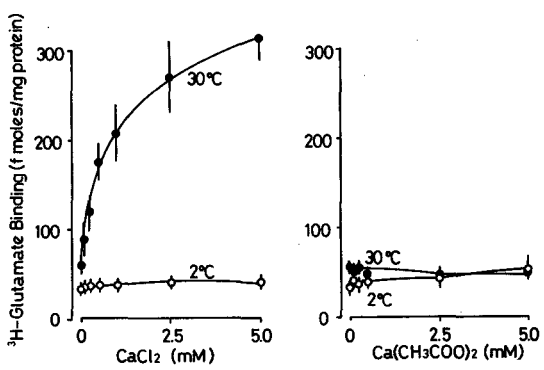


Fig.1. Effect of calcium ion on ^{3}H-glutamate binding.

０００×ｇで３０分間遠心分離して停止し、さらに再度洗浄操作を行った。得られた沈査は５０ｍＭトリス酢酸緩衝液（ｐＨ７．４）に懸濁して実験に供した。フィルター上の放射活性は５mlのトリトン・トルエンシンチレーター（Triton X-100; 1l,0.6% Omnifluor in toluene; 2l, H_2O; 120ml）を用いて測定した。＜実験結果＞塩化カルシウムの添加（０．１－５ｍＭ）は、反応温度３０℃条件下では濃度依存的に^{3}Ｈ－ＧＬＵ結合を増強したが、２℃では塩化カルシウムを添加しても結合に著変は見出せなかった。一方、酢酸カルシウムはいずれの反応温度においても結合に影響を与えなかった（Fig. 1）。２℃条件下ではＣｌイオンの存在下においても酢酸カルシウムは結合増強作用を発揮しなかった。３０℃条件下ではＣｌイオンの添加により結合は著明に増強されたが、酢酸カルシウムはこのＣｌ依存性結合をさらに増強させることが判明した（Fig. 2）。この時反応液中に、アニオン輸送阻害薬のＤＩＤＳを添加すると、Ｃｌ依存性結合ばかりでなくＣａ刺激性の結合も濃度依存的に抑制されることが認められた（Fig. 3）。同様の結果がアニオンチャンネル拮抗薬のピクロトキシニンやアニオン輸送阻害薬エタクリン酸の添加の場合にも観察された。ＧＬＵ受容体については少くとも三種類のサブタイプ、すなわちキスカル酸（ＱＡ）型、Ｎ－メチル－Ｄ－アスパラギン酸（ＮＭＤＡ）型、およびカイニン酸（ＫＡ）型の存在が報告（３）されているので、前述のＣｌ依存性結合およびＣｌ依存性Ｃａ刺激性結合がいずれのサブタイプに分類されるかを追究するために、これら三種のアゴニストの作用を検討したところ、両結合ともにＱＡに対して極めて感受性が高いことが見出された（Fig. 4）。これに対して、ＮＭＤＡおよびＫＡは^{3}Ｈ－ＧＬＵ結合に対して著明な変化を与えなかった。コンピューターを用いてこのＣｌイオンおよびＣａイオンの作用を Scatchard 解析したところ、両イオンともに結合部位のＧＬＵに対する親和力（Ｋｄ）には影響せずにその数（Ｂmax）の増加を誘発することが明らかとなった(Table1)。次に、シナプス膜をＮＥＭまたはＰＣＭＢで前処理したのちに各^{3}Ｈ－ＧＬＵ結合を測定すると、ＮＥＭ処理によりＣａ刺激性結合が完全に消失することが見られた。一方、ＰＣＭＢ処理では基礎結合に比べて、Ｃｌ依存性結合およびＣａ刺激性結合がより強く阻害

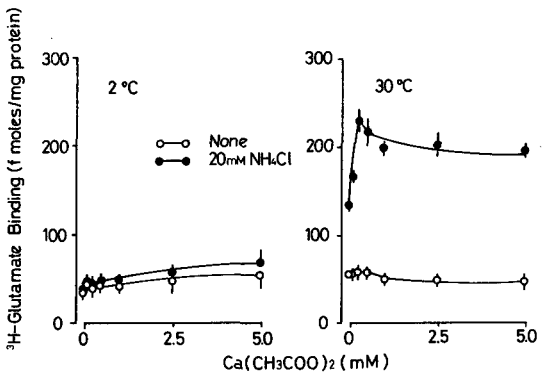


Fig.2. Effect of ammonium chloride and calcium acetate on ^{3}H-glutamate binding.

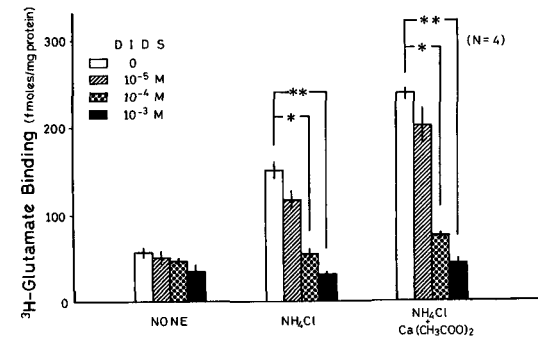


Fig.3. Effect of 4,4'-diisothiocyanatostilbene-2,2'-disulfonic acid (DIDS) on ^{3}H-glutamate binding.

されることが認められた（Fig. 5）。

<考察>Clイオンがアニオンチャンネルを介して ^{3}H－GLU結合を著明に増強することは既に報告したが（3）、このアニオンチャンネル依存性結合がCaイオンによってさらに増強されることが明らかとなった。Caイオンの増強作用はClイオン存在下においてのみ出現すること、およびCl依存性結合と同様にCaイオンの増強作用は温度依存性であること（Figs. 1, 2）、さらにはアニオンチャンネル拮抗薬やアニオン輸送阻害薬がCl依存性結合ばかりでなくCa刺激性結合も抑制すること（Fig. 3）などを考慮すると、Caイオンは直接GLU受容体に対して作用するよりはむしろ、アニオンチャンネルを介してGLU受容体に作用すると考えた方が妥当な様に思われる。Cl依存性結合およびCa刺激性結合がともに、三種類のアゴニストのうちQAによってのみ阻害されることもこの仮説を裏付ける一つの傍証と言えよう。

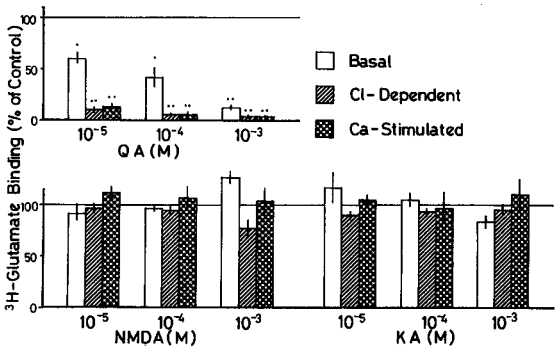


Fig.4. Effect of quisqualic acid (QA), N-methyl-D-aspartic acid (NMDA) and kainic acid (KA) on ^{3}H-glutamate binding.

Tablel. Scatchard analysis of ^{3}H-glutamate binding.

	Kd (μM)	Bmax (pmoles/mg protein)
None	1.11±0.28	8.79±0.87
20mMNH$_4$Cl	1.07±0.12	17.7 ±1.53**
20mMNH$_4$Cl+ 2.5mMCa(CH$_3$COO)$_2$	1.41±0.12	31.8 ±2.53**

Scatchard 解析では両イオンはいずれも結合部位の数を増加させることが判明したが、これらのイオンの添加によって受容体蛋白質が新しく生合成されることは考え難く、当然両イオンにより結合部位が新しく露出されると考えた方が妥当であろう。NEMとPCMBの作用の相違の詳細な機序については現時点では明らかでないが、両薬物の親水性を考え合わせると、親水的環境に存在するSH基がCa刺激性結合の発現により重要な役割を演じている可能性が示唆される。GLU受容体蛋白質の生化学的諸性質を追究するうえにおいて、本研究結果は極めて興味深いと言えよう。

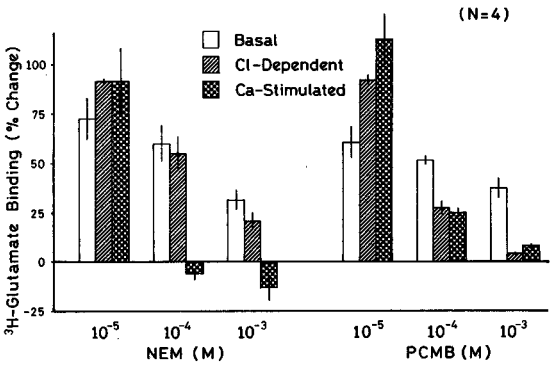


Fig.5. Effect of N-ethylmaleimide (NEM) and p-chloromercuribenzoic acid (PCMB) on ^{3}H-glutamate binding.

〔謝辞〕本研究の一部は薬学研究奨励財団昭和59年度研究助成金の援助のもとに行った。

〔文献〕1. Fagg, G.E., Foster, A.C., Mena, E.E., and Cotman, C. W. (1982) J. Neurosci. 2, 958-965 2. Takeuchi, A., and Onodera, K. (1973) Nature New Biol. 242, 124-126 3. Watkins, J.C., and Evans, R.H. (1981) Annu. Rev. Pharmacol. 21, 165-204 4. 米田幸雄・荻田喜代一・中牟田弘道・福田美衛・小井田雅夫（1985）神経化学 24, 印刷中

52. Na 依存性および非依存性 ^{3}H－グルタミン酸結合に対するグルタチオンの作用について

荻田喜代一・中牟田弘道・小井田雅夫・米田幸雄
（摂南大・薬・薬理）

〔要　約〕

ラット脳シナプス膜標品へのNa依存性および非依存性^{3}H-グルタミン酸(GLU)結合の意義を解析するとともに、両結合におけるSH基の役割について検討した。

酢酸ナトリウム(1-100mM)は濃度依存的に本結合を増強したが、このNa依存性結合はGLU取り込み部位に親和性を持つD-アスパラギン酸(10^{-7}-10^{-3}M)により著明に抑制された。しかしながら、Na非依存性結合はD-アスパラギン酸によっては阻害されず、GLU受容体のアゴニストの1つであるキスカル酸(10^{-5}-10^{-3}M)により有意に抑制された。Na非依存性結合は、各種のSH修飾剤(PCMB,NEM,DTNB)の前処理により有意に阻害されたが、Na依存性結合はPCMBによってのみ抑制された。種々のSH化合物の中で還元型グルタチオン(10^{-6}-10^{-3}M)は、Na依存性および非依存性結合をともに強く阻害した。このGSHの阻害作用は反応温度に関係なく認められ、また同様の抑制作用が酸化型グルタチオンの場合にも観察された。

以上の結果より、Na依存性結合が取り込み部位への^{3}H-GLU結合を反映すること、およびグルタチオンが脳内GLUニューロンにおけるシナプス伝達に何らかの役割を演じている可能性があることが示唆される。

Key word：
Glutamate receptor, D-Aspartate, Glutathione

哺乳動物中枢神経系の興奮性神経情報伝達物質としての機能を示唆されているL-グルタミン酸(GLU)は、シナプス後膜上の受容体と結合したのちNaイオンの膜透過性亢進を招来して、興奮性シナプス後電位を発生させると考えられている(6)。また、そのシナプス伝達後の不活性化機構としては、Na依存性の高親和性取り込み機構の存在が知られている(1)。一方、このGLU親和性部位の生化学的指標である^{3}H-GLU結合は、^{3}H-GABA結合の場合(2)とは異なり、Naイオンにより阻害される(3)と考えられていたが、近年このNaイオンによる阻害作用はClイオン存在下においてのみ出現し、Clイオン非存在下ではNaイオンは逆に著明な結合増強作用を発揮することが明らかにされている(5)。したがって本研究では、このNa依存性結合の機能的意義の追究とともに、その結合におけるSH基の役割についてNa非依存性結合の場合と比較検討した。＜実験方法＞シナプス膜の調製および^{3}H-GLUをリガンドとするレセプターアッセイは前報(7)に準じて行った。シナプス膜標品とp-chloromercuribenzoic acid(PCMB), N-ethylmaleimide(NEM)あるいは5,5'-dithiobis-(2-nitrobenzoic acid)(DTNB)との前処理は前報(8)の如く行った。また、還

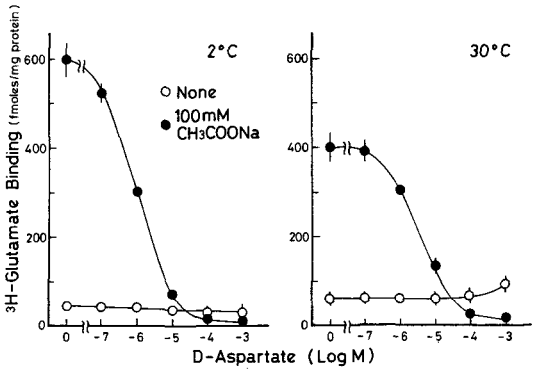


Fig.1. Effect of D-aspartate on Na-independent and -dependent binding of ^{3}H-glutamate.

元型グルタチオン(GSH)、酸化型グルタチオン(GSSG)およびGLUは、セルロースプレート(20×20cm)を用いた薄層クロマトグラフィー法により分離・同定した。プレートは75%フェノールで展開(9)後、ニンヒドリン発色により各スポットを検出した。<実験結果>酢酸ナトリウムは濃度依存的(1-100mM)に^{3}H-GLU結合を増強したが、このNa依存性結合はGLU取り込み部位に作用することが知られている(4)D-アスパラギン酸(D-ASP;10^{-7}-10^{-3}M)の添加により反応温度にかかわりなく著明に抑制された(Fig.1)。一方、Na非依存性結合に対してD-ASPは著しい阻害作用を発揮しなかった。次いで、GLU受容体の各サブタイプのアゴニストであるキスカル酸(QA)、N-メチル-D-アスパラギン酸(NMDA)およびカイニン酸(KA)の作用について検討したところ、Na依存性結合はNa非依存性結合に比べてQAの阻害作用に対する感受性が低いことが判明した(Fig.2)。また、NMDAおよびKAはいずれの結合に対しても有意な影響を与えなかった。シナプス膜標品をPCMB、NEMあるいはDTNBと前処理したのち^{3}H-GLU結合を測定すると、Na非依存性結合はいずれの前処理によっても有意に抑制されたのに対して、Na依存性結合はPCMB前処理によってのみ阻害された(Fig.3)。さらに、各種のSH化合物の作用について検索を進めたところ、GSHがNa依存性および非依存性結合をともに強く阻害することが見出された(Fig.4)。反応温度2℃条件下では、GSHはNa依存性結合よりもNa非依存性結合をより強く阻害したが、30℃条件下では両者に対する阻害作用に有意な変化は認められなかった(Fig.5)。同様に、GSSGはNa依存性および非依存性結合を強く抑制したが、その抑制作用はGSHに比べると弱いことが明らかとなった(Fig.6)。これらの反応液を2℃あるいは30℃の反応前後に薄層クロマトグラフィーで分析したが、いずれの反応液中においてもGLUのスポットは検出されなかった。<考察>GLU取り込み部位に作用することが知られているD-ASPがNa依存性結合を選択的に阻害するのに対して、GLU受容体アゴニストの1つであるQAのNa依存性結合に対する抑制作用が比較的弱いことから考えて、Na依存性結合はGLU取り込み部位への^{3}H-GLU結合を反映する可能性が高いものと思われる。一方、三種類のSH修飾剤の中でPCMBのみがNa依存性結合を有意に抑制したことは、Na依存性結合には疎水的環境に存在するSH基が重要な役割を演じている可能性を示唆するものかもしれない。本研究結

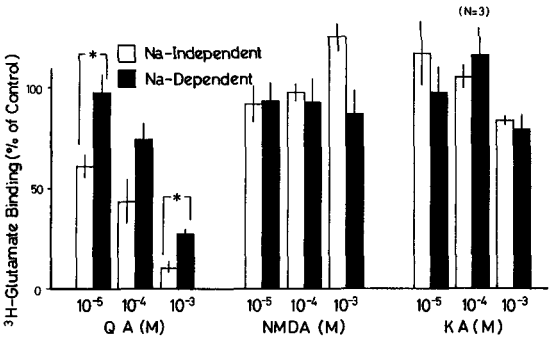


Fig.2. Effect of quisqualic acid (QA), N-methyl-D-aspartic acid (NMDA) and kainic acid (KA) on Na-independent and -dependent binding of ^{3}H-glutamate.

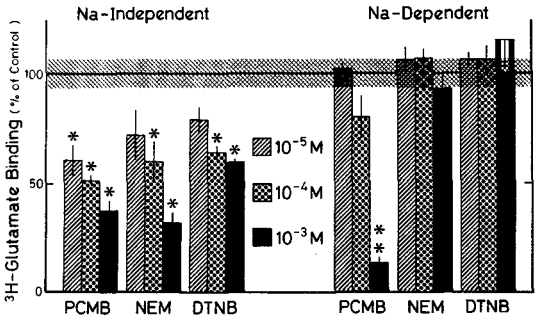


Fig.3. Effect of p-chloromercuribenzoic acid (PCMB), N-ethylmaleimide (NEM) and 5,5'-dithiobis-(2-nitrobenzoic acid) (DTNB) on ^{3}H-glutamate binding.

果で特筆すべきことは、GSHによるNa依存性および非依存性結合の阻害現象であろう。その阻害作用は10^{-6}Mで認められ、反応温度に関係なく出現することから考えて、GSH自身の持つ作用だと思われる。事実、反応後の反応液中にはGLUの混在は見出せなかった。したがって、反応中にGSHが酵素的あるいは非酵素的に代謝分解されてGLUが遊離し、その結果^{3}H-GLU結合が抑制される可能性は否定出来るものと思われる。また、GSSGがGSH より弱い阻害作用を示したことも、GSH分子そのものによる結合阻害を裏付けるものである。これらの成績は、GLU受容体およびGLU取り込み部位に対して、GSH(GSSG)が親和性を持つことを示唆しており、脳内GLUニューロンにおけるシナプス伝達にこの内在性ペプチドが何らかの機能的意義を持つ可能性は高いものと思われる。今後、他の内在性GLU含有ペプチドの作用の追究とともに、GSHの電気生理学的作用の解析は、早急に解決されなければならない検討課題であろう。

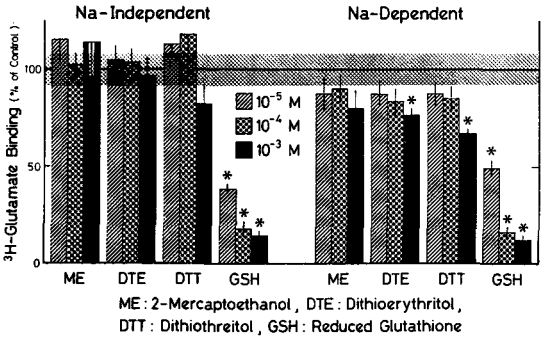


Fig.4. Effect of various SH compounds on ^{3}H-glutamate binding.

〔謝辞〕本研究の一部は薬学研究奨励財団昭和59年度研究助成金の援助のもとに行った。〔文献〕1. Bennet,J.P.Jr., Logan W.J., and Snyder,S.H. (1973) J. Neurochem. 21, 1533-1550 2. Enna,S.J., and Snyder,S.H. (1975) Brain Res. 100, 81-97 3. Foster,A.C., and Roberts,P.J. (1978) J.Neurochem. 31, 1467-1477 4. Logan,W.J., and Snyder,S.H. (1971) Nature 234, 297-299 5. Mena,E. E., Fagg,G.H., and Cotman,C.W. (1982) Brain Res. 243, 378-381 6. Takeuchi, A. and Onodera,K. (1973) Nature New Biol. 242, 124-126 7.米田幸雄，荻田喜代一，中牟田弘道，福田美衛，小井田雅夫 (1985) 神経化学 24, 印刷中 8. 米田幸雄，荻田喜代一，中牟田弘道，小井田雅夫 (1985) 神経化学 24, 印刷中 9.Yoneda, Y., Roberts,E., and Dietz,G.W.Jr. (1982) J.Neurochem. 38, 1686-1694

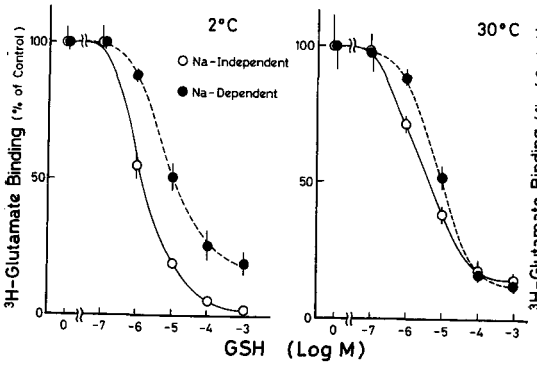


Fig.5. Effect of reduced glutathione (GSH) on ^{3}H-glutamate binding.

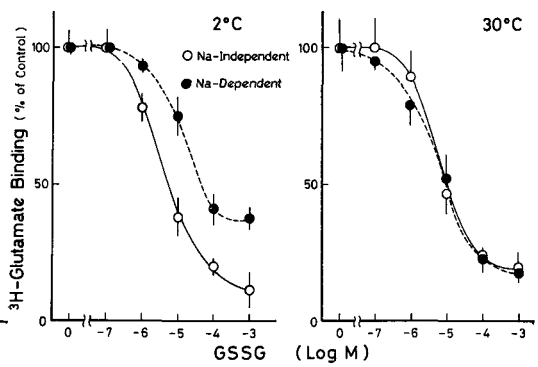


Fig.6. Effect of oxidized glutathione (GSSG) on ^{3}H-glutamate binding.

53. キスカル酸感受性 L-[^{3}H] グルタミン酸結合部位：モルモット脳膜分画からの可溶化

越谷和雄　（金沢大・医・第二生理）

〔要　約〕

シナプス伝達に関与するグルタミン酸レセプターの分子的性質を明らかにする目的で、グルタミン酸結合部位を脳から可溶化し、その性質を調べた。

モルモット脳 P_2 膜分画を 3-[(3-cholamidopropyl)-dimethylammonio]-1-propanesulfonate(CHAPS) およびチオシアン酸アンモニウムで処理することにより、150,000xg 上清に L-[^{3}H] グルタミン酸結合活性を得た。可溶化物に対する L-[^{3}H] グルタミン酸の結合は飽和性かつ可逆的であり、Na^+および Cl^- 非要求性であった。Scatchard 解析の結果は，L-[^{3}H]グルタミン酸の結合が K_D=63.8および644nMの見かけ上2つのコンポーネントから成ることを示した。L-[^{3}H] グルタミン酸結合部位に対する興奮性アミノ酸の親和性はL-グルタミン酸 >> D-グルタミン酸 ≒ L-アスパラギン酸 > D-アスパラギン酸の順であった。キスカル酸は L-[^{3}H]グルタミン酸の結合を強く阻害し、その置換曲線は2相性であった。またキスカル酸レセプターのアンタゴニストであるグルタミン酸ジエチルエステル（ GDEE ）も中程度の親和性を示した。他の興奮性アミノ酸類縁体の親和性は、ホモシステイン酸を除いては、低かった。

以上の結果から、本研究で可溶化された L-[^{3}H] グルタミン酸結合部位は、シナプス伝達に関与するキスカル酸型のグルタミン酸レセプターに相当するものと思われる。

Key word： glutamate receptor, solubilization, CHAPS

電気生理学的研究から、興奮性アミノ酸のニューロンに対する作用はいくつかの異なる型のレセプターに介在されることが示唆されており、現在までにキスカル酸型、N-メチル-D-アスパラギン酸（ NMDA ）型、カイニン酸型、2-アミノ-4- ホスホノ酪酸（APB)型の4種類が提唱されている（1,2)。このうち特に、外来性に適用したキスカル酸とL-グルタミン酸が互いによく似た反応をニューロンに引き起こすことから（ 3)、キスカル酸型のレセプターがL-グルタミン酸による神経伝達に関与している可能性が強い。生化学的にも、キスカル酸感受性のL-グルタミン酸結合の存在が脳の膜標本を用いた実験により証明されている（ 4)。しかしながら、リガンドとしてのL-グルタミン酸は上記のどのタイプのレセプターにも結合しうるので、キスカル酸型レセプターの性質を詳細に検討するためには、可溶化と精製を行なうことが必要とされる。

現在までに、L-グルタミン酸結合蛋白の可溶化と精製に関しては Michaelisら(5) による報告があるが、彼らの標品はキスカル酸に対する感受性を持たないなどの理由からキスカル酸型レセプターとは考えられない。本研究では、両性イオン性界面活性剤 CHAPS とカオトロピックイオンを用いることによりキスカル酸感受性 L- グルタミン酸結合部位を可溶化し、その性質を調べた。

〈実験方法〉

粗シナプス膜分画の調製：　モルモット脳を 0.32M sucrose 中でホモジエナイズし、遠心により P_2 分画を集めた。これを40倍量の蒸留水で浸透圧破壊し、8,000 xg 20 分遠心後のペレットの上層を回収した。この粗シナプス膜分画を 4 mM Tris-HCl (pH7.4) で4回洗浄し、同じバッファーに懸濁した。

可溶化：　蛋白量 1-1.5 mg/mlの膜懸濁液を10 mM CHAPS 、200 mM NH_4SCN 、1 mM $MgSO_4$、50 mM Tris-HCl （ pH 7.4 ）存在下で 4°C 、30分間撹はんしたのち 150,000xgで 1時間遠心した。透明な上清を回収し Triton X-100 を 0.5 % になるように加えたのち、0.5 % Triton X-100 、1 mM EDTA･2Na を含む

25 mM Tris-HCl (pH 7.4) に対して 4°C 、一晩透析した。

結合実験： 蛋白量 80-120 μg の可溶化試料を 20 nM L-[3,4-^{3}H]グルタミン酸を含む 40 mM Tris-HCl(pH 7.4) 500 μl中で 0°C、2 時間インキュベートした。アッセイは triplicateで行ない、非特異的結合は 100 μMの非放射性 L-グルタミン酸存在下で測定した。B/F 分離は Bruns ら（6）の方法に従い 0.3 % ポリエチレンイミンで処理した Whatman GF/B フイルターを用いた濾過によって行なった。濾過後フイルターを2.5mlの 40mM Tris-HCl pH 7.4で洗浄し、残った放射能を測定した。Scatchard プロットの解析は Feldman の理論（7）に基づくコンピューターモデリングによって行なった。

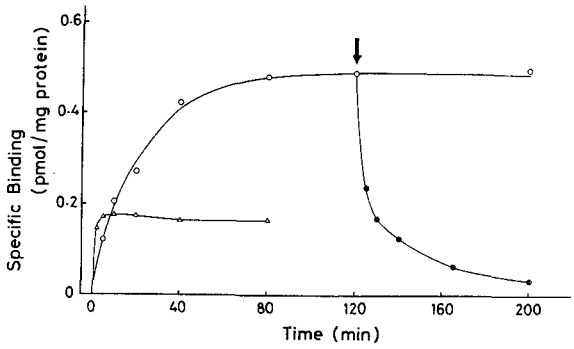


Fig. 1

Soluble extract was incubated with 20 nM of L-[^{3}H]glutamate at 0°C (○) or 30°C (△). Non-radioactive L-glutamate at a final concentration of 100 μM was added after incubation for 2 hr at 0°C (arrow), and the incubation was continued for an additional 80 min (●).

〈結 果 と 考 察〉

可溶化試料に対する L-[^{3}H]グルタミン酸結合の時間経過をFig.1 に示す。0°C では結合はゆっくり増加し 約 2 時間で平衡に達した。30°Cでは結合は約 5分で平衡に達したが最大値は 0°C の 35 % であった。100 μM の非放射性グルタミン酸の添加によって放射性リガンドは速やかに解離した。L-[^{3}H] グルタミン酸の結合は 200 mM NaClの添加によって変化せず、反応液中の Tris-HCl を Tris-acetate に置き換えても結合に差は見られなかった。

可溶化試料への L-[^{3}H]グルタミン酸の結合は Fig. 2-A に示すように飽和性であった。Scatshard解析(Fig.2-B)から、K_D=63.8 nM、B_{max}=1.00 pmol/mg protein および K_D=644 nM, B_{max}=7.86 pmol/mg protein の 2 つの成分の存在が示唆された。

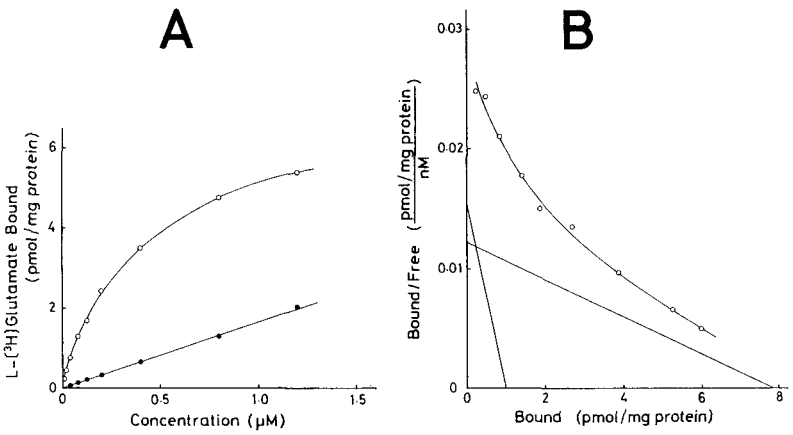


Fig. 2

Saturability (A) and Scatchard analysis (B) of the glutamate binding. Soluble extract was incubated with 10-1200 nM of L-[^{3}H]glutamate with or without 100 μM of non-radioactive L-glutamate. Specific binding: —○—. Non-specific binding: —●—.

Fig.3およびTable Iは、可溶化されたL-[^{3}H]グルタミン酸結合部位の特異性を置換実験によって調べた結果を示す。本結合部位は、アスパラギン酸よりもグルタミン酸に対して、またD体よりもL体に対して高い親和性を示した。キスカル酸による置換曲線は2相性であり（Fig.3）、高親和性の成分（IC_{50}=11nM）と中程度の親和性の成分（IC_{50}=16μM）が得られた。キスカル酸型レセプターのアンタゴニストとされるGDEEがL-[^{3}H]グルタミン酸の結合を強く置換したのに対し、NMDA型レセプターのアンタゴニストであるNMDA、アンタゴニストである2-アミノ-5-ホスホノ吉草酸（APV）の作用は弱かった。またカイニン酸型レセプターのアンタゴニストであるカイニン酸、およびAPB型レセプターのアンタゴニストであるAPBの親和性も低かった。ホモシステイン酸はD体、L体とも中程度の親和性を示した。

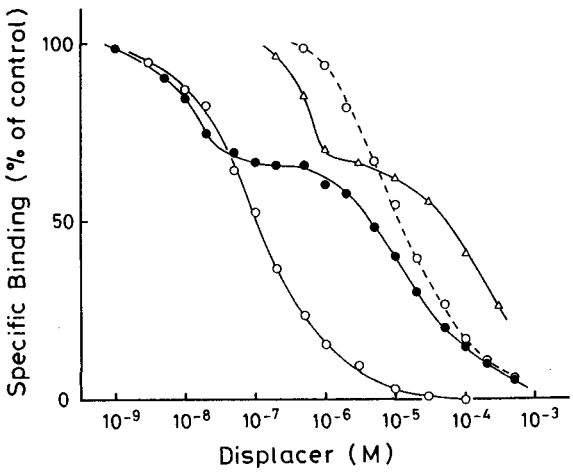


Fig. 3

Displacement of L-[^{3}H]glutamate binding by L-glutamate (—○—), D-glutamate (--○--), L-aspartate (—△—) and quisqualate (—●—).

以上の性質は、生理的なキスカル酸型レセプターとよく適合しており、NMDA型、カイニン酸型、APB型のレセプターおよびグルタミン酸取り込み部位の性質とは異なる（1,2,4）。このことから、本研究において可溶化されたL-[^{3}H]グルタミン酸結合部位はキスカル酸型のグルタミン酸レセプターに相当するものと思われる。

TABLE I

Displacement of Glutamate Binding to the Solubilized Glutamate Binding Sites by Various Compounds

Compound	IC_{50} (μM)	Compound	Inhibition at 100 μM (%)
Quisqualate	0.011*, 16*	NMDA	48
L-Glutamate	0.10	Kainate	45
L-Homocysteate	2.5	D-Aspartate	43
GDEE	3.5	cis-PDA	41
D-Glutamate	11	APV	36
D-Homocysteate	17	APB	28
L-Aspartate	51	γ-DGG	24
		GABA	8

* IC_{50}s of two components.

References

1. Watkins, J.C. and Evans, R.H., Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol., 21,165-204(1981).
2. Watkins, J.C.,Glutamate Transmitter in the Central Nervous System, Roberts, P.J., Storm-Mathisen, J. and Johnston, G.A.R. (eds.), pp.1-24 (1981).
3. Yamamoto, C. and Sato, H., Exp. Brain Res., 57,313-320(1985).
4. Foster, A.C. and Fagg, G.E., Brain Res. Rev., 7,103-164(1984).
5. Michaelis, E.K., Michaelis, T.M., Storman, T.M., Chittenden, W.L. and Grubbs, R.D., J. Neurochem., 40,1742-1753(1983).
6. Bruns, R.F., Lawson-Wendling, K. and Pugsley, T.A., Anal. Biochem., 132,74-81(1983).
7. Feldman, H.A., Anal.Biochem., 48,317-338(1972).

54. 伝達物質グルタミン酸の動態
—グルタミン回路仮説の検討—

高垣玄吉郎・小長谷初枝　　(東京都神経研・神経生化)

〔要　約〕

伝達物質グルタミン酸の動態を解明しようとする研究の一環として，モルモット大脳皮質スライスを用い，高カリウム刺激によるグルタミン酸の放出とその前駆物質との関係を調べ，「グルタミン回路仮説」の妥当性を検討した。(1) ラベルしたD－グルタミン酸あるいはD－アスパラギン酸と大脳皮質スライスをインクベート(preloading)したのち，そのスライスを灌流(superfusion)したときには，放射能の放出速度は高カリウム刺激によって約2倍に増加したのみである。(2) ところが，L-[U-^{14}C]-グルタミン酸で preload した場合には，放射性グルタミン酸の放出速度は高カリウム刺激によって8～10倍に増加し，[U-^{14}C]-グルコースでpreloadした場合には，約8倍に増加した。(3) さらに，L-[U-^{14}C]-グルタミンでpreloadした場合には，放射性グルタミン酸の放出速度は高カリウム刺激によって8～12倍に増加し，高カリウム・メジウム中で L-[U-^{14}C]-グルタミンで preload した場合には，その増加は23～26倍にも達した。(4) 高カリウム刺激による放出速度の増加は，何れの場合もカルシウム依存性であった。これらの成績は「グルタミン回路仮説」に一致するものと考えられる。

Key word : neurotransmitter; amino acid; glutamic acid

著者らは昨年の本学会では，伝達物質グルタミン酸の動態を探ろうとして，モルモット大脳皮質スライスとシナプトゾーム画分による非代謝性のD－グルタミン酸とD－アスパラギン酸の取り込みと放出の特徴を解析した成績を報告した(1)。シナプトゾーム画分では取り込まれたアミノ酸は高カリウム刺激によって大部分放出されるが，スライスではその一部のみが放出され，高カリウム・メジウム中でも活発な取り込みが認められることを示した。そして，大脳皮質スライスに取り込まれたD－グルタミン酸とD－アスパラギン酸の大部分はグリア細胞に局在するものと考察された。今回は，大脳皮質スライスからの高カリウム刺激によるカルシウム依存性のグルタミン酸の放出とその前駆物質との関係を解析し，「グルタミン回路仮説」(2) の妥当性を検討した成績を報告する。

〔実験方法の概要〕モルモット大脳皮質スライスをKrebs-Ringer液(グルコース，5 mM)中で，^{3}H-アミノ酸，^{14}C-アミノ酸や^{14}C-グルコースと好気条件で37℃，15分間インクベート(preloading)したのち，灌流装置に移してNa-freeメジウムで灌流(superfusion)し，灌流液を連続的に2分間づつ分取してイオン交換樹脂カラムクロマト(3)でグルタミン酸画分を分け，その放射能を測定した。灌流にNa-freeメジウムを用いたのは，放出されたアミノ酸の再取り込みを阻害して放出を定量的に測定するためである。高カリウム刺激による放出速度の増加とそのカルシウム依存性を調べた。また，大脳皮質スライスをL-[U-^{14}C]グルタミン酸(10 μM)およびL-[U-^{14}C]グルタミン(0.4 mM)とインクベートしたのち，その過塩素酸(3.5 %)抽出液からイオン交換樹脂クロマトで，グルタミン酸，アスパラギン酸，グルタミンおよびGABA画分

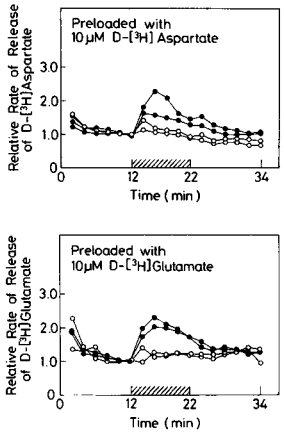


Fig. 1. After preloaded with D-[^{3}H]aspartate(10 μM) or D-[^{3}H]glutamate(10 μM) in standard medium for 15 min, the slices were superfused with Na-free medium at a rate of 2 ml per min. Over a 10-min period indicated by hatching on the time scale, the superfusion medium was switched to that containing 50 mM-KCl.

●, Superfusion with Na-free medium
○, Superfusion with Na-free and Ca-free medium

The radioactivity in each successive 4-ml portion of the superfusate was counted, and expressed relative to the mean of the two portions just prior to switching to 50 mM-KCl medium.

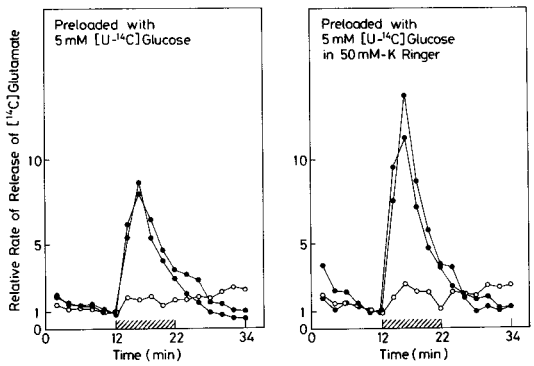


Fig. 2. After preloaded with [U-^{14}C]glucose in standard medium, or in 50 mM-KCl medium, the slices were superfused with Na-free medium. See legend to Fig. 1.

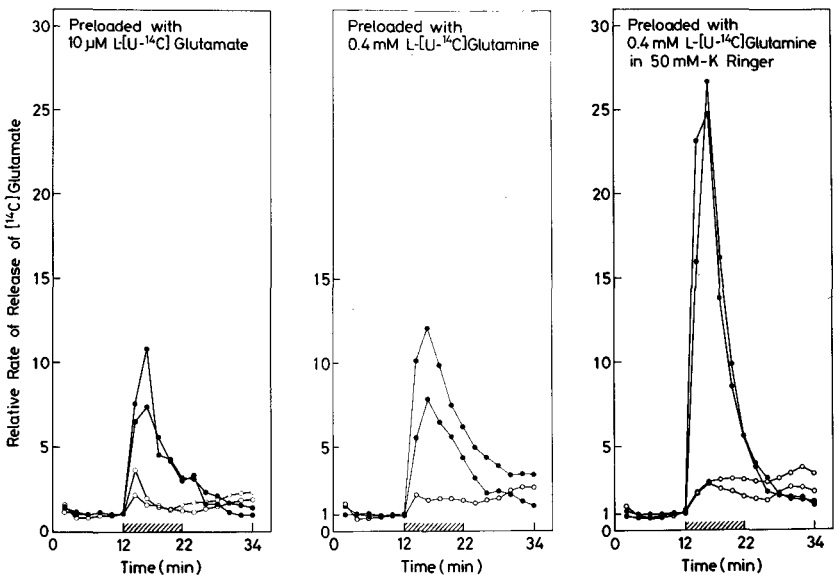


Fig. 3. After preloaded with L-[U-^{14}C]glutamate(10 μM) or L-[U-^{14}C]glutamine (0.4 mM) in standard medium, and with L-[U-^{14}C]glutamine(0.4 mM) in 50 mM-KCl medium, the slices were superfused with Na-free medium. The fraction of glutamate from each successive portion of the superfusate was obtained by ion-exchange resin column chromatography, and its radioactivity was counted. See legend to Fig. 1.

を分け，それぞれの放射能を測定して，グルタミン酸およびグルタミンの代謝を調べた。個々の実験の条件は図の説明のうちに記載してある。

〔成績と考察〕ラベルしたD－グルタミン酸(10 μM)あるいはD－アスパラギン酸(10 μM)を大脳皮質スライスにpreloadしたのちに灌流したときには，放射能の放出速度は高カリウム刺激によって約2倍に増加したのみである(Fig. 1)。この成績は，大脳皮質スライスに取り込まれたD－グルタミン酸やD－アスパラギン酸の大部分はグリア細胞に局在するというさきの考察に符合するだろう。ところが，ラベルしたL－グルタミン酸(10 μM)あるいはL－グルタミン(0.4 mM)――血漿および脳脊髄液中のグルタミン濃度は約0.4 mMである ――でpreloadした場合には，灌流液への放射性グルタミン酸の放出速度は高カリウム刺激によって約8～10倍に増加し，ラベルしたL－グルタミン(0.4 mM)で高カリウム・メジウム(50 mM)中でpreloadした場合には，放射性グルタミン酸の放出速度の高カリウム刺激による増加は23～26倍にも達した(Fig. 3)。さらに，大脳皮質スライスを[U-^{14}C]-グルコース(5 mM)でpreloadした場合には，灌流液中への放射性グルタミン酸の放出速度は高カリウム刺激で約8倍に増加し，高カリウム・メジウム中で[U-^{14}C]-グルコースでpreloadすると，放出速度の増加は10～12倍に達した(Fig. 2)。高カリウム刺激によるグルタミン酸の放出速度の増加は，何れの場合もカルシウム依存性であった。

大脳皮質スライスをL-[U-^{14}C]グルタミン酸(10 μM)とインクベート(15 min)したのち，スライス中のグルタミン画分の放射能を測定すると，グルタミン酸画分の放射能の約35％にも達していた。一方，スライスをL-[U-^{14}C]グルタミン(0.4 mM)とインクベートしたときの，スライス中のグルタミン酸，アスパラギン酸，GABA画分の放射能はFig. 4に示した如くであった。すなわち，大脳皮質スライスではグルタミン－グルタミン酸の相互変換が活発であり，とくに高カリウム・メジウム中では，グルタミンは極めて活発にグルタミン酸に変わることが示された。以上の成績はすべて，伝達物質グルタミン酸はおもにグルタミンに由来するという，「グルタミン回路仮説」（2）に一致するものと考えられる。

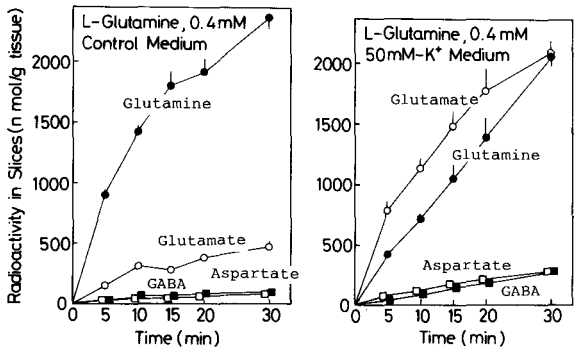


Fig. 4. After the varying time of incubation with L-[U-^{14}C]glutamine (0.4 mM) in standard medium and in 50 mM-KCl medium, the slices were separated from the medium, and homogenized and extracted with 3.5% PCA. The fractions of glutamate, aspartate, glutamine and GABA were obrained by ion-exchange resin column chromatography. The radioactivity of each fraction was determined.

〔文献〕(1)高垣，小長谷(1984):神経化学,23, 369-371; Takagaki, G. & Konagaya, H.(1985): Neurochem.Res., 10, accepted for publication. (2) Hamberger, A. et al(1979): Brain Res., 168, 513-530; Hamberger, A. et al(1979): Brain Res., 168, 531-541. (3) Berl, S. et al(1962): J.biol.Chem., 237, 2562-2569.

55. アスパラギン酸特異抗体の作製と免疫組織化学

斎藤尚亮・雲井一夫・坂上元祥・田中千賀子
(神戸大・医・薬理)

〔要　約〕

興奮性神経伝達物質の1つとして、アスパラギン酸等の酸性アミノ酸が働いていることが示唆され、いくつかの脳神経経路が Asp 作動性神経の候補として挙げられてきた。しかし、Asp 神経の存在を証明するには不充分なものが多く、特に形態学的な研究は、オートラジオグラフィーあるいは Asp 分解酵素に対する抗体を用いたものだけで充分なものとは言えなかった。今回、我々はグルタールアルデヒドによる Asp 結合ウシ血清アルブミンを抗原として抗 Asp 血清を得、更に、アフィニティークロマトグラフィーを用いて Asp 抗体を精製した。免疫化学的に特異性を検討した結果、精製 Asp 抗体は Asp 以外の生体内アミノ酸とは反応しなかった。この精製 Asp 抗体を用いて、ラット脳組織と免疫染色すると Asp 陽性反応は、大脳皮質、海馬体、視床核、視床下部、赤核、前庭核等の限られた神経細胞群に認められた。また Asp 陽性反応は神経組織にのみ観察されたことから、我々の作製した抗 Asp 抗体は神経性の Asp を認識し、Asp 作動性神経の同定に有効であると考えられる。

Key word：　aspartate antibody, immunohistochemistry

＜緒言＞

酸性アミノ酸のうちグルタミン酸及びアスパラギン酸（Asp）は、興奮性伝達物質として働いている可能性が多くの研究によって示唆されてきた[1]。しかし、グルタミン酸及びアスパラギン酸は、神経組織内で代謝機能に深く関与しており、代謝物質としての機能と伝達物質の機能から分離して解析することは困難であった。1983 年 Storm-Mathisen らは、グルタミン酸に対する抗血清の作製を報告し[2]、興奮性アミノ酸作動性神経の形態学的研究の可能性を示唆した。しかし彼らの報告した抗血清にはその特異性に若干の問題があり、グルタミン酸作動性神経として証明するには不充分であった。今回、我々はアスパラギン酸に対する抗血清を作製し、アフィニティークロマトグラフィーを用いることによって、アスパラギン酸に対する特異抗体と精製した。そして、この Asp 抗体の特異性を検討し、また、免疫染色によって、ラット脳における Asp 作動性神経について詳細な検討を加えた結果をここに報告する。

＜実験方法＞

1) Asp 抗血清の作製と精製方法

Asp（1mmol）をグルタールアルデヒド(1mmol）によってウシ血清アルブミン(120 mg）と 0.1 M リン酸緩衝液（20 ml, pH 7.4）中で結合し、透析、ゲル ろ過後、それを抗原として型どおりウサギに免疫した。抗血清の抗体を測定しつつ、ブースターを行い高い抗体価をもった抗血清を抗体の精製に用いた。Asp 抗体の精製は Asp を固定した epoxyactivated agarose gel に抗血清反応させ、洗浄後、50 mM グリシンバッファー（pH 2.2）で抗 Asp 抗体を溶出した。

2) 抗体価の測定法

一定量のAsp 固定化 epoxyactivated gel (10～20 mg) に一定量の抗血清あるいは抗体を反応させ、PAP 法にて発色、洗浄後、gel をエチレングリコールに浮遊させて吸光度を測定した。また交叉性の検討には、各種アミノ酸を固定化した epoxyactivated gel を抗体と反応させ同様に発色、吸光度を測定した、Asp 固定化 gel における吸光度に対する百分率で表示した。

3) 免疫染色法

ウィスター系ラットをペントバルビタール麻酔下にて左心室から 4 % パラホルムアルデヒド(FA)、0.5 % グルタールアルデヒド、0.2 % ピクリン酸(PA)を含むリン酸緩衝液で灌流固定し、後固定、サッカロースによる洗浄後、凍結切片を作製し浮遊状態で[3] PAP法あるいは蛍光抗体法にて、免疫染色した。

＜結果および考察＞

1) Asp 抗体の特異性

Asp 抗血清あるいは精製 Asp 抗体を用いて Asp 固定化 epoxyactivated gel と反応させ吸光度を測定すると抗血清、抗体ともに濃度依存性に吸光度は増大した。しかし、表1に示す様に Asp 抗血清は D-Asp, グルタミン酸に交叉性を持ち一方精製 Asp 抗体は D-Asp にわずかな交叉性を示すのみであった。また D-Asp は生体内では無視できる程度の少量しか存在しないことから精製抗体を用いた免疫染色の結果は L-Asp の局在を示すものと考えられる。また過剰の Asp (0.5-1 mM) と精製抗体を反応させ免疫染色を行うと免疫反応は弱くなるが Asp 量をいかに増加させても免疫反応は消失しなかった。このことから精製 Asp 抗体は free Asp と反応しうるものの親和性は低く、蛋白等の物質に固定された Asp との親和性がより高いと考えられる。

2) 免疫組織化学

精製 Asp 抗体 (IgG量 0.5-1 ug/ml) を用いて免疫染色した結果、Asp 陽性反応は神経細胞内に限局して認められグリア細胞内やその他の非神経性要素には殆んど認められなかった。またAsp 固定化 epoxyactivated gel カラムと反応させた Asp 抗血清つまり flow through を用いても免疫反応は認められず精製抗体においても Asp 固定化 epoxy activated gel との吸着により完全に免疫反応は消失した。これらのことより、Asp 抗体による免疫反応陽性所見は Asp の局在を示すものと考えられる。

ラット脳においては大脳皮質、海馬体、視床、視床下部、赤核、外側膝状体、橋核蝸牛核、前庭核、嗅結節、扁桃核、下丘核、上丘、手綱核等の神経細胞に限局した Asp 陽性反応が認められた。化学定量による脳内の Asp の分布はかなり均一であり、 Asp 陽性細胞の分布と必ずしも一致しなかった。化学定量では代謝機能に関するAsp と神経性の Asp を分離して測定することは不可能であったが Asp 抗体は神経性の Asp のみを認識することができ、これは神経伝達物質としての Asp と非神経性細胞における Asp との存在様式あるいは濃度の差によるものと考えられる。

Asp抗体は Asp の神経伝達物質としての同定および Asp 作動性神経分布の研究に有力な手段である。

表 1　アスパラギン酸抗体の各種アミノ酸に対する交叉性

Bound substance	mol/100mg gel	anti-Asp serum		purified Asp antibody	
		relative absorbance	%	relative absorbance	%
L-asp	1.34	30.1±2.73	100	27.5±3.03	100
D-asp	1.12	4.5±0.27	14.9	0.7±0.03	2.5
Glu	1.07	0.8±0.21	2.7	0	0
Pro	3.80	0.5±0.07	1.6	0	0
Ala	1.34	0.3±0.04	0.9	0	0
GABA	1.23	0	0	0	0
Gln	2.01	0	0	0	0
Tau	1.93	0	0	0	0
Leu	2.14	0	0	0	0
Gly	1.66	0	0	0	0
ß-ala	1.74	0	0	0	0
Choline	0.86	0	0	0	0

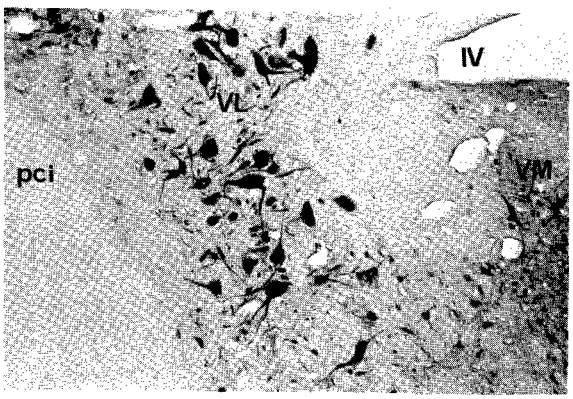


図 1

ラット前庭核におけるアスパラギン酸陽性神経構造

pci ；下小脳脚
IV ；第四脳室
VM ；前庭核内側核
VL ；前庭核外側核

1) Fagg, G.E. and Foster, C. (1983) Neuroscience 9, 701-719

2) Storm-Mathisen, J., Leknes, A.K., Bore, A.T., Vaaland, J.L., Edminson, P., Haug, F.M.S. and Ottersen, O.P. (1983) Nature 301, 517-520

3) Kimura, H., McGeer, P.L., Peng, J.H. and McGeer, E.G. (1981) J. Comp. Neurol. 200, 151-201

56. 神経伝達物質による摘出白鼠上頚交感および迷走神経節への α-aminoisobutyric acid (AIB) 輸送系の促進効果とその細胞局在の相違

安藤正人・高濱和也・永田　豊　(藤田学園保衛大・医・生理)

〔要　約〕

交感性ニューロンならびに周辺グリア細胞とから構成される摘出白鼠上頚交感神経節（ＳＣＧ）と，コリン作動性迷走神経節（ＮＧ）とを *in vitro* で incubate して，アミノ酸（α－aminoisobutyric acid,AIB）の能動的取り込み過程におよぼすアドレナリン（noradrenaline,ＮＡ）あるいはコリン作動性（acetylcholine,ＡＣｈ）神経伝達物質の促進効果について比較検討した。(1)摘出ＳＣＧ内へのＡＩＢ取り込みはＮＡ（50μM）添加で有意に促進したが，ＡＣｈ（1mM）は無効であった。このアミノ酸輸送亢進は，節後神経切断（axotomy）を施して１週間後，ＳＣＧ内ニューロンの変性脱落とグリアの増殖した標本でさらに増大した。NAはまた，膜輸送系酵素（Na,K−ATPase）を著明に活性化した。この効果は主に α_1 拮抗剤の prazosin（10μM）添加で抑制され，この際ＮＡによるＡＩＢ輸送系の亢進も消失した。即ち，ＮＡ伝達刺激は主に周辺グリア細胞膜 α_1 受容体を介してNa，K−ATPaseの活性化を引き起こし，それと共役したアミノ酸輸送系を亢進する可能性が強く示唆された。(2)ＮＧ内へのＡＩＢの能動輸送系は，ＡＣｈ（1mM）添加で亢進するのがみられたが，この際Ca，Mg−ATPaseの活性化が平行して認められた。このように，ＮＡやＡＣｈはシナプス伝達過程のみならず，それに伴なう神経系の機能的代謝基質の取り込み亢進作用にも働いていることが示された。

Key word：α−aminoisobutyric acid uptake, norepinephrine and acetylcholine superior cervical sympathetic and nodose ganglia.

すでに我々は，摘出白鼠上頚交感神経節（ＳＣＧ）を *in vitro* でインキュベートした時，タンパク生合成基質のアミノ酸（α−aminoisobutyric acid,ＡＩＢ）が細胞内へ能動的に取り込まれる過程が神経成長因子（ＮＧＦ）によって著明に促進されることを観察した。この際，ＮＧＦは主にＳＣＧ内交感性ニューロン膜の輸送系酵素（Na，K−ATPase）の活性化を引き起こし，これと共役するＡＩＢの能動輸送系を促進させている可能性が示された。[11] 一方，グリア細胞成長因子（GMF）は迷走神経節（ＮＧ）内へのＡＩＢ輸送系を亢進したが，その作用機序は不明な点が多い。[1]

一方，ラット大脳皮質シナプトソーム膜のNa，K−ATPase活性は，種々のカテコールアミン添加で有意に上昇することが知られている。[8] したがって，noradrenaline（ＮＡ）は膜輸送酵素を活性化してアミノ酸輸送系をも促進する効果が充分予想される。そこで，今回はＮＡともう一つの伝達物質，acetylcholine（ＡＣｈ）を作用させてＡＩＢ能動輸送系に及ぼす効果をＳＣＧとＮＧについて比較検討し，シナプス伝達との関連性を考察した。

〈実験材料および方法〉

(1)ＳＣＧおよびＮＧの摘出，節前（denervation）あるいは節後神経切断（axotomy）手術はWistar系成熟白鼠を用い，既報に従い実施した。[11]

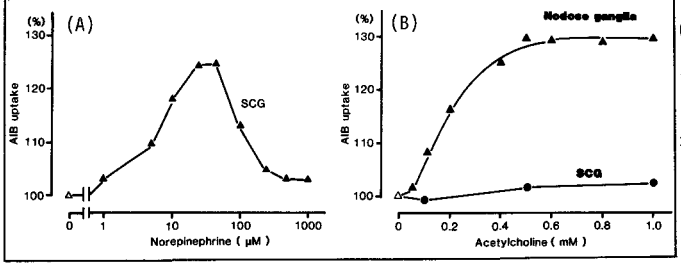
(2)組織中へのアミノ酸取り込み実験は，中性アミノ酸のＡＩＢ（1.25μCi，100μM）を tracer として，ＨＥＰＥＳを含むKrebs−Ringer（glucoseを含む，pH 7.3）中[6]で95％O_2−5％CO_2ガスで通気しながら37℃，２時間インキュベートして，細胞内に

TABLE 1. EFFECTS OF ADRENERGIC AND CHOLINERGIC AGONISTS AND ANTAGONISTS ON AIB UPTAKE IN SCG EXCISED FROM RATS

Conditions	AIB uptake (μmol/mg-protein)
In control Ringer	48.3 ± 2.6 (12)
+Dopamine(0.1mM)	62.3 ± 3.0 (4)***
+NA (50μM)	60.1 ± 2.1 (6)***
+ACh(1mM) + eserine	50.1 ± 3.3 (6)

Aerobic incubation for 2 hours; *** p<0.001

FIG. 1. EFFECT OF VARIOUS CONCENTRATION OF NA OR ACh ON AIB UPTAKE INTO SCG OR NODOSE GANGLIA EXCISED FROM RATS



取り込まれたＡＩＢの放射活性から算出した。

(3)Na，K−ATPase あるいはCa，Mg−ATPase 活性は，それぞれGibbs ら[5]あるいはSobue ら[12]の方法に準じて測定し，生成する無気リン量[10]で表示した。試料のタンパク含量はLowry ら[9]の方法で求めた。

〈実験結果および考察〉

(1)ＮＡのＳＣＧ内へのＡＩＢ取り込みにおよぼす促進効果とその細胞局在：刺激によって節前末端から遊離されるＡＣｈは直接に，あるいはさらにＳＣＧ内生体アミン作動性の介在ニューロン（ＳＩＦ細胞）からのカテコールアミンを介して間接的に，交感性の節後ニューロンの興奮をひき起こす。[7]そこで，コリンおよびアドレナリン作動性アゴニストを添加して摘出ＳＣＧを好気的にincubate すると，dopamine（0.1mM）およびＮＡ（50μM）添加で組織内への有意なＡＩＢ取り込み系の促進がみられた。しかし，ＡＣｈ（1mM）による促進効果は殆んど示されなかった。また，このようなＮＡによるＡＩＢ輸送系の亢進は，濃度依存性に増大しＮＡが10−50μMで最大効果を示したが，さらに濃度を上昇させると急激にその効果は消失した（Fig.1−A）。Na，K−ATPase 活性におよぼすＮＡあるいはＡＣｈ添加効果を調べると，やはりＮＡ（50μM）添加によってのみこの輸送酵素の著明な活性化（約8.5倍）が認められた（Tab.2）。ＮＡはＮＧＦの作用[11]と同様に細胞内Ｎａイオンの排出に与かるNa，K−ＡＴＰaseの著明な活性化と共役してアミノ酸の細胞内への取り込みを促進する一種のtrophic 作用を示すことが明らかとなった。

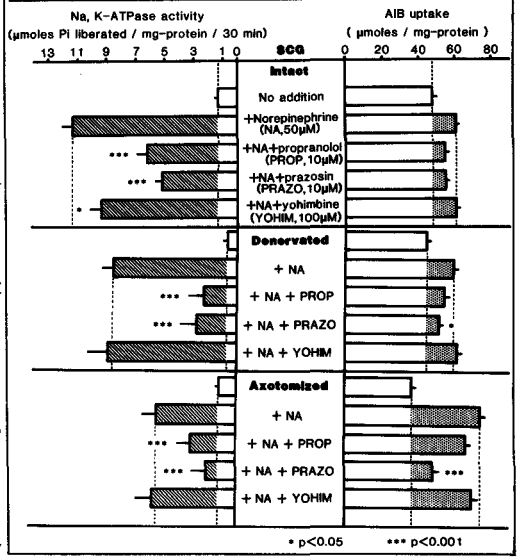
TABLE 2. EFFECTS OF NOREPINEPHRINE(NA) AND ACETYLCHOLINE(ACh) ON Na, K-ATPase ACTIVITY IN INTACT AND OPERATED SCG EXCISED FROM RATS

Conditions	Intact SCG	Denervated SCG	Axotomized SCG
In control Ringer	1.34 ± 0.12(8)	0.66 ± 0.22(6)*	1.22 ± 0.18(6)
+ NA (50μM)	11.33 ± 1.06(4)***	8.52 ± 1.31(4)***	5.41 ± 0.98(4)***
+ ACh (1mM)	1.88 ± 0.10(4)	0.95 ± 0.36(4)	0.92 ± 0.23(4)

Na, K-ATPase activity : Pi μmol/mg-protein/30 min　　* p<0.05　*** p<0.001

節前末端のWaller 変性を生じているが，節後ニューロンは保持されているdenervated ＳＣＧ（１週間後）のＡＩＢ取り込みは，非手術側ＳＣＧの場合と殆んど差異がみられなかった。ところが，axotomy 手術１週間後の節後ニューロンの変性・脱落と周辺グリア細胞の増殖・置換したＳＣＧ標本では，ＮＡ添加によるＡＩＢ取り込みの促進効果はより一層増大（約２倍）して認められ

FIG. 2. EFFECTS OF α- AND β-ADRENERGIC BLOCKERS ON NOREPINEPHRINE-INDUCED AIB UPTAKE AND Na, K-ATPase ACTIVITY IN ISOLATED INTACT AND OPERATED SCG



た（Fig.2）。β拮抗剤のpropranolol（10μM）およびα2拮抗剤，yohimbine（100μM）の添加では，正常および手術後のＳＣＧ標本へのＡＩＢ輸送系のＮＡによる亢進は，殆んど抑制されなかった。しかし，α1拮抗剤のprazosin（10μM）は特にaxotomized ＳＣＧで著明にＡＩＢ取り込みを抑制した。一方，βあるいはα1拮抗剤の影響を受けて，正常および手術後のＳＣＧのNa，K−ATPase活性は何れも抑制効果がみられたが，特にaxotomized ＳＣＧ標本でα1拮抗剤のprazosinによる抑制が他の拮抗剤よりも著明であった（Fig.2）。最近，培養Ｃ６細胞で細胞骨格となるグリア線維性タンパク（ＧＦＡ）がＮＡにより極めて短時間にリン酸化され得ることが報告されている。[3] 今回の我々の実験結果から，ＮＡは少なくともα1受容体を介したNa，K−ATPaseの活性化（リン酸化）をひき起こして，その結果これと共役して主にＳＣＧ内のグリア細胞内へのアミノ酸の取り込みの促進を示したものと考える。このことは，ＳＣＧ内ＳＩＦ細胞から遊離されるＮＡは，その濃度によるfeed back inhibition[8]（Fig.1−A）を受けながら節後ニューロンのs−ＩＰＳＰ発現[7]のみならず，周辺グリアへのアミノ酸取り込みの調節にも密接に関与し得る可能性が示唆される。

TABLE 3. EFFECTS OF ACETYLCHOLINE(ACh) AND NOREPINEPHRINE(NA) ON AIB UPTAKE AND Ca, Mg-ATPase ACTIVITY IN ISOLATED NODOSE GANGLIA EXCISED FROM RATS

Conditions	AIB uptake (μmol/mg-protein)	Ca, Mg-ATPase activity (Pi μmol/mg-protein/30min)
In control Ringer	27.9 ± 3.3(6)	5.82 ± 0.18(4)
+ ACh (1mM)	36.4 ± 2.9(6)***	7.68 ± 0.40(4)**
+ NA (50μM)	31.2 ± 3.6(4)	5.90 ± 0.72(4)

Aerobic incubation for 2 hours; ** p<0.01 , *** p<0.001

(2)ＮＧ内へのＡＩＢ取り込みにおよぼすＡＣｈの促進効果：ＳＣＧ内へのアミノ酸輸送系に対し，ＡＣｈの添加効果は全く認められなかった（Tab.1）。しかしながら，副交感系迷走神経節（ＮＧ）ではＡＣｈ（1mM）添加で有意なＡＩＢ取り込みの促進効果が認められた（Fig.1−B）。一方，ＮＡ添加はＮＧ内へのＡＩＢ取り込みには全く変動を与えなかった（Tab.3）。一般にアミノ酸の取り込み過程は，細胞外Naイオンに依存することが知られている[11]が，Tab.2に示すごとく，Na，K−ATPase活性に対するＡＣｈの影響は殆んど認められない。一方，ラット胸腺組織内へのＡＩＢ輸送系は，甲状腺ホルモン（Ｔ3，Ｔ4）によって促進され，さらにＴ3，Ｔ4は細胞内Caイオンの排出ポンプの一つと考えられるCa，Mg−ATPase活性を増大することが報告されている。[4] そこで，本実験でＮＧ内Ca，Mg−ATPase活性におよぼすＡＣｈの効果を調べたところ，明らかな活性上昇を引き起こすことが見られた（Tab.3）。つまり，ＮＧ内へのアミノ酸輸送系の亢進は，おそらくＡＣｈ刺激によるコリン作動性ニューロン膜のイノシトール・リン脂質の加水分解[2]と共役しているCaイオンの膜輸送系と密接に関連し得る可能性が示唆されたものと解される。何れにしても，コリンあるいはアドレナリン作動性シナプス伝達過程の促進は，それぞれ対応したＳＣＧ内の細胞成分の代謝基質の取り込みの促進過程をもひき起こすことが明らかにされたわけである。つまり，神経機能発現に与かるＮＡあるいはＡＣｈ伝達物質が，ＮＧＦあるいはＧＭＦと同様に広義のtrophic作用をも包含している事実が強く示唆されたことは興味深い。

〈文　　献〉

(1)Ando,M.et.al.(1986?)Brain Res.(submitted)(2)Briggs,C.A.et.al.(1985)J.Neurochem.44:731-739(3)Browning, E.T.et.al.(1984)J.Neurochem.42:718-726(4)Davis,F.B.et.al.(1983)J.Biol.Chem.258:12373-12377(5)Gibbs,R.et. al.(1965)J.Biol.Chem.240:2181-2187(6)Greene,L.A.& Rein,G.(1977)Brain Res.129:247-263(7)Libet,B.(1979) Life Sci.24:1048-1057(8)Logan,L.G.(1980)J.Neurochem.35:349-353(9)Lowry,O.H.et.al.(1951)J.Biol.Chem.193: 265-275(10)Martin,J.B.& Doty,D.M.(1947)Analyt.Chem.21:965-966(11)Nagata,Y.et.al.(1985)Neurochem.Res.10: 1173-1185(12)Sobue,K.et.al.(1979)FEBS Lett.99:199-202

57. 軟体動物巨大神経細胞における芳香族アミノ酸誘導体の抑制作用

船瀬広三・竹内　宏　　(岐阜大・医・第一生理)

〔要　約〕

1．アフリカマイマイの神経節中に同定される巨大神経細胞１３個の興奮性に対する，N-β-phenylpropionyl-L-Tyr （P-L-Try ）など，芳香族アミノ酸関連物質およびダイペプタイド計６物質（表１参照）の作用を検定した．

2．これら芳香族アミノ酸関連物質は，ｄ－ＲＰｅＡＮ，ｄ－ＬＣＤＮ，ＴＡＮ，ＰＯＮなど８個の神経細胞に顕著な抑制作用を示したが，ｖ－ＲＰＬＮ，ＲＡＰＮなど５個の神経細胞には，ほとんど作用を示さなかった．

3．これら物質群が作用を示した８個の神経細胞では，ごく一部の例外を除いて，これらの構造活性連関は非常に似通っていた．すなわち，C-L-Tyr の作用が最も強く，ついでC-L-Trp と P-L-Tyrが強く，P-L-Trp の作用は上記のものより弱く，P-L-Phe とL-Phe-L-Tyr はさらに弱かった．

4．上記の結果より，物質の構造を cyclohexylpropionyl- （C-）基，phenylpropionyl- （P-）基の部分と Tyr，Trp，Pheの部分に分けて考えれば，物質がこのような抑制作用を示すためには，前者の部分では，「C-基＞P-基＞L-Phe （アミノ基を有する）」の順となり，後者の部分では，「L-Tyr ＞L-Trp ＞L-Phe 」の順となる．

Key words： aromatic amino acids, neuromodulator, molluscan giant neuron

Ⅰ．はじめに

先に私どもは，アフリカマイマイ巨大神経細胞ＴＡＮに対して，２つのダイペプタイド，L-Phe-L-Tyr と L-Phe-L-Trpが，強い抑制作用を示すことを見出し，ついでこれらからアミノ基を取除いた N-β-phenylpropionyl-L-Tyr (P-L-Tyr)と N-β-phenylpropionyl-L-Trp (P-L-Trp)が，さらに強い抑制作用をあらわすことを観察した（１，２，３，４）．

本研究では，ＴＡＮを含めて合計１３個のアフリカマイマイ巨大神経細胞に対する，上記物質およびその関連物質６種の作用を検定し，それらの最小有効濃度を比較することにより，その構造活性連関を検討した．

Ⅱ．材料と方法

アフリカマイマイ (Achatina fulica Férussac) 食道下神経節中に１１個，脳神経節中に２個の巨大神経細胞を同定して，実験に用いた（詳細については，２，３，４，５，参照）．

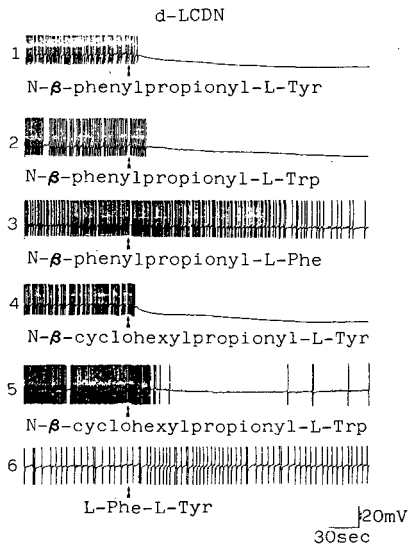


図１．巨大神経細胞ｄ－ＬＣＤＮに対する６種の芳香族アミノ酸誘導体の作用．10^{-3} Ｍにおける作用の強さの比較．

表1．アフリカマイマイ巨大神経細胞に対する，芳香族アミノ酸誘導体の作用

		Suboesophageal			
		Right parietal ganglion			
No.	Substances	TAN(a)*	PON(a)	RAPN(s)	d-RPLN(s)
1.	N-β-phenylpropionyl-L-Tyr (P-L-Tyr)	I(3×10^{-7}-10^{-6})	I($1-3\times10^{-6}$)	(-)	I(3×10^{-6}-10^{-5})
2.	N-β-phenylpropionyl-L-Trp (P-L-Trp)	I(10^{-6})	I($1-3\times10^{-5}$)	(-)	I(3×10^{-5}-10^{-4})
3.	N-β-phenylpropionyl-L-Phe (P-L-Phe)	I(10^{-4})	(-)	(-)	(-)
4.	N-β-cyclohexylpropionyl-L-Tyr (C-L-Tyr)	I(3×10^{-8}-10^{-7})	I($1-3\times10^{-7}$)	(-)	I(3×10^{-6})
5.	N-β-cyclohexylpropionyl-L-Trp (C-L-Trp)	I(10^{-6})	I(3×10^{-5})	(-)	I($1-3\times10^{-4}$)
6.	L-Phe-L-Tyr	I($1-3\times10^{-5}$)	(-)	(-)	(-)

		Suboesophageal ganglia			Cerebral
		Pedal ganglia			
No.	Substances	d-LPeLN(a)	d-LPeCN(a)	d-RPeAN(a)	d-LCDN(a)
1.	N-β-phenylpropionyl-L-Tyr (P-L-Tyr)	I(3×10^{-6})	(-)	I(3×10^{-7})	I($1-3\times10^{-7}$)
2.	N-β-phenylpropionyl-L-Trp (P-L-Trp)	I(10^{-5})	(-)	I(3×10^{-6})	I(10^{-6})
3.	N-β-phenylpropionyl-L-Phe (P-L-Phe)	SI	(-)	I($1-3\times10^{-4}$)	I(3×10^{-5}-10^{-4})
4.	N-β-cyclohexylpropionyl-L-Tyr (C-L-Tyr)	I($1-3\times10^{-6}$)	(-)	I($1-3\times10^{-7}$)	I(10^{-7})
5.	N-β-cyclohexylpropionyl-L-Trp (C-L-Trp)	I(10^{-3})	SI	I(3×10^{-6}-10^{-5})	I($1-3\times10^{-7}$)
6.	L-Phe-L-Tyr	SI	(-)	SI	(-)

I，抑制作用．SI，スクリーニング濃度で弱い抑制作用．（－），作用なし．（括弧内），最小有効濃度（M）．（a），自発発火細胞．（s），自発発火を示さない細胞．＊，Takeuchi et. al.（2．3．4）．

III．結果と考察

本研究の結果を表1に要約し，また実際の測定結果として，d－LCDNに対する6物質（すべて10^{-3} M）の作用を，図1に示す．

本研究で用いた物質群が，TAN同様に顕著な抑制作用を示した細胞群と，ほとんど作用しなかった細胞群とに分けられた．前者は，TAN (tonically autoactive neurone)，PON (periodically oscillating neurone)，d－RPLN (dorsal-right parietal large neurone)，d－VLN (dorsal-visceral large neurone) d－LPeLN (dorsal-left pedal large neurone)，d－RPeAN (dorsal-right pedal autoactive neurone)，d－LCDN (dorsal-left cerebral distinct neurone)，v－RCDN (ventral-right cerebral distinct neurone)の8個であり，後者は，RAPN (right anterior pallial neurone)，v－RPLN (ventral-right parietal large neurone)，v－VLN (ventral-visceral large neurone)，VIN (visceral intermittently firing neurone)，d－LPeCN (dorsal-left pedal constantly firing neurone)の5個であった．物質が作用を示した細胞群よりTANを例にとれば，検定された物質のなかで，最も作用の強いものは

（スクリーニング濃度：10^{-3} M）．

ganglia		Visceral ganglion			ganglia
v-RPLN(s)	d-VLN(s)	v-VLN(s)	VIN(a)	v-RCDN(s)
(-)	I(3×10^{-5}-10^{-4})	(-)	SI	I(10^{-4})
(-)	I(10^{-4})	(-)	(-)	I(10^{-4})
(-)	(-)	(-)	(-)	SI
(-)	I(10^{-5})	(-)	I(10^{-3})	I(10^{-5})
(-)	I(10^{-3})	(-)	(-)	I(10^{-5})
(-)	(-)	(-)	(-)	SI

C-L-Tyr であり，ついで C-L-TrpとP-L-Tyr が強く，P-L-Trp の作用は上記のものより弱く，P-L-Phe と L-Phe-L-Tyrはさらに弱かった．このような作用の強さの順序は，他の７個の細胞でも，僅かな例外を除いて，同様に観察された．しかしながらこれら物質に対する感受性は，細胞により差が見られた．この感受性の差を，P-L-Tyr の最小有効濃度で比較すれば，最も感受性の強い細胞はｄ－ＲＰｅＡＮであり，ついでｄ－ＬＣＤＮとＴＡＮ，さらにＰＯＮ，ｄ－ＬＰｅＬＮ，ｄ－ＲＰＬＮ，最後にｄ－ＶＬＮとｖ－ＲＣＤＮであった．これら物質群の構造活性連関については，物質を N--phenylpropionyl あるいは N-β-cyclohexylpropionylの部分と，L-Tyr , L-Trp , L-Phe の部分にわけて考えられる．すなわち前者についていえば，N-β-cyclohexylpropionyl を持つ場合の作用が最も強く，ついで N-β-phenylpropionylの場合であり，L-phenylalanyl（この場合にはアミノ基が残っている）の場合には作用が弱い．後者については，L-Tyr の場合が最も作用が強く，ついで L-Trpの場合であり，L-Phe の場合にはほとんど作用を失う．

これら物質群の抑制作用は，神経細胞の細胞体神経膜に対する過分極作用である．この抑制のイオン機構については，先にＴＡＮにおいては，非Cl^-依存性（恐らくK^+依存性）であることが，証明されている（２，３）．他の細胞については，まだ観測してないが，過分極性抑制が比較的長く続く（順応があまり速くない）ことより，恐らくＴＡＮの場合と同様のイオン機構によるのではないかと推測される（６）．

C-L-Tyr , P-L-Tyr を始めとするこれら芳香族アミノ酸関連物質の作用の生理的な意味合いについては，現在では推測するに過ぎないが，これら物質がある細胞群には顕著な作用を示し，他のある細胞群にはほとんど作用を示さない事実は，ある細胞にはこれら物質群に対するレセプターが存在し，他の細胞群にはこのようなレセプターが存在しないことを示唆している．そして物質が作用を示す細胞群において，これら物質の構造活性連関が似通っていることは，これらレセプターの性質が似通っていることを示唆する．これらのことより，本研究で検定した芳香族アミノ酸関連物質は，未知の神経伝達物質（あるいは広い意味での神経調節物質）のアゴニストとして，作用を示したのではないかと推測される．

References
(1) Ariyoshi, Y. and Takeuchi, H. (1982) Brit. J. Pharmacol., 77, 631-639.
(2) Takeuchi, H. et al. (1979) Arch. int. Pharmacodyn. Thér, 237, 149-168.
(3) Takeuchi, H. and Tamura, H. (1980) Brit. J. Pharmacol., 69, 29-34.
(4) Takeuchi, H. et al. (1977) Experientia (Basel), 33, 938-939.
(5) Takeuchi, H. et al. (1973) C. R. Soc. Biol. (Paris), 167, 598-602.
(6) Watanabe, K. and Takeuchi, H. (1977) C. R. Soc. Biol. (Paris), 171, 703-709.

58. タウリン抗体の作成，特異性の検定およびその中枢神経系における免疫組織化学的応用

冨田安信・木村　宏・井田修二*・栗山欣弥*
（滋賀医大・第二解剖，京都府医大・薬理*）

〔要　約〕

タウリン(TA)は生体内に豊富に存在し、神経系においても広く分布している含硫アミノ酸の一つである。特に脳内では他のアミノ酸に比べて含有量が多く、その機能としては、抑制性の神経伝達に関与していると考えられている。しかし、その細胞レベルでの局在などの形態学的詳細は不明である。この解明には免疫組織化学的手法が有効と考えられるが、TAの分子量が小さいため抗体の作成が困難であった。今回我々は、TA抗体の作成に成功した。この抗血清の特異性の検討を、新たに開発した免疫化学的手法を用いて行った。種々の含硫アミノ酸や抑制性の神経伝達物質であるGABA等について交叉性を検討したが、これらとはほとんど免疫反応性が認められなかった（交叉性;0.5% 以下）。

この抗体を用いてラット脳を免疫組織化学法で検索した。TA陽性免疫反応は神経細胞およびグリア細胞に局在していた。陽性グリアは脳内に広くほぼ均一に分布していたが、陽性神経は小脳や、外側中隔核などの特異な脳部位に分布していた。

Key word：Taurine antibody, crossreactivity, immunohistochemistry.

免疫組織化学法の発展に伴ない、脳内神経伝達物質の局在や分布などが、形態学的に観察できるようになった。しかし、アミノ酸のような分子量の小さい物質については、その抗体の作成が困難であり、GABAおよびグルタミン酸(3)の他には免疫組織化学的な報告をみない。今回我々は、脳内に最も豊富に存在する遊離アミノ酸のひとつで(2)、抑制性神経伝達の候補物質に挙げられているTA(1)について、まずその特異抗体を作成し、次に免疫組織化学法で脳内局在を観察することを試みた。さらに、この抗体の特異性を検討するために新しい免疫化学的な方法を開発した。

方法

（抗体の作成）　TAをグルタルアルデヒド(Glu)でウシ血清アルブミンと結合させ、透析した。これを遠心し、その上清を抗原(TA-Glu-BSA)としてウサギを免疫した。抗体価を免疫組織化学的に検定し、最も染色性に優れた時期の血清を今回使用した。

（特異性の検討）　血清の交叉性を免疫化学的に検討した。1cmX1cm のセルロース・アセテート膜に 200mMから 6μMのTAを各々 5μlスポットした。すなわち各膜が、1μmoles から 30pmoles のTAを含む様に作成した。交叉性の検討には、各被検物質60 mMを含有する溶液を5μl (300nmoles) スポットした。これを風乾後、パラホルムアルデヒド(FA)で蒸気固定した。この膜を組織切片と同様にABC 法を用いて免疫化学法で処理した。呈色反応には基質に2,2'Azinobis (3-ethylbenzothiazoline-6 sulfonic acid) Diammonium Sulfate (ABTS) を用いて浮遊性の反応産物を作り、その吸光度を415nm で測定した。各々の吸光度とそれに相当するTA量から交叉度を求めた。

（免疫組織化学法） ラットを、4% FA 、 0.35% Glu、0.2%ピクリン酸(PA)を含む燐酸緩衝液で灌流固定し、脳をFAとPAの混液で後固定した。15% ショ糖液で洗浄後、クリオスタット切片を作成し、PAP またはABC 法で免疫染色した。

結果

（抗体の特異性） Fig.1 に示すように、TAの含有量に相関してS状の曲線が得られた。交叉度の検定にはまず、検討する物質(300nmoles) の吸光度を測定した。つぎに、その吸光度に相当するTA量を上述の曲線から求めた。そのTA量と実際に物質をスポットした量(300nmoles) との比を計算し、これを交叉度とした。ほとんどの物質では交叉性は0.1%以下であった。最も交叉の大きかったGABAでも 0.5% 以下であった (Table) 。

(Table) Crossreactivity of TA antiserum

GABA	0.48%	L-Cysteine	<0.1%	L-Cysteic Acid	<0.1%
L-Homocystine	0.35%	L-Glutamine	<0.1%	L-Glutamic Acid	<0.1%
L-Homocysteine	0.34%	Glycine	<0.1%	DL-2-Amino-	
Cysteamine HCl	0.14%	L-Homoserine	<0.1%	n-butyric Acid	<0.1%
L-Ornitine HCl	0.12%	L-Isoleucine	<0.1%	4-Amino-3-hydroxy-	
L-Aspartic Acid	0.12%	L-Leucine	<0.1%	n-butyric Acid	<0.1%
L-Methionine	0.11%	L-Lysine HCl	<0.1%	Cysteine Sulfinic Acid	<0.1%
L-Alanine	<0.1%	L-Proline	<0.1%	Sodium Isethionate	<0.1%
β-Alanine	<0.1%	L-Lysine HCl	<0.1%		
L-Asparagine	<0.1%	2-Pyrrolidone	<0.1%		
DL-Carnitine Cl	<0.1%	L-Valine	<0.1%		

（免疫組織化学） TA抗体の至適希釈倍率は１万倍であった。TA陽性免疫反応は、神経細胞およびグリア細胞に局在していた。陽性グリア(Fig.2-d) は脳内に広くほぼ均一に分布していたが、陽性神経細胞は小脳のプルキンエ細胞(Fig.2-a) 、外側中隔核(Fig.2-b) や嗅球(Fig.2-c) などの特異な脳部位に分布していた。

この陽性反応は、抗血清を10mMのTAまたは、免疫に用いた抗原(TA-Glu-BSA)で吸収させると消失した。

考察

今回作成したTA抗体は、特異性が高く、免疫組織化学法に応用しても優れた染色性を示した。この抗体を用いた免疫組織化学法により、TA陽性細胞は、特異な脳部位に分布することが観察された。さらに詳細な局在を調べることにより、TAの神経伝達における働きがいっそう解明されていくものと考えられる。

TA抗体の特異性の検討には新しく開発した免疫化学的な検定方法を用いたが、この検定方法は、TA抗体だけでなく、GABA抗体や、Angiotensin II抗体の特異性の検討にも応用可能であった(Fig.3.4.)。この方法は、アイソトープを使用しないのでどこでも容易に行なえ、また切片と同一の免疫組織化学法の操作を行なっているので、実際の染色性に即した交叉性を知ることができ、RIA より有効であると考えられる。

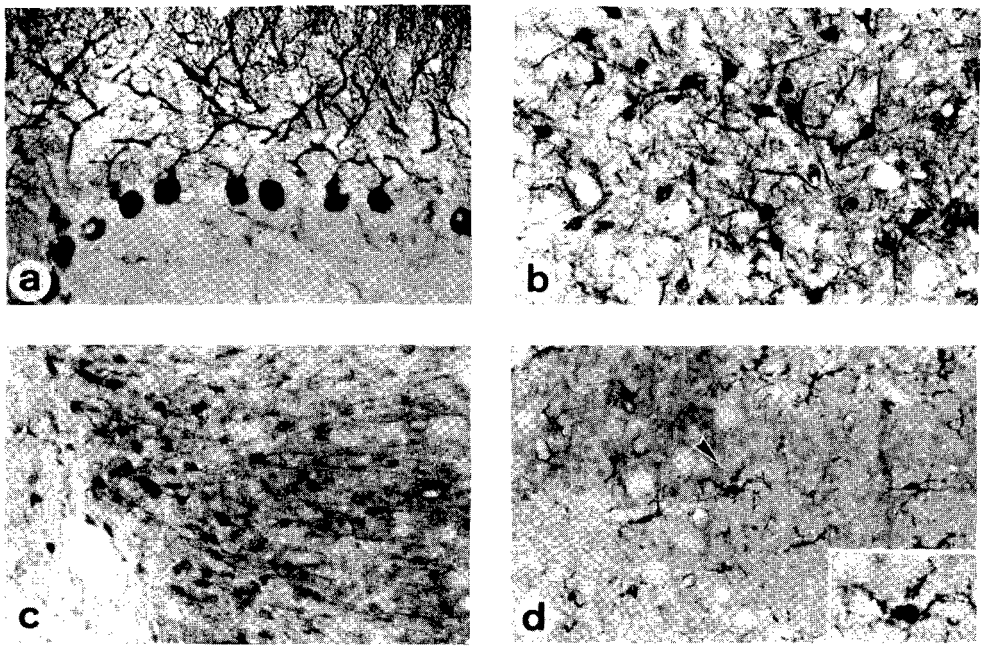


Fig. 2 TA抗体による免疫組織染色

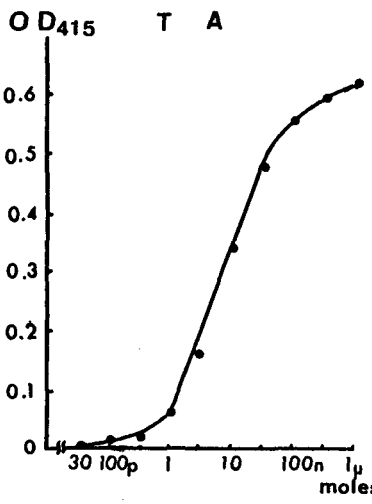


Fig.1 TA抗体による標準曲線

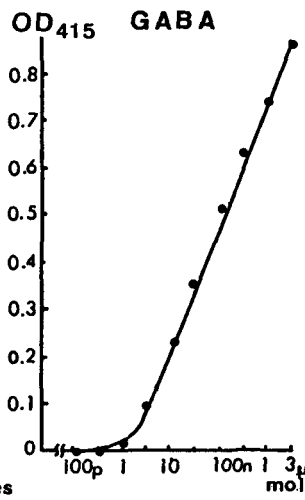


Fig.3 GABA抗体による曲線

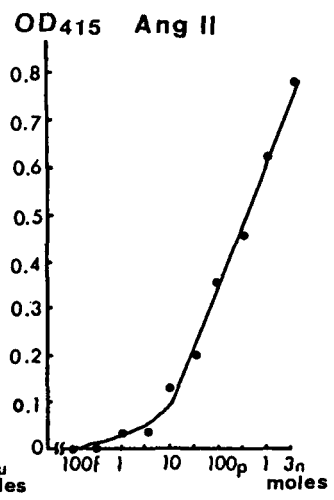


Fig.4 Ang II抗体による曲線

[文献]

1. Hass H.L. and Hosli L. (1973) Brain Res., 52, 399-402

2. Kontro P. et al. (1980) Brain Res., 184, 129-141

3. Storm-Mathisen et al. (1983) Nature, 301, 517-520

59. *El* マウス大脳皮質切片からの taurine release とそれに及ぼす抗てんかん薬の影響について

小川一寿・平松　緑・加太英明・森　昭胤
(岡山大・医・脳研・機能生化)

〔要　約〕

放り上げ刺激を行なってけいれんが誘発されるようになった、Elマウスの大脳皮質切片からの [^{3}H] タウリン (Tau) release を、ddY マウス及び放り上げ刺激をしないElマウス (無けいれん群) とに対して比較検討した。その結果、放り上げ刺激をしていないElマウス (無けいれん群) の大脳皮質切片からのTau の release はddY マウスのものに比べて著明に高値であるが、放り上げ刺激によりけいれんが誘発されるようになると (けいれん群)、Tau release は無けいれん群に比べて有意に低下することが見い出された。また、Elマウス (けいれん群) 大脳皮質切片からのTau release は、Elマウスのけいれん発作を抑制することが知られているdiphenylhydantoin(5mM) 及びdipropylacetate(5mM)により、有意に増加し、Elマウス無けいれん群のlevel に迄回復した。

以上の実験成績より、Elマウスの発作発現機構には、大脳皮質からのTau release の機能低下が大きく関与していることが示唆された。

Key word : Elmice, taurine, release

われわれはさきに、放り上げ刺激を行なっていないElマウス大脳皮質切片からの [^{3}H] セロトニン (5-HT) のrelease 量はddY マウス大脳皮質のものよりも多く、放り上げ刺激によりけいれんが誘発されるようになると大脳皮質からの5-HT release量は減少することを認め、Elマウスのけいれん発作発現機構に5-HTのreleaser量の低下が関与していることを示した[6]。タウリン (Tau)の抗けいれん作用については既に多くの報告がある[5,12]。今回はElマウス大脳皮質切片からの [^{3}H] Tau のrelease について検討した。また放り上げ刺激によりけいれん準備性を獲得したElマウスを用い、Tau のrelease に対する抗てんかん薬の影響についても同様に検討した。

実験方法

1)実験動物：　Elマウス及びその母系のddY マウスを使用した。Elマウスは当教室で飼育保存しており、ddY マウスは静岡実験動物より入手した。

2)Elマウスの放り上げ刺激：　Elマウスを2群に分け、その1群については生後4週目より1週間に2回、板上で約10cmの高さに80回の放り上げ刺激を毎週行なった。実験には毎回連続してけいれんを起こすマウスを使用した。

3)Tau release の測定：

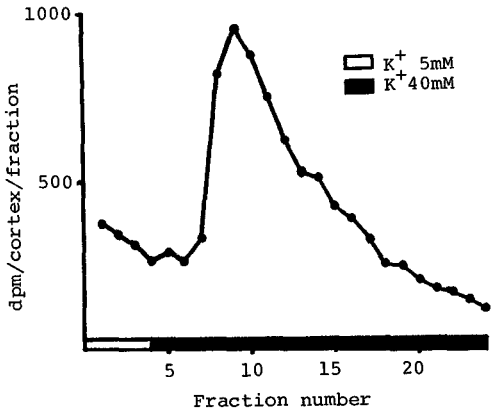


Fig 1. Time course of [^{3}H]taurine release from cortical slices of ddY mouse. Each fraction for 3min is 1.5ml.

マウスを断頭後、氷上ですばやく大脳皮質を摘出し、Mcllwain tissue chopper で0.3mm の厚さの切片を作成した。切片を95%O_2-5%CO_2 飽和中で37℃で5分 preincubation 後、最終基質濃度12.3nM の [^{3}H] Tau(0.9 μCi) を加え、再び15分 incubationした。ついで吸引ろ過後の切片を superfusion chamber に移し、酸素飽和中37℃で0.5ml/min の速度で、superfusion した。25分後、3分おきに4回 fractionを収集し、さらに40mMK^+の bufferに切り換え、再び3分おきに60分 fractionを収集した。これらの fraction を放射能測定用 vialにとり、Dotite Scintillator 6mlを加え、そのradioactivityを測定した。Tau release は40mMK^+による release の増加量で示した。Buffer成分は以下の如くであった。NaCl, 150mM; KCl, 5mM; $MgSO_4$, 1.2mM; $CaCl_2$, 1.2 mM; Na_2HPO_4, 1.2mM; HEPES, 20mM(pH7.4); Nialamide, 10μM; D-glucose, 5.6mM; EDTA, 0.05mg/ml; ascorbate, 0.2mg/ml。

4)抗てんかん薬： Diphenylhydantoin(DPH)及び dipropylacetate(DPA)は40mMK^+ buffer に溶解し、各々5mM を使用した。

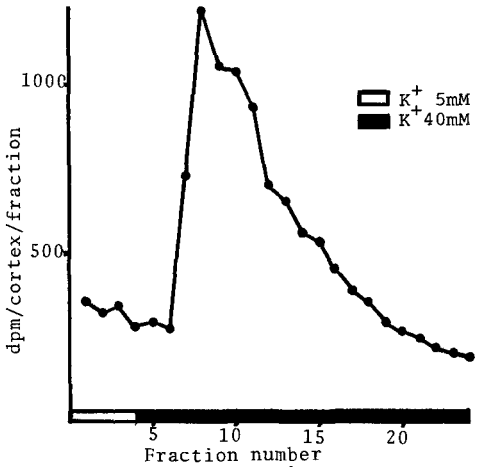


Fig 2. Time course of [^{3}H]taurine release from cortical slices of El mouse (non-stimulated). Each fraction for 3min is 1.5ml.

実験結果

図1～3はddY マウス及びElマウスの大脳皮質切片からのTau のrelease の実験例を示している。Tau のrelease 量は Minchin et al.[7]の方法に従い、40mM K^+によって放出された [^{3}H] Tau から basic release の [^{3}H] Tau 量を差し引き、basic release の [^{3}H] Tau を100%として示した（表1,2）。まずddY マウスと放り上げ刺激をしていないElマウス（無けいれん群）とを比較すると、大脳皮質切片からの [^{3}H] Tau のrelease は Elマウスの方が有意に高値であった。また、Elマウス（無けいれん群）と放り上げ刺激を行ない、けいれんを誘発するようになったElマウス（けいれん群）とでは、大脳皮質切片からの [^{3}H] Tau の release は後者の方がElマウス無けいれん群に比べて有意に低下していた。なお、ddY マウス群、Elマウス無けいれん群及びElマウスけいれん群との間には、[^{3}H] Tau のbasic release は有意差がなく、Tau のspontaneous な release には相違が認められなかった。また、DPH 及びDPA はElマウスけいれん群の大脳皮質切片からの [^{3}H] Tau のrelease をそれぞれ有意に増加させることが認められた。（表2）。

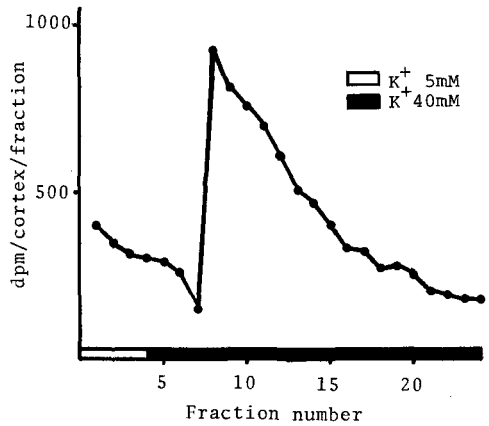


Fig 3. Time course of [^{3}H]taurine release from cortical slices of El mouse (stimulated). Each fraction for 3min is 1.5ml.

考察

Tau はてんかん発作発現機構に対して抑制的に作用することが示唆されている[1]。Elマウスについては、けいれん発作直前にTau の量が大脳皮質と小脳で増加すること、及びTau をi.p.投与するとElマウスのけいれんいき値は増加することが見い出され、Tau はElマウスの発作発現に抑制的に作用していることが想定されている[5]。今回、ElマウスとddY マウスとではspontaneous なreleaseには相違のないことが示されたが、high K^+ によるTau のreleaseには明らかにElマウスの方がddY マウスに比べて著明に多いことが示された。

Table 1. K^+-stimulated release of [^{3}H]taurine from cortical slices in ddY and El mice

	n	K^+-stimulated release (dpm/50mg tissue wet weight)	Basic release	K^+-stimulated release (% increase over base line)
ddY mice	10	4515±1615	5375±1142	86.6±33.0
El mice				
Non-stimulated	8	6443±3184	4397±2427	159.4±48.2[a]
Stimulated	7	3693±1364	4801± 777	75.9±21.0[b]

Student's t-test analysis: [a]$p<0.005$, compared with ddY mice; [b]$p<0.005$, compared with non-stimulated El mice. [c]One way ANOVA analysis : $p<0.01$, df 2,22; f=12.647.

Table 2. Effect of anticonvulsants on K^+-stimulated release of [^{3}H]taurine from cortical slices of stimulated El mice

	n	K^+-stimulated release[b] (dpm/50mg tissue wet weight)	Basic release	K^+-stimulated release[c] (% increase over base line)
ddY mice	10	3693±1364	4801± 777	75.0±21.0
Diphenylhydantoin	6	6185±1199[a]	4698±1476	142.9±45.7[a]
Dipropylacetate	4	7074±1534[a]	4620±1050	159.1±46.1[a]

Student's t-test: [a]$p<0.01$, compared with control. [b]One way ANOVA analysis: $p<0.01$, df 2,14; f=9.718. [c]One way ANOVA analysis: $p<0.01$, df 2,14; f=8.205.

ElマウスとddY マウスの大脳皮質切片でのTau uptakeについては今検討中である。

また、何回もけいれんが起きるようになるとElマウス大脳皮質からのTau release は低下していた。さきに無けいれんのElマウス大脳皮質の5-HT含有量はddY マウスに比べて高く、けいれんが起こるようになるとElマウス大脳皮質の5-HT量は低下することを見い出し[2]、その際大脳皮質切片からの5-HT releaseもddY マウスとElマウスとではElマウスの方が高く、けいれんが起きるようになると5-HT releaseは低下することを見い出した[3]。Elマウスの5-HT neuron に対して合成酵素活性、MAO 活性、uptake、binding などの種々の実験から、5-HT releaseは5-HT含有量に依存していることが示唆された[4]。今回の成績は5-HTと同じくTau はElマウスの発作発現に抑制的に作用していると思われ、けいれん発作が起こりやすくなった状態では、Tau のrelease が低下しているが、その際DPH やDPA はTau のrelease を促進して発作を抑制されるものと思われる[6]。Elマウスは5-HTと同様に先天的にddY マウスに比べてTau neuron の働きが非常に活発なものと想定された。

文献

(1) Bargeau, A. and Donaldson, J. (1974) Arch. Neurol. 30, 52-58. (2) Hiramatsu, M. (1983) Neurochem. Res. 8, 1163-1175. (2) 平松縁、加太英明、森昭胤 (1984) 神経化学 24, 75-77. (4) Hiramatsu, M. (1981) Folia Psychiat. Neurol. Jpn. 35, 261-265. (5) Iwata, H. Yamagami, S., Lee, E., Matsuda, T. and Baba, A. (1979) Jpn. J. Phamacol. 29, 503-507. (6) Matsumoto, Y., Hiramatsu, M. and Mori, A. (1983) IRCS Med. Sci. 11, 837. (7) Minchin, M. C. M., Williams, J., Bowdler, J. M. and Green, A. R. (1983) J. Neurochem. 40. 765-768.

60. ラット小脳における新しいGABAニューロンの可能性

青木英子・仙波禮治・柏俣重夫 (愛知県コロニー研・周生期)

〔要　約〕

ラット小脳ではプルキンエ細胞，ゴルジ type II細胞(largeゴルジ細胞)，バスケット細胞，ステレイト細胞と小脳核の一部の神経細胞で，GABAが抑制性の神経伝達物質として働いていることが知られている．今回，小脳において神経伝達物質がまだ知られていない神経細胞に注目し，精製抗 GABA 抗体を用いた蛍光抗体法によってラット小脳を染色し，かつ同一切片をヘマトキシリンで二重染色して検討した．その結果，上記の GABA ニューロンの他にルガロ細胞と smallゴルジ細胞が抗 GABA 抗体に強い反応を示すことを見出した．ルガロ細胞はプルキンエ細胞層あるいはその直下に存在し紡錘形の細胞体をもつ．smallゴルジ細胞の全体の形，突起の様子はゴルジ type II細胞のそれに似ているが細胞体がそれより小さい．一方，核が明るく顆粒細胞より大きいペイル細胞は smallゴルジ細胞との異同が不明であったが，抗 GABA 抗体に反応せず明瞭に区別されることが判明した．また一部の顆粒細胞が抗 GABA 抗体で染色された．以上のことより，すでに知られている小脳 GABA ニューロンの他に，ルガロ細胞とsmall ゴルジ細胞も GABA を神経伝達物質としていることが示唆された．

Key word： GAGAergic neuron, Lugaro cell, small Golgi cell

はじめに

GABA (γ-アミノ酪酸) は脊椎動物の神経系で抑制性の神経伝達物質として作用しているが，小脳にはこれを神経伝達物質としていると考えられる神経細胞として，プルキンエ細胞，ゴルジ type II細胞，バスケット細胞，ステレイト細胞と小脳核の神経細胞が知られており (8,9)，これらはいずれも抗 GABA 抗体に反応する．今回，これらの神経細胞の他にも抗 GABA 抗体に反応する 2種類の神経細胞をみつけたので報告する．

方法

抗 GABA 抗血清の作成は基本的には Storm-Mathisen らの方法 (12) に従い，GABA にウサギ血清アルブミン(RSA) をグルタールアルデヒドで結合させた GABA-RSA コンプレックスをコンプリートアジュバントと混和して，ウサギに免疫して抗血清を得た (4)．抗体の精製には，Epoxy activated Sepharose に固定化した GABA をリガンドとしたアフィニティゲルクロマトグラフィーを用い，抗体を吸着，溶出した (10)．また他のアミノ酸との交叉性を除くため，数種のアミノ酸を固定化したアフィニティゲルを通過させた．

動物は30日齢あるいは40日齢の SD-GR系ラットを用い，1 %グルタールアルデヒド，4 %ホルムアルデヒド，0.2 %ピクリン酸，2 %しょ糖，0.1 M 酢酸ナトリウム緩衝

本研究の一部は厚生省神経疾患研究委託費の援助を受けた．

液（pH=6.0）の固定液で心臓から灌流した後，4-5時間固定した．50 mM トリス緩衝液（pH=7.6）で二回液を交換し一晩洗った後に，ポリエチレングリコールに包埋しガラスナイフ（11）で3μm切片にした．切片は蛍光抗体法に依り(6)浮遊状態で抗GABA染色を行ない，蛍光顕微鏡下で写真を撮影した後，同一切片をヘマトキシリンで染色しなおした．細胞の同定には描画装置を用い，抗GABA反応を示した写真とヘマトキシリン染色した標本を同一視野上に重ねて観察を行なった．

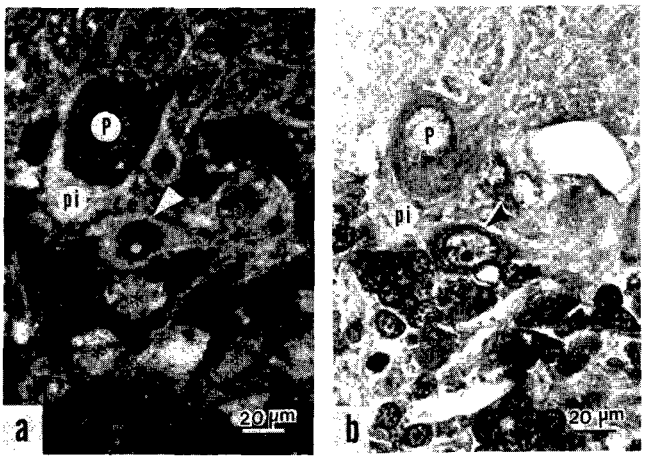


Fig. 1 Immunostaining of Lugaro cell with anti-GABA antibody
a. immunofluorescence stain b. hematoxyline stain
arrowhead: Lugaro cell, ＊: glomerulus, P: Purkinje cell, pi: pinceau

結果と考察

すでに知られている小脳GABAニューロンの他に，ルガロ細胞，small ゴルジ細胞とペイル細胞の抗GABA抗体に対する免疫反応性を検討した．ルガロ細胞は1894年にLugaroが記載した細胞(7)で，プルキンエ細胞層あるいはその直下に存在する場合が多く，紡錘形の細胞で樹状突起はプルキンエ層に水平に伸びている(1,5,7,13)．軸索は一本で顆粒細胞層に伸びるもの，分子層に伸びるものが知られているが線維連絡や神経伝達物質はわかっていない．図1-aに蛍光抗体法で抗GABA抗体に反応した小脳標本を示した．図1-bは同じ切片をヘマトキシリンで二重染色したものである．プルキンエ細胞の下に紡錘形の細胞体をもつ細胞が認められ，その位置と形態からルガロ細胞と考えられる．この他，プルキンエ細胞のまわりを囲むバスケット細胞軸索が形成して

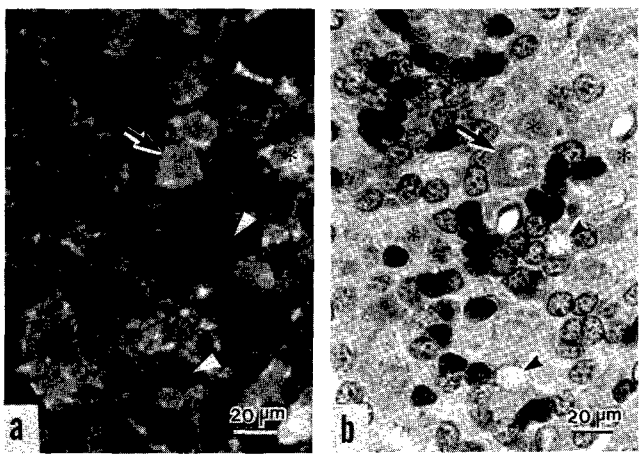


Fig. 2 Immunostaining of small Golgi cell with anti-GABA antibody
a. immunofluorescence stain b. hematoxyline stain
arrow: small Golgi cell, arrowhead: pale cell, ＊: glomerulus

いる pinceau，顆粒細胞層にあるゴルジ細胞が形成するglomerulusなどもよく染色されている．図2-aには small ゴルジ細胞が抗 GABA 抗体で染色されたことを示した．small ゴルジ細胞の全体の形，突起の様子はゴルジ type II 細胞に似ているがそれより小さい．この細胞はヘマトキシリン染色（図 2-b）では明るく明瞭な輪郭の核をもち仁は明確で細胞質は少なく，2－3個集まって clusterがみられることもある（13）．また顆粒細胞層には，核が明るくその大きさは顆粒細胞の 2倍くらいで細胞質がほとんどない球形の細胞，ペイル細胞が存在する(2) が，この細胞は抗 GABA 抗体に反応を示さなかった（図 2）．ペイル細胞は分布が特徴的で虫部小節，虫部垂腹側，小舌，片葉，房片葉に多く存在し，小節でのプルキンエ細胞あたりのペイル細胞の割合は山腹小葉の約10倍と報告されている(2)．一方，顆粒細胞は興奮性の神経細胞としてよく知られているが，一部抗GABA抗体で染色される細胞があった（図 3）．この場合，ヘマトキシリンで濃染される顆粒細胞が抗体に反応する傾向がみられた．以上のことより，小脳皮質ではプルキンエ細胞，ゴルジ type II細胞，バスケット細胞，ステレイト細胞の他にルガロ細胞とsmall ゴルジ細胞も GABA ニューロンである可能性が高く，ペイル細胞は GABA ニューロンではないと判断される．また顆粒細胞の一部はGABAである可能性がある．

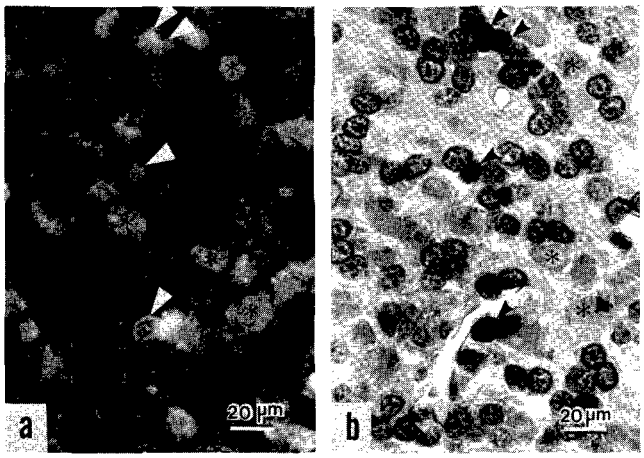


Fig. 3 Immunostaining of granule cell with anti-GABA antibody
a. immunofluorescence stain b. hematoxyline stain
arrowhead: granule cell, ＊: glomerulus

文献

1. Altman, J.(1972) J. Comp. Neurol. 145:465-514
2. Altman, J. and Bayer, S.A.(1977) Exp. Brain Res. 29:265-274
3. 青木英子，仙波礼治，慶野宏臣，柏俣重夫（1984）神経化学 23: 375-377
4. Aoki, E., Semba, R., Keino, H., Katoh-Semba, R. and Kashiwamata, S.(1985) Biomed. Res. 6:145-152
5. Fox, C.A.(1959) J. Comp. Neurol. 112:39-51
6. Heggenes, M.H. and Ash, J.F.(1977) J. Cell Biol. 73:783-788
7. Lugaro, E.(1894) Riv. sper. Freniat 20:297-331
8. McLaughlin, B.J., Wood, J.G., Saito, K., Barber, R., Vaughn, J.E., Roberts, E., and Wu, J.-Y.(1974) Brain Res. 76:377-391
9. Ribak, C.E., Vaughn, J.E. and Saito, K.(1978) Brain Res. 140:315-332
10. 斉藤尚亮，雲井一夫，木村宏，田中千賀子（1984）神経化学 23: 378-280
11. Semba, R.(1979) Stain Technol. 54:251-255
12. Storm-Mathisen, J., Leknes, A.k., Bore, A.T., Vaaland, J.L., Edminson, D., Haug, F.-M., and Ottersen, O.P.(1983) 39:360-365
13. Palay, S.L. and Chan-Palay, V.(1974) Cerebellar Cortex. Cytology and Organization. Springer-Verlag, N.Y. 121-132, 133-141

61. 培養牛副腎髄質クロマフィン細胞における ACh 応答機能の不活性化について

小原美佳・熊倉鴻之助　（上智大・生命科学研）

〔要　約〕

牛副腎髄質から調製した初代培養クロマフィン細胞を用いて Cell Bed Closed Perfusion(CBCP)system による灌流実験を行ない、分泌動態を電気化学検出器(ECD)により直接測定して、Acetylcholine(ACh)刺激に対する分泌応答の不活性化について検討し、以下のような結果を得た。

1)ACh 刺激に対する分泌応答の不活性化において、voltage dependent Ca^{2+} channels は影響を受けず、主に ACh receptor機能の変動によって分泌応答の不活性化が引き起こされる。

2)ACh 濃度が 5×10^{-4} M未満の場合に見られる分泌応答は、不活性化の後、より高濃度の ACh によって再活性化が可能であり、ACh receptor channelを介した Ca^{2+}流入の変動が深く関わると考えられる。但しその再活性化の大きさは Ca^{2+}によって抑制される。

3)ACh 濃度が 5×10^{-4} M以上の場合に見られる分泌応答の不活性化状態は ACh receptor の recognition siteの脱感作による不活性化であり、この脱感作状態は Ca^{2+}や Na^{+}の影響を受けない。

Key word： Adrenal chromaffin cells, Secretory function, Inactivation

培養クロマフィン細胞に持続的に ACh刺激或いは KClによる脱分極刺激を加えるとcatecholamines(CA)遊離が引き起こされるが、その応答は1分以内に不活性化に至る。既報[1]において我々は CBCP-ECD systemを用いて、クロマフィン細胞において ACh 刺激への分泌応答の不活性化と脱分極刺激への不活性化とは、それぞれ異なる機構によって引き起こされる可能性を示唆した。今回の研究では ACh刺激に対する分泌応答の不活性化の性格を詳細に検討し、不活性化現象の機構について考察した。

［実験方法］

1)クロマフィン細胞の培養　牛副腎髄質よりWaymire らの方法[2]に従って単離調製し、培養3-10日の細胞を実験に用いた。

2)CBCP-ECD system による測定（図1）　CBCP-ECD system による実験は既報[1,3]の方法に従った。即ち、2枚の membrane filterにはさまれた 3.5×10^{6} 個の細胞を 250μl の space に保持し、この cell bedをLocke's 溶液、2ml/min で灌流した。ACh による連続刺激を与える際は灌流液を ACh溶液に置き換えて与えた。また、HPLC用のループ式サンプルインジェクターを用いて 50 μl の刺激物質溶液を灌流液中に加えることによりパルス刺激を行なった。溶液は、pH 7.4, 30℃の一定条件とした。ECD systemは bas社製グラッシーカーボン電極と LC4B を用い、電極に450mV の固定電位を印加し、灌流液中に遊離されたCAに主として由来する電解電流（I/nA)を測定し、電流ー時間曲線として記録した。

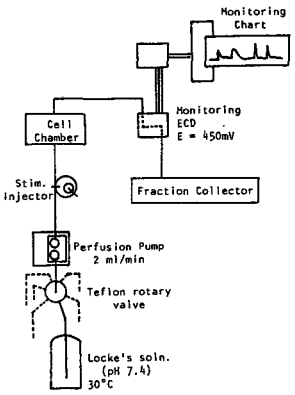


図1. CBCP-ECD system

［結果及び考察］

まずAChに対する連続刺激を行ない、分泌応答の不活性化状態においてKCl刺激を行なった。一定濃度のAch連続刺激に対して分泌応答の不活性化が応答ピークの1/3まで進んだ所（刺激開始1分後）で、100 mM KCl溶液によるパルス刺激を与えた。このKClパルス刺激による分泌応答の高さをcontrolであるAChパルス刺激前のKClパルス刺激による分泌応答の高さに対する比（Relative Response）で表わした所、図2のようになった。広範囲のACh濃度においてKClによる応答ピークが検出されたが、とくに10^{-5}M以上のACh濃度においてKClパルス刺激による応答の大きさは、コントロールに比べ、約2.5倍の大きさとなった。このことから、ACh刺激に対する分泌応答の不活性化はKCl刺激に対する分泌応答の不活性化とは異なる機構によって、引き起こされることと、単にCA貯蔵量の減少によるものではないことが明確となった。また、ACh刺激に対する応答の不活性化状態においてvoltage dependent Ca^{2+}channelsは影響を受けないことが推察された。

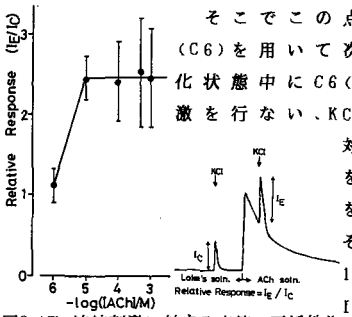


図2. ACh 連続刺激に対する応答の不活性化状態中でのKCl(100mM)パルス刺激の効果

そこでこの点についてAChのアンタゴニストであるhexamethonium (C6)を用いて次に検討した。ACh(10^{-4}M)連続刺激に対する応答の不活性化状態中にC6(5×10^{-4}M, 10^{-4}M)を含むKCl溶液(100mM)によるパルス刺激を行ない、KClのみのパルス刺激の場合と比較した（図3）。KCl刺激に対する応答ピークの大きさ(I KCl)をA,Bから求め、C6を含むKCl刺激に対する応答ピークの大きさ(I KCl+C6)をC,Dから求め、(KClとI KCl+C6を比較した（図3-2））。その結果、I KClとI KCl+C6は同じ値を示した((C6)=5×10^{-4}Mの場合、I KCl:I KCl+C6=1.15:1, (C6)=10^{-4}M の場合I KCl:I KCl+C6=0.982:1となった)。この様に、ACh刺激に対する不活性化においてC6によりACh receptor channelからのCa^{2+}の流入を阻害[4]してもKCl刺激に対する応答が阻害前と変わらないことから、ACh刺激に対する不活性化状態においてvoltage dependent Ca^{2+} channelは全く影響を受けないことがわかった。そしてさらにACh刺激に対する応答の不活性化は、主にACh receptor機能の不活性化であることが示唆された。

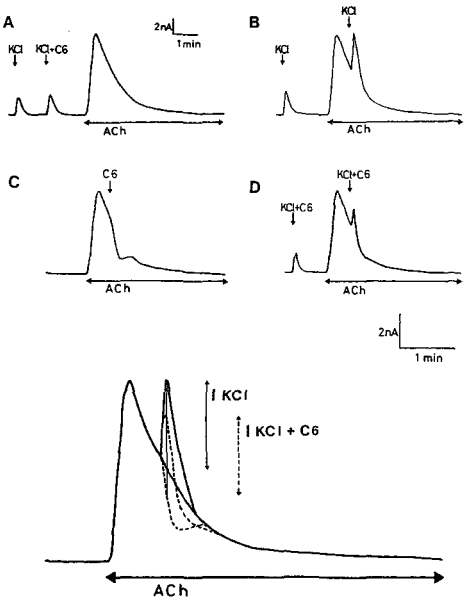


図3. ACh 連続刺激に対する応答の不活性化状態中でのKCl(100mM)パルス刺激の効果とそれに及ぼすC6(5×10^{-4}M)の効果

そこで、このことを考察するために、ACh刺激に対する不活性化化状態において、さらに高濃度のACh刺激を行ない、AChによる応答の不活性化におけるACh濃度依存性を調べた。ACh((ACh)1)連続刺激に対して応答が不活性化された時点において、さらにその5倍の濃度のACh((ACh)2)で連続刺激を行ない（図-4)、再び得られた応答の大きさを初めの応答の大きさに対する比（Relative Response: I2/I1）で表わしたのが図5-●である。その結果、ACh溶液が高濃度になるに従ってRelative Responseが小さくなり、5×10^{-4}M以上になると5倍の高濃度のACh溶液を作用させても再び応答しないことがわかった。この5×10^{-4}Mによる不活性化では、さらに10倍、20倍の高濃度のACh溶液を作用させても再び応答は得られ

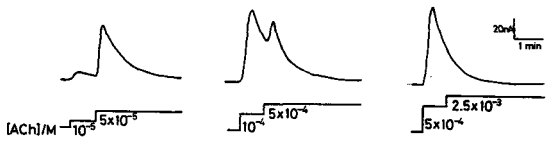


図4. ACh 刺激に対する応答の不活性化状態において、より高濃度のACh を加えたときの応答の再活性化

ない。一方、C6 10^{-4}M を加えたACh 5×10^{-4}M 溶液による不活性化において、さらに5倍の高濃度のACh のみの溶液で連続刺激を行なうと応答は現われる。以上のことから、5×10^{-4}M未満のACh 溶液による不活性化と5×10^{-4}M以上のACh 溶液による不活性化には、それぞれ異なる機構が関与していることが推察され、前者は ACh receptor channel が単に一過性に開閉することによるchannel の不活性化と考えられ、後者はACh receptor のrecognition siteの脱感作による不活性化であると考えられる。

さらに同様の実験を高Ca^{2+}(23mM) 存在下（図5-▲）、低Ca^{2+}(0.23mM) 存在下（図5-△）、Na^+free (NaCl をsucrose に置換) 下（図5-□）で行ない、AChによる応答の不活性化におけるCa^{2+} Na^+ の影響について検討した。低Ca^{2+}下では個々のACh 濃度での Relative Responseがcontrol(図5-●) に比較して大きくなり、逆に高Ca^{2+}下では小さくなり、Ca^{2+}はACh による分泌応答の再活性化を抑制することがわかった。Na^+free 下ではcontrol に比べて多少Relative Response が小さかった。しかし注目すべきことは、高Ca^{2+}においても、低Ca^{2+}においても、Na^+free 下においても、ACh が5×10^{-4}M以上になるとそれ以上高濃度のACh を作用しても再び分泌応答が現われなかった。従って、5×10^{-4}M以上のACh によるACh receptorのrecognition siteの脱感作は、Ca^{2+}, Na^+により有意な影響は受けないと考えられる。

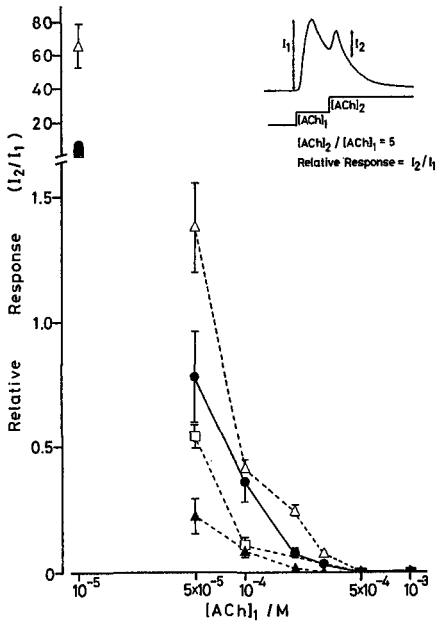


図5. ACh([ACh]1) に対する応答の不活性化状態においてその5倍の高濃度のACh ([ACh]2)刺激を加えた時の応答の再活性化（●）とCa（高Ca (23mM)(▲), 低Ca (0.23mM)(△)), Na(Nafree(□)）による影響

文献
1)熊倉鴻之助、小原美佳、中川豊、関谷真、藤原三二、佐藤弦. (1983) 神経化学、22,126-128.
2)Waymire,J.C.,Waymire,K.C.,Boehme,R.,Noritake,D. & Waedell,J. (1977) In: Structure and Function of Monoamine Enzymes,(eds. E.Usdin,N.Weiner and M.B.H.Youdim). Dekker, N.Y. pp.327-363.
3)小原美佳、中川豊、熊倉鴻之助. (1984) 神経化学、23,327-329.
4)Knight,D.E. and Kesteven,N.T. (1983) Proc.R.Soc.Lond.B.Biol.Sci. 218,177-199.

62. 大脳皮質シナプス膜のコリン作動性膜機能と膜コンホメーション
—Nicardipine の膜修飾作用—

関谷　真・迫　昭子　（上智大・生命科学研）

〔要　約〕

Dehydropyridine derivativeの多くは、K+voltage dependent Ca2+ channel blockerの作用がよく知られ、nicardipine も同様の作用がある。今回は nicardipineの中枢性作用として、大脳皮質シナプス膜コンホメーションに対する影響を検討した。膜コンホメーションの蛍光プローブ，1-anilinonaphthalene-8-sulfonate(ANS)を用いてラット大脳皮質シナプス膜で実験を行なった。その結果、nicardipine 量が　10-6M order でシナプス膜のmodulationがみられ、Ca2+によって安定化した膜構造に対して著明な作用を示すことが分かった。さらにnicardipine による膜　modulation は Acetylcholine receptor(AChR)を介するacetylcholine(ACh)のシナプス膜との反応に対してもその抑制作用が明らかとなった。これらのことから、上述のnicardipine の中枢性作用は、そのCa2+ channel blockerの働きとは異なる膜構造への直接的作用であることが示唆された。これらのnicardipine の作用に対して膜結合ANS の binding propertyはそのKm値を変えず、Vmaxを変えるものであった。以上の結果から、神経伝達のメカニズムに関する中枢シナプスに対するホルモンなどの endogenous factorの調節作用の有無が今後の検討さるべき興味深い課題と思われる。

Key word：
nicardipine,　membrane modulation,　synaptic membranes

Dihydropyridine derivativeの一つである nicardipineは、末梢性のK+ voltage depnendent Ca2+ channel blocker として知られている。nicardipine について Oguraら（１９８４）（３）が、ラット大脳皮質synaptosome について K+voltage dependent Ca2+ influxおよびtransmitter release(GABA) の抑制がみられなかったと報告しているが、一方で、Middlemissら（１９８５）（２）は nifedipine の作用としてCa2+のinfluxは抑制されないが、Ca2+ channel enhancer であるBay k8644 の作用にきっ抗することをrat frontal cortex slices で観察している。

そこで、nifedipineと同じdihydropyridine derivativeである nicardipineの中枢性作用についてCa2+ channel blockerとは異なる作用様態が考えられるのでその可能性についてラット大脳皮質シナプス膜で検討した。

［実験方法］われわれは、従来よりラット大脳皮質シナプス膜(synaptic membranes SM) のAcetylcholin receptor(AChR) を介したacetylcholine(ACh)による膜コンホメーション変化の動態について膜蛍光プローブ、1-anilinonaphthalene-8-sulfonate(ANS) を用いて研究してきた。ＳＭの調製はAzucurraらの方法（１）を多少変更して行なったもので、粗ミトコンドリア画分を０．２％ triton X-100 処理後、庶糖密度勾配遠心によって得られるものである。ＳＭは０．１M　tris-HCl buffer pH7.4 に懸濁した。ＡＮＳ５．４ｘ１０$^{-5}$ＭをＳＭに作用させると、励起３６０nmで４８０nm付近に著明な蛍光ピークがみられる。この蛍光強度変化を膜コンホメーションの動態として検討した。

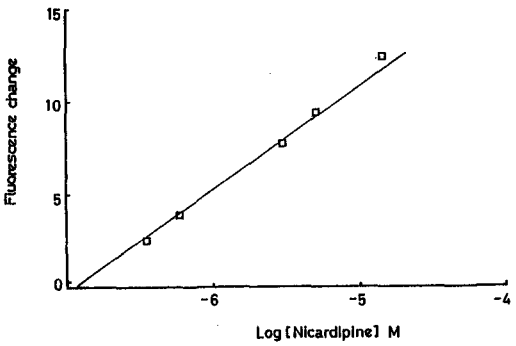
nicardipine は山之内製薬より供与のものである。水に溶解性であり、実験には水溶

液として用いた。

［結果と考察］１．nicardipine の作用：ＳＭ１００μｇ／３ｍｌにＡＮＳ５．４ｘ１０$^{-5}$Ｍを加えて、１cm lightpath quartz cellで前記の条件のもとに蛍光ピークの変動をHITACHI 204 fluoro-spectrometerにより観察した。

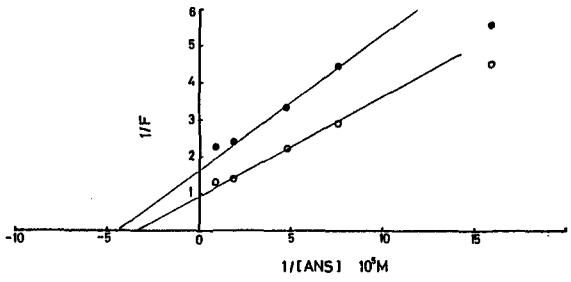
図１では nicardipineを２．４ｘ１０$^{-7}$Ｍより１．０５ｘ１０$^{-5}$Ｍの範囲でＳＭに作用させた時の蛍光強度の変化、すなわち、その減少を示した。濃度依存性のnicardipine 作用が観察された。図示されていないが蛍光強度変化から得られる nicardipineのＫｍ値は５．５ｘ１０$^{-6}$Ｍ程度であった。図２は、ＳＭについてのＡＮＳの binding properetyに対する nicardipine （５．４ｘ１０$^{-6}$Ｍ）の影響をみたものである。図のごとく、ＡＮＳの affinity は nicardipineの作用によって影響を受けず、約１．２ｘ１０$^{-5}$Ｍであったが、Ｖｍａｘを変動させた。このことは、nicardipine の作用点とＡＮＳ吸着部位が異なることを示すが、また、nicardipine によるＳＭ膜修飾（modulation）による膜コンホメーション変化を示唆する。

図１ Dose-Response of Synaptic Membrane to Nicardipine in terms of ANS Fluorescence Change



２．Ｃａ2+とnicardipine の作用：５ｍＭＥＤＴＡで処理したＳＭを0.1 M tris-HCL buffer pH7.4 で一晩 dialysis し、そのSMについて nicardipineの作用を観察した。図３に示されるごとくＥＤ－ＴＡ処理膜とその膜にCa2+(18mM)を添加した場合では明らかにANS結合のＶｍａｘは異なるが、Kmは変わらなかった。そこで、nicardipineをそれぞれＥＤＴＡ処理膜およびＣａ2+添加ＥＤＴＡ処理膜に作用させた場合、Ｃａ2+添加膜で nicardipineの作用が明らかであるが、ＥＤＴＡ処理膜ではその作用は顕著ではなかった。したがって、nicardipine作用はＣａ2+によってＳＭ膜がある一定の生理的条件を回復した場合にはじめて発現するのであるが、その結合部位の性質は詳まびらかではない。

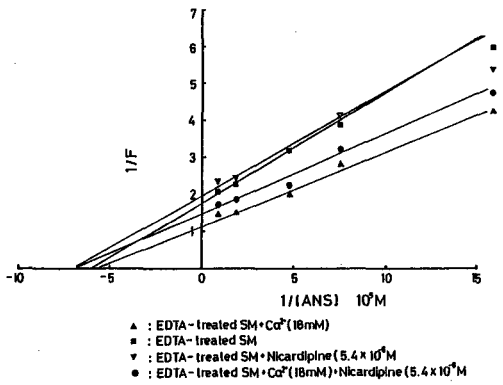
図２ Nicardipine Effect on ANS Binding



F : Fluorescence Intensity
● : Nicardipine
○ : Without drug

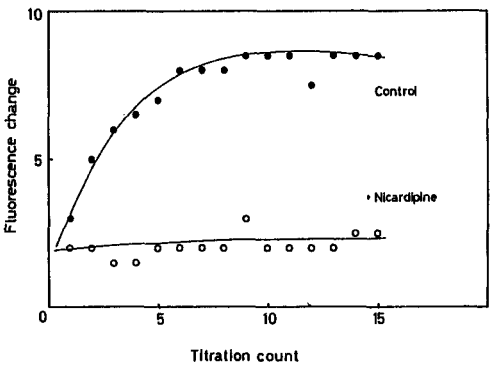
３．コリン作動生シナプス膜機能にたいするnicardipineの影響：nicardipineがSM膜に作用したときにそのコリン作動性機能に与えるnicardipineの影響を調べたのが図４である。以前われわれが報告したごとく（４）、ＡＣｈはＡＣｈＲを介してＳＭに作用し、シナプス膜のコンホメーションを変化させる。すなはちＳＭ suspensionにＡＣｈ titration（３．３ｘ１０$^{-4}$Ｍ）を実行すると、図４の ｃｏｎｔｒｏｌのごとくＡＮＳ蛍光を減少させる。しかし、このＡＣｈによる膜コンホメーション変化は nicardipine（５．４ｘ１０$^{-6}$Ｍ）を予め作用させた膜では抑制された。このことは nicardipineによる影響がＡＣｈのＡＣｈＲを介した神経伝達機序と関連するＳＭ膜コンホメーションの修飾作用であるといえるであろう。すなわち nicardipineの神経膜に対する作用は、必ずしもＫ+ voltage dependent Ca2+ channel blockerの作用のみではなく、Ｍｉｄｄｌｅｍｉｓｓらの示唆するごとく（２）ある膜状態に特に作用をする nifedipine の modulation effectと類似の作用と考えられる。

図３ Ca^{2+} Effect on Nicardipine Dose on Synaptic Membranes



これらのことから、シナプス膜が exogenous factor である nicardipineの修飾作用と同様に hormoneあるいは endogenous physiological peptides の調節作用を受けるであろうと推察される。われわれは昨年 vasopressinのＳＭに対する作用について報告したが（５）今後神経シナプス膜の可塑性あるいは神経シグナル細胞内伝達機構と膜コンホメーションとの関連で膜修飾作用の検討は興味深い問題である。

図４ Nicardipine Effect on Ach Reaction with Synaptic Membranes



［謝辞］ nicardipine 供与をこころよく承諾された山之内製薬に感謝します。

［文献］１．Azucurra,J.M, DeRobertis,E & Fiszer,S(1967) Brain Res.,5, 45 ２．Middlemiss, D.N & Spedding, M(1985) Nature 314(7), 94-96 ３．Ogura, A & Takahashi, M(1984) Brain Res., 301, 323-330 ４．関谷真、門田和広、三村千春、菊野正隆（１９８２）神経化学 ２１、９３－９５ ４．関谷真、迫昭子（１９８４） 神経化学 ２３、２１－２３

63. 実験的脳梗塞モデルラットの学習行動および脳内コリン作働性神経系活動について

成実重彦・清田義弘・永岡明伸 （武田薬品・中央研・生物研）

〔要　約〕

Microspheres（直径35±5μm）を左側内頸動脈内へ注入することにより作製した実験的脳梗塞モデルラット（脳梗塞ラット）の学習行動（受動的回避反応）ならびに脳内諸部位のCholine acetyltransferase（CAT）およびacetylcholinesterase（AChE）活性の変動を測定した。

その結果，脳梗塞ラットの受動的回避反応の獲得障害はmicrospheres注入3日後から認められ2週間後をピークとしてその後徐々に回復し，8週間後では偽手術群と同一レベルにまで回復した。Microspheres注入3日後および1～4週間後の脳梗塞ラット左側脳の海馬および後頭葉の大脳皮質のCAT活性は偽手術群の60～70％に低下した。注入8週間後では海馬のCAT活性は偽手術群の80％であり依然低下傾向を示した。しかし後頭葉およびその他の部位の大脳皮質のCAT活性はほゞ回復した。脳内AChE活性に対するmicrospheres注入の影響はCAT活性の変動とほゞ類似していた。

以上の成績から，このコリン作働性神経活動の変動と受動的回避学習の程度とが，時間的に良く一致していたことから，本モデルラットの学習障害に対し，大脳皮質と海馬領域におけるコリン作働性神経系特に中隔野－海馬コリン作働性神経系活動の低下が重要な役割を演じていると考えられる。

Key word：　Cerebral embolized rats，passive avoidance　choline acetyltransferase（CAT）

〔緒　言〕

人口の高齢化にともない老年痴呆患者の増加が，社会的な問題となり，向知能薬といわれる新しい分類の薬剤の開発が進められつつある。痴呆きたす疾患はAlzheimer病，Alzheimer型老年痴呆および血管性痴呆に代表されるが，わが国では特に脳血管障害による痴呆の占める割合が高く，老年痴呆の半数以上を占めている。

清田らはmicrospheresを内頸動脈内へ注入することによって作製した脳梗塞モデルラットの学習行動を受動的回避学習，能動的回避学習および水迷路学習課題を用いて調べ，本モデルラットが著明な学習障害をもつことを明らかにし，血管性痴呆モデル動物としての有用性を示唆した[4]。

本報告においては，同脳梗塞モデルラットのコリン作働性神経系の活動の指標としての脳内諸部位のCholine acetyltransferase（CAT）およびacetylcholinesterase（AChE）の活性変化を調べ，受動的回避学習障害との関連について検討した。

〔実験材料および方法〕

1. 脳梗塞手術

雄性Wistarラット（8～10週齢）を用い，エーテル麻酔下，頸部を切開し内頸動脈の支流である翼突口蓋動脈および外頸動脈を結紮し，総頸動脈の血流をクレンメで止めた状態で外頸動脈からポリエチレンチューブ（PE-50）を挿入し，20％ dextranに懸濁したcarbon microspheres（35±5μm）2,000個／50μℓを約10秒間かけてゆっくりと内頸動脈内へ注入した。Microspheres注入後クレンメをはずし，総頸動脈から内頸動脈への血流を再開した。対照群には同容量の20％ dextranを注入した（偽手術群）[4]。

2. 受動的回避学習

Step-through 型の受動的回避学習装置[1]を用いた。装置は床がグリッドになっている暗室（30×30×30cm）と40cm の高さから100Wの白色光で照明された明室（25×10×25cm）からなり，2室はギロチンドア（8×8cm）で仕切られている。ラットは獲得試行の約1時間前に馴化試行を施した。馴化試行では明るいコンパートメントにラットを入れ，10秒後にドアを開けラットの四肢が完全に暗いコンパートメントに入ったところでドアを閉め10秒間暗いコンパートメントに放置した後に取り出した。獲得試行は馴化試行の1時間後に行い，馴化試行と同様の操作で行ったが，ラットが暗いコンパートメントへ移動してドアを閉めると同時に床のグリッドから2.5mA の逃避不能な footshock を3秒間与えた。保持テストは明るいコンパートメントへ入れたラットが暗いコンパートメントへ移動するまでの潜時つまり受動的回避反応を示した時間を最大300秒まで測定した。最大測定時間（300秒）以上回避反応を示したラットについては300秒を記録した。脳梗塞手術後の各時期における受動的回避学習の獲得能力は手術3日，1，2，4および8週間後に別々のラットを用いて検討した。

3. Choline acetyltransferase（CAT）活性測定法

Fonnum 法[3]に準じて，50μMの1-〔^{14}C〕-acetyl CoA（0.02μCi），5mM choline，60mM NaCl，2mM EDTA，40μM physostigmine を含む50mM sodium phosphate buffer（pH 7.4）10μℓ および酵素標品（40μg／40μℓ の1% triton X-100を含む 0.32M sucrose の脳ホモゲネート）を37℃で10分間 incubate して測定した。

4. Acetylcholiesterase（AChE）活性測定法

Reed らの方法[5]に基づく Blume らの変法[2]を更に若干改変して用いた。

5. Adenosine-5-triphosphatase（ATPase）活性測定法

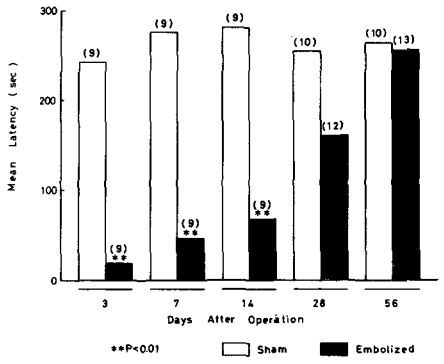
CAT と同じ酵素標品を用いて，5mMATP，5mM $MgCl_2$ を100mM Tris-acetate buffer（pH 7.5）中で37℃で20分間 incubate し，生成した無機燐を高橋法[6]に準じて測定した。

〔実験成績〕

1. 脳梗塞ラットにおける受動的回避学習反応

Microspheres（2,000個／50μℓ）注入により作製した脳梗塞ラットの受動的回避反応を，注入3日および1，2，4，8週間後の各時期において測定した。偽手術ラットはいずれの時期においても最大測定時間（300秒）に近い平均反応潜時を示したのに対し，脳梗塞ラットは注入2週間後までは著しく短い潜時を示した。しかし脳梗塞ラットの反応潜時は経時的に徐々に延長し，注入4週間後では依然短い傾向を示したものの有意な差は認められなくなり，8週間後では偽手術群のそれと比較しまったく差がなくなった（図1）。

図1 Microspheres 注入後の受動的回避学習反応の時間－経過

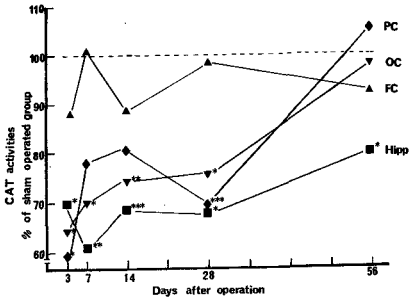


2. 脳梗塞ラットにおける脳諸部位の CAT 活性

図2に示すように，注入3日および1，2，4，8週間後の後頭葉の大脳皮質および海馬

のCAT活性は注入1週間後をピークとして著明に低下し，その後徐々に回復し8週間後には偽手術群のレベルにまで回復した。しかし海馬のCAT活性は注入8週間後でもまだ有意に低下していた。その他の脳部位（前頭葉，側頭葉の大脳皮質および線条体）のCAT活性はmicrospheres注入によってほとんど影響を受けなかった。

図2 Microspheres注入後の脳諸部位のCAT活性の変動の時間－経過



*P<0.05, **p<0.01, ***P<0.001 VS. 偽手術群

3.脳梗塞ラットにおける脳諸部位のAchE活性

CAT活性の場合とほゞ同様に，海馬，後頭葉および頭頂葉の大脳皮質のAChE活性は注入後1～2週をピークとして低下した。そして注入4～8週間後には偽手術群のレベルにまで回復し，その回復はCAT活性の場合より幾分早い傾向にあった。

4.脳梗塞ラットの海馬におけるMg^{2+}-dependent ATPase（Mg^{2+}-ATPase）活性

Microspheres注入3日，1～8週間後の海馬のMg^{2+}-ATPase活性は偽手術群のそれとほとんど差がなかった。

〔考　察〕

Microspheres注入による脳梗塞ラットでは大脳皮質（頭頂葉および後頭葉）と海馬でCATおよびAChE活性は低下するが，その変化は経時的に回復することがわかった。しかし，海馬での変化は長期間認められることから，主に中隔野－海馬のコリン作働性神経系の損傷が著しいことが示唆される。その海馬においてもMg^{2+}-ATPase活性はほとんど変動しないことから，脳組織が非特異的な損傷を受けているのではないと思われる。いずれにしてもこのコリン作働性神経活性の変動と受動的回避学習の程度とが時間的に良く一致していた事実から，本モデルラットの学習障害に対し，大脳皮質と海馬領域におけるコリン作働性神経系の活性の低下が重要な役割を演じていると考えられる。それ以外にも脳組織全体（特に大脳皮質および海馬）における化学伝達物質（特にモノアミン）およびmodulatorなどの変動も原因していると思われ，今後更に検討する必要がある。

〔文　献〕

1. Ader, R., Weijnen, J. A.W. M. and Moleman, P. : Psycho. Sci. 26, 125－128(1972)
2. Blume, A., Gilbert, F., Wilson, S., Farber, J., Rosenberg, R. and Nirenberg, M. : Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 67, 786－792 (1970)
3. Fonnum, F. : J. Neurochem. 24, 407－409 (1975)
4. Kiyota, Y., Miyamoto, M., Nagaoka, A. and Nagawa, Y. : Pharmac. Biochem. Behav. 24, (3) in press (1986)
5. Reed, D. J. Goto, K. and Wang, G. H. : Anal. Biochem. 16, 59－64 (1966)
6. 高橋　泰常：生化学 26, 690－698 (1955)

64. ヒト胃におけるムスカリン様アンタゴニスト ^{3}H-QNB 特異的結合の多様性とその機能的局在

山本　純*・津島宏美・正岡　昭*・松田友宏
（名古屋市大・医・薬理，第二外科*）

〔要　約〕

胃癌患者の外科的切除胃の正常部におけるムスカリン様アンタゴニスト ^{3}H−QNB(キヌクリジニルベンジレート）の結合について研究した。胃の平滑筋層と粘膜層のホモジェネートへの ^{3}H−QNB の非特異的結合は大差はなかったが，特異的結合は平滑筋層は粘膜層の数倍大であった。特異的結合のスキャッチャードプロットを胃の3区分（胃底部，胃体部，幽門部）について行った結果，いずれの区分でも，平滑筋層には1種の，粘膜層には2種の親和性の異なる結合部位があった。平滑筋層ではこれら3区分において K_D と B_{max} はほぼ等しい値を示した。粘膜層の高親和性結合の K_D は胃体部＞幽門部≒胃底部，B_{max} は胃体部≒幽門部＞胃底部であった。粘膜層の低親和性結合の K_D，B_{max} はいずれの区分においてもほゞ等しかった。ヒトの胃の各種 ^{3}H−QNB特異的結合の結合親和性（$1/K_D$），B_{max} 値はラットの対応する値の約1/6～1であった。

以上の結果より，ヒトの胃に胃の運動と消化という異なった機能を分担する平滑筋層と粘膜層にムスカリン様アンタゴニスト ^{3}H−QNBの多様な特異的結合が局在していることが明らかとなった。

Key word：Stomach, Muscarinic receptor, Muscarinic antagonist

我々はすでにラット胃においてムスカリン様アンタゴニスト ^{3}H−QNB特異的結合に親和性のことなる複数の結合部位（胃の平滑筋層には1種，粘膜層には2種，計3種）があることを明らかにした(2)。今回はヒトの外科切除手術胃の正常部における ^{3}H−QNB結合について検討し，ヒトの胃にも同様の多様性と局在を認めたので報告する。

＜方　法＞

手術前1週間にコリン作働薬あるいは遮断薬の薬物療法を受けていない胃癌患者(年令33～77才，n＝7）の胃を外科的治療の目的で切除後，直ちに氷冷し，研究用に1部を液体窒素で凍結させ，−40℃にて保存した。解凍後，ホモジェネートをグラス・グラスホモゲナイザーとポリトロンを用いて調整し(2)，Yamamura らの方法(3)により ^{3}H−QNB の結合実験を行った。インキュベーションは25℃，30分とした。胃癌が発生した胃の区分内で癌部から最も離れた正常部位を結合実験に用いた。癌部はいずれも病理学的診断を受けた。平滑筋層と粘膜層は眼科用ハサミとピンセットで剥離した。

Table 1. Non-specific and specific ^{3}H-QNB binding to the homogenates of the muscular and mucosal layers of human stomach.

	n	^{3}H-QNB binding(f mol/mg protein)			
		Non-specific	(S.D./Mean)	Specific	(S.D./Mean)
Muscular layer	7	20.3 ± 3.3	0.438	91.3 ± 8.6	0.250
Mucosal layer	7	31.3 ± 10.1	0.853	12.1 ± 3.2	0.694

Values are the mean ± S.E.. n: number of experiments. Concentration of ^{3}H-QNB used: 2 nM.

蛋白定量はホモジェネートをミクロ・ウルトラソニック（コンテス社）で均一にした後，BSAを対照としてLowryらの方法(1)によった。

＜結果および考察＞

表1は胃の平滑筋層と粘膜層のホモジェネートへの2nM ^{3}H−QNBの非特異的結合と特異的結合を示している。非特異的結合は平滑筋層と粘膜層とは大差がなかったが，特異的結合は平滑筋層は粘膜層より約8倍大であった。変異係数（S.D./mean×100）は両結合ともに粘膜層が平滑筋層より大であり，粘膜層では個体差あるいは部位差が大きいことを示していた。癌の多発部である胃体部のみについて集計したが，表2に示したように結果は上記と同様であった。

次に，^{3}H−QNB特異的結合のスキャッチャードプロットを胃の3区分（胃底部，胃体部，幽門部）について行った。図1に胃体部の平滑筋層と粘膜層の例を示した。ヒトの胃においてもいずれの区分でも，平滑筋層には1種の結合部位があり，粘膜層に

Table 2. Non-specific and specific ^{3}H-QNB binding to the homogenates of the muscular and mucosal layers from the corpus of human stomach.

		^{3}H-QNB binding(f mol/mg protein)			
		Non-specific	(S.D./Mean)	Specific	(S.D./Mean)
Muscular layer	5	21.3 ± 4.3	0.451	89.9 ± 22.1	0.246
Mucosal layer	5	36.7 ± 13.4	0.815	8.56 ± 3.26	0.852

Values are the mean ± S.E.. n: number of experiments. Concentration of ^{3}H-QNB used: 2 nM.

Fig. 1. Scatchard plots of specific ^{3}H-QNB binding to the homogenates of the corpus of human stomach.
a) Muscular layer, b) Mucosal layer.

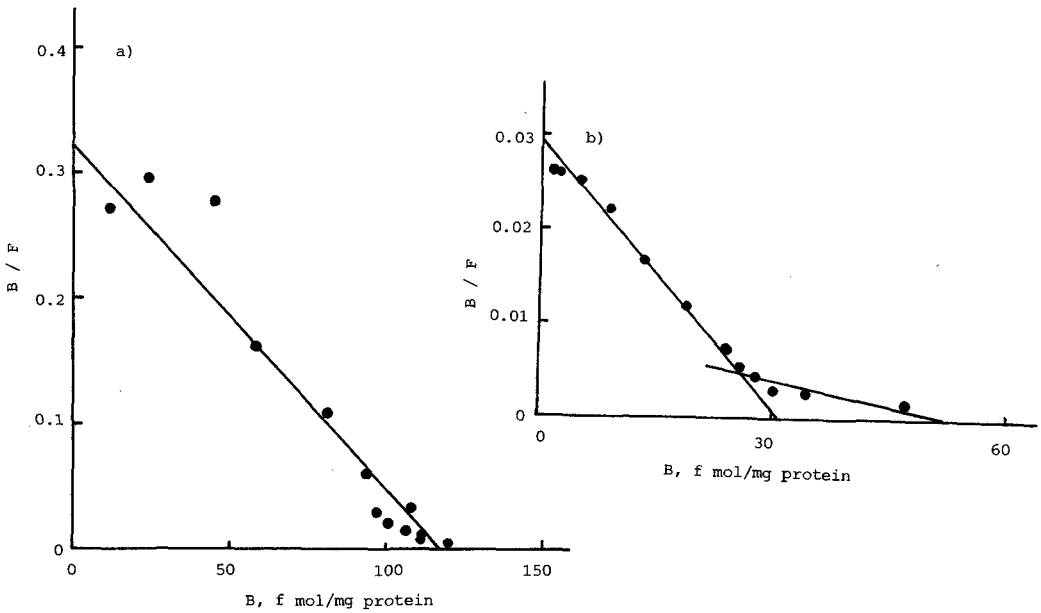


Table 3. Specific ^{3}H-QNB binding to the homogenates of the muscular and mucosal layers of various regions of human stomach.

Regions of stomach	Muscular layer		Mucosal layer			
			High affinity		Low affinity	
	K_D	B_{max}	K_D	B_{max}	K_D	B_{max}
Fundus	9.01 ± 0.66 (4)	83.5 ± 14.4 (4)	12.9 ± 5.2 (3)	4.6 ± 1.3[a] (3)	164 ± 52 (3)	12.4 ± 2.3 (3)
Corpus	8.88 ± 0.72 (6)	101 ± 13 (6)	44.8 ± 14.3[a] (6)	12.7 ± 4.7 (6)	183 ± 27 (5)	13.5 ± 3.4 (6)
Pylorus	11.6 ± 0.3 (6)	92.0 ± 8.9 (6)	15.9 ± 1.8 (6)	14.5 ± 2.2 (6)	164 ± 35 (4)	10.0 ± 3.4 (6)

All values for K_D(10^{-11}M) and B_{max}(f mol/mg protein) are the mean ± S.E.. (n): number of experiments.
a: $P < 0.05$, compared to Pylorus.

は2種の結合部位があることを示していた。表3にこれらK_D，Bmaxをまとめた。平滑筋層ではこれら3区分において大差なく，K_Dは9～12×10^{-11}M，Bmaxは80～100 fmol/mg proteinとほぼ等値を示した。一方，粘膜層の高親和性K_Dは胃体部＞幽門部≒胃底部であり，B_{max}は胃体部≒幽門部＞胃底部であった。胃底部の粘膜層のB_{max}は他の粘膜層の約1/3であった。粘膜層の低親和性結合の区分差はK_DにもBmaxにも認められなかった。

以上のヒトの胃の各種K_D，Bmaxをラットの相対応する値(2)と比較すると，ヒトの胃の平滑筋層では結合親和性もBmaxもラットの約1/3であった（ラットの胃平滑筋のK_D = 3.7 ± 1.2 × 10^{-11}M，Bmax = 304 ± 38 fmol/mg protein）。ヒトの胃の粘膜層の高親和性結合の結合親和性は胃底部と幽門部ではラットとほぼ等しく，胃体部ではラットの約1/4であった（ラット胃粘膜層の高親和性結合のK_D = 11.9 ± 3.9 × 10^{-11}M）。ヒトの胃の粘膜層の高親和性Bmaxは胃体部と幽門部においてラットの約1/2，胃底部では約1/6であった（ラット胃粘膜層の高親和結合のBmax = 30 ± 15 f mol/mg protein)。しかし，ヒトの胃の粘膜層の低親和結合は3区分ともK_D，Bmaxがラットとほぼ等値であった。

以上の結果より，ヒトの胃にも親和性のことなる^{3}H－QNB特異的結合部位が平滑筋に1種，粘膜層に2種局在することが明らかとなった。ヒトの胃の各種K_D，Bmaxはラットの対応する値のほぼ等値か数分の1以内の差であった。本研究で用いた正常部が癌部とどうことなるか目下検索中である。

REFERENCES

1) Lowry, O. H., Rosebrough, W. J., Farr, A. L., and Randall, R. J.(1951) J. biol. Chem. 193,265-275
2) Yamamoto, J., Tsushima, H., Masaoka, A., and Matsuda, T. (1984) Bull. Japan. Neurochem. Soc. 23, 27-29
3) Yamamura, H. I. and Snyder, S. H.(1974) Mol. Pharmacol. 10, 861-867

65. ラット胃におけるムスカリン様アンタゴニスト ^{3}H-QNB の特異的結合能のストレスによる減弱

山本　純*・津島宏美・正岡　昭*・松田友宏
（名古屋市大・医・薬理，第二外科*）

〔要　約〕

ラット胃におけるムスカリン様アンタゴニスト^{3}H−QNB（キヌクリジニルベンジレート）の特異的結合能に対する拘束水浸ストレスの影響について検討した。ストレスにより胃全体，平滑筋層，粘膜層の湿重量ならびに胃全体，平滑筋層の蛋白量には変化はなかったが，粘膜層の蛋白量は約70％に減少した。胃平滑筋層のホモジェネートに対する^{3}H−QNB特異的結合のK_Dは約2倍に増大し，結合親和性が約1/2に低下し，B_{max}は約15％減少していた。胃粘膜層ホモジェネートに対する^{3}H−QNB特異的結合は高親和性結合に関してはK_D，B_{max}がともに増大する傾向を示し，低親和性結合ではこれらがともに減少する傾向を示したが有意ではなかった。

以上の結果は，ラットを拘束水浸ストレスにかけると，胃の平滑筋層では^{3}H−QNBの特異的結合の親和性の減弱と最大結合量の減少がおこり，粘膜層では総最大結合量の減少がおこることを示していた。胃の運動と消化という異なる機能を有する平滑筋層と粘膜層がこのムスカリン様アンタゴニストの結合能において異なった様式の調節を受けている可能性が示された。

Key word：　Stress, Stomach, Muscarinic receptor

高等動物の消化管はAChを伝達物質とするコリン作働性優位の中枢神経支配下にあり（3），ストレスによるコリン作働性緊張亢進によりストレス潰瘍が発生することが知られている。マウスに寒冷ストレスをかけると，小腸のムスカリン様アンタゴニスト（^{3}H−QNB）の最大結合量が減少することが報告されている（4）。最近我々はラット胃において，平滑筋層には1つ，粘膜層には2つ，計3つの親和性の異なる^{3}H−QNB特異的結合部位があることを明らかにしたが（5），今回はこれら3種の結合部位の拘束水浸ストレス時の変動について検討した。

＜方法＞ウィスター系雄性ラット（8週齢，体重270～330g）を用いた。拘束水浸ストレスは，Takagiらの方法（2）に準じ，24～25℃の水槽で4時間水浸させた。メスで胃を平滑筋層と粘膜層に分け，ホモジェネートを調整した。^{3}H−QNB結合実験はYamamuraらの方法（6）によって行い，インキュベーションは25℃，30分と

Table 1. Effects of the stress on the wet weight and amount of protein of the muscular and mucosal layer of stomach

	Control rats	Stressed rats
Wet weight(g)		
Total	1.22 ± 0.02(11)	1.18 ± 0.03(9)
Muscular	0.62 ± 0.03(11)	0.60 ± 0.02(9)
Mucosal	0.60 ± 0.03(11)	0.58 ± 0.02(9)
Protein(mg)		
Total	183 ± 5(7)	153 ± 6(9)[a]
Muscular	75.9 ± 3.8(8)	73.9 ± 2.4(9)
Mucosal	111 ± 5(10)	79.1 ± 5.6(9)[a]

a: $P<0.05$, compared to control rats. All values are the mean ± S.E..
(n): number of experiments.

した。蛋白定量はLowry らの方法（１）によった。

＜結果と考察＞

拘束水浸ストレスによりほゞ全例に肉眼的な胃潰瘍の発生をみとめた（１例のみ潰瘍の発生なし）。潰瘍の数は１～７コであり，平均3.5±0.8（n＝8）コであった。表１に示したように，対照ラットの胃全体の湿重量は1.22±0.02gであり，平滑筋層（0.62±0.03g）と粘膜層（0.60±0.03g)の湿重量はほゞ等しかった。ストレス群の胃の各層の湿重量に変化は認められなかった。一方，胃全体の蛋白量は対照群で183±5mgであったが，ストレス群では153±6mgとなり，対照の約85％に減少していた。ストレス群の平滑筋層の蛋白量は対照群と変らなかったが，粘膜層の蛋白量は対照群の約70％に減少していた。図１に胃平滑筋ホモジェネートにおける^{3}H−QNB特異的結合のスキャッチャードプロットを示した。図１aの対照例に比べ，図１bのストレス例ではSlopeがより緩やかになり，横軸との交点B_{max}が減少していた。表２に示したようにストレス群の$K_D = 7.37 \pm 0.83 \times 10^{-11}$Mであり，対照群（$K_D = 3.65$

Fig. 1. Scatchard plots of specific ^{3}H-QNB binding to the homogenates of the muscular layer of stomach.
a) Control rat, b) Stressed rat.

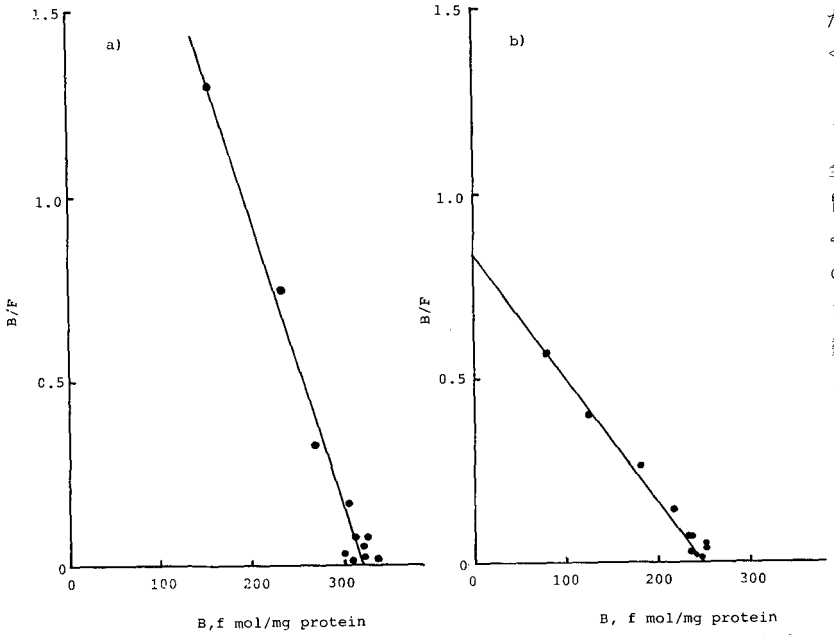


Table 2. Effects of the stress on specific ^{3}H-QNB binding in the homogenates of the muscular layer of stomach.

	n	$K_D(10^{-11}M)$	B_{max}(f mol/mg protein)
Control rats	6	3.65 ± 0.49	304 ± 16
Stressed rats	9	7.37 ± 0.83[a]	263 ± 8[a]

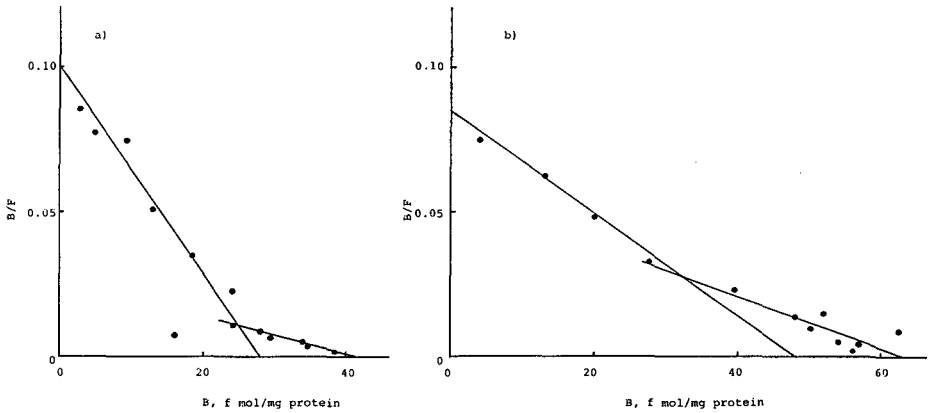
a: P<0.05 , compared to control rats. All values are the mean ± S.E..

Table 3. Effects of the stress on specific ^{3}H-QNB binding in the homogenates of the mucosal layer of stomach

	n	High affinity		Low Affinity	
		K_D	B_{max}	K_D	B_{max}
Control rats	8	11.9 ± 1.4	29.5 ± 5.2	111 ± 30	14.5 ± 3.6
Stressed rats	8	17.4 ± 2.6	40.7 ± 4.8	53.9 ± 12.0	10.7 ± 3.2

All values for $K_D(10^{-11}M)$ and B_{max}(f mol/mg protein) are the mean ± S.E..

Fig.2. Scatchard plots of specific ^{3}H-QNB binding to the homogenates of the mucosal layer of stomach.
a) Control rat, b) Stressed rat.



$\pm$ 0.49 $\times$ 10^{-11}M）の約2倍に増大し，結合親和性が約1/2に低下していた。B_{max}は蛋白mg当りストレス群では263 $\pm$ 8 fmolに対し，対照群は304 $\pm$ 16 fmolであり，ストレス群では約15％減少していた。図2は胃粘膜層ホモジェネートへの^{3}H−QNB特異的結合のスキャッチャードプロットを示している。Slopeがより急な高親和性結合については，図2aの対照例に比べ，図2bのストレス例ではSlopeがより緩やかになり，B_{max}の増大が認められた。表3にこれら粘膜層の結合実験の結果を集計したが，高親和性結合部位に関しては，ストレス群ではK_D，B_{max}がともに増大する傾向を示し，低親和性結合部位では逆にこれらがともに減少する傾向を示したが，いずれも有意ではなかった。ストレス群の胃粘膜層の蛋白量は対照の約70％に減少しており，胃の粘膜層の^{3}H−QNBの総最大結合量は減少していると考えられる。

以上の結果はラットを拘束水浸ストレスにかけると胃の平滑筋層ではムスカリン様アンタゴニスト^{3}H−QNBの結合親和性の減弱と蛋白mg当りの最大結合量の減少がおこり，粘膜層では総最大結合量の減少がおこることを示していた。胃の運動と消化という異なる機能を有する両層がムスカリン様アンタゴニストの結合能において異なった様式の調節を受けている可能性が示された。

REFERENCES

1) Lowry, O. H., Rosebrough, W. J., Farr, A. L., and Randall, R. J.(1951) J. biol. Chem. 193, 265-275
2) Takagi, K., Kasuya, Y., and Watanabe, K.(1964) Chem. Pharm. Bull. 12, 465-472
3) Taylor, P.(1980) in The Pharmacological Basis of Therapeutics(Gilman, A. G.,Goodman, L. S.,and Gilman, A., eds) 6th Ed, p.211, MacMillan, New York
4) Uchida, S., Takeyasu, K., Noguchi, Y., Yoshida, H., Hata, T., and Kita,T.(1978) Life Sci. 22 2197-2203
5) Yamamoto, J., Tsushima, H., Masaoka, A., and Matsuda, T.(1984) Bull. Japan. Neurochem. Soc. 23 27-29
6) Yamamura, H. I. and Snyder, S. H.(1974) Mol. Pharmacol. 10, 861-867

66. 培養星状膠細胞の老化とガングリオシド

阿相皓晃・武藤紀子・原田　寧・金本和男・平野修助
(東邦大・医・生理)

〔要　約〕

脳の初代培養星状膠細胞と何回も継代操作を重ねて長期間培養した細胞で膜糖質のひとつであるガングリオシドについて検討した。初代培養星状膠細胞に含まれるガングリオシドの主なものは GM_3, GD_3, GD_{1a} であり，何回も継代を重ねて長期間（165日）培養したいわゆる老化星状膠細胞でもガングリオシドの分子種構成にはほとんど変化がみられなかったが，培養後期になるに伴い GD_3 が増加していることがわかった。またモノクロナール抗体（AbR_{24}）を用いた免疫組織化学法で染色したところ初代培養星状膠細胞（生後21日目から11日間培養）よりも長期間培養した老化細胞（9回継代操作165日間培養）では GD_3 の存在を強く示した。

このことから GD_3 の増加は培養星状膠細胞の老化機構との関連に強くかかわっているのかもしれない。

Key word :　Astroglia,　Agingcell,　Ganglioside,

星状膠細胞を使用した培養系で脳細胞の老化と細胞膜の関係を膜の重要な構成成分である糖脂質（ガングリオシド）の動態から追求することを目的として，この膜糖脂質の機能と老化との関係を解析しようとした。

〈実験方法〉

1）培養方法：星状膠細胞は生後21日目のラット脳よりこれまでの方法(1)で分離培養し，細胞が増殖してシャーレ底面に一杯になれば，0.25%トリプシンで処理して細胞をバラバラにし新しいシャーレに植え換え，何回も継代操作（Passage No.）を繰り返して長期間培養し続けたものを用いた。

2）ガングリオシドの分析：初代培養星状膠細胞または Passage No. の異なる細胞（蛋白量にして5～10 mg）からのガングリオシドの抽出は *Tettamanti* らの方法(3)に従い，テトラヒドロフランで抽出した後 HPTLC 上で分離固定し，ガングリオシドの分子種構成を島津クロマトスキャンナーを用いて調べた。シアル酸の定量は Warren 法(4)で，また蛋白量の定量はガングリオシド抽出後の残渣について Lowry 法に従って行なった。

3）培養細胞の免疫組織化学：ガングリオシドに対する特異染色は Dr. K. O. Lloyed（N.Y）より寄与された AbR_{24} (D_3) のモノクローナル抗体で固定した。(2)

〈実験結果〉

生後24日目のラット脳から11日間培養した初代培養の星状膠細胞は一般的には平ら

な紙のような形態をしたものや Fig. 1a に示したような線維の非常に豊富は形態を示しているものとがあった。これらの細胞は，GFAP 抗体でよく染まり，わずかながら AbR_{24} の抗体でも染色された。(Fig. 1b) 一方，初代培養組胞から分離した継代数を重ねながら長期間培養し続けた細胞 (Passage. No. 9，165日間培養) では Fig. 2a に示したように非常に分化の進んだ形態を示し，GFAP 抗体による染色性は弱く，しかしながら AbR_{24} の抗体で多くの細胞は陽性を示した。(Fig. 2b)

次に，これらの細胞から抽出したガングリオシドを薄層クロマトグラフィーの上で調べたところ初代培養星状膠細胞の場合と (Fig. 3a) 継代数を重ねながら長期間培養を続けたいわゆる老化細胞ではガングリオシドの分子種の構成にはほとんど変化が認められなかった。(Fig. 3b) さらにクロマトスキャンナーを用いて調べてみると初代培養星状膠細胞に比べて，165日間培養した老化細胞では相対的に GD_3 が増加し，GM_3 が減少していた。(Fig. 4a，Fig. 4b)

〈考察〉

脳の細胞の老化に伴って生じる物質的な変化に関する報告はこれまで少なかったが，今回，我々が初代培養細胞から長期間継代を重ねて培養した細胞で，細胞膜脂質2分子層に局在するガングリオシドの GD_3 が老化に伴って著しく変化していることを示唆した成績は，細胞膜糖脂質機能が細胞の老化と密接な関係をもっていることを強く示唆するものと思われる。これらの細胞は継代培養を続けていく間に染色体変質を起こして株化細胞になる可能性も十分にあることから，現在染色体の解析も行なっているが，いずれにしても増加した GD_3 が星状膠細胞の老化に特異的であるかどうかについて，乏突起膠細胞，または神経細胞の初代培養期 (I期)，増殖期 (II期)，休止期 (III期) で比較検討することで，GD_3 の増加のメカニズムと細胞老化機能の関連性について検討していく計画でいる。

REFERENCES

1) Asou,H. and Brunngraber,E.G. (1984) Neurochem. Int. 6, 81-89.
2) Pukel,C.S., Lloyd,K.O. (1982) J.exp.Med. 155, 1133-1142.
3) Tettamanti,G. et al., (1973) Biochem.biophys. Acta. 296, 160-170.
4) Warren,L. (1959) J. biol. Chem. 234. 1971-1975.
5) Rösner,H. (1980) Analyt. Biochem. 109, 437-442.

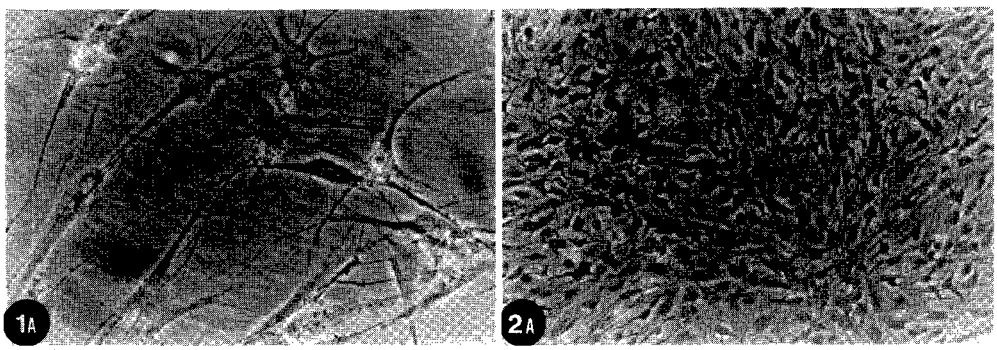
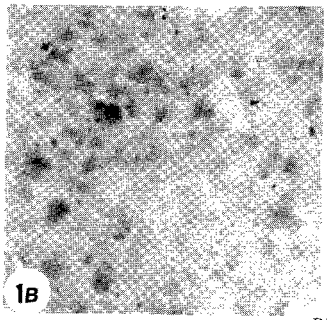


Fig.1**A,B**: Phase-contrast micrographs of 11-day-old growing astrocytes(1A) and 9th-passaged cells(1B).



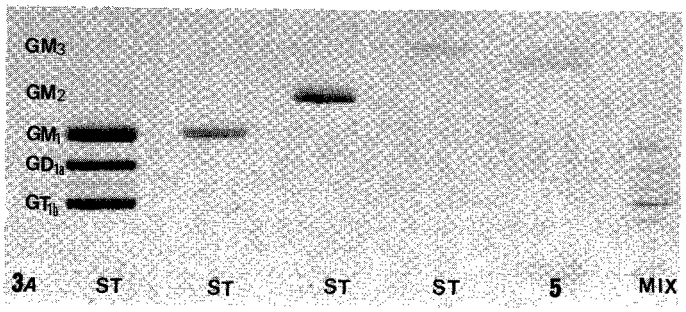
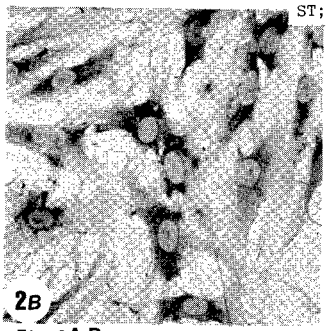


Fig.3**A,B** : Thin layer chromatograms of separated gangliosides obtained from primary astrocytes(3A-5) and 9th-passaged cells(3B-5).
ST; standard gangliosides, MIX; 5 day cultured cells from fetal rat brain



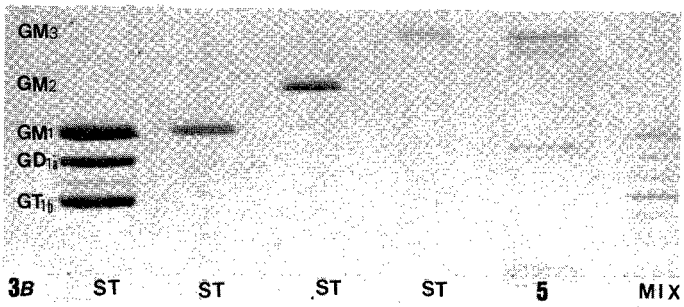


Fig.2**A,B** : Immunoperoxidase stain for GD3 in primary astrocytes(2A) and 9th-passaged cells(2B).

Fig.3**A,B**; The separation of the gangliosides was achieved by the TLC method using chloroform-methanol-0.25% $CaCl_2$-29% NH_4OH (60:36:8:0.25,v/v/v/v) as the developing solvent(5)

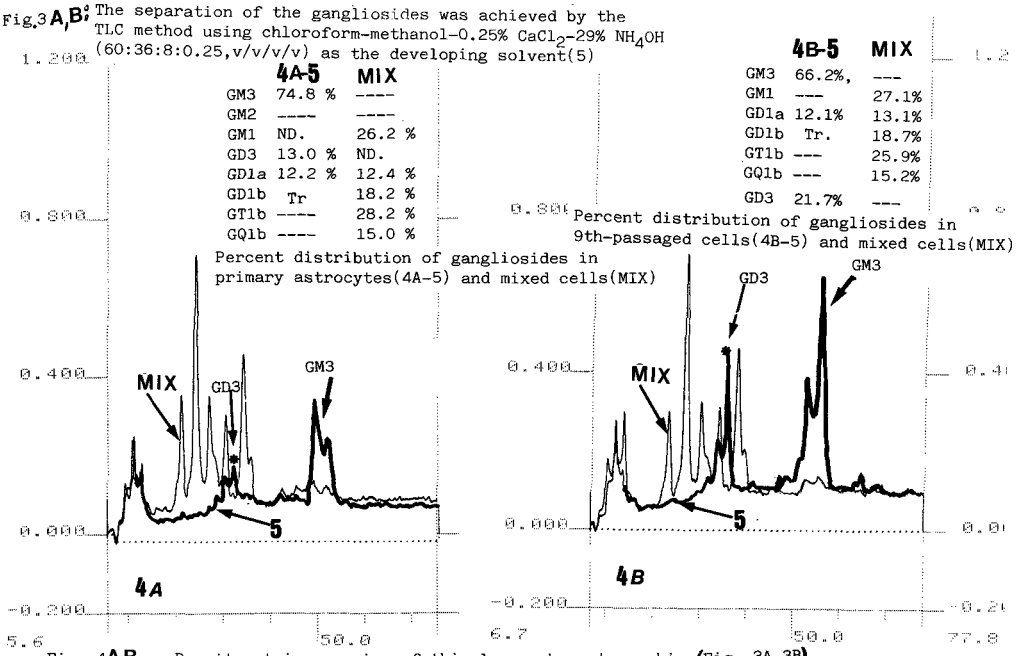


Fig. 4**A,B** : Densitometric scanning of thin layer chromatographies(Fig. 3A,3B) of gangliosides isolated from primary cultured astroglial cells(4A-5) and 9th-passaged cells(4B-5). MIX; 5 day cultured cells from fetal brain,

67. α－アミノアジピン酸のグリア毒性について

加藤　聖・根岸晃六　（金沢大・医・神経情報研）

〔要　約〕

グリアのマーカー酵素であるグルタミンシンセターゼ（GS）活性を指標として、コイ網膜におけるα－アミノアジピン酸（α-AAA）のグリア毒性について検索した。初めにGSに対する特異的抗体を作製し、網膜におけるGSの局在を免疫組織化学的に調べたところ、網膜内唯一のグリア細胞であるミューラー細胞に限局していた。次いで、L-α-AAA 8μmolを眼球内に注射し、網膜GS活性を4時間～3週間に亘り追跡した。活性は速やかに減じ、投与後1～2日で最大30%まで減少した。その最小有効濃度は約0.5 μmolであった。他方D型異性体（D-α-AAA）はL型に比し、約1/3の力価であった。またL-α-AAAの眼球内投与後の網膜可溶性タンパクと未処置コントロール網膜のそれと、SDS-PAGEにより比較すると、投与後5～7日目に、L-α-AAA処置網膜では、有意に減少するタンパクと、コントロール群で看取できないタンパクが出現、ないしは増加するのが見られた。イムノブロット法により、コイ網膜GS（分子量約45KD）タンパク自体もL-α-AAA処置により減少していた。しかしL-α-AAAによるGSの生化学的変化は、投与後3～4週でほぼ正常レベルにまで回復した。L-α-AAAの影響を電気生理学的に調べると、投与1日後の網膜において、ERG-b波（ミューラー細胞由来）は完全に消失していたが、S-電位（水平細胞由来）はほぼ正常に記録できた。以上の事実から、L-α-AAAは選択的に網膜グリア細胞に作用し、一過性に細胞を障害するものと思われた。

Key word：　fish retina, α-aminoadipic acid, gliotoxin

［序］

興奮性アミノ酸のグルタミン酸アナローグであるα－アミノアジピン酸（α-AAA）のグリア毒性について、近年注目があつめられている。網膜においても、一過性にERG－b波の消失や、網膜グリア細胞であるミューラー細胞の選択的破壊等が報告されている（1、2、3）。しかしながら、形態学的および電気生理学的（ERG）研究に比し、α-AAAに関する生化学的実験は殆ど皆無である。そこで本研究では、コイ網膜を用い、グリアのマーカー酵素の1つであるグルタミンシンセターゼ（GS）活性を指標に、α-AAAのグリア毒性の細胞特異性やその作用について検索した。

［実験方法］

i）実験材料　体重600～800 gの成熟コイを用い、PBS(-)液にて溶かした種々の濃度のα-AAA 50 μlを眼球内に1回ないし、2日間計2回注射し、α-AAA処置網膜を4時間～3週に亘り、GS酵素活性、SDS-PAGEによる可溶性タンパクの変化および電気生理学的実験に供し、未処置網膜のそれらと比較した。

ii）抗GS血清の作製　ヒツジ脳から精製されたGS（シグマ社　typeⅢ）を抗原とし、ウサギを免疫し、その抗GS血清を得た。

iii）免疫組織化学　FITC-conjugated 抗ウサギIgGを用い間接抗体法にて蛍光顕微鏡にて観察した（4）。

iv）GSアッセイ　コイ網膜を10 mMイミダゾール（pH 7.2）、0.5 mM EDTA，5 mMβ－メルカプトエタノール、0.5 mM PMSFバッファにてホモジナイズ、27,000xg、1時間4℃で遠心し、その上清（50～60μgタンパク）を粗酵素標品とし、L-[^{14}C]グルタミン酸からグルタミンへの変換をDowex 1 x 4樹脂を用い分離し、そのカウントを測定した（5）。

v）<u>イムノブロット</u>　SDS-PAGEにて電気泳動した網膜可溶性タンパクを、Towbinらの法（６）に従い、ニトロセルロース膜上に移し、GS抗体にて処理した後、アビジン－ビオチン法にて発色させた。

vi）<u>電気生理学</u>　コイ網膜を剥離し、灌流下に銀－塩化銀電極にてＥＲＧを、ガラス微小電極を水平細胞に刺入し、その光応答電位（S-電位）を記録した（７、８）。

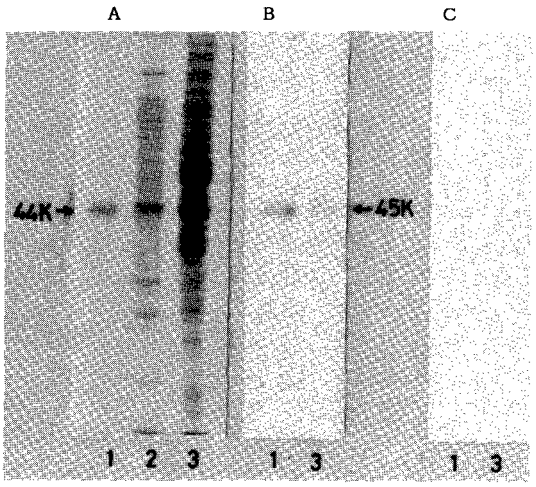


Fig. 1

［結果］

<u>抗体の特異性</u>　得られた抗血清と網膜粗酵素標品とをアガロース寒天上にて拡散させると、特異な沈降線が粗酵素の容量依存性に観察され、プレ血清とはクロスしなかった。ヒツジ GS を SDS-PAGE すると分子量44KDの単一バンドが得られ（Fig. 1A-1）、ニトロセルロース膜に移し抗血清と反応させても同じ44KDのバンドのみが見られた（Fig. 1B-1）。他方、コイ網膜粗酵素標品をSDS-PAGEした後（Fig. 1A-3）、ニトロセルロース膜上に移し抗血清と反応させると分子量45KDの単一バンドが観察され（Fig. 1B-3）、プレ血清とでは何ら呈色しなかった（Fig. 1C）。次に、コイ網膜粗酵素標品と抗血清とを１晩反応させ、10,000xg 30 分遠心した後、その上清（sup）中の GS 活性を測定したところ、抗血清の濃度に依存し、完全に GS 活性が抑制され（Fig. 2）、更にこの反応沈査（ppt）をSDS-PAGEにて解析したところ、分子量45KDのメジャータンパクが観察された（Fig. 1A-2）。更にこの抗 GS 血清を用い間接免疫組織化学を行なったところ、コイ網膜ミューラー細胞に限局し染め出された。よって網膜のグリアマーカーとして GS が良いことが判明したので、このGS活性を指標に、α-AAAのグリア毒性について検索した。

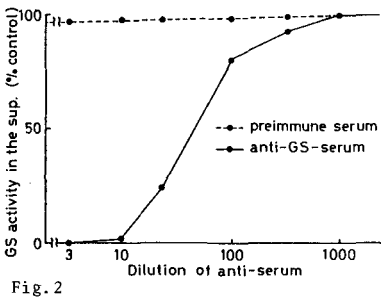


Fig. 2

<u>α-AAAによる網膜 GS 活性の減少</u>　L-α-AAA（8 μmol）眼球内１回投与（●）により、網膜 GS 活性は顕著に減じ、投与後１～２日で70％減じた（Fig. 3）。また、この GS の減少は投与後３～４週でほぼコントロールに回復した。この傾向は２日間２回投与群（○）でも見られた。一方D-α-AAAはＬ型に比し作用は弱く、25％ GS 活性が減じたにすぎなかった。また、L-α-AAAの最小有効濃度は約 0.5μmol であった。

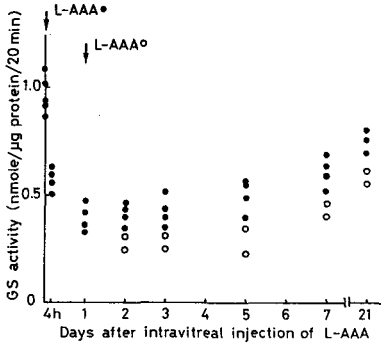


Fig. 3

<u>L-α-AAAの網膜可溶性タンパクに及ぼす影響</u>　GSタンパクを含む網膜粗酵素標品（可溶性タン

パク）に及ぼすL-α-AAAの影響をコントロール群と比べて調べたところ、L-α-AAA投与後５～７日に顕著に減少するタンパク（Fig. 4A-3、●）と増加ないしは新しく出現するタンパク（▲）とが見られた。この変化は投与後３～４週網膜ではほぼコントロールに復していた。また、イムノブロット法により、明らかにGSタンパク自体もL-α-AAA投与により減少していた（Fig. 4B）。

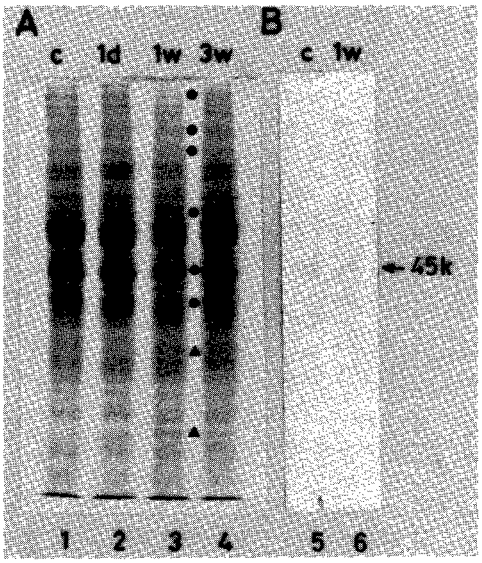


Fig. 4

<u>電気生理学的実験</u>　L-α-AAA投与１日後ERG-b波は完全に消失していたが、S-電位はほぼ正常に記録できた（Fig. 5B）。

［考察］

私達は既に、２～４ mMのL-α-AAAがC6グリオーマ細胞に対し cytotoxicに働き細胞死をもたらすことを培養実験で報告してきた（９）。そこで今回、このL-α-AAAのグリア毒性を in vivoで確かめるためコイ網膜を用い検索したところ、C6細胞での実験とほぼ同程度の濃度でグリアマーカー酵素であるGS活性やGSタンパクを一過性に減少させ、また、ERG-b波も完全に消失させた。しかしながら視細胞や水平細胞の電気活動はほぼ正常に記録できた。以上の事実からL-α-AAAは特異的に網膜ミューラー細胞に働き、一過性に細胞障害をもたらすものと結論した。

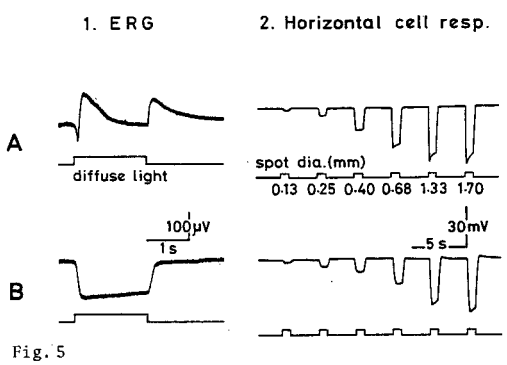


Fig. 5

［参考文献］

1. Olney, J. W., O.L. Ho, and V. Rhee (1971) Exp. Brain Res. <u>14</u>: 61-76.
2. Pederson, O. O, and R. Lund Karlsen (1979) Exp. Eye Res. <u>28</u>: 569-575.
3. Szamier, R. B., H. Ripps, and R. L. Chappell (1981) Neurosci. Letter <u>21</u>: 307-312.
4. Prusiner, S., and L. Milner (1970) Anal. Biochem. <u>37</u>: 429-438.
5. Negishi, K., S. Kato, T. Teranishi, H. Kiyama, Y. Katayama, and M. Tohyama (1985) Brain Res. (in press).
6. Towbin, H., T. Staeehelin, and J. Gordon (1979) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. <u>76</u>: 4350-4354.
7. Kato, S., and K. Negishi (1978) Exp. Eye Res. <u>26</u>: 363-376.
8. Kato, S. (1979) Exp. Eye Res. <u>28</u>: 627-639.
9. Kato, S., H. Higashida, Y. Higuchi, S. Hatakenaka, and K. Negishi (1984) (1984) Brain Res. <u>303</u>: 365-373.

68. 培養グリオーマ細胞に及ぼす forskolin の影響

本田千穂・田渕和雄・入江恵子・福岡高宏
三野章呉・吉岡純二・植田清隆・大本堯史
（香川医大・脳神経外科）

〔要　約〕

細胞内 cyclic AMP（cAMP）の上昇をもたらす諸因子により glioma 細胞に分化が誘導されることはよく知られている。今回我々は、cAMP 合成酵素である adenylate cyclase の活性化物質として注目されつつある forskolin（FK）の培養 glioma 細胞に及ぼす影響を検索した。ヒト glioblastoma 由来の KY 細胞を用い、増殖曲線の変化及び colony 形成法により、FK の増殖抑制並びに殺細胞効果を判定した。一方、flow cytometry により細胞周期に及ぼす影響を検討するとともに、細胞の形態学的変化を光顕並びに電顕レベルで観察した。また、二次元電気泳動法により、細胞の水溶性蛋白分画の変化の検討も併せて行った。FK を培養液中に添加することにより濃度依存性に増殖抑制効果が認められたが、10μM 以上ではそれ以上濃度を上げても効果の増強はみられず、100 μM の高濃度でも完全な増殖停止には至らなかった。一方、100 μM の高濃度 24 時間作用でも殺細胞効果は全く認められず、DNA histogram 上特定の細胞周期でのブロックはみられなかった。また、FK 処置により細胞突起は延長し、形態学的に細胞分化の傾向が認められた。さらに、ヌードマウス皮下移植 KY 細胞に対する効果も検討した結果、FK 1mg／kg／day 連続 10 日間腹腔内投与により約 50％の腫瘍縮小効果が得られた。

Key word：Forskolin，glioma cells，growth inhibition

［はじめに］

Forskolin は、ネパール、インド地方に自生するシソ科の植物 Coleus forskohlii の芋から抽出、精製された物質である。古来この芋は、心臓病や、不眠、ひきつけなどに有効な民間薬として用いられており、forskolin はその中の心筋収縮増強物質として発見された[1)]。その後の研究により、forskolin の作用は、cyclic AMP（cAMP）合成酵素、adenylate cyclase の活性化に基づくものであることが明らかとなった[4, 5)]。しかし、forskolin は、従来の adenylate cyclase 活性化因子とは全く異なる新たな活性化因子として注目されつつある。一方、細胞内 cAMP の上昇をもたらす諸因子により、グリオーマ細胞には分化が誘導されることが知られている[3)]。今回我々は、培養グリオーマ細胞に及ぼす forskolin の影響を、細胞の形態変化と、増殖、DNA 合成および水溶性蛋白分画の観点から検索し、さらに in vivo での腫瘍縮小効果についても併せて検討し、興味ある成績を得たので、若干の考察を加えて報告する。

［材料および方法］

用いた細胞は、我々がヒト glioblastoma 症例より確立し、継代維持している KY 細胞である。細胞は、10％牛胎児血清および抗生物質を含む Eagle's minimum essential medium を培養液とし、Falcon プラスチックシャーレ（3002, 3003）を用いて、37°C、5％炭酸ガス中で静置培養を行った。Forskolin（Scripps Laboratories）は、99.5％エタノールに溶解し、エタノールの最終濃度が 0.5％になるように培養液中に加えた。コントロールには 0.5％のエタノールを含む培養液を用いた。まず、forskolinの細胞増殖に及ぼす影響を検討した。1×10^5 個の細胞をシャーレに接種し、24 時間後に forskolin を含む培養液に交換し、そのまま培

養液を交換することなく培養を続け、24時間ごとに細胞数を算定して、細胞増殖曲線を作成した。次に、colony formation assayにより、forskolinの殺細胞効果を判定した。細胞が対数増殖期にある時期に、forskolinを含む培養液に交換し、24時間培養したのちcolony形成能をみた。生細胞率は、コントロールとforskolin処置細胞のcolony形成数の比より求めた。また、forskolinの細胞周期に及ぼす影響を調べるため、10 μMのforskolinを作用させた細胞を経時的に遊離して、flow cytometerによるDNA histogramの観察を行った。DNAの染色は、Ethidium bromideを用いたVindelφv[9]らの方法によって行い、G_0+G_1、S、G_2+M、各周期の全細胞数に対する割合は、Friedの式によるコンピューター処理によって算出した。また、forskolinを作用させた細胞の形態学的変化を、光顕および電顕的に観察した。さらに、O'Farrell[6, 7]の二次元電気泳動法により、水溶性蛋白質地図の変化についても検討を行った。in vivoでは、ヌードマウスの皮下にKY細胞を移植し、腫瘍が小指頭大となった時点より連続10日間、forskolin 1 mg/kg/dayを腹腔内投与し（n＝12）、投与終了後3日目に腫瘍の湿重量を測定し、コントロール群（n＝9）と比較した。

Fig. 1

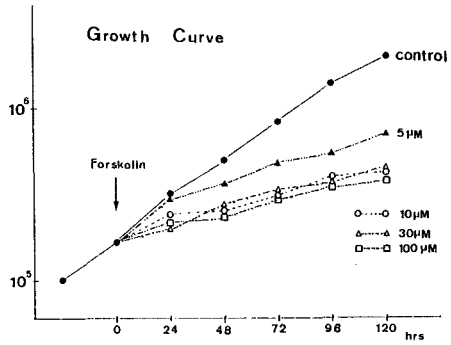
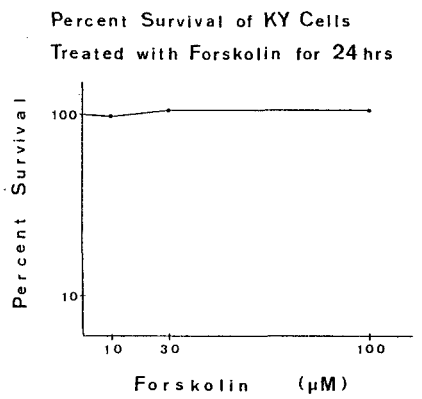


Fig. 2



[結果ならびに考察]

細胞増殖曲線の変化をみると、forskolinは、KY細胞に対し、10 μM以下の濃度で濃度依存性に増殖抑制効果を示した。しかし、10 μM以上では、さらに濃度を上げても効果の増強はみられず、100 μMの高濃度でも完全な増殖停止には至らなかった（Fig. 1）。一方、colony formation assayによる殺細胞効果の検討では、100 μMの高濃度24時間処置でも、生細胞率の低下はみられなかった（Fig. 2）。これらの結果から、forskolinの増殖抑制効果は、cytotoxicではなく、もっぱらcytostatic effectによるものと考えられる。

次にforskolinの細胞周期に及ぼす影響について、Fried[2]の式により、G_0+G_1、S、G_2+M期各周期の細胞数の割合を求めてみると、G_2+M期細胞の割合の軽度増加（コントロール13％、forskolin処置48時間後19％）が認められるものの、その変化は著明ではなかった。時間経過を追ってDNA histogramの変化をみると、多倍体細胞の出現が観察され（Fig. 3）、したがって、上述のG_2+M期細胞のみかけ上の増加は、4CをG_0+G_1期とし、8CをG_2+M期とする4倍体細胞の出現によるものと考えられる。この結果から、forskolinのcytostatic effectは、特定の細胞周期でのブロックではなく、細胞回転全体の進行遅延、停止作用によるものと推察される。

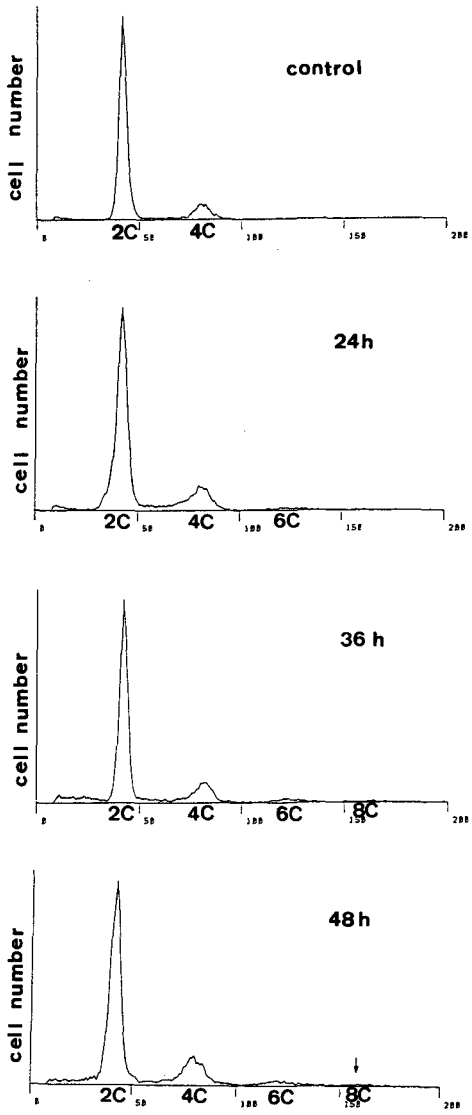
細胞の形態学的変化を観察してみると、forskolin処置により、細胞の胞体が小さくなり、

細い突起を長く延して、正常のグリアにより近い形となり、形態学的に細胞分化が誘導されたものと考えられる。

また、forskolin 処置細胞と無処置細胞で、二次元電気泳動法による水溶性蛋白質地図を比較してみると、数個の蛋白スポットは、forskolin 処置後著明に増加したが、一部のスポットでは減少がみられた。cAMP の上昇を C6 グリオーマ細胞に引き起こすことにより、S−100蛋白などの増加がみられることが報告されており[3, 8]、KY 細胞でも、forskolin 処置による adenylate cyclase の活性化により、種々の蛋白分画の増加あるいは減少が誘導されることが判明したが、こうした変化が、細胞の分化、増殖抑制に深く関与しているものと思われる。

In vivo の実験では、腫瘍重量は、コントロール群 1.54 ± 1.21 g、forskolin 投与群 0.81 ± 0.53 g と、forskolin 投与により、腫瘍湿重量で 47％の腫瘍縮小効果が認められた。Forskolin は生体内投与により、血圧低下や心拍数増加を来すことが知られている[4, 5]。さらに、実際の glioma 症例では血液脳関門の存在も問題となるが、今回の実験から、forskolin のグリオーマ細胞に対する増殖抑制効果は、in vitro だけでなく in vivo でも発現されることが明らかとなり、forskolin が有望な抗グリオーマ作用物質となる可能性が示唆されたものと考えられる。

Fig. 3 Chronological change of DNA histogram of KY cells treated with Forskolin (10 μM)



[文献]

1. Dubey, M.P. et al (1974) Indian J. Pharmacol. 6: 15
2. Fried, J. et al (1976) J. Cell Biol. 71: 172
3. 北島哲子, et al (1984) 神経化学 23: 321
4. Lindner, E. et al (1978) Drug Res. 28: 284
5. Metzger, H. et al (1981) Drug Res. 31: 1248
6. O'Farrell, P.H. et al (1975) J. Biol. Chem. 205: 4007
7. O'Farrel, P.H. et al (1977) Cell 12: 1133
8. Tabuchi, K. et al (1982) J. Neuro. Sciences 56: 57
9. Vindelφv, L. (1977) Virchows Arch. B. Cell Path. 24: 227

69. ラット胎児脳細胞初代培養系に対するグリア腫細胞の条件培地（GCM）の Neuronotrophic Effects

松岡一郎・佐藤嗣道・栗原堅三　　（北海道大・薬・薬剤）

〔要　約〕

ラット胎児脳細胞の初代培養系に対するグリア腫細胞の条件培地（ＧＣＭ）の効果を形態的あるいは、生化学的指標を用いて解析し、以下の結果を得た。　１）ＧＣＭの存在により、血清非存在下でも胎児脳細胞の生存が長期的に維持され細胞の増殖、分化が観察された。２）ＧＣＭ存在下では、細胞のCholine acetyltransferase （ＣＡＴ）活性、Acetylcholinesterase（ＡＣｈＥ）活性、Glutamate decarboxylase（ＧＡＤ）活性が著しく増加したが、Tyrosine hydroxylase（ＴＨ）活性はほとんど増加しなかった。３）ＧＣＭを比較的低濃度（＜３０μｇ蛋白／ｍｌ）で与えた場合、細胞の増殖より、むしろ神経繊維の伸張、ネットワークの形成が促進されたが、比較的高濃度（＞５０μｇ蛋白／ｍｌ）で与えた場合には細胞の増殖が促進され、神経細胞以外に、アストログリアも多数観察された。　４）Cytosine arabinofuranoside（Ａｒａ－Ｃ）を加え増殖する細胞（主にグリア）を抑制した条件下でも、ＧＣＭにより神経繊維のネットワーク形成が著しく促進された。これらの結果は、ＧＣＭには、中枢の神経細胞に直接作用して、その生存、分化を長期的に促進する因子が含まれることを示している。

Key word：Neuronotrophic factor, Glioma-conditioned medium, Brain neuron

〔はじめに〕

神経系における微細な細胞構築は、発生過程での細胞間の特異的な相互作用によりなされると考えられている。その代表例が、主に末梢神経系に働く神経成長因子（ＮＧＦ）の作用である（９）。これに対し、中枢神経系に作用する因子（神経栄養因子）については、限られた報告（４，５）を除いて、その物質的実体、あるいは神経細胞の成長、分化に対する作用のメカニズムなどがほとんどど明らかにされていない。

従来、グリア腫細胞、Ｃ６を培養して得られた条件培地（ＧＣＭ）には、末梢神経細胞に作用しコリン作動性分化を引き起こす神経栄養因子が含まれていることが知られている（３，７）。今回、我々は中枢神経系の発生のモデルとなるラット胎児脳細胞初代培養系においても、ＧＣＭが直接、神経細胞に作用して、その生存を促進し、コリン作動性分化を引き起こす可能性を明らかにしたので報告する。

〔実験方法〕

条件培地：Ｃ６細胞は、5 μg/ml トランスフェリン、5 μg/ml インスリンを含むＤＭＥ：Ｆ１２（１：１）からなる無血清培地で、マイクロキャリアー(Cytodex 3) を用いて旋回培養した。その培養液を限外濾過膜(cut off M.W. 10,000) で２００倍に濃縮してＧＣＭとした。

初代培養：妊娠１６－１７日のラット胎児脳より大脳部位を切り出し髄膜を取り除いた後、細切し、トリプシン処理(0.25%, 37°C, 15 min) により細胞を分散させ、これを1.5-2.0x10^5cells/cm^2の密度でポリリジンコートしたプラスチックシャーレにまいた。無血清培養には、20μg/ml トランスフェリンを含む改変Ｎ　培地をもちいた。

生化学的測定：シャーレ上の全細胞を集め少量の緩衝液中で超音波処理した後、蛋白

量および、各種酵素活性を測定した。ＣＡＴ活性はFonnumの方法（２）、ＧＡＤ活性はWilson等の方法（８）、ＴＨ活性はWaymire 等の方法（６）、ＡＣｈＥ活性はEllman等の方法（１）により測定した。

［結果および考察］

ＧＣＭ非存在下の無血清培養では、胎児脳細胞の生存は不安定であり、その多くが培養開始後、7-14日で死滅した（図1A）。一方、ＧＣＭ存在下では、細胞の増殖が著しく促進され、飽和密度に達した後、１５－２０日で随所に神経節様の細胞凝集塊を形成し、その周囲に放射状の繊維束を伸展した（図１Ｄ）。このとき、細胞凝集塊の内部、その周囲、および繊維束中にグリア繊維が、また繊維束中にはニューロフィラメントが、それぞれ間接蛍光抗体法により、多数観察された。そして、３０日を越えて安定に培養することができた。

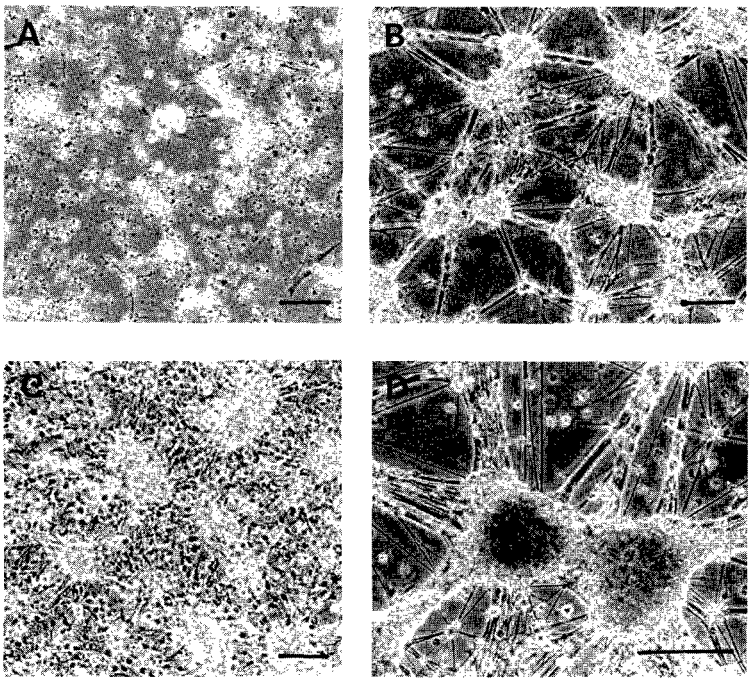


図１．無血清培養下のラット胎児脳細胞。培養開始後、８日（A，B，C），または２２日（D）。ＧＣＭ濃度：0(A), 4.4(B),133(C),70 μg/ml (D)．　Ｂａｒ，100 μm.

ＧＣＭ存在下では、細胞の増殖、分化に伴ってＣＡＴ活性、ＧＡＤ活性、ＡＣｈＥ活性が日数依存的に著しく増加したが、ＴＨ活性はあまり増加しなかった(Table I)。ＣＡＴ活性の増加はＧＣＭ中の因子が中枢においてもコリン作動性神経分化を促進することを示唆する。また、ＧＡＤ活性、ＡＣｈＥ活性の増加については、コリン作動性神経の成長、分化に伴う２次的なTrophic effects （栄養効果）も考えられる。

このような胎児脳細胞の形態的および生化学的分化に対するＧＣＭの作用には特徴的な濃度依存性がみられた。すなわち、比較的低濃度のＧＣＭ（＜３０μｇ蛋白／ｍｌ）を与えた場合細胞の増殖より、むしろ神経繊維のネットワークの形成が短期

Table I. Effects of GCM on Transmitter-Related Enzymes of Fetal Rat Brain Cells in Culture.

Enzyme	Days in Culture	Activity (pmol/min/dish) Control	+ GCM
CAT	27	0.88 ± 1.25	44.8 ± 7.7
GAD	27	1.02 ± 0.82	30.8 ± 15.8
TH	32	4.00 ± 0.57	5.80 ± 0.12
AChE	22	n. d.	9090 ± 1340

GCM: 56-90 ug prot./ml.　　n. d.: not detected.

間（１０日以内）に観察された（図１Ｂ）。また、存在する細胞（蛋白）当たりのＣＡＴおよびＧＡＤ活性（比活性）の増加もこの低濃度のＧＣＭにより飽和した（図２Ｂ、Ｃ）一方、比較的高濃度（＞５０μg蛋白／ml）のＧＣＭを与えた場合は細胞の増殖が顕著であり、グリア繊維が多数観察された（図１C)また、特にＧＡＤの比活性は高濃度のＧＣＭにより減少する傾向を示した（図２Ｃ）。そこで、増殖するグリア細胞を抑制するために、培養開始後 3-4日目より１日間、10 μM Ara-Ｃを胎児脳細胞に与えて、その形態を観察した。ＧＣＭ非存在下では、Ara-Ｃ処理により多くの細胞が死滅したが、ＧＣＭ存在下ではAra-Ｃ処理後、かなりの細胞の死滅にもかかわらず、２－３日で神経繊維のネットワークが形成された。また、この条件ではグリア繊維はほとんど観察されなかった。これらのことは、ＧＣＭ中には、２種の因子が存在し、このうち第１の因子は直接、神経細胞に作用し、その形態的および生化学的分化を促進することを示唆する。また第２の因子は、神経あるいはグリア細胞の増殖を促進し、高濃度のＧＣＭ存在下での神経細胞の分化には、グリア細胞を介した２次的なTrophic effectsも含まれると考えられる。

大脳部位に加えて、中脳部位の細胞に対しても、同様なＧＣＭによる無血清培養下での細胞の生存、ＣＡＴ活性の増加作用がみられた。従って、ＧＣＭの末梢での作用を合わせ考えると、ＧＣＭ中の神経栄養因子は広くコリン作動性神経の生存、分化に共通な基本的役割を担っている可能性が高い。

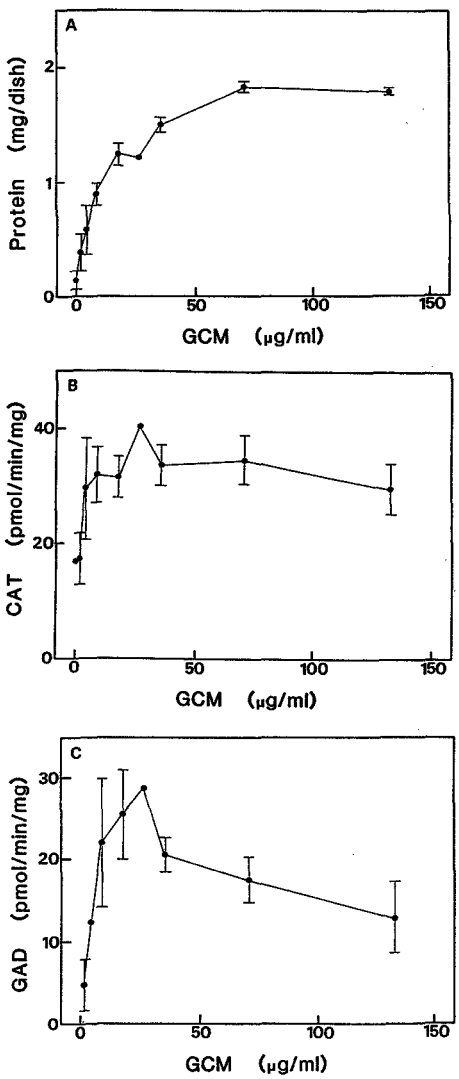


図２．ラット胎児脳細胞の蛋白量(A)，ＣＡＴ比活性(B)，ＧＡＤ比活性(C) 増加のＧＣＭ濃度依存性。培養開始後８日目

[References]

(1) Ellman, G. L. et al. (1961) Biochem. Pharm. 7, 88-95.
(2) Fonnum, F. (1975) J. Neurochem. 24, 407-409.
(3) Matsuoka, I. et al, (1985a, b) Dev. Brain Res. in press
(4) Muller, H. W. et al. (1984) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81, 1248-1252.
(5) Ojika, K. & Appel, S. H. (1984) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81, 2567-2571.
(6) Waymire, J. C. et al. (1971) Anal. Biochem. 43, 588-600.
(7) Weber, M. J. (1981) J. Biol. Chem. 256, 3447-3453.
(8) Wilson, S. H. et al. (1972) J. Biol. Chem. 247, 3159-3169.
(9) Yankner, B. A. & Shooter, E. M. (1982) Ann. Rev. Biochem. 51, 845-868.

70. TPAによるヒトグリオーマ細胞リン脂質代謝の変化

桃井真里子・粕谷淳子*・桃井　隆*
（自治医大・小児科，国立武蔵療・神経センター・疾病5部*）

〔要　約〕

ヒト神経芽細胞腫IMR-32細胞，及びヒトグリオーマ由来MGC細胞を用いて，カルシウム－脂質依存性キナーゼ（Cキナーゼ）を活性化するTPAのリン脂質代謝への影響を調べた。TPAはIMR-32細胞には影響を与えず，MGC細胞のリン脂質代謝に顕著な影響を与えた。1 ng/mlという低濃度のTPAでも，15分以内の時間に，フォスファチジルイノシトール（PI）の合成を抑制し，フォスファチジルエタノールアミン（PE）及びフォスファチジルコリン（PC）の生合成を促進した。（50 ng/mlのTPAで約2時間，処理すると，PIは2－3倍減少し，PE，PCは約5－10倍増大した)。

他のCキナーゼ活性化物質，テレオシジン及びメゼレインでも同様の効果が観察され，1α 25 dihydroxyvitamin D_3では効果がないことから，PEPCの生合成に関与する酵素，すなわち，ジアシルグリセロールエタノールアミンフォスフォトランスフェラーゼと，ジアシルグリセロールコリンフォスフォトランスフェラーゼ，がCキナーゼを介して活性化される可能性が示唆された。

Key word：　TPA, Phospholipids, C-kinase

緒論

12－0－tetradecanoylphorbol－13－acetate(TPA)は，マウス皮膚の発癌プロモーターとしてだけでなく，ヒト白血病細胞，ヒト神経芽細胞腫の分化誘導因子としても，広く知られている。最近，西塚らにより，TPAがジアシルグリセロール（DG）の代わりとして，カルシウム脂質依存性キナーゼ（Cキナーゼ）を活性化することが，報告された(1)。Cキナーゼは，脳に豊富に存在し，特に前シナプスに局在する。最近，Cキナーゼに対する抗体により，白質オリゴデンドログリア様細胞や，アクソンにも存在することが明らかになり，脳を構成する細胞におけるCキナーゼの生理的役割が注目されている(2)。今回私達は，ヒト神経芽細胞腫（IMR-32）及びヒトグリオーマ細胞（MGC）を用いて，TPAのリン脂質代謝に及ぼす効果を検討した。

方法

培養；IMR-32，MGC細胞は5％ FCSを含むF－10培地の下，CO_2培養器中で，培養した。

^{32}P標識リン脂質の調製；IMR-32，MGCの細胞を，リンを含有しないDMEM培地（透析FCSを含む）下で約1時間培養したのち，10 μCi ^{32}Pの添加とともに，TPA，テレオシジン，メゼレイン，1α 25 dihydroxyvitamin D_3，あるいは，EGFを加え，15，30，60，120分間反応させた。10％ TCAを加えて反応を停止したのち，細胞をPBSにて，3回よく洗滌し，クロロホルムメタノール（2：1　v/v）にて脂質を抽出した。0.5 N塩酸を加えて，Folch分配を行ない，下層を更に3回，0.5 N塩酸／メタノール（1：1　v/v）にて，洗滌後，下層中の^{32}P含有量を測定した。

薄厚クロマトグラフィー；下層中の一定量を薄層プレートに添加し，クロロホルム／メタノール／酢酸／水（50:30:4:2 v/v/v/v）にて一次展開し，よく風乾後，クロロホルム／メタノール／ギ酸（65:25:10 v/v/v）にて二次展開した。展開後，－80℃にて，X線フイルムに感光し，リン脂質各スポットを薄層プレートよりかきとり，カウントを測定した。

結果

MGC，IMR-32の細胞を，TPA（10 ng/ml）と2時間培養するとTPA処理MGCは，無処理のMGCに対し，^{32}Pのリン脂質への取り込みは約2倍ほど高かった（図1）。一方，IMR-32では，有意の差は観察されなかった。薄層クロマトグラフィー（TLC）による分析の結果，この増大は，主にフォスファチジルエタノールアミン（PE）とフォスファチジルコリン（PC）への^{32}Pのとりこみ増大に由来することが明らかとなった(図2)。

TPAの濃度を，1 ng/ml～50 ng/mlと変化させて，MGC細胞及びIMR-32細胞と約1時間反応させると，MGC細胞では，フォスファチジルイノシトール（PI）の減少に伴ない，TPAの量に対応して，PE及びPCが2－10倍増大した。一方，IMR-32では，TPA 50 ng/mlにても，リン脂質への影響は見られなかった（図3）。

またMGCにおけるPIの減少が，分解の促進によるものか，あるいは合成の抑制によるものかを検討する目的で，MGCを^{32}P含有培地にて，あらかじめ，1時間培養したのち，培地を変え，^{32}Pの含まぬ培地下で，TPA（50 ng/ml）を加え，15，30，60，120分間反応させた。その結果，PIの減少は，観察されず，PE，PCの増大のみが観察された。

TPA同様，Cキナーゼを活性化することで知られるテレオシジン(10ng/ml）及びメゼレイン（10 ng/ml）は，TPAと同様に，PE，PCの増大，及びPIの減少をもたらした。しかしながら，Cキナーゼとは無関係な，マウス発癌プロモーターである，1α 25 dihydroxyvitamin D_3は，PE，PCの代謝に全く影響を及ぼさなかった。（図4）。

Fig. 1

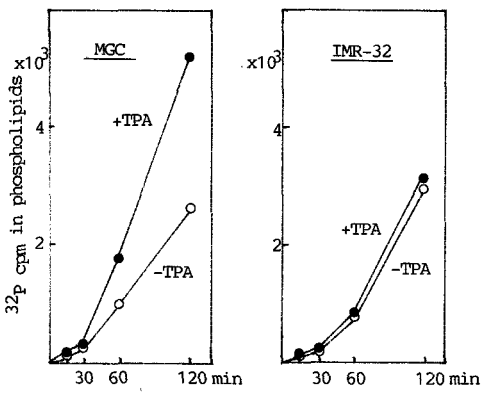


Fig. 2

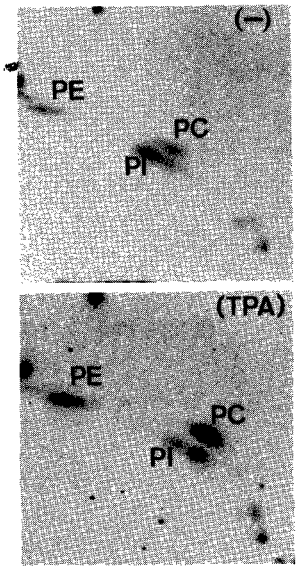


Fig. 3

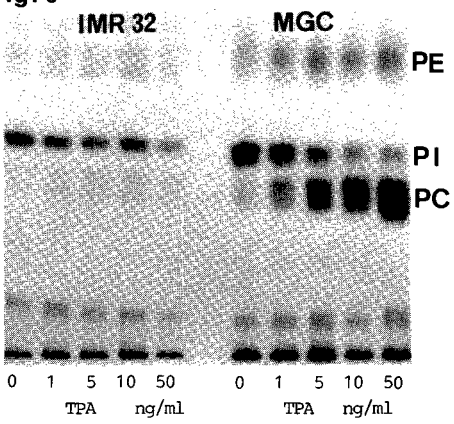
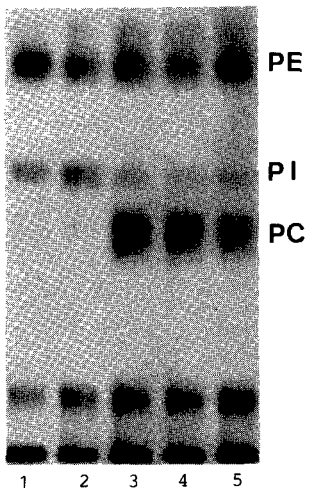


Fig. 4



1. untreated MGC 2. 1α25(OH)$_2$D$_3$
3. TPA 4. Teleocidine
5. Mezereine

考察

ヒトグリオーマ細胞におけるリン脂質代謝，とくに，PEとPCの生合成が，Cキナーゼにより促進されることが明らかとなった。PIの合成抑制と考え併わせ，Cキナーゼが，ジアシルグリセロールエタノールアミンフォスフォトランスフェラーゼ（EC 2.7.8.1）及びジアシルグリセロールコリンフォスフォトランスフェラーゼ（EC 2.7.8.2）を活性化することが推測された。このことは，生体内でDGがCキナーゼを活性化するのとは逆に，活性化されたCキナーゼは，DGから，PE，PCを生合成し，DGを減少させることにより，活性のバランスをとっているものと考えられる。

文献

1) Nishizuka, Y. (1984) Nature ,308, 693-698

2) Girard,P.R. et.al. (1985) Proc. Natl. Acad. Sci. , 82, 3030-3034

71. 脳腫瘍における src 遺伝子の発現について

竹中信夫・御子柴克彦*・岡野栄之**・藤城正敏**
緋田芳樹**・陣崎雅弘**・高松　研**・塚田裕三**
大谷光弘・戸谷重雄
（慶応大・医・脳神経外科，大阪大・蛋白研*，慶応大・医・生理**）

〔要　約〕

ヒト脳腫瘍と src 遺伝子との相関を検索することを目的に，src gene product に対する抗血清を用いて免疫組織化学的手技により，脳組織及び脳腫瘍組織内における src gene product の存在を検討した。

1. src 遺伝子産物が astrocytoma の一部において特異的に認められた。免疫組織染色上 src 遺伝子産物は astrocytoma の細胞質に陽性であり，核は陰性であった。また immunoblotting 法においては pellet 分画，Mw 60,000 に特有の band として検出された。

2. 従って，astrocytoma では本遺伝子産物が病的に増幅し，細胞の腫瘍化の上で重要な支配をしているものと考えられた。

Key word： src gene product, astrocytoma, immunohistochemical staining

近年の遺伝子工学手技の進歩により，種々の悪性新生物における細胞の腫瘍化の過程で，宿主の癌遺伝子（c-onc）が活性化している事実が解明されてきた(1)。脳腫瘍に関しては，EVA らが glioblastoma multiforme における sis 遺伝子の増幅を報告し(2)，Shi ら，Broudeur ら，Schwab 及び Marx は neuroblastoma や retinoblastoma において，N-myc 遺伝子が増幅している事を報告した(3, 4, 5)。一方，Rous sarcoma virus の発癌遺伝子蛋白（pp60 src）は，細胞のトランスフォーメーションの上で重要な生化学的特性として tyrosin 残基リン酸化能（protein kinase）を有し，src 遺伝子と細胞の腫瘍化との関連は強く示唆されるが，現在まで証明はされていない。また脳腫瘍と src gene との関連を示す報告もこれまで認められない。今回，我々は脳腫瘍と src gene product との相関を解析し若干の知見を得たので報告する。

研究方法

1. 免疫組織染色：Sternberger の方法に準じて免疫組織染色を施行した。抗血清として抗 src 抗血清（Transformation Research Incorporation 社，Oncogene 社），抗 GFAP 抗血清（Stanford university, L.F. Eng 教授供与(6)），抗 S 100 抗血清（埼玉医科大学，植村慶一教授供与(7)）を用いた。各抗血清は希釈濃度 800：1 として使用した。

2. Western blotting：試料は採取後直ちに 70℃にて凍結保存した。Rerart の方法に準じて Western blotting を施行した(8)。

結　果

免疫組織染色では，S 100 蛋白は正常剖検脳組織のグリア細胞，脈絡叢組織，GFAP は astrocyte に特異的に同定された。src gene product は陰性であった。ヒト

脳腫瘍組織ではTableに示すごとく抗src抗血清はastrocytoma及びglioblastoma multiformeの一部に対して特異的に陽性に反応した。陽性細胞においては細胞質が陽性に反応し核は陰性であった(Fig.1)。また抗GFAP抗血清はastrocytoma, glioblastoma multiforme, ependymoma, mixed glioma, chordoma, hemangioblastomaのstroma cells, medduloblastomaの一部の細胞に陽性であった。抗S100抗血清による成績は従来の報告と一致するものであった(9)。一方, Western blottingによって免疫組織学的陽性腫瘍組織を用いてその抗原を解析した。まずヒト脳腫瘍及び脳組織の上清分画は抗src抗血清に陰性であった。pellet分画ではastrocytoma 3例すべてにおいてMw 60,000の位置に特異的に陽性反応が得られたが, lobectomy部, meningioma, medduloblastomaの組織では陰性であった(Fig.2)。また種々の脳腫瘍で異常発現もしくは遺伝子増幅の認められる発癌遺伝子(PDGF, EGF-R)及びsrcに関して, その遺伝子一次構造をsrc陽性が確認されたastrocytoma 3例について, Southern blott解析(v-onc probe)を行なったところ, PDGF(v-sis)では増幅・再構成が認められなかった。EGF-R (Erb-B), srcについてはhybridization stringencyの困難さのため(トリv-oncであるため)明瞭な結果は得られなかった。現在hybridizationの条件を検討中であり, srcの異常発現と遺伝子構造との関連を明らかにしていく予定である。pp60srcは免疫電顕学的に(10), またsubcellular fractionの解析から(11)主として細胞質膜内面に, 一部は細胞質に存在する蛋白であることが知られている。今回の免疫組織染色, Western blottingの結果もastrocytoma内のsrc gene productが細胞質膜及び細胞質に存在することを示していた。今回我々が脳腫瘍組織を用いて検討した結果, astrocytomaとglioblastoma multiformeに特異的に陽性結果が得られたが, astrocytomaのうちでもより悪性度の高いgrade 2-3にsrc陽性の傾向が強く見られ, GFAP・S100陽性腫瘍とおおむね一致する傾向が見られた。このようにglia系の腫瘍にのみ陽性結果が得られたが, その発現機序は未だ不明であり, その機構の解明は今後の課題である。しかし特定の腫瘍に陽性反応が認められたことは脳腫瘍の発生機序を解明する上で重要な所見と考えられ, 今後他のoncogeneについても解析を進めてゆきたい。

文　献

1) Pateskene, J.H. (1983) TINS, sept.: 353-354
2) Eva, A.et al (1982) Nature 295: 116-119
3) Schwab, N. et al (1983) Nature 305: 245-248
4) Marx, J.L. (1984) Science 224: 1084
5) Brodeur, G.M. et al (1984) Science 224: 1121-1124
6) Eng, L.F. et al (1971) Brain Res. 28: 351-354
7) Uyemura, K. et al (1971) J.Neurochem. 18: 429-438
8) Renart, J. et al (1979) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 76: 3116-3120
9) Nakajima, T. et al (1982) Am.J. Surg. Pathol. 6: 715-727
10) Willingham, M.C. et al (1979) Cell 18: 125-134
11) Courtheidge, S.A. et al (1980) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77: 3783-3787

Table 5 : Results in 118 cases of brain tumors

	SRC		GFA		S100	
	+	-	+	-	+	-
Astrocytoma grade 1	5	4	6	3	7	2
2	13	2	13	2	13	2
3	10	5	9	6	9	6
Glioblastoma multiforme	4	2	1	5	5	1
Oligodendroglioma	0	5	0	5	5	0
Choroid plexus papilloma	0	1	0	1	1	0
Medulloblastoma	0	10	0	10	0	10
Ependymoma	0	2	2	0	2	0
Meningioma	0	10	0	10	0	10
Hemangiopericytoma	0	5	0	5	0	5
Neurinoma	0	12	0	12	9	3
Hemangioblastoma	0	7	5	2	4	3
Hemangioendothelioma	0	2	0	2	0	2
Chordoma	0	5	3	2	5	0
Embrional carcinoma	0	1	0	1	0	1
Fibrosarcoma	0	1	0	1	0	1
Osteochondroma	0	1	0	1	0	1
Giant cell tumor	0	1	0	1	0	1
Metastatic tumor	0	3	0	3	0	3
	118		118		118	

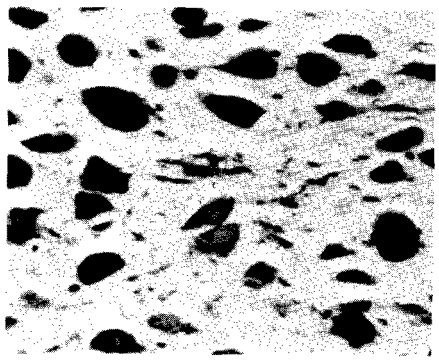


Fig.1: Immunohistochemical staining against the src gene products with hematoxilin for astrocytoma grade 3. The cytoplasma showed a strongly positive reaction (100X).

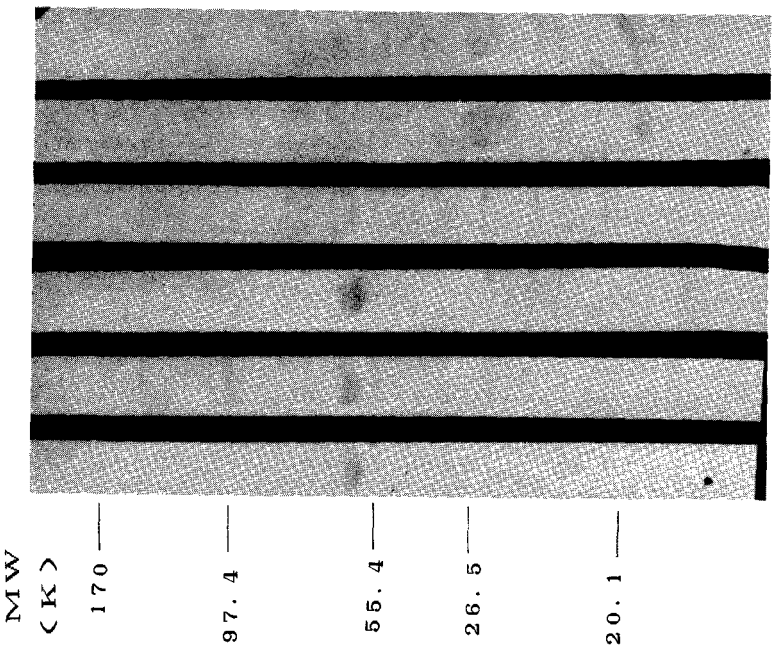


Fig.2 Western blotting analysis against src gene products for the pellets of astrocytoma grade 3(lane 1), astrocytoma grade 2(lane 2), astrocytoma grade 2(lane 3), brain tissues of posterior lobe(lane 4), meningioma(lane 5), and meddulo-blastoma(lane 6). A special band of Mw 60000 was found in lane 1-3, but not found in lane 4-6.

72. モノクローナル抗体によるグリア線維性蛋白質（GFAP）の抗原決定部位の解析

羽賀誠一・徳武　哲・石井　毅・篠田友孝*
（東京都精神研・神化・超微，東京都立大・理・生化*）

〔要　約〕

老年痴呆剖検脳組織を抗原にしてマウスモノクローナル抗体を作製し，その中で抗GFAP(glial fibrillary acidic protein)抗体と同定された抗体（Hy 12-29-1L)を得ることができた。この抗体は市販のウサギ抗体と比較して，免疫組織化学的に染色力価が10倍以上高くneurofilament およびvimentin等とは交差せず特異性の高いものであった。本実験ではHy 12-29-1L 抗体の抗原認識部位をペプチドのレベルで解明することを試みた。

(1) GFAPは，牛脳白質を材料にLiemの方法を改良してハイドロオキシアパタイトとDE-52 カラムクロマグラフィーにより精製した。

(2) 精製した牛GFAPは，CNBr分解，S.aureus protease,chymotrypsinによる限定分解を行った。CNBr分解ではSDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動によりH.W.24,500 (CB5),20,000 (CB6),3,500 (CB11) S.aureus protease ではH.W.28,000 (P1),26,000 (P2),3,000 (P10),chymotrypsinでは H.W. 32,000 (C1), 21,500 (C2),19,500 (C3) のものが見出された。そのうちイムノブロット法でHy12-29-1L抗体と反応するペプチドはCB5, CB6, P2, C1であった。

(3) CNBr分解GFAPの主ペプチドCB6 を高速液体クロマトグラフィー(HPLC)で単離し，そのアミノ酸組成よりおよその抗原部位を推定した。

Key word：GFAP, Monoclonal antibody, CNBr cleavage

GFAPはアストログリア細胞のグリア線維を構成する，中間径線維蛋白質の一種である。最近，どの中間径線維蛋白質も headpiece,middle domain,tail piece と呼ばれる３つの部位からなっており，特に middle domainはα-helix構造で，中間径線維の骨格を形成していることがわかってきている(4,11)。GFAPについても Lewisらが c DNA probeを使ってマウスGFAPの全アミノ酸配列を決定している(8)。その結果，GFAPは，α-helixの部位にdesmin,vimentin と65% の共通のアミノ酸が存在することを報告している。このことは，vimentinと交差反応を持つGFAPに対するモノクローナル抗体の報告によっても裏付けられる(7)。

Hy 12-29-1L 抗体はneurofilament, vimentin とは交差せず，GFAPだけに特異性を持っていた。我々はこの抗体が，GFAPのどの部分を認識しているのかCNBr分解，S. aureaus protease,chymotrypsinによる限定分解を行い，イムノブロット法で明らかにすることを試みた。

（実験法）

(1) モノクローナル抗体の作製および免疫組織化学についてはすでに報告した通りである(5)。

(2) 牛GFAPの精製：牛脳白質よりLiemの方法に従って，0.85 M sucrose に浮遊する myelinated axonから１% Triton X-100不溶の蛋白質をとり，8 M 尿素で可溶化後ハイドロキシアパタイトゲルに吸着させ，140mM NaH_2PO_4 で粗 GFAP を抽出した。さらに DE-52カラムクロマト(1×50cm) で精製しFig.2 のG分画を用いた(9,12)。蛋白量は Bradford の方法で測定した(1)。

(3) CNBr分解：精製した GFAP 1 mgを70% ギ酸1 mlに溶かし，これに80 mg のCNBrを加え，室温で24時間，48時間処理した。反応後10倍量の水を加えて凍結乾燥した。

(4) 限定分解：S.aureus protease, chymotrypsin について，それぞれ1/80,1/40,1/20,1/10 量加え37℃で30分，60分，120分消化を行った(2)。

(5) SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動（SDS-PAGI）：Laemmli の方法により 10-15% linear

gradient slab ゲル電気泳動を行った(6)。ゲルはCoomassie Blueで染色した。

(6) イムノブロット：Towbinらの方法によりゲルからニトロセルロース膜へペプチドを移した(13)。ニトロセルロース膜は Hy 12-29-1L抗体(腹水，1:1000)で1時間反応させ，PBS 洗浄後，さらにHPR 標識抗マウス IgG血清(1:2000)で1時間反応後，0.015% H_2O_2，0.05% 4－クロロ－1－ナフトールで発色させた。ウサギ抗ヒト GFAP 抗体(DAKO 社)についても 1:200に希釈して同様に行った。

(7) ＨＰＬＣ：CNBr分解ペプチドを8 M urea溶解し，日立3063カラム(4.6mm×25cm)を用い，25% アセトニトリル-0.1% TFA から80% アセトニトリル-0.1% TFA まで60分で濃度を上げ，溶出したペプチドを分取した。さらに目的とするペプチドを同一条件でリクロマトグラフィーを行い精製した。

Fig.1

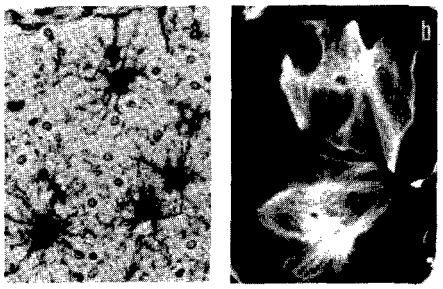
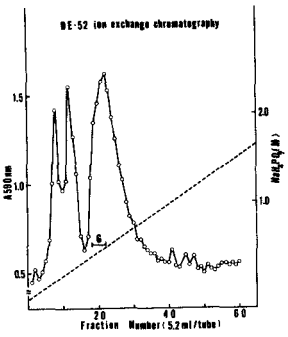


Fig.2



（結　果）

(1) Hy 12-29-1L 抗体（サブクラス IgG_1）は免疫組織化学的にホルマリン固定パラフィン材料や培養細胞でもアストログリア細胞に強く陽性で，神経細胞，脳軟膜，血管など他の組織成分については陰性であった(Fig.1a,1b)。

(2) ペプチドの SDS-PAGE: CNBr 分解ペプチドは少なくとも11本確認され，主なバンドはM.W.24,500(CB5),20,000(CB6),3,500(CB11) であった(Fig.3b)。

S.aureus protease消化のペプチドは酵素量が1/80のときは主バンドはM.W.28,000(P1),26,000(P2)であったが　proteaseを1/40～1/10に増加させるとP1,P2 のペプチドは減少しM.W.15,000(P6)とそれ

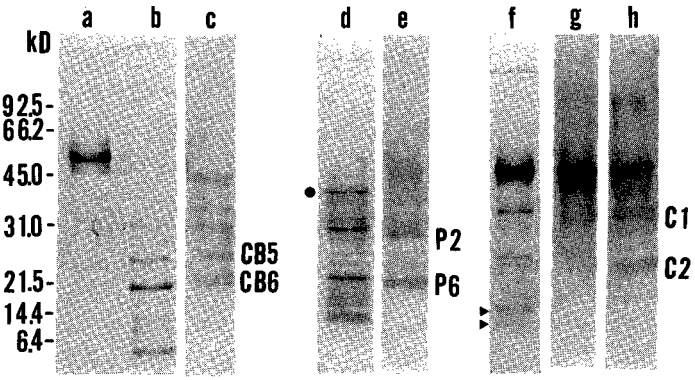


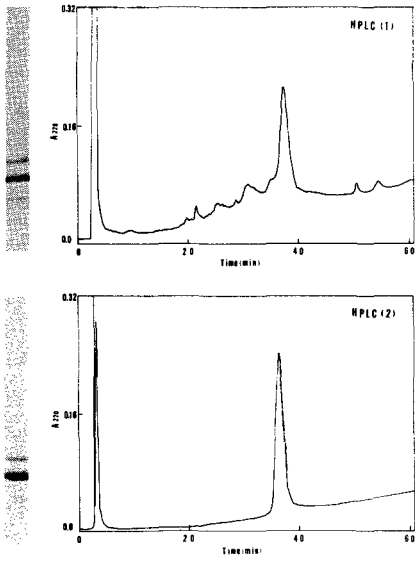
Fig.3 a.精製GFAP　b.CNBr分解GFAPペプチド　C.b ペプチドのイムノブロット(Hy 12-29-1L) d.S.aureus protease 消化GFAPペプチド(1/20) e.d　ペプチドのイムノブロット(Hy 12-29-1L) f.chymotrypsin　消化GFAPペプチド(1/20)g.f ペプチドのイムノブロット(Hy 12-29-1L)h.f のイムノブロット（ウサギ抗ヒトGFAP) ●:s.aureus protease　▲:chymo - trypsin

以下の分子量のペプチドが増加してきた(Fig.3d)。Chymotypsin 消化では酵素量1/80ではほとんど認められない分子量19,500(C3)のペプチドが酵素量を1/40以上にすると出現してきた。この条件下でも消化されていない GFAPが残存していた(Fig.3f)。

(4) イムノブロット: Hy 12-29-1L 抗体はCNBr分解ペプチドCB5, CB6さらに分子量の大きいペプチドと反応した(Fig.3c)。S.aureus protease ペプチドはP2, P6と強く反応し，その他の陽性ペプチドもいくつか確認された(Fig.3e)。Chymotrypsinペプチドとは C1にだけ反応があったが，polyclonal抗体ではC2にも反応した(Fig.3g,3h) 。

(5) ＨＰＬＣ:CNBr 分解ペプチドをHPLCで分離し，免疫反応陽性のCB6 が主ピークに得られた(Fig.4) 。さらにリクロマトを行ったが，CB5 が多少混在していた(Fig.4)。精製されたペプチドのアミノ酸組成を調べ，完全一次構造のわかっているマウス GFAPと比較したところ，このペプチドはGFAPのC-末端側の半分に由来しているものと思われた。

Fig.4



（考　察）

ウシGFAPのCNBr分解および酵素消化によるペプチドマップはRuegerら，Chiuらにより報告があり(10,3) ,測定した分子量にちがいはあるが，ペプチドのパターンはよく一致していた。Hy 12-29-1L 抗体はmonoclonal抗体にもかかわらず，イムノブロット法で数種のペプチドと免疫反応がみられた。これは同一の抗原基が消化状態の異なるペプチドに含むまれているためと思われる。またchymotrypsin 消化でpolyclonal抗体ではC2ペプチドにも反応があり，GFAPに存在する別の抗原基がC2ペプチドに含まれているのだろう。

CB6 は分子量がまだ大きく，GFAPのおおよその位置を推定することしかできないが，今後さらにHy 12-29-1L 抗体と反応する小さなペプチドに精製し，抗原決定部位を限定するための実験を行っている。

（文　献）

(1)Bradford,M.(1976)Anal.Biochem.,72,248-254. (2)Cleveland,D.W.,Fischer,S.G ,Kirshner,M.W.,and Laemmli,U.K.(1977)J.Biol.Chem.,252,1102-1106 (3)Chiu,F.-C.,Korey,B.and Norton,W.T.(1980)J.Neurochem.,34,1149-1159 (4)Geisler,N.,Kaufmann,E.,and Weber,K.(1982)Cell,30,277-288 (5)羽賀誠一 ,石井毅 ,小柳新策 ,他(1985)臨床検査,29,819-823 (6)Laemmli,U.K.(1970) Nature,227,680-685 (7)Lee,V.M-Y., Page,C.D.,Wu,H.-L.,and Schlaepfer,W.W.(1984)J.Neurochem.,42,25-32 (8)Lewis,S.A.,Balcarek,J.M.,Kerk,V.,Shelanski,M.,and Cowan,N.J.(1984) Proc.Natl.Acad.Sci.USA,81,2743-2746 (9)Liem,R.(1982)J.Neurochem.,38,142-150 (10)Ruegar,D.C.,Gardner,E.E.,Simonian,H.D., Dahl,D.,and Bignami,A.(1981)J.Biol.Chem.,256,10606-10612 (11)Steinert,P.M.,Idler,W.W.,and Goldman,R.D. (1980)Proc.Natl.Acad. Sci.USA,77,4534-4538 (12)Tokutake,S.(1984)Anal.Biochem.,140,203-207 (13)Towbin, H.,Staehelin,T.,and Gordon,J.(1979) Proc.Natl.Acad. Sci.USA,76,4350-4354

73. ヒト正常大脳および膠芽腫における S-100 蛋白サブユニットの局在証明

福岡高宏・田渕和雄・守屋芳夫*・古田知久*・西本　詮*
（香川医大・脳神経外科，岡山大・医・脳神経外科*）

〔要　約〕

我々は、マウスモノクローナル抗体を用いた間接酵素抗体法により、ヒト正常大脳および膠芽腫における S—100 蛋白 α、β鎖サブユニットの局在を、光顕ならびに電顕的に検索した。その結果、ヒト正常大脳では、星状膠細胞と希突起膠細胞が S—100 蛋白 α 鎖、β 鎖いずれも陽性であったが、神経細胞では、α 鎖のみ陽性で β 鎖は陰性であった。膠芽腫では症例により、S—100 蛋白 α 鎖、β 鎖ともに陽性のもの、どちらか一方のみ陽性のもの、両者とも陰性のものと様々であった。電顕レベルでは、S—100 蛋白 α 鎖に対する陽性反応は、膠細胞の細胞質、核質およびミトコンドリアや粗面小胞体の外膜に認められ、神経細胞においても、細胞下レベルでの α 鎖の局在はほぼ同じ様であった。一方、S—100 蛋白 β 鎖に対する陽性反応は、膠細胞の、細胞質、核質、およびミトコンドリアや粗面小胞体の外膜におもに認められた。さらに、電顕レベルで検索しえた膠芽腫例において S—100 蛋白 α 鎖陽性反応は、細胞質、核質、核小体の周囲、外核膜、ミトコンドリアや粗面小胞体の外膜に認められた。このように S—100 蛋白 α、β 鎖サブユニットの細胞内局在は、膠細胞、神経細胞、膠芽腫細胞間でも基本的には同じであることが判明した。

Key word：α and β subunits of S—100 protein，immuno-electron microscopy，normal human brain

緒言：1965 年 Moore らにより分離された S—100 蛋白は、その後の研究により、α 鎖、β 鎖の 2 つのサブユニットから構成される 2 量体であり、現在、S—100 a（α、β）、S—100 b（β、β）、S—100 a_0（α、α）の 3 分子種の存在が指摘されている。最近になり、S—100 蛋白 α 鎖、β 鎖各々についての免疫組織化学的局在検索が行われ、その結果、S—100 蛋白の分子種による局在証明が、正常組織のみならず、腫瘍組織についても試みられつつある。しかし S—100 蛋白サブユニットの細胞内微細局在に関する報告は少ない。今回我々は、S—100 蛋白 α 鎖、β 鎖サブユニットに対するマウスモノクローナル抗体を用いて、ヒト正常大脳および、膠芽腫における S—100 蛋白 α、β の局在を光顕並びに電顕的に検索した。その結果、S—100 蛋白の機能を推測する上で興味ある所見を得たので若干の文献的考察を加えて報告する。

材料と方法：ヒト大脳組織は深在性脳腫瘍に対する内減圧術の目的で切除を行った 5 例の脳組織（主に前頭葉）を用いた。また 6 例の膠芽腫組織は、当教室において開頭術により摘出された生検材料を用いた。免疫組織化学的局在証明には、一次抗体として、抗 S—100 蛋白 α 鎖あるいは β 鎖マウスモノクローナル抗体を使用し、間接酵素抗体法により、光顕並びに電顕レベルで検索した。

結果　光顕：ヒト正常大脳においては、神経細胞、星状膠細胞、希突起膠細胞が S—100 蛋白 α 鎖陽性であった。また S—100 蛋白 β 鎖は、星状膠細胞、希突起膠細胞に陽性で、神経細胞は陰性であった。6 例のヒト膠芽腫においては、S—100 蛋白 α 鎖、β 鎖共に陽性 1 例、α 鎖のみ陽性 1 例、β 鎖のみ陽性 2 例、共に陰性 2 例であった。（Table 1）（Fig. 1—a）

電顕：細胞内における S—100 蛋白サブユニットの局在様式は Table 2 に示す如く、神経細

胞、膠細胞、膠芽腫細胞間で大きな相違は認められなかった（膠芽腫におけるβ鎖は未検索）。（Fig. 1—b）

考察：S—100蛋白α鎖、β鎖に関するこれまでの局在検索から、神経細胞にはS—100 a_0（α、α）、膠細胞にはS—100 a（α、β）が存在することが知られている。今回の検索でもほぼ同様の結果を得たが、神経細胞については、S—100蛋白α鎖が陰性のものも認められ、こうした神経細胞ではS—100蛋白の果たす役割を他の蛋白、たとえば同じEF—Handグループに属するカルモデュリン等が果している可能性が考えられる。今後はS—100蛋白と他のCa^{++}結合蛋白との機能上の関連性を追求していくことも必要であろう。膠芽腫においては、Table 1の如くS—100蛋白サブユニットの局在に関して種々の結果が得られた。従って、今回の免疫組織化学的検索結果よりS—100蛋白の面からも、膠芽腫の不均質性が示されたものと考えられる。これまでS—100蛋白の局在に関しては多くの免疫組織化学的検討がなされてきているが、S—100蛋白のもつ生物学的意義については必ずしも見解の一致をみていない。S—100蛋白によるシナプス伝達の調節、膜を介するカチオンの輸送への関与、核内機能への関与、プロテインキナーゼの活性化、微小管脱重合とか、ホルモン分泌への関与等幅広い役割が想定されている。ところで、S—100蛋白の細胞内局在を生細胞で観察できればその機能を推測する上で最適であろう。しかし免疫組織化学では固定を行うことが普通であるが、組織固定が強くなればなる程、一般に標的物質の抗原性が阻害されやすくなるという欠点があり、また物質の局在のみからただちにその機能を推測することは困難である。今回の検索結果より、神経細胞、膠細胞、膠芽腫細胞を問わず、S—100蛋白サブユニットの陽性反応が、細胞質、核質、細胞内小器官の外膜等に観察されたこと

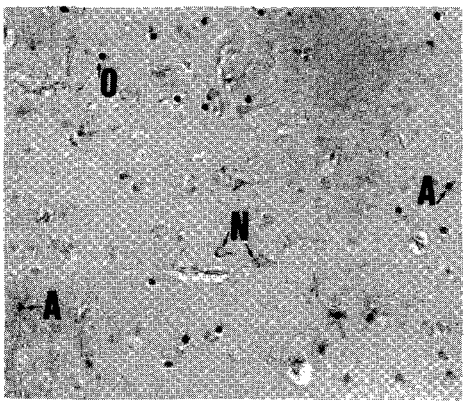


Fig. 1—a
S—100蛋白α鎖、大脳灰白質（200倍）
A：星状膠細胞、N：神経細胞
O：希突起膠細胞

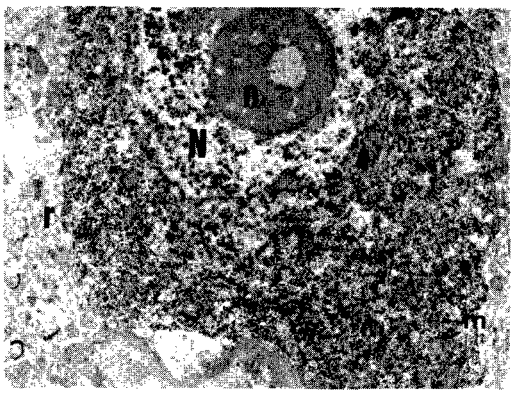


Fig. 1—b
S—100蛋白α鎖、神経細胞（4000倍）
m：ミトコンドリア、N：核
n：核小体、　　r：粗面小胞体

Table 1 Immunohistochemical Localization of α and β subunits of S-100 Protein

	glioma cells		neurons	glioblastoma cells*
	astrocyte	oligodendrocyte		
α chain	+	+	+	+ or -
β chain	+	+	-	+ or -

+: postive, -: negative, *: variable among tumors

Table 2 Subcellular Localization of α and β subunits of S-100 Protein

	Cytoplasm		Nucleoplasm		Nucleolus		Outer membrane of cell organelles	
	α	β	α	β	α	β	α	β
Glial cells	+	+	+	+	-	-	+	+
Neurons	+	-	+	-	-	-	+	-
Glioblastoma cells	+	NE	+	NE	+	NE	+	NE

NE: not examined

などから、S—100蛋白はその機能の一つとして細胞内において Ca^{++} などのカチオンの輸送に広く関与している可能性が考えられる。

文献：

1. 磯部俊明、石岡憲昭、奥山典生 (1980) 神経進歩 24: 983-1007
2. Isobe, T., Ishioka, N., Masuda, T., Takahashi, Y., Ganno, S. and Okuyama, T. (1983) Biochem. Interna. 6: 419-426
3. McLean, I.W. and Nakane, P.K. (1974) J. Histochem. and Cytochem. 22: 1077-1083
4. Moore, B.W. (1965) Biochem. Biophys. Commun. 19: 739-745
5. Tabuchi, K. and Kirsch, W.M. (1975) Brain Res. 92: 175-180
6. Tabuchi, K., Ohnishi, R., Nishimoto, A., Isobe, T. and Okuyama, T. (1984) Brain Res. 298: 353-357
7. Takahashi, K., Isobe, T., Ohtsuki, Y., Akagi, T., Sonobe, H. and Okuyama, T. (1984) Virchows Arch. (Cell Pathol.) 45: 385-396

74. 人神経膠腫由来の神経特異 γ-エノラーゼ (NSE)

倉光正春・佐和弘基・加藤兼房*
(九州大・医・脳研・病理, 愛知県コロニー研・生化*)

〔要　約〕

神経特異エノラーゼ(NSE) は神経細胞に特異的な酵素とされ、神経細胞の有用なマーカーと考えられてきた。しかし非神経細胞由来の組織中にNSEが存在することが明らかとなって来た。そこで脳腫瘍の中の多形膠芽腫、星状膠細胞腫、乏突起膠腫、髄芽腫等の組織を用い、NSEの高感度エンザイム イムノアッセイ(EIA)法による定量的検討及び免疫組織化学的検討を行った。結果は上記脳腫瘍中に高濃度のNSEが存在し免疫組織学的にもNSE陽性所見が得られた。更に人多形膠芽腫皮下移植マウス腫瘍及びその移植腫瘍培養細胞、人由来神経膠腫クローン化培養細胞中にもNSEを認めたが、移植前脳腫瘍NSE値より低かった。又上記脳腫瘍患者及び皮下移植マウス血清中にも高濃度NSEが存在し、特にマウスでは腫瘍重量と正の相関をしていた。以上の結果から非神経細胞由来腫瘍ではNSEを産生していることは明らかであり、それ故に高感度EIA法を用いて血清中のNSE濃度を検討することは、脳腫瘍の動態を知るうえで良い指標となるであろう。

Key word :
Enolase・Enzyme immunoassay・Human Glioma

γγ とαγ エノラーゼは今迄''神経特異''エノラーゼ(NSE) (2) と呼称されて来たが、免疫組織化学的探索及び高感度EIA法を用いた検索によって、神経細胞以外の神経内分泌細胞(3)及びこれらの細胞に由来する腫瘍(5)中にも分布しているとの報告がある。本研究では人神経膠腫や他の神経組織腫瘍、人多形膠芽腫皮下移植マウス腫瘍及び、その移植腫瘍の培養細胞、人神経膠腫由来のクローン化細胞中のNSEの定量的データを報告し、合わせて、神経膠腫患者血清及び上記マウス血清中のNSE含量を検討した。又腫瘍組織を用いた抗NSE抗体による免疫学的検討も行った。

「実験材料及び方法」

NSE量の測定：抗ウシNSE抗体を用いたサンドウィッチ法による高感度EIA法(1)を新たに確立し、この測定系を用いた。人脳腫瘍組織及び血清サンプル：65例の脳腫瘍及び7例の正常脳組織(Table 1) 、18名の神経膠腫患者及び20名の正常成人血清(Fig 1)を用いた。動物及び組織培養：3例の多形膠芽腫(Table 1：A、BとC)をヌードマウス皮下に継代移植し、経時的に腫瘍重量を測定し、採血した。なお非移植マウス血清をコントロールとした。実験終了後のマウス腫瘍、3種の人神経膠腫由来のクローン化細胞、継代移植腫瘍由来の培養細胞はMg^{2+}を含むBouin液で固定した。免疫組織学的方法：染色法は精製抗NSE及び抗GFAP抗体を用いた酵素抗体(PAP)法で行った。

「結果」

65例の人脳腫瘍中、髄芽腫では高いNSE含量を有し最大6,760ng／mg蛋白質であり、他の非神経細胞由来腫瘍でもかなりの量のNSE含量を示しており、多形膠芽腫の47％(8／17例)、星状膠細胞腫の23％(3／13)、乏突起膠腫の2／3例、髄膜腫の1／4例が、1,000ng／mg蛋白質以上を示していた。又3例のマウス皮下腫瘍中のNSE含量は脳を除いて、マウスの各組織よりも高値を示し、再大218ng／mg蛋白質(139.3±80.1ng／mg蛋白質、mean±SD)であったが移植前の人神経膠芽腫組織中の含量よりも明らかに低値を示した。3例の人神経膠腫由来のクローン化細胞のNSE含量は種々の値を示した(Table 2)。2例の移植神経膠芽腫由来の培養細胞では、最大54.4ng／mg蛋白質であったが、移植前腫瘍組織中の含量と比較し、かなりの低値を示した。多形膠芽腫患者の3／8、星状膠細胞腫患者の1／7、乏突起膠腫患者の1／3例が正常コントロール血清(4ng／ml)よりも有意に高値を示した(Fig 1)。人多形膠芽腫皮下移植マウス血清NSEレベルは腫瘍増大に伴って増加し、その

相関系数γ＝0.803であった(Fig 2)。NSE濃度／重量の増加率は人多形膠芽腫Aよりも低いNSE含量を示すB移植例の方が高値を示した。なお全例に於て肉眼的、組織学的に中枢神経系及び他臓器は正常であり、転移は認めなかった。正常神経膠細胞を除き検索した4例の人多形膠芽腫及び人多形膠芽腫皮下移植腫瘍、人神経膠腫由来クローン化細胞の免疫染色では抗NSE抗体に染色されかつ抗GFAP抗体にも染色された。抗NSE抗体に対しては壊死巣周囲のPalisading細胞が著明に染色され、抗GFAP抗体に対しては、血管周囲に増殖した内皮細胞周囲の腫瘍細胞が著明に染色された。なお、増殖した血管内皮細胞は抗NSE、抗GFAP抗体に対しても染色されなかった。又コントロールとして用いた正常家兎血清では上記のいずれの組織、細胞も染色されなかった(Fig 3)。

「考察」

NSEの出現は正常な条件下では機能的、構造的な神経発生と密接に関連し、その含量は神経の発達、分化の指標として用いられて来た(4)。今回我々が検討した65例の脳腫瘍の全例にNSEが分布しており、その濃度は正常脳組織中よりも低濃度ではあったが、神経膠腫を含む非神経細胞由来腫瘍の数例に比較的高濃度の例を認めた。これらの結果よりNSEの細胞遺伝学的特異性は当初schmechelらによって提唱された程厳密なものではない事を示している。又多形膠芽腫組織、人神経膠腫由来のクローン化細胞、人多形膠芽腫皮下移植腫瘍組織のいずれも抗NSE及び抗GFAP抗体で染色され、腫瘍化した神経膠細胞内では2つの''特異蛋白''即ちNSE、GFAPが同一細胞内で相互に排斥されずに存在していることを示している。更に我々が検索した18例の神経膠腫患者の血清中、5例が正常血清NSE濃度よりも高濃度を示していた。この神経膠腫患者血清中に認められる高濃度のNSEが神経膠腫細胞自体に由来するものか、周囲神経組織への侵襲に由るものかを検討する為に、人多形膠芽腫をヌードマウス皮下に移植し、中枢神経系への傷害の関与を除外し、経時的に血清NSEレベルと腫瘍重量を測定した。その結果マウス血清中のNSE濃度は、腫瘍重量の増加と密接に関連して上昇し、マウス末梢組織は、その腫瘍組織と比較しNSE濃

Table 1
NSE Contents of Human Gliomas and Other Neurogenic Tumors

Tissues	NSE (ng/mg protein)	Tissues	NSE (ng/mg protein)
Normal cerebral cortex	13200±5600[a]	Meningioma	2500
		Meningioma	280
Normal cerebral white matter	10700±5100[b]	Meningioma	191
		Meningioma	80
Glioblastoma	6560	Meningioma	74
Glioblastoma	6300	Meningioma	60
Glioblastoma	3200	Meningioma	44
Glioblastoma A	2100	Meningioma	43
Glioblastoma	1200	Meningioma	42
Glioblastoma	1200	Meningioma	12
Glioblastoma	1100	Medulloblastoma	6800
Glioblastoma	1000	Medulloblastoma	4200
Glioblastoma B	440	Medulloblastoma	3500
Glioblastoma C	410	Medulloblastoma	1600
Glioblastoma	321	Medulloblastoma	950
Glioblastoma	275	Ependymoma	2400
Glioblastoma	271	Ependymoma	323
Glioblastoma	241	Ependymoma	156
Glioblastoma	235	Ependymoma	138
Glioblastoma	220	Acoustic neurinoma	304
Glioblastoma	63	Acoustic neurinoma	191
Astrocytoma	6340	Acoustic neurinoma	190
Astrocytoma	2200	Acoustic neurinoma	94
Astrocytoma	1020	Craniopharyngioma	72
Astrocytoma	814	Yolk sac tumor	241
Astrocytoma	325	Pinealoma	198
Astrocytoma	318	Malignant lymphoma	81
Astrocytoma	300	Hemangiopericytoma	157
Astrocytoma	229	Hemangiopericytomaa	99
Astrocytoma	207	Neurinoma	148
Astrocytoma	158	Neurofibroma	327
Astrocytoma	117	Neurofibroma	43
Astrocytoma	105	A[c]	218±12
Astrocytoma	16	B[c]	142±12
Oligodendroglioma	1210	C[c]	58± 4
Oligodendroglioma	1040		
Oligodendroglioma	702		

[a] mean ± SD of 7 samples
[b] mean ± SD of 3 samples
[c] 3 human glioblastoma tissues transplanted to the congenital athymic nude mice, and analysed after 9th passage.

Table 2
NSE Contents of Transplanted Mouse Tumors and Human Glioma Cell Lines

Cell lines	No.of assay	NSE (ng/mg protein)
A[a]	3	54±2.3[b]
C[a]	3	47±8
B2-100	5	135±32
KNS-42	4	42±16
U251MG	3	72±15

[a] derived from A and C shown in Table 1
[b] mean + SD

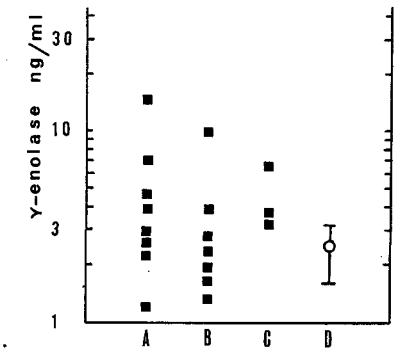


Fig.1. Concentrations of NSE in Serum of Patient with Glioma

A:Sera of patients with glioblastoma
B:Sera of patients with astrocytoma
C:Sera of patients with oligdendroglioma
D:Sera of healthy control adults, mean ± SD of 20 samples
The mean value was 2.4 ± 0.8 ng/ml,
ranged from 1.3 to 3.8 ng/ml.

度が低濃度であることより、マウス血中NSE濃度の上昇は主に多形膠芽腫由来であることを示していた。以上の結果より、血清中のNSEは神経膠腫患者における腫瘍の動態を評価するよい生物学的指標となると推察される。

「文献」

(1) Kuramitsu M., Sawa H., Takeshita I., Iwaki T. and Kato K. (in preparation)

(2) Schmechel D.E., Marangos P.J., Brightman M., and Goodwin F.K. (1978) Science 199, 313-315.

(3) Schmechel D.E., Marangos P.J., and Brightman M.W. (1978) Nature 276, 834-836.

(4) Schmechel D.E., Brightman M.W., and Marangos P.J. (1980) Brain Res. 190, 195-214.

(5) Topia F.J., Polak J.M., Barbos A.J.A., Bloom R., Marangos P.J., Dermo C., and Pease A.G.E. (1981) Lancet 1, 808－811.

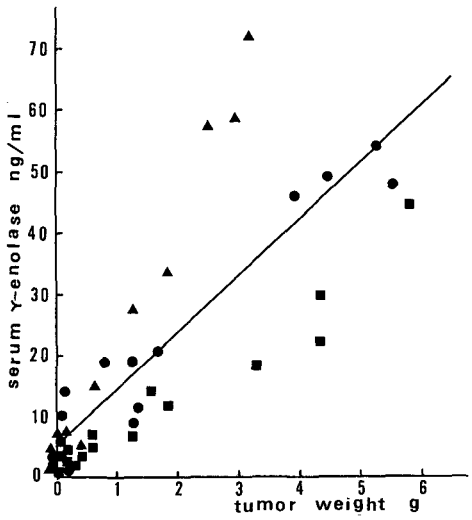


Fig.2.

Correlation Between NSE Concentrations in Sera and Tumor Weights in 18 Congenital Athymic Nude Mice Bearing 3 Different Human Glioma Lines.

A(●), B (▲)and C (■) indicate the tissues derived from glioblastoma A, B and C shown in Table 1. Correlation coefficient $\gamma = 0.803$; $Y = 9.05\ X + 4.84$; $n = 47; p < 0.001$.

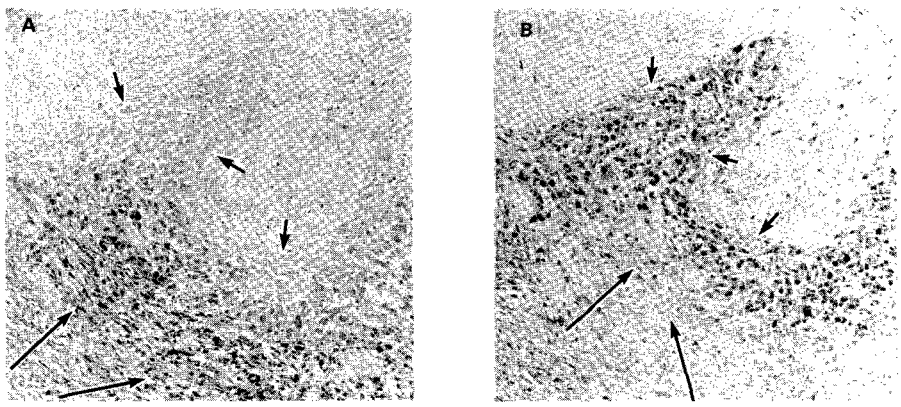


Fig.3.

Immunoperoxidase Staining for NSE or GFAP in Human Glioblastoma, Transplanted Glioblatoma and Permament Human Glioma Cell Lines.

A:Tumor cells around the blood vessel in human glioblastoma-C showed moderate staining for NSE (short arrows) and tumor cells(long arrows)around the necrotic tissues showed marked staining. Anti bovine NSE rabbit IgG dilution was 1:500. Counter stained with hematoxyline, 75.

B:Same area as A was stained for GFAP. Marked staining of tumor cells(short arrows) around the endothelial cells and faint staining of tumor cells (long arrows) surrounding the necrotic tissues. Anti bovine glial fibrillary acidic protein(GFAP) rabbit serum dilution was 1:200. Counter stained with hematoxyline, 75.

75. 星状膠細胞に特異的に局在するグルタチオン S-トランスフェラーゼ

千丈雅徳・石橋輝雄　　(北海道大・医・第二生化)

〔要　約〕

ラット脳細胞質よりGlutathione S-transferase (ＧＳＴ) をセファデックスＧ－75, ＧＳＨ－アフィニティー, ＣＭ－セルロースカラムクロマトにより分離・精製し, ４つの分子種を得た。それらのクロマトフォーカシングにより溶出されるpHは 10.1, 8.9, 7.6, 6.7であり, ラット肝ＧＳＴの既知の６つの分子種に対する抗体を用いた免疫沈降反応から前３者はＧＳＴ－Ａ２ (Ｙc Ｙc), Ｂ２ (Ｙb Ｙb), Ｃ２ (Ｙb' Ｙb') と同定され, 脳にはＹａ サブユニットが存在しないことが判明した。細胞質以外の細胞画分にもＧＳＴ活性が存在し, 特に核画分に高い活性が見られた。免疫組織化学的にも核が強く染色され, 更にＧＳＴは星状膠細胞, 上衣細胞, 脈絡叢に局在し, 神経細胞と乏突起細胞には存在しないことが示された。

Key word : glutathione S-transferase, immunohistochemistry, astroglia

グルタチオンＳ－トランスフェラーゼ (EC 2.5.1.18)は各種 xenobiotics或いは生体内で生じる有害物質と還元型グルタチオン (ＧＳＨ) との抱合を触媒する解毒酵素として知られ, ２つの subunitから成る分子量約45,000の酵素蛋白である。本酵素は解毒作用のほか, 種々の物質と結合する能力を有し, また, ミトコンドリアで生成されたヘムをミクロソーム膜チトクロームb$_5$へ運搬する[1]など多様性に富んだ機能を持っている。我々は昨年の本学会でラット脳細胞質上清に存在する分子量 12,000 の脂肪酸結合蛋白について報告したが[2),3)], 同じカラムクロマトにて脂肪酸結合能を持つ別のピークが分子量 45,000 の位置に溶出され, それがＧＳＴであることを確認した。そこで, ラット脳細胞質上清よりＧＳＴを分離・精製し, ４つの分子種を得た。更に, 他の細胞画分にもＧＳＴ活性が存在し, 特に核画分に高い活性が見られた。免疫組織化学的にもラット脳におけるＧＳＴの局在を検討した。以下, 得られた知見を報告する。

---実　験　材　料　と　方　法---

ＧＳＴ活性の測定：　ＧＳＴと 0-dinitrobenzene を基質とした浅岡と高橋の方法で測定した[4]。

ラット脳ＧＳＴの精製：　８週齢のラット脳を１０倍容の 0.25 M sucrose bufferを加え, Potter homogenizer にてhomogenizeした後, 105,000 g で90分間遠心する。得られた上清を細胞質画分としてＧＳＴの精製に用いた。

免疫組織化学的検索：　ラット脳のパラフィン包埋切片 (５μm) をラット肝ＧＳＴに対する抗体を用いた酵素抗体法 (ＰＡＰ法) で染色した。

---結　果　と　考　察---

I　GSTの精製

Sephadex G-75 カラムクロマト：　ラット脳の 105,000 g上清(Fr.I)をゲル濾過し溶出された各画分のGST活性を見ると(Fig.1)，Ovalbumin (M.W. 45,000)が溶出される位置に一致してGSTの活性ピークが見られた (Fr.II)。

GSH-アフィニティカラムクロマト：　Fraction II をGSH-アフィニティカラムにかけ，十分に洗浄後吸着部分をGSHで溶出した (Fig.2, Fr.III)。

CM-セルロースカラムクロマト：　Fraction IIIをCM-セルロースカラムにかけると，未吸着部と吸着部に計３つのピークが得られ，それぞれを peak A, B, C とする(Fig.3) 。

以上，細胞質より出発して，GSTは 130～200 倍にまで精製され，収率は12～13 %であった (Table I)。

Fig.1. Sephadex G-75 Column Chromatography

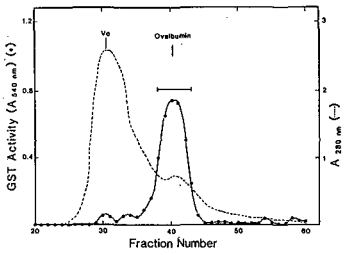
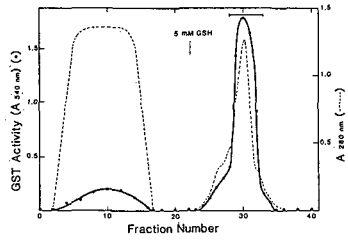


Fig.2. GSH-Affinity Column Chromatography



II　精製標品の純度と分子量

得られた精製標品 peak A, B, C のSDS-電気泳動を行なうと，peak Bは単一の蛋白染色を示し，分子量は 23,500 であった。

Fig.3. CM-Cellulose Column Chromatography

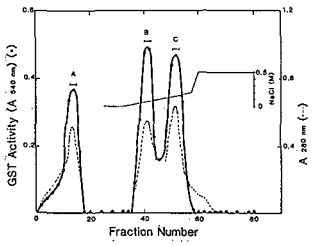


TABLE 1. Purification of glutathione S-transferases from rat brain cytosol

	Fraction	Volume (ml)	Protein (mg)	Total activity (nmol)	Yield (%)	Specific activity (nmol/mg)	Purification (-fold)
I	Cytosol	50	860	33226.0	100	27.9	1
II	Sephadex G-75	86	363.0	26315.0	79.2	72.5	2.6
III	GSH-affinity	32	11.9	33824.1	101.8	2848.6	102.1
IV	CM-cellulose						
	peak A	3	0.9	4086.8	12.3	4598.0	164.8
	peak B	3	1.0	5382.6	16.2	5630.2	201.8
	peak C	3	1.3	4917.4	14.8	3682.8	132.0

peak Aと Cはそれぞれ23,500と24,500，23,500と25,000の２本の蛋白染色が示された (Fig.4)。ゲル濾過の結果 (Fig.1)と併せて考えると，peak A, B, C はそれぞれ分子量が約45,000であり，それぞれ２つのサブユニットから成る２量体である。

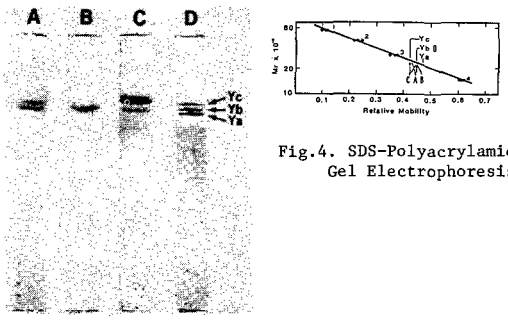


Fig.4. SDS-Polyacrylamide Gel Electrophoresis

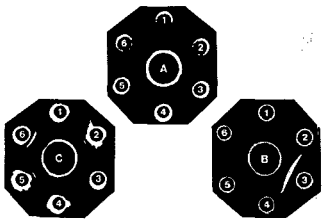
III　ラット脳細胞質GSTの性質

免疫沈降反応：　ラット肝細胞質に存在する既知の６つの分子種GST-A2 (YbYb), B2 (YcYc), BL (YaYc), AC (YbYb'), C2 (Yb'Yb'), L2 (YaYa) に対する抗体と今回得られた標品 peak A, B, C をそれぞれ免疫拡散法にて抗原性の相違を検討すると，peak Bは抗GST-C2に対してのみ，peak Cは抗GST-BL, B2, A2と沈降線を形成し，それ以外のものとは反応

しなかった。peak Aはどの抗体とも反応しなかった（Fig.5）。以上の結果から，peak BはＧＳＴ－C2であり，peak CにはＧＳＴ－A2とB2が含まれていることが示唆された（Table 2.3）。

Chromatofocusing： peak A，B，Cをそれぞれchromatofocusingを行なうと，溶出されるpHはそれぞれpeak Aは6.7，peak B は7.6，peak C は8.9 と10.1であった（Fig.6，Table 3）。

Fig.5. Double Immunodiffusion Analysis



ＩＶ　ラット脳におけるＧＳＴの分布

遠心分離法によりＧＳＴ活性は肝と同じく細胞質に多く存在したが，核にも豊富に認められ（42 %），このことは，免疫組織化学的にも示された。更に，星状膠細胞系の細胞にのみ強く染色され，神経細胞には染まらなかった。

以上，ラット脳細胞質には未知のＧＳＴが含まれていること，また，肝に豊富なＧＳＴ－L2（YaYa）が存在しないことが示された。更にＧＳＴは星状膠細胞に特異的に局在することが見い出され，今後，ニューロン・グリアの初期発生・分化の問題に有力なマーカーとして用いられる可能性を示唆した。

TABLE 2. Immunological analysis on isozyme pattern of purified glutathione S-transferases of rat brain cytosol

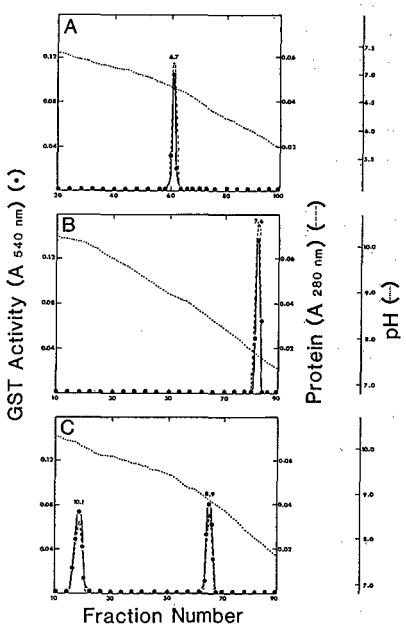
Anti-Isozymes	Precipitin line formed[a]			Theoretical immunoprecipitin reaction of each glutathione S-transferase isozyme with antibodies[b]					
	peak A	peak B	peak C	L_2	BL	B_2	A_2	AC	C_2
ant.-L_2 (YaYa)	-	-	-	++	+	-	-	-	-
ant.-BL (YaYc)	-	-	+	+	++	+	-	-	-
ant.-B_2 (YcYc)	-	-	++	-	+	++	-	-	-
ant.-A_2 (YbYb)	-	-	++	-	-	-	++	+	±
ant.-AC (YbYb')	-	-	-	-	-	-	+	++	+
ant.-C_2 (Yb'Yb')	-	++	-	-	-	-	±	+	++

TABLE 3. Properties of purified proteins

Protein purified	Molecular weight native	Molecular weight denatured	pI_{400}	GST subunit SDS-PAGE	GST subunit Ouchterlony	Isozyme identified
peak A	45,000	23,500	6.7	N.I.	-	-
		24,500		N.I.		
peak B	45,000	23,500	7.6	Yb(Yb')	Yb'	C_2
peak C	45,000	23,500	8.9, 10.1	Yb(Yb')	Yb	B_2
		25,000		Yc	Yc	A_2

N.I.; Not Identified

Fig.6. Chromatofocusing



＜文　献＞

1. M. Senjo, T. Ishibashi, Y. Imai, J. Biol. Chem. in press
2. M. Senjo, T. Ishibashi, Y. Imai, K. Takahashi, T. Ono, Arch. Biochem. Biophys. 236, 662-668, 1985
3. M. Senjo, T. Ishibashi, Y. Imai, 神経化学, 23, 231-233, 1984
4. K. Asaoka, K. Takahashi, J. Biochem. 94, 1685-1688, 1983

76. ムスカリン性アセチルコリン受容体とGTP結合蛋白質の精製及び再構成

芳賀和子・芳賀達也　（浜松医大・第一生化）

〔要　約〕

（1）ムスカリン性アセチルコリン受容体を、ブタ大脳膜分画のジギトニン－コール酸抽出液より、アフィニティークロマトグラフィーと高速液体ゲル ろ過クロマトグラフィーを用いて精製した。精製標品はSDS電気泳動で分子量約7万の位置に単一バンドとして観察され、(^{3}H)キヌクリヂニルベンジレート((^{3}H)QNB)結合の比活性はアミノ酸組成より求めた蛋白質量を基にして13.1 nmol/mgと計算された。この値は分子量7万あたり1個のリガンドが結合する時に予想される値にほぼ等しい。

（2）2種類のGTP結合蛋白質（Gi, Go）を、4段階のクロマトグラフィー操作により (^{35}S)GTPγS 結合活性を指標としてブタ大脳膜分画のコール酸抽出液より精製した。

（3）精製したムスカリン受容体とGTP結合蛋白質をリン脂質中で再構成させ、アゴニスト結合に対するグアニンヌクレオチドの影響を(^{3}H)QNB 結合を指標として調べた。Gi, Goいずれを用いた場合も、再構成によりオキソトレモリンに対する親和性が増大し、GppNHpの同時添加により親和性　の増大が抑制された。

（4）これらの結果より、ムスカリン受容体はアセチルコリンとGTP結合蛋白質という2つのリガンドに対する結合部位を持つ、分子量約7万の単一ポリペプチドであると結論した。

Key word :
Muscarinic acetylcholine receptor, GTP-binding regulatory protein

ムスカリン受容体は、(1) cGMPの増加、(2) cAMPの減少、(3) フォスファチジルイノシトール代謝の促進、(4) イオン透過性の調節など多くの機能との連関が推測されているが、受容体分子の性質及び機能についての知見は乏しい。その理由の1つは受容体の量が少ないため精製が困難であった事によると思われる。我々は先に開発したアフィニティークロマトグラフィー系(4) を改良しムスカリン受容体を単一標品にまで精製した。また、膜標品及び可溶化未精製標品を用いた実験結果よりムスカリン受容体とGTP結合蛋白質との相互作用が推測されるているので(3,7,8,10)、それを直接証明するためにGTP結合蛋白質をSternweis らの方法(9) に準じて精製し、リン脂質膜中での精製したムスカリン受容体との相互作用について検討した。

［実験方法］

1］アフィニティークロマトグラフィー

ABT（3-(2'-aminobenzhydryloxy)-tropane）－アガロースゲルは前報(4) に従って調製した。ただし、未反応のゲル内の活性基を不活化するためにアルカリ中での長時間の反応及びエタノールとの反応を利用し、エタノールアミンとの反応により＋イオンが生じるのを避けた(5)。

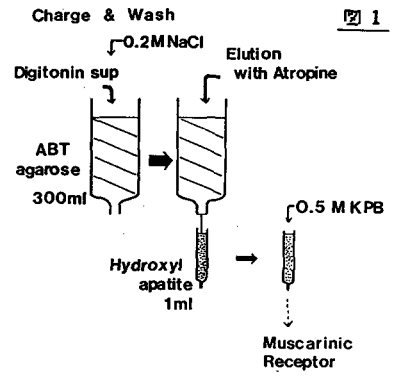


図1

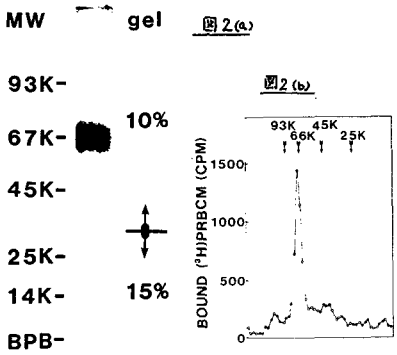


図2(a)

図2(b)

ブタ大脳膜分画（出発組織量 150 g、蛋白質量約4 g、[3H]QNB 結合部位約5 nmol）の1%ジギトニン−0.1%コール酸Naでの抽出液約1 lをABT−アガロースゲルのカラム（300-400ml）に通しムスカリン受容体を吸着させた。0.1%ジギトニンと 0.15-0.2M NaCl を含む20mMリン酸緩衝液（pH7.0）約2 lでカラムを洗浄した後、同液に0.1 mMアトロピンを含む液約1 lでムスカリン受容体を溶出させた。溶出されたムスカリン受容体はハイドロキシアパタイトの小カラムに吸着させ，そこから0.5 M リン酸緩衝液で溶出した（図1）。この方法を用いることにより、受容体はリガンドフリーで濃縮した形で得られた。この一段階の操作によりムスカリン受容体は約 3,000倍精製された。

2] ゲルろ過HPLC

アフィニティークロマトグラフィーで精製した標品3回分をまとめて透析、凍結乾燥し、少量の緩衝液に溶かしてゲルろ過HPLC（TSK 4000 60 cm、2本，TSK 3000 60 cm、1本）にかけた。溶出液として200mM K-リン酸緩衝液、0.1%ジギトニン、10 mM カルバミルコリンを用いた。同一カラムで再クロマトグラフィーを行ない最終精製標品を得た。

精製の結果を表1にまとめた。

3] GTP結合蛋白質の精製

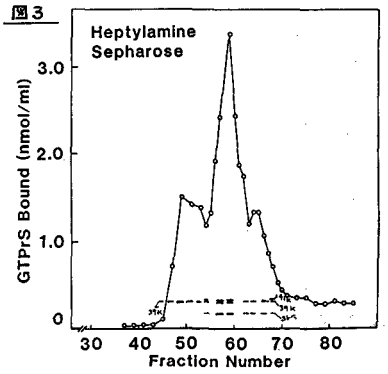
ブタ大脳膜分画（蛋白質量約13 g）の1%コール酸Naでの抽出液約1 lをDEAE-Sephacel にかけ、[35S] GTPγS 結合活性部分を濃縮後 Ultrogel AcA 34にかけ、同様に[35S] GTPγS 結合活性部分をHeptylamine Sepharoseにかけた（図3）(9)。最後にDEAEトヨパールでGiとGoを分離した（図4）(6)。

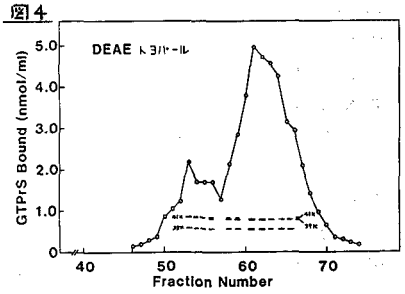
4] 再構成と結合実験

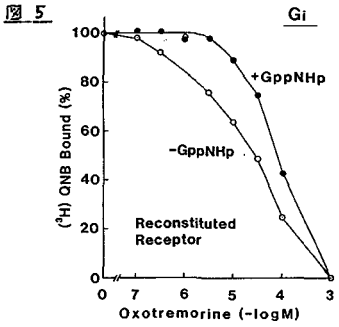
脂質としては、クロロフォルム−メタノールによるブタ脳からの抽出液を用いた。脂質とアフィニティークロマトグラフィーで精製したムスカリン受容体をデオキシコール酸中で音波処理後Sephadex G50にかけvoid volume 画分を集め、精製したGTP結合蛋白質と氷中で1時間保温した (1,3)。緩衝液で稀釈後[3H]QNB と30°Cで1時間保温し、結合した[3H]QNB をガラス繊維濾紙に集めて測定した。

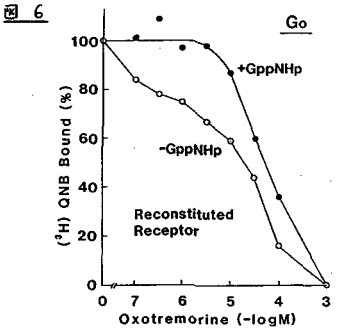
［結果と考察］

ムスカリン受容体の最終精製標品のSDS電気泳動により分子量約7万の位置に単一のバンドが銀染色法で検出された（図2 (a)）。クロラミンT法で[125]I 標識した標品も同一位置に単一バンドを与えた。これらのバンドはムスカリン受容体に対する特異的なアルキル化剤である[3H]プロピルベンジルコリン









マスタード（PrBCM）で標識されたバンドと一致した（図２（b））。最終標品の(^{3}H)QNB結合活性は13,100 pmol/mg蛋白質で、この値は分子量７万の分子１個あたり１個のリガンドが結合するときに予想される値にほぼ等しかった。

これらの結果は、ムスカリン受容体又はそのリガンド結合サブユニットは分子量約７万の１種類の蛋白質からなり、伝達物質との結合にそれ以外の蛋白質は必要ない事を示している。

ＧＴＰ結合蛋白質の精製は、ウシ大脳を用いたSternweis ら(9) の方法に従って行ない、ほぼ彼らと同様な結果が得られた。主要な (^{35}S)GTPγS 結合成分は、Giとαサブユニットの分子量がGiより僅かに小さいGoからなる。GiとGoはDEAEトヨパールでよく分離され（図４）、同一ゲルを用いた再クロマトグラフィーで精製標品が得られた。ブタ大脳を用いた今回の実験ではGoがGiの約４倍量得られた。

ＧＴＰ結合蛋白質と再構成されたムスカリン受容体は、Gi（図５）とGo（図６）いずれの場合もムスカリン性アゴニストであるオキソトレモリンに対する親和性が増加し、GppNHp存在下で高親和性結合が消失した。同様の結果がカルバミルコリン及びGTP を用いた時も得られたが、アンタゴニストであるアトロピンを用いたときはグアニンヌクレオチドの効果は見られなかった。これらの結果は、先に示された(6) Gi以外にGoともムスカリン受容体が直接相互作用することを示している。

ムスカリン受容体に２種類以上のサブタイプの存在を示唆する結果が報告されている(2)。Giと相互作用する受容体とGoと相互作用する受容体が異なるサブタイプに属するという仮説は興味あるが、現在のところそれを直接的に示す結果は得られていない。

最後にGiとGoの分離にDEAEトヨパールが有効であることを教えて下さった北大薬学部堅田利明氏に感謝致します。

表１　ムスカリン性アセチルコリン受容体の精製

	蛋白質	(^{3}H)QNB 結合活性		
	(mg)	(pmol)	(pmol/mg)	(% yield)
膜分画	11,700	15,900	1.4	100
ジギトニン抽出液	7,500	7,890	1.1	50
ＡＢＴ－ゲル溶出液	0.45	1,270	2,800	8.0
ＨＰＬＣ溶出液	0.041	540	13,100	3.4

［文献］

1. T.Asano, S.E.Pederson. C.W.Scott & E.M. Ross: Biochemistry, 23,5460-5467 (1984)
2. M.S.V.Burgen et al.: Trends Pharm. Sci., Supplement (1984)
3. V.A.Florio & P.C.Sternweis: J. Biol. Chem.,260,3477-3483(1985)
4. K.Haga & T.Haga: J. Biol. Chem., 258,13575-13579 (1983)
5. K.Haga & T.Haga: J. Biol. Chem., 260,7927-7935(1985)
6. K.Haga, T.Haga, A.Ichiyama, T.Katada, H.Kurose & M.Ui: Nature in press
7. K.Kurose, T.Katada, T.Amano & M.Ui: J. Biol.Chem., 258,4870-4875(1983)
8. T.Nukada, T.Haga & A.Ichiyama: Mol. Pharma.24,366-373(1983)
9. P.C.Sternweis & J.D.Robishaw: J. Biol. Chem. 259,13806-13813(1984)
10. S.Uchida, K.Matumoto, K.Takeyasu, H.Higuchi & H.Yoshida: Life Sci., 31,201-209(1982)

77. ラット耳下腺における β- 及び α_1 -アドレノセプターの相互関係
— Isoproterenol 処置による phosphatidylinositol 代謝回転の亢進 —

宮本　篤・大鹿英世　　(札幌医大・薬理)

〔要　約〕

β- 及び α_1- アドレノセプターの相互関係を理解する目的で，phospholipid代謝回転に対する isoproterenol処置の影響をラット耳下腺においてin vitroで検討した。Isoproterenol (10 μM) を処置した組織切片からの粗膜標本において，(^{3}H)prazosin結合のBmax値を増加させたが，Kd値に変化はなかった。また，同粗膜標本において (^{3}H)dihydroalprenolol結合のBmax値及びKd値は，変化しなかった。Isoproterenol(10 μM) の処置は，組織切片のphosphatidic acid の (^{32}P)phosphate labellingを減少したが，phosphatidylinositolの (^{32}P)phosphate labellingを増加した。しかし phosphatidylethanolamine - phosphatidylcholine代謝には，変化がなかった。その上，isoproterenol (10 μM) の処置は epinephrine, norepinephrine或は phenylephrine (10 μM) によるphosphatidylinositol代謝回転を，さらに亢進させた。以上の成績から，isoproterenol処置は phosphatidylinositol 代謝回転の亢進を増強させることが示唆され，isoproterenol 処置による α_1- アドレノセプター数の増加との相関が考えられた。

Key word : β- and α_1-receptor interaction, [^{3}H]prazosin binding, isoproterenol

【緒　言】

ラット耳下腺は，α_1 - (1,2)及び β_1 -(3,4) adrenergic, muscarinic cholinergic (5) receptorなどを有し，これらの受容体を介してenzymeや電解質などの唾液への分泌を調節している。この為，同組織は，特定の受容体刺激が他の受容体機能に与える影響を検討する上で至的な材料であると考える。我々はこれ迄，同組織における potassium 放出 (α_1- 増加 ; β_1- 減少)，phosphatidylinositol (PtdIns) 代謝回転 (α_1- 亢進) 及びcyclic AMP生成 (β_1- 促進) が受容体刺激に依存した現象である事を報告した (6,7,8,9)。さらに同組織への isoproterenol (ISO)のin vitroでの処置は，α_1- 受容体刺激によって引き起こるpotassium 放出を増強させることを報告した (10)。本報は，PtdInsの代謝回転が ISO処置によって惹起される α_1- 受容体機能の亢進に関与するか否かを検討した。

【方　法】

実験には，Wistar系雄性ラット(260-280g)の摘出耳下腺切片を使用した。

1) Isoproterenol処置後の膜標本の調製と (^{3}H)prazosin, (^{3}H)dihydroalprenolol結合実験

組織切片は，ISO を含むKRB buffer (pH 7.4) と 37 ℃で 10 min間 incubateした後，洗浄(10 min)した。その後，同切片より粗膜標本を調製し Tris-HCl buffer (pH7.4) 中に浮遊させた。この膜標本 0.4 ml(0.8-1.0 mg protein/ml)を用い (^{3}H)prazosin (0.09-2.70 nM)存在下で 25 ℃, 30 min incubateし，10 μM phentolamineでdisplaceされる結合を特異的結合とした。(^{3}H)Dihydroalprenolol結合は，膜標本の 0.4 ml(

0.2-0.4 mg protein/ml)に (^{3}H)dihydroalprenolol (0.50-20.32 nM)を添加し，displacerとして 10 μM propranololを使用した。結合飽和実験の結果をScatchard plot (11)し，結合成分の Kd, Bmax を求めた。Protein 量は，Lowry らの方法(12)で測定した。

2) Isoproterenol処置切片における(^{32}P)phospholipidsの抽出と分離

KRB buffer中で組織切片を(^{32}P)phosphate (20 μCi/ml)と37°Cで60 min pre-incubate後，ISO を10 min間作用させ，洗浄(10 min)後再度種々のadrenergic agonistを作用させた。組織切片からの phospholipidsを Folchらの方法(13)で抽出し，二次元TLC にて各phospholipids を分離後，各spotの ^{32}P の放射活性を測定した。

【結果及び考察】

1) ISO処置によるα_1- 受容体数の特異的増加

(^{3}H)Prazosin及び(^{3}H)dihydroalprenolol結合に対する ISO処置の影響を検討した(Table 1)。ISO (10 μM) の処置は(^{3}H)-prazosin結合成分のBmax値を増加 ($P<0.01$) したが，Kd値は変化しなかった。また，(^{3}H)-dihydroalprenolol結合のKd値及びBmax 値には，影響しなかった。従ってISOの処置は，アドレノセプターの中でもα_1- レセプター数を特異的に増加させると考えられる。

Table 1. Influence of isoproterenol treatment on Kd and Bmax of specific binding of (^{3}H)prazosin and (^{3}H)dihydroalprenolol to parotid membranes

Ligand	Treatment	Saturation parameters	
		Kd (nM)	Bmax (fmol/mg protein)
(^{3}H)Prazosin	Vehicle	0.39±0.04 (4)	29.77±1.06 (4)
	Isoproterenol	0.45±0.07 (4)	39.70±3.02 (4)**
(^{3}H)Dihydroalprenolol	Vehicle	4.20±0.11 (4)	333.86±10.12 (4)
	Isoproterenol	4.95±0.47 (4)	341.56±15.98 (4)

Parotid slices were pre-incubated with or without 10 μM isoproterenol at 37 °C for 10 min in KRB buffer (1st incubation). After then washed with KRB buffer for 10 min, crude membranes prepared from the intact (vehicle-trated) and the isoproterenol-treated parotid slices. (^{3}H)Prazosin and (^{3}H)dihydroalprenolol (final concentration 0.09 - 2.70 and 0.50 - 20.32 nM, respectively) were used for the binding assay. The Kd and Bmax values were estimated by Scatchard analysis. Each values show the mean±S.E. with the number of experiments in parentheses.
**P<0.01 as compared to control (vehicle-treated).

Table 2. Effect of isoproterenol treatment on the phospholipids of rat parotid prelabelled with (^{32}P)phosphate

Phospholipid	Treatment	
	Vehicle	Isoproterenol
	(% of phospholipid radioactivity)	
Phosphatidic acid	9.19 ± 0.44	6.60 ± 0.86 **
Phosphatidylinositol	23.80 ± 0.55	30.15 ± 4.58 *
Phosphatidylethanolamine	4.40 ± 0.69	4.67 ± 0.50
Phosphatidylcholine	24.50 ± 2.95	26.66 ± 1.27

(^{32}P)Phosphate prelabelled parotid slices were pre-incubated with or without 10 μM isoproterenol at 37 °C for 10 min in KRB buffer (1st incubation). After then washed with KRB buffer for 10 min, the radioactivities of relative (^{32}P)phospholipids were determined. Values represent mean percentage of total radioactivity recovered in phospholipids±S.E. of mean of 6 to 7 experiments.
**P<0.01, *P<0.05 as compared to control (vehicle-treated).

2) ISO処置によって惹起されたPtdIns代謝回転の亢進

ラット耳下腺におけるPtdIns代謝回転は，主にα_1- アドレノセプターの活性化によって引き起こされる (9,14,15)。そこで，(^{32}P)phosphateを前標識したラット耳下腺のphopholipidsに対する ISO処置の影響を検討した (Table 2)。ISO(10 μM)処置はphosphatidic acid (PtdA)の (^{32}P)phosphate labelling を減少 ($P<0.01$) したが，PtdInsの (^{32}P)phosphate labelling を増加 ($P<0.05$) させた。また ISOの処置は，phosphatidylethanolamine(PtdE)及び phosphatidylcholine(PtdC)の (^{32}P)phosphate labelling を変化させなかった。従って ISOの処置は，PtdInsの代謝回転の亢進を引き起こすと考えられ，PtdE - PtdC 代謝は ISO処置により影響されないと思われる。

3) ISO前処置後のα_1- 受容体刺激薬によるPtdIns代謝回転の増強

Table 3. Effects of various adrenergic agonists on (^{32}P)phospholipids of isoproterenol-pretreated rat parotid slices

	Changes in radioactivity (c.p.m x 10^{-2} / 10 mg tissue)			
	Vehicle	Epinephrine	Norepinephrine	Phenylephrine
Pretreatment				
Vehicle				
Phosphatidic acid	1.67±0.06	2.45±0.11**	2.57±0.09**	2.72±0.18**
Phosphatidylinositol	5.95±0.48	8.92±0.78**	6.98±0.55**	7.24±0.61**
Phosphatidylethanolamine	1.16±0.09	1.17±0.23	0.97±0.09	1.15±0.12
Phosphatidylcholine	4.39±0.41	4.78±0.53	4.29±0.36	5.11±0.42
Isoproterenol				
Phosphatidic acid	1.17±0.09¶¶	2.43±0.27**	2.79±0.18**	2.46±0.38**
Phosphatidylinositol	8.19±0.17¶¶	12.21±1.96**¶¶	9.25±0.08**¶¶	10.11±1.51**¶¶
Phosphatidylethanolamine	1.11±0.11	1.48±0.26	1.27±0.29	1.38±0.45
Phosphatidylcholine	4.34±0.26	4.43±0.57	4.73±0.41	4.96±0.43

(^{32}P)Phosphate prelabelled parotid slices were pre-incubated with or without 10 μM isoproterenol at 37 °C for 10 min in KRB buffer (1st incubation). After then washed with KRB buffer for 10 min, then re-incubated for 10 min with 10 μM adrenergic agonists (2nd incubation), and the radioactivities of relative (^{32}P)phospholipids were determined. Each values represents mean±S.E. of 4 to 6 experiments.
** P<0.01 as compared to respective pretreatment group,
¶¶ P<0.01 as compared to respective agonist alone in vehicle pretreatment.

ISOを前処置した組織切片の(^{32}P)phospholipidsに対する種々の adrenergic agonistの効果を検討した (Table 3)。Epinephrine,norepinephrine(mixed α - and β - agonist)或は phenylephrine (pure α_1-agonist) によって引き起こるPtdInsの(^{32}P)-phosphate の labellingの増加は，ISO (10 μM) の前処置によりさらに増加(P<0.01)した。従って ISOの処置は，α_1-agonists による PtdIns 代謝回転の亢進をさらに増強させることが示された。

【結　論】

以上の成績から，ISOの処置が組織切片からの potassium放出を増強させるのと同様に，PtdIns代謝回転の亢進を増強させることが示唆され，ISO処置による α_1- アドレノセプター数の増加との相関が考えられた。

【文　献】

1. Strittmatter, W. J., Davis, J. N., and Lefkowitz, R. J. (1977) J. Biol. Chem. 252, 5472-5477 2. Ito, H., Hoopes, M. T., Baun, B. J., and Roth, G. S. (1982) Biochem. Pharmacol. 31, 567-573 3. Butcher, F. R., Goldman, J. A., and Nemerovski, M. (1975) Biochim. Biophys. Acta 392, 82-94 4. Calsöö, B., Danielsson, Å., and Henriksson, R. Br. J. Pharmacol. 62, 364-366 5. Leslie, B. A., Putney, J. W., and Sherman, J. M. (1976) J. Physiol. (Lond.) 260, 351-370 6. Ohshika, H., Miyamoto, A., Takemura, H., Hatta, S., and Tanaka, M. (1983) Japan. J. Pharmacol. 33, 811-817 7. Miyamoto, A., and Ohshika, H. (1984) Japan. J. Pharmacol. 36, 100-103 8. Miyamoto, A., and Ohshika, H. (1985) Japan. J. Pharmacol. 38, 305-311 9. Miyamoto, A., Akino, T., and Ohshika, H. (1985) Japan. J. Pharmacol. in press 10. Miyamoto, A., and Ohshika, H. (1984) Japan. J. Pharmacol. 34, 356-358 11. Scatchard, G. (1949) Ann. N. Y. Acad. Sci. 51, 660-672 12. Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L., and Randall, R. J. (1951) J. Biol. Chem. 193, 265-275 13. Folch, J., Lees, M., and Sloane-Stanley, G. H. (1957) J. Biol. Chem. 226, 497-514 14. Jones, L. M., amd Michell, R. H. (1976) Biochem. J. 158, 505-507 15. Weiss, S. J., McKinney, J. S., and Putney, J. W. (1980) Biochem. J. 206, 555-560

78. 血管 adrenergic nerve からの 5-hydroxytryptamine 遊離と presynaptic α-adrenoceptor による調節

川崎博己・増元圭三・高崎浩一朗　　(宮崎医大・薬理)

〔要　約〕

5-Hydroxytryptamine (5-HT) は血管 adrenergic nerve に取り込まれ、神経刺激によって遊離されるが、この5-HT遊離に対する presynaptic α-receptor の調節機序について、摘出ラット腸間膜動脈灌流標本で、〔^{3}H〕-5-HT と〔^{3}H〕-noradrenaline (NA) を用いて検討した。〔^{3}H〕-5-HT label 標本で、動脈周囲神経の電気刺激 (PNS, 8Hz) は、灌流液中の〔^{3}H〕量の増加 (〔^{3}H〕-efflux) を起こした。〔^{3}H〕-efflux は、methoxamine (α_1-agonist)、prazosin (α_1-antagonist) と LY53,857 (5-HT$_2$ antagonist) で影響されなかったが、clonidine、oxymetazoline (α_2-agonist) と yohimbine (α_2-antagonist) では増加を起こし、また、cocaine (uptake inhibitor) と BHT-920 (α_2-agonist) は著明に抑制した。clonidine と cocaine の作用は yohimbine によってのみ拮抗されたが、BHT-920 の作用は変化を受けなかった。〔^{3}H〕-NA label 標本では、〔^{3}H〕-NA efflux は、clonidine、oxymetazoline で軽度増加、cocaine で著明な促進、BHT-920 では逆に抑制された。以上の結果から、血管 adrenergic nerve からの5-HT遊離は、同時に遊離された NA 量に依存し、presynaptic α_2-receptor の興奮により抑制的に調節されており、また、presynaptic α_2-receptor には二つの亜型が存在する可能性が示唆される。さらに、BHT-920 の作用は α_2-receptor を介したものでなく他の receptor の興奮に基くと考えられる。

Key word：　5-Hydroxytryptamine, Vascular adrenergic nerve, Presynaptic α_2-receptor

我々は強力な血管収縮作用を有する 5-Hydroxytryptamine (5-HT) が血管交感神経 (adrenergic nerve) に取り込まれ、神経刺激によって遊離されることを見出し、その遊離機序について報告した (3)。また、adrenergic nerve に取り込まれた 5-HT は transmitter の noradrenaline (NA) と同じ vesicle に貯蔵され、Ca^{++} 依存性で、exocytosis によって遊離される可能性を示唆した (3)。

Adrenergic nerve terminal 上には、NA 遊離を局所的に調節している presynaptic receptor が存在することが知られている (4)。その中でも α_2-adrenoceptor (α_2-receptor) の刺激は NA 遊離を抑制する。従って、adrenergic nerve に取り込まれた 5-HT も、その遊離に際して presynaptic receptor によって調節されていると考えられる。本研究では、〔^{3}H〕-5HT と〔^{3}H〕-NA を用いて、血管 adrenergic nerve からの 5-HT 遊離と presynaptic α-receptor による調節を検討した。

〔実験方法〕　Wistar 系雄性ラット (300 g 前後) を用い、pentobarbital 麻酔下 (50 mg/kg i.p.) に開腹し、上腸間膜動脈の起始部付近に polyethylene catheter を挿入し、腸間膜動脈を腸管とともに摘出した。上腸間膜動脈からの側枝を盲腸側の4本を残して全部結索して切断した後、残りの動脈を腸管壁の近縁で切断した。摘出した腸間膜動脈は 37 °C に保った organ bath 上に置き、動脈内を peristaltic pump を用いて Krebs 液で定流量 (2.5 ml/min) 灌流し、同時に標本の乾燥を防ぐため標本上を同液で表面灌流 (0.1 ml/min) した。Krebs 液は予め 95% O_2 − 5% CO_2 の混合ガスで通気し、37 °C に保ったコイル内を通過させた。動脈カテーテル付近の側枝から pressure transducer を介して灌流圧を測定した。灌流圧が一定した後 (約30分)、〔^{3}H〕-5-HT (0.1 μM) あるいは〔^{3}H〕-NA (

0.03 μM) を20分間灌流して標本をlabelし、60分～70分間〔^{3}H〕を含まないKrebs液で洗浄灌流した。 上腸間膜動脈の周囲に置いた白金電極を通して、1分間の経壁電気刺激 (PNS、 8Hz、 2msec、 60V) を16分間隔で行った。 その間の灌流液を2分間隔で集め、灌流液中の〔^{3}H〕量を測定した。 薬物はすべてKrebs液にて最終濃度 (M) に希釈し、〔^{3}H〕-5-HTの実験では、第2回PNS (S_2) の前10分から、〔^{3}H〕-NAでは第4回PNS (S_4) の前10分から灌流を開始し、刺激終了後10分まで行った。 拮抗薬の灌流は、第1回PNS (S_1) の前10分から開始し、実験終了まで行った。 途中、〔^{3}H〕-5-HTではS_2の10分前、〔^{3}H〕-NAではS_5の前10分から拮抗薬と作働薬を含んだKrebs液を実験終了まで灌流した。 実験終了後、標本はSoluen-100を加えて溶解し、標本中の〔^{3}H〕を測定した。 PNSによる〔^{3}H〕遊離量は組織中の〔^{3}H〕量の%として表し (fractional release)、PNS直前の〔^{3}H〕自然遊離を差し引いた値とした。 薬物の作用をみる場合、〔^{3}H〕-5-HTではS_2/S_1、〔^{3}H〕-NAでS_4/S_3の比を求めた。

Table 1. Effects of α_1- and α_2-adrenoceptor agonists and an uptake inhibitor on the PNS(8 Hz)-evoked [^{3}H]-efflux in the perfused rat mesenteric vascular beds prelabeled with [^{3}H]-5-HT or [^{3}H]-NA.

Agonist	Ratio [^{3}H]-5-HT (n) (S_2/S_1)	[^{3}H]-NA (n) (S_4/S_3)
Control	0.91 ± 0.03(20)	0.95 ± 0.06(6)
Methoxamine		
0.1 μM	0.80 ± 0.07(5)	-
1 μM	0.96 ± 0.04(5)	-
10 μM	0.78 ± 0.15(4)	-
Clonidine		
0.01 μM	0.88 ± 0.15(5)	-
0.1 μM	1.08 ± 0.11(5)	0.94 ± 0.06(5)
1 μM	1.29 ± 0.12(7)***	0.92 ± 0.07(7)
10 μM	1.45 ± 0.22(5)**	1.18 ± 0.13(5)
BHT-920		
0.01 μM	0.71 ± 0.06(4)*	0.84 ± 0.08(3)
0.1 μM	0.57 ± 0.10(5)***	0.78 ± 0.04(4)
1 μM	0.39 ± 0.03(5)***	0.51 ± 0.04(5)***
Oxymetazoline		
0.1 μM	1.34 ± 0.17(6)***	0.96 ± 0.19(3)
1 μM	1.04 ± 0.10(5)	1.04 ± 0.16(3)
Cocaine		
1 μM	0.73 ± 0.16(3)	1.23 ± 0.05(5)*
10 μM	0.52 ± 0.12(6)***	1.40 ± 0.01(4)***

*P<.05, **P<.01, ***P<.001 significance from control.

Table 2. Effects of α_1- and α_2-adrenoceptor and 5-HT_2 receptor antagonists on the PNS(8 Hz)-evoked [^{3}H]-efflux in the perfused rat mesenteric vascular beds prelabeled with [^{3}H]-5-HT.

Antagonist	Ratio [^{3}H]-5-HT (n) (S_2/S_1)
Control	0.91 ± 0.03(20)
Prazosin	
0.1 μM	0.95 ± 0.14(6)
1 μM	1.34 ± 0.18(8)**
Yohimbine	
0.1 μM	1.37 ± 0.14(5)***
1 μM	1.64 ± 0.13(6)***
LY 53,857	
0.01 μM	0.93 ± 0.20(5)
0.1 μM	0.93 ± 0.15(4)

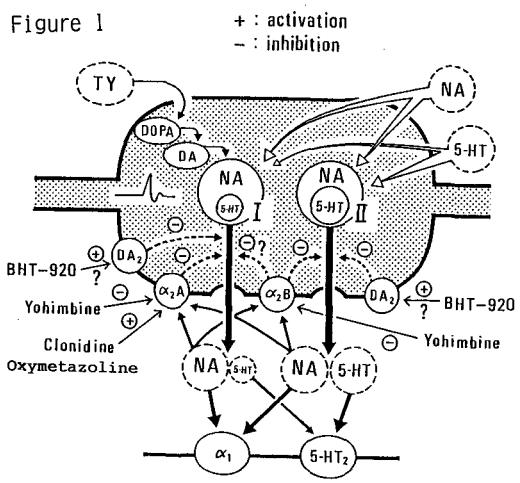
**P<.01, ***P<.001 significance from control.

〔実験成績〕 〔^{3}H〕-5-HT label標本において、PNS (8 Hz) は灌流液中の〔^{3}H〕量 (〔^{3}H〕-efflux) を増加させたが、tetrodotoxin (100 nM) およびCa^{++}-free Krebs液存在下では〔^{3}H〕-effluxは出現しなかった。 表1および表2は、PNSによる〔^{3}H〕-effluxにおよぼすα-agonist、α-antagonist、5-HT_2-antagonistおよびuptake inhibitorの作用を示したものである。 methoxamine、prazosin (100 nM) およびLY53,857 (2) は〔^{3}H〕-5-HT effluxにほとんど影響しなかった。 oxymetazolineは低濃度において、clonidineは用量依存的な〔^{3}H〕-5-HT efflux の増加を起こし、また、yohimbineでも〔^{3}H〕-effluxの増加が認められた。 しかし、BHT-920およびcocaineは、用量依存的に〔^{3}H〕-5-HT effluxを減少させた。 〔^{3}H〕-NA label標本では、PNSによる〔^{3}H〕-effluxは、clonidineとoxymetazolineで軽度の増加、cocaineで著明な増加が認められ、逆にBHT-920によって用量依存的に抑制された。 clonidine (1～10 μM) による〔^{3}H〕-

5-HT efflux増加作用は、prazosin (0.1 μM) では影響を受けなかったが、yohimbine (1 μM) 存在下では消失した。 また, cocaine (10 μM) の〔^{3}H〕-5-HT efflux抑制作用もyohimbine存在下では消失し、逆に増加が認められた。 しかし、BHT-920 (0.1~1 μM) の〔^{3}H〕-efflux抑制作用は、yohimbine存在下でも出現し、その抑制の程度はyohimbine非存在下とほぼ同じであった。

〔考察〕 以上の結果に基いて、血管交感神経終末からの5-HT遊離機序とpresynaptic α-receptorによる調節の仮説を図示したものが図1である。

Figure 1



神経終末には少なくとも2つの貯蔵pool (pool IとII) が存在する。 pool Iには主に生合成されたNAおよび再取り込みされたNA (〔^{3}H〕-NA) が貯蔵され、pool IIには取り込まれたNAとfalse transmitterの5-HT (〔^{3}H〕-5-HT) が含まれる。 神経刺激はpool IとIIからNAと5-HTをCa^{++}依存性にexocytsisによって遊離するが、この遊離は2種のpresynaptic α_2-receptor (α_2Aとα_2B) によって調節される。 α_2Aの興奮はpool IからのNA遊離を抑制し、pool IIからのNAと5-HTの遊離はα_2Bの興奮によって抑制される。 遊離されたNAは両α_2-receptor subtypeを興奮させ、negative feedbackを作働させる。 cocaineはNAの神経への再取り込み抑制によりシナプス間隙のNA濃度を高め、α_2Aとα_2Bを興奮させ5-HT遊離を抑制する。 一方、yohimbineは両α_2-receptorを遮断しnegative feedbackを抑制することによって5-HT遊離を促進する。 clonidineとoxymetazolineはα_2Aのみを興奮させる。 その結果、pool IからのNA遊離減少が起こり、シナプス間隙のNA濃度の低下をもたらす。 これによりα_2Bの興奮性は低下し、negative feedbackが抑制され、pool IIからの5-HT遊離の促進が起こる。 clonidineによって〔^{3}H〕-NA efflux減少がみられなかったのは、〔^{3}H〕-NAのpool Iからの遊離減少とpool IIからの遊離促進の結果と考えられる。 BHT-920による5-HT遊離抑制作用はyohimbineで抑制されないので、α_2-receptorを介したものでなく、dopamine receptor (DA_2)の興奮による可能性も考えられる。 事実、BHT-920は中枢神経においてDA receptor興奮作用を有する(1)。 一方、5-HT遊離においてpresynaptic α_1-receptorおよびpresynaptic $5\text{-}HT_2$ receptorの関与はないと考えられる。

〔文献〕 (1) Anden, N.-E., Golembiowska-Nikitin, K. and Thornstrom, U. (1982) Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol. 321, 100-104.
(2) Cohen, M.L., Fuller, R.W. and Kurz, K.D. (1983) J. Pharmacol. Exp. Ther. 227, 327-332.
(3) Kawasaki, H. and Takasaki, K. (1984) J. Pharmacol. Exp. Ther. 229, 816-822.
(4) Langer, S.z. (1980) Pharmacol. Rev. 32, 337-362.

79. ラット大脳皮質細胞膜分画のアデニル酸シクラーゼ活性におよぼす各種抗うつ薬の影響

山岡巧一・難波経篤*・野村総一郎・永田　豊*・中澤恒幸
(藤田学園保衛大・医・精神神経，生理*)

〔要　約〕

ラット大脳皮質より調整した細胞膜標品のアデニル酸シクラーゼ(A-cyclas)活性におよぼす各種抗うつ薬の影響について検討し，以下の結果をえた。

① imipramine, clomipramine, amitriptyline, desmetylimipramine, mianserin, zimelidine などの抗うつ薬は，そのいずれもが濃度依存性にA-cyclase活性を抑制した。② A-cyclase 活性の Mn^{2+} による上昇はいずれの抗うつ薬によっても影響されなかった。③各種抗うつ薬は，A-cyclase の F^- による活性上昇に対して有意な活性抑制効果を示した。この結果はあらかじめ抗うつ薬と細胞膜標品とを反応させた後に F^- を作用させた場合により顕著に認められた。④抗うつ薬はGTPによるA-cyclaseの活性化を抑制した。この作用はあらかじめ抗うつ薬と細胞膜標品を作用させた後にGTPを添加した場合により著明に見られA-cyclaseのGTPによる活性化作用は認められなかった。

以上の結果は，抗うつ薬はA-cyclaseの触媒単位に直接作用するのではなくGTP結合蛋白質に作用してA-cyclaseの活性化を抑制している可能性が強く示唆された。

Key word : antidepressants, adenylate cyclase, GTPbinding regulatory protein

近年，抗うつ薬はシナプス後膜のアデニル酸シクラーゼ（A-cyclase）と共役しているβ-受容体数を減少させ(2)，脳内 cyclic AMP 量を減少させる作用があると考えられるようになっている(8)。ところが，ある種の抗うつ薬は脳内 cyclic AMP 量を減少させるにもかかわらず，β受容体数には変化を及ぼさないことが示されている(1)。このことから，抗うつ薬が脳細胞膜の受容体と細胞内 cyclic AMP 生成との間に介在している酵素，A-cyclase そのものに直接作用している可能性も考えられる。

そこでわれわれはラット大脳皮質より調整した細胞膜標品を用いて，各種抗うつ薬のA-cyclase 活性におよぼす影響を調べ，それらの作用部位について検討した。

〔実験方法〕

1）脳細胞標品の調整：Wister 系雄性ラット（180～220 g）をエーテル麻酔下に 0.9 % NaCl を左心室より加圧注入して脳内の血液を灌流除去し断頭後に大脳を摘出した。皮質部分を切り出し，10 倍量の 0.32 M 蔗糖を含む 50mM Tris-HCl buffer (pH 7.4) 中でホモジェナイズした後，1000g で 10 分間遠心分離して得られた上清を，更に 50,000g で 60 分間遠心し，得られた沈渣画分を酵素標品として実験にもちいた。2）A-cyclase 活性測定法：酵素の活性測定はすでに記載した方法にしたがった(5)。酵素標品に抗うつ薬等を加えて，あらかじめ 37℃ で 20 分間のインキュベートをした後，〔^{3}H〕ATPを含む反応液を加えてさらに 20 分間反応させた。酵素の活性は，20 分間の反応時間中に基質から酵素的に生成された〔^{3}H〕cyclic AMP 量より求めた。測定値の有意差検定は Student t-test によっておこなった。3）蛋白質定量：Lowryらの方法(3)により牛血清アルブミンを標準試量としておこなった。

〔結果と考察〕

1. A−cyclase 活性におよぼす抗うつ薬の影響：imipramine（IMI），clomipramine（CLO），amitriptyline（AMI），desmetylimiprame（DMI），mianserine（MIA）および zimelidine（ZIM）の各種抗うつ薬は，そのいずれもが濃度依存性に脳細胞膜のA−cyclase 活性を抑制した（表−1，図−1）。このことは，in vivo においてもこれら抗うつ薬の慢性投与後には，脳内の cyclic AMP 量が減少するという現象（6，7，8）の一部に，抗うつ薬に膜のA−cyclaseの活性化を直接阻害する作用があることを強く示唆している。抗精神病薬の chlorpromazine（CP）も A−cyclase活性を強く抑制したが，CPをラットに連日経口投与して6日目以降に脳内 cyclic AMP 量が減少する事が示されている(7)。しかし抗コリン剤の atropinや，中枢刺激剤の methylphenidate はA−cyclase 活性には全く影響を与えなかった。(表−1)

	Drug concentration (μM)			
	0	50	100	300
control	2.801 ± 0.192			
IMI		2.812 ± 0.042	2.142 ± 0.108**	1.081 ± 0.112***
AMI		2.557 ± 0.082*	2.185 ± 0.104***	1.059 ± 0.114***
DMI		2.336 ± 0.028	2.159 ± 0.005	1.369 ± 0.087***
MIA		2.700 ± 0.196	2.451 ± 0.144**	1.291 ± 0.052
CP		2.241 ± 0.220***	1.171 ± 0.073***	0.196 ± 0.003
atropine		2.851 ± 0.009	2.890 ± 0.066	2.773 ± 0.030

Tab.-1. Effect of various drugs on A-cyclase activity in cell membrane from rat cerebral cortex. A-cyclase activity is expressed as the amount of cyclicAMP formed (nmol/mg-protein).
*p<0.05, **p <0.01, ***p<0.001 significant different from the control.

2. A−cyclaseに対する抗うつ薬の作用部位の検討：Mn^{2+}はA−cyclaseの触媒単位に直接作用して酵素を活性化することが知られている。そこで，標品の酵素活性値を半減させる濃度の各種抗うつ薬をMn^{2+}と共に作用させたところ，Mn^{2+}による酵素の活性化はいずれの抗うつ薬によっても全く阻害されなかった（図−1）。したがって，抗うつ薬がA−cyclaseの触媒単位に作用して酵素活性を阻害している可能性は考えにくい。他方，GTP 結合蛋白質（N−タンパク）に作用して，A−cyclase 活性を上昇させることが知られているF^-を各種抗うつ薬と一緒に作用させると，F^-による酵素の活性化はいずれの抗うつ薬によっても有意に阻害された（図−1）。つまり，抗うつ薬はN−タンパクに直接作用して酵素活性の発現を抑制している可能性が示唆された。この可能性をさらに明かにするために，あらかじめF^-でN−タンパクを刺激しておいて，次いで抗うつ薬を作用させた場合（図−2，右欄）と，これとは逆に，あらかじめ抗うつ薬を作用させた酵素標品にF^-を作用させた場合（図−2，左欄）の酵素の活性化の程度を比較した。すると抗うつ薬のA−cyclase 抑制効果は後者の方が前者より著明であった。つまり，抗うつ薬がN−タンパクの働きを抑制し，F^-によるA−cyclaseの活性化を阻

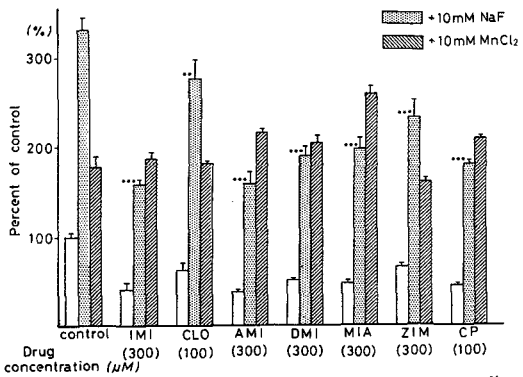


Fig.-1. Effect of various antidepressants and chlorpromazine on Mn^{2+}-stimulated A-cyclase and on F^--stimulated A-cyclase activity in cell membrane from rat cerebral cortex. Each value is the mean ± S.D. of at least 4 experiments, expressed as percentage of the control. **p<0.01, ***p<0.001 significantly different from the F^--stimulated value in the control group.

止していることを物語っている。したがって抗うつ薬のA－cyclase 活性の抑制作用は触媒単位に作用するのではなく，N－タンパクに直接作用する結果による可能性が強く示唆される。しかし，抗うつ薬の種類によってこの抑制作用の程度には差異が見られるので，さらに詳細な検討が必要であろう。

3. GTPとN－タンパクとの結合におよぼす抗うつ薬の影響：GTPは50μMの低濃度で酵素標品のA－cyclase 活性を2倍以上に活性化した（図－3）。あらかじめGTPと酵素標品とを作用させた後に抗うつ薬を作用させると，抗うつ薬によって抑制されたA－cyclase 活性はGTPの濃度を増加させるに従って回復する傾向が見られた（図－3）。一方，あらかじめ酵素標品と抗うつ薬とを作用させた後にGTPと作用させた場合には，A－cyclase 活性のGTPによる活性化効果は全く認められなかった（図－3）。このことは，抗うつ薬がN－タンパクのGTP結合部位に影響を与えて酵素活性の発現を阻害するためと考えられる。

Menkes ら(4)は，ラットに種々の抗うつ薬を慢性投与した後には脳のA－cyclase が活性化されており，この活性化がGTPによってさらに増大されることを示した。この事から抗うつ薬はN－タンパクとA－cyclaseの触媒単位との結合を強め，その結果A－cyclase の活性化が引き起こされると考えている。しかしながら今回我々が酵素標品を用いて in vitro の実験系で得た成績結果は彼等の成績とは反対であり，種々の抗うつ薬はN－タンパクそのものに直接作用してA－cyclase の活性化を抑制し，なおかつ抗うつ薬がGTPとN－タンパクとの結合を阻害する作用を持っていると推論される。

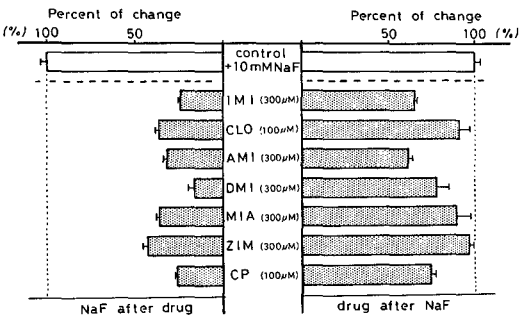


Fig.-2. Interaction of antidepressants or chlorpromazine and NaF on A-cyclase activity in a cell membrane from rat cerebral cortex.
Each value is the mean ± S.D.,expressed as percentage of the contrl plus 10mM NaF.

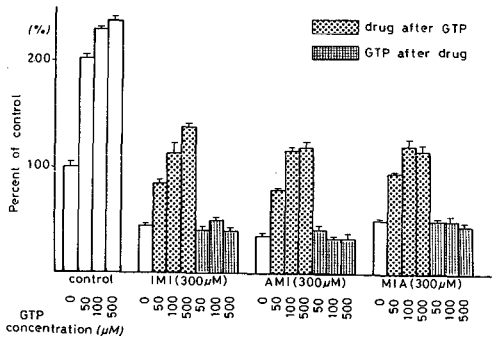


Fig.-3. Interaction of antidepressants and GTP on A-cyclase activity in a cell membrane from rat cerebral cortex.
Each value is the mean ± S.D., expressed as percentage of the control.

文献： (1) Asakura,M.,Tsukamoto,T. and Hasegawa,K.(1982) Brain Res.,235,192-197. (2) Banerjee,S.P.,Kung,L.S.,Riggi,S.J. et al.(1977) Nature,268,455-456. (3) Lowry,O.H.,Rosebrough,N.J.,Farr,A.L. et al.(1951) J.Biol.Chem.,193,265-275. (4) Menkes,D.B.,Rasenick,M.M.,Wheeler,M.A. et al.(1983) Science, 219,65-67. (5) Nanba,T.,Ando,M.,Nagata,Y. et al.(1981) Brain Res.,235,192-197. (6) Salser,F.,Lanowsky, A.J.,Okada,F. et al.(1983) Neuropharmacology,22,425-431. (7) Schultz,J.(1976) Nature,261,417-418. (8) Vetulani,J. and Sulser,F.(1975) Nature,257,494-496.

80. Serotonin 受容体に対する phencyclidine の作用

野田幸裕・鍋島俊隆・山口和政・吉田　茂
石川和宏・古川　宏*・亀山　勉
（名城大・薬・薬品作用，薬化*）

〔要　約〕

Phencyclidine(PCP)によって惹起される常同行動にserotonin(5-HT)神経系が密接に関与していることが示唆されている。そこで、PCPの5-HT神経系に及ぼす作用を明らかにするため、ρ-chloroamphetamine(PCA; 10 mg/kg)を前処置し、PCPによって惹起される常同行動がどのような影響を受けるか、5-HT関連薬物と比較検討した。PCA前処置群では、脳内5-HTおよび5-hydroxyindoleacetic acid含量がともに有意に減少し、また結合実験によって、5-HT受容体の結合量に有意な増加が見られた。これらの結果よりPCA 前処置によって5-HT神経系のpresynapseが破壊され、postsynapseの5-HT受容体の感受性が増大していると思われる。一方、この動物にPCPを投与すると、5-methoxy-N,N-dimethyltryptamine(5-HT受容体agonist)と同様にPCP による5-HT依存性の行動が有意に増強されたが、PCA(5-HT放出薬)のそれは逆に減少した。さらに^{3}H-PCPが親和性を持つopioid sigma受容体をsigma agonistのSKF 10,047でブロックし^{3}H-PCPの結合実験を行ったところ、^{3}H-PCPの結合量が有意に増加したが、5-HT受容体antagonistであるmethysergideで5-HT$_2$受容体をブロックし、^{3}H-PCPの結合実験を行ったところ、^{3}H-PCPの結合量の増加は見られなかった。以上の結果より、PCPは5-HT神経系のpresynapseに作用するのではなく、5-HT受容体、特に5-HT$_2$受容体に直接作用することにより5-HT依存性の行動を惹起すると思われる。

Key word： PCP　5-HT receptors　Supersensitivity

Phencyclidine(PCP)を動物に投与すると常同行動の発現や自発運動量の増加などの行動変化が現れる。PCPの惹起する行動変化の中には、一般的に5-HT依存性の行動といわれる、5-HT神経系を刺激した場合に認められるような行動(backpedalling, wet dog shake, turning, head weaving, forepaw treading, head twitchなど)が多い。我々はPCPによって惹起される常同行動が5-HTの細胞体が分布している縫線核の破壊、および5-HT受容体拮抗薬によって減弱されることを既に報告している(3,4)。また、tryptophan(5-HT前駆体)，ρ-chloroamphetamine(PCA; 5-HT放出薬)，imipramine(5-HT取り込み阻害薬)およびpargyline(monoamine oxidase(MAO)阻害薬)で5-HT神経系を活性化すると、PCPによって惹起されるhead weavingが増強される(5)。さらにPCAで5-HT神経機能を低下させると、PCP 5 mg/kgの常同行動が減弱されるが(5)、12.5 mg/kgのそれは変化しない(未発表データー)。また、5-HT受容体において、PCPが^{3}H-*spiperone*結合(5-HT$_2$受容体)を低濃度で阻害するが、^{3}H-5-HT結合(5-HT$_1$受容体)を阻害しないこと(6)、またPCP連続投与後に、5-HT$_1$および5-HT$_2$受容体の結合量が減少すること(3)を報告している。これらのことは、PCPが5-HT神経系に密接に関与していることを示しており、その作用は5-HT受容体に対して直接的であると考えられる。そこで今回、PCPの5-HT神経系に及ぼす作用をより明らかにする目的で、脳内5-HT受容体の感受性を増大させたラットを用いて、PCPによって惹起される常同行動がどのような影響を受けるか、PCA(5-HT放出薬)および5-methoxy-N,N-dimethyltryptamine(5-MeODMT; 5-HT受容体agonist)を投与した場合と比較検討した。加えて、この動物より得たシナプス膜の5-HT受容体に対する^{3}H-PCPの結合について、5-HT関連の^{3}H-ligandの結合能と比較した。

〔実験方法〕

薬物処置　動物はFischer344系雄性ラット、体重150－250 gを使用した。実験スケジュールはFig. 1に示した。脳内5-HT受容体の感受性を増大させる方法として、Friedmanら(2)の方法を若干変えて、PCA 10 mg/kgを1回腹腔内へ投与後13日間休薬する方法を用いた。このような前処置をした後、動物にPCP 2.5, 5.0および7.5mg/kgを腹腔内へ投与し、PCPによって惹起される行動変化を観察した。また、PCPの代わりに対照薬の5-HT agonistのPCAおよび5-MeODMTを投与し、それらの薬理作用をPCPのそれと比較検討した。

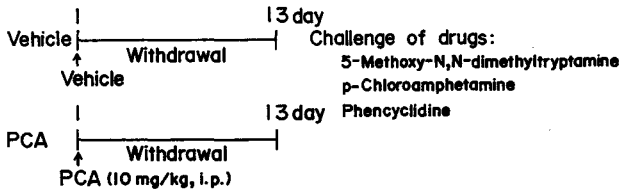


Fig. 1 Experimental schedule　PCA; p-chroloamphetamine

行動観察法　5-HT依存性の行動(head weaving, head twitch, backpedalling, wet dog shake)を経時的に記録した。なお測定は、PCPでは投与後60分間、PCAでは120分間および5-MeODMTでは30分間行い、head twitchおよびhead weavingについては15分毎に3分間ずつ発現回数を(5-MeODMTは15分毎に5分間)、残りの行動は15分間に発現する回数をカウントした。

脳内5-HT、および5-hydroxyindoleacetic acid(5-HIAA)含量の測定　実験スケジュール(Fig. 1)に示した手順で、PCA前処置後ラット脳内の5-HTおよびその代謝物である5-HIAAの含量をCurzonとGreenの方法(1)に従って測定した。

シナプス膜の調製法、および結合実験　実験スケジュール(Fig. 1)で示した手順で、PCA前処置後ラットを断頭により殺し、Sivamらの方法(9)によりシナプス膜を調製した。結合実験はシナプス膜200 μl(タンパク含量 約0.15－0.25 mg/200 μl)に、^{3}H-ligand, cold ligand, buffer等を加え最終容量1 mlとし、25℃で30分間インキュベーションした後、GF/B filter で濾過し、さらにcold buffer 5 mlで2回洗浄後、液体シンチレーションカウンターで測定した。特異的結合量は^{3}H-ketanserin, ^{3}H-5-HTおよび^{3}H-PCPに対してそれぞれcold 5 μM methysergide, cold 10 μM 5-HT、およびcold 10 μM PCPの存在下の結合量を非特異的結合量とし、cold ligand非存在下の全結合量との差とした。また^{3}H-5-HTの結合実験において、5-HTがMAOで酸化されないように、MAO阻害薬のpargylineを10 μM加えた。なお、^{3}H-PCPの結合実験においてはPCP が親和性を持つ、opioid sigma受容体をブロックするため、cold 5 μM SKF 10,047存在下で行い、また5-HT$_2$受容体をブロックする結合実験においては、cold 5 μM methysergide存在下で行った。

〔結果および考察〕

PCA 前処置により、ラット脳内5-HT、および5-HIAA含量はともに有意に減少した。また、脳内5-HT受容体に対する結合実験において、5-HT$_1$および5-HT$_2$受容体のそれぞれの高親和性結合部位および低親和性結合部位のB $_{max}$ 値は有意に増加(Table 1; summary B)した。さらに、PCA を前処置した動物に、5-MeODMT(5-HT受容体agonist)

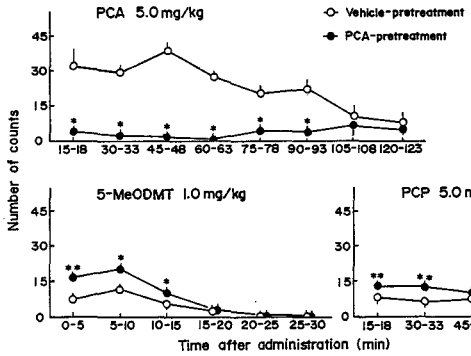


Fig. 2 Time course of 5-MeODMT-, PCP- and PCA-induced head weaving in PCA-pretreatment rat. Each rat was pretreated with PCA and challenged with 5-MeODMT, PCP or PCA. Values are the mean of 5-10 rats. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ as compared with Vehicle-pretreatment

Table 1 Scatchard analysis of specific [^{3}H]-5-HT, [^{3}H]-ketanserin ([^{3}H]-KET) and [^{3}H]-PCP bindings to brain synaptic membrane from saline-treated (control) and PCA-treated rats

[^{3}H]-Ligand	Treatment	Affinity	Kd (nM)	Bmax (fmol/mg protein)
[^{3}H]-5-HT	Control	High	0.38 ± 0.08	87.56 ± 11.19
		Low	8.56 ± 0.69	446.40 ± 33.90
	PCA-treatment	High	0.35 ± 0.06	102.68 ± 10.63
		Low	41.66 ± 4.20 **	986.00 ± 174.49 *
[^{3}H]-KET	Control	High	0.06 ± 0.01	38.85 ± 2.12
		Low	6.39 ± 0.39	461.24 ± 13.66
	PCA-treatment	High	0.12 ± 0.02 *	53.25 ± 1.59 **
		Low	5.21 ± 0.26	451.47 ± 13.15
[^{3}H]-PCP + SKF 10,047	Control	High	0.17 ± 0.03	13.25 ± 3.58
		Low	23.66 ± 0.69	1037.11 ± 27.21
	PCA-treatment	High	0.29 ± 0.04	26.84 ± 2.41 *
		Low	27.88 ± 2.39	1340.21 ± 88.39 **
[^{3}H]-PCP + SKF 10,047 + Methysergide	Control	High	0.20 ± 0.06	40.35 ± 2.99
		Low	12.92 ± 1.12	689.48 ± 30.09
	PCA-treatment	High	0.17 ± 0.02	40.77 ± 13.55
		Low	14.39 ± 4.22	621.76 ± 69.32

The values of dissociation constant (Kd) and maximum binding capacity (Bmax) are the means of 3-9 independent determinations (± S.E.M.), each in triplicate.
* P < 0.05, ** P < 0.01 as compared with Control

SUMMARY

A. Behavior

	HT	HW	WS	TN	BP
5-MeODMT	—	↑	±	±	↑
PCA	↓	↓	↓	±	±
PCP	↑	↑	—	↑	↑

B. Binding Assay

	B_{max}	Affinity
[^{3}H]-5-HT binding (5-HT_1 receptor)	↑	High
[^{3}H]-Ketanserin binding (5-HT_2 receptor)	↑	Low
[^{3}H]-PCP binding + SKF 10047	↑	High and Low
[^{3}H]-PCP binding + SKF 10047 + Methysergide	±	——

↑: increased, ↓: decreased, ± : non-changed
HT : head twitch, HW : head weaving, WS : wet dog shake, TN : turning
BP : backpedalling 5-MeODMT : 5-methoxy-N,N-dimethyltryptamine
PCA : p-chloroamphetamine, PCP : phencyclidine

またはPCA(5-HT放出薬)を投与したところ、5-MeODMTによって惹起される5-HT依存性の行動は増強されたが、PCAによるそれは、逆に減弱された(Fig. 2; summary A)。これらの結果から、従来の報告通りPCA前処置により、presynapseの5-HT神経が破壊され、postsynapseの5-HT受容体の感受性が増大したものと考えられる。そこで、PCAを前処置した動物にPCPを投与したところPCPによる5-HT依存性の行動もまた増強された(Fig. 2; summary A)。5-MeODMT 1.0 mg/kg, PCA 5.0 mg/kgおよびPCP 5.0 mg/kgを投与した場合、特に、head weavingにおいて上記作用は著明に見られた(Fig. 2)。

一方、我々は結合実験においてPCPが、5-HT_1でなく5-HT_2受容体と相互作用を持っていることを示唆している(6,7,8)。また今回の結果ではPCA前処置により、sigma受容体をSKF 10,047でブロックした状態で^{3}H-PCPの低・高親和性結合部位のB_{max}値もまた増加しており(Table 1)さらに、sigma受容体および5-HT_2受容体をブロックした状態での^{3}H-PCPのB_{max}値には、有意な増加は見られなかった(Table 1, summary B)。このことは^{3}H-PCPが5-HT受容体に結合していることを示唆している。従って、5-HT放出薬であるPCAより、5-HT受容体agonistである5-MeODMTとその作用が似ていることと(Fig. 2; summary A)、以上の結果を考え合わせると、PCPは5-HT受容体、特に5-HT_2受容体に直接作用することによって、5-HT依存性の行動を誘発するものと考えられる。

1)Curzon, G. and Green, A.R. (1970) Brit. J. Pharmacol. 39, 653-655
2)Friedman, E. et al. (1983) Eur. J. Pharmacol. 89, 69-76
3)Martin, J.R. et al. (1979) Life Sci. 24, 1699-1704
4)Nabeshima, T. et al. (1983) Eur. J. Pharmacol. 91, 455-462
5)Nabeshima, T. et al. (1984) Pharmacol. Biochem. Behav. 21, 401-408
6)Nabeshima, T. et al. (1984) Res. Commun. Subst. Abuse 5, 81-87
7)Nabeshima, T. et al. (1984) Res. Commun. Subst. Abuse 5, 175-186
8)Nabeshima, T. et al. (1985) Eur. J. Pharmacol. 109, 129-130
9)Sivam, S.P. et al. (1982)Neuro-Psychopharmacol. and Biol. Psychiat. 6, 119-127

81. $5HT_2$ receptor の血小板 5HT-induced shape change による検討

増子博文・金子元久・柳内　努・熊代　永・高野静子*
（福島県医大・神経精神，薬理*）

〔要　約〕

血小板は中枢神経系の$5HT_2$ receptorと類似性があることが指摘されている。そこで，今回われわれは，reserpine処置ウサギを用い，$5HT_2$ receptorの感受性を反映するといわれる血小板の5HT-induced shape change と血小板内ならびに血漿中の5HT濃度を測定し，両者の関係をみ，また，血小板のshape changeの臨床応用の可能性などを検討した。さらに，Lithium（Li）が血小板shape changeを誘発する現象をみたので併せて報告する。〔**方法**〕3 kg前後のオスウサギを用い，reserpineは筋注で，急性投与と慢性投与を行った。血小板のshape changeの測定はaggregometerを用い，5HT，あるいはLi投与時のshape changeを光の透加度の減少として記録した。〔**結果**〕(1)5HT-induced shape changeはreserpine急性投与後に減少し，慢性投与後では不変であった。この急性投与後には，血漿5HTの増加がみられ，両者の間には負の相関関係がうかがわれた。(2) 4 から30mEq／LのLiClを投与すると著明なshape changeがみられ，その増加はdose dependentであった。以上の結果をもとに，血小板のshape changeが中枢神経系の$5HT_2$ receptorの感受性を反映すること，ならびにLiが$5HT_2$ agonistとしての性質を有する可能性を示唆した。

Key word：

$5HT_2$ receptor, Platelet shape change, Reserpine

躁うつ病の生化学的成因のひとつとして，5HT receptorの感受性異常説が注目されている。ところで，血小板は中枢神経系の$5HT_2$ receptorとの類似性が指摘され，また，血小板の5HT-induced shape changeが$5HT_2$ receptorの感受性を反映することが示唆されている。[2] そこで今回われわれは，reserpine処置ウサギの5HT-induced shape changeや，血小板ならびに血漿中の5HT濃度を測定し，両者の関係や血小板shape changeの臨床応用の可能性などを検討した。また，Lithium（Li）が血小板shape changeを誘発する現象をみたのであわせて報告する。

〔**方法**〕実験動物としては，体重 3 kg前後のオスウサギを用いた。また，reserpineの投与方法は，急性投与の場合は，5 mg／kgを 1 回投与し，慢性投与の場合は，0.25mg／kgまたは0.3mg／kgを 1 日 1 回連続 2 週間いずれも筋注した。採血は耳静脈よりあらかじめ10分の 1 量の50mM，2Na・EDTAを入れた注射筒に採取した。血小板のshape changeの測定に際しては，Pletscher[2]らの方法に準じ，採取した血液を，120 g，12分間の遠心を行ないplatelet rich plasma (PRP) を得，さらに，このPRPを，1700 g，15分間遠心して，platelet poor plasma（PPP）を得た。上記のPRPとPPPの 2 者を混合し，1 ㎣あたり，100,000個の血小板を含むPRPを作製した。以下のshape changeの測定はすべてこのPRPについて行なった。shape changeの測定法は，理化電機工業製のaggregometer RAM型を用い，同社製のrecorderに記録した。shape changeは，このPRPに10^{-8}から10^{-5}Mまでの5HTを投与した時のPRPを通過する光の透過度の減少として，記録紙上に上向きの偏位として記録される。また，shape changeに対するLiの直接作用をみる場合のLiの投与量は0.1から30mEq／Lの範囲で行った。5HT濃

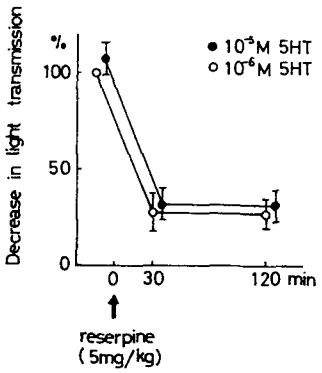


Fig. 1 Effect of reserpine on platelet 5HT-induced shape change

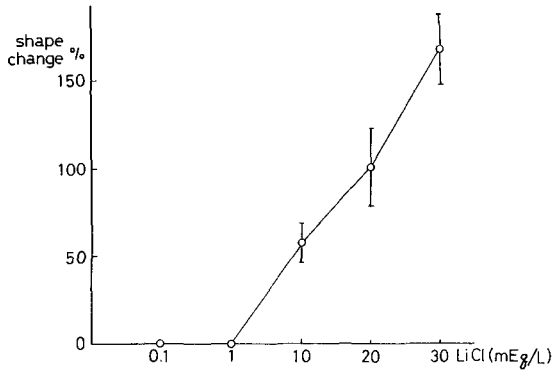


Fig. 2 Li-induced shape change of blood platelets in rabbits

Table 1 (a) Platelet and plasma 5HT concentration after acute administration of reserpine (5mg/kg)

	platelet (μM/5·10^7 platelets)	plasma (μM)
before	5.51 ± 1.03	1.95 ± 0.58
30 min	4.57 ± 1.54	2.86 ± 0.3
120 min	2.58 ± 0.51	2.47 ± 0.38

(M ± S.E., N=6)

Table 1 (b) Platelet and plasma 5HT concentration after acute administration of saline.

	platelet (μM/5·10^7 platelets)	plasma (μM)
before	3.71 ± 0.644	0.816 ± 0.0147
30 min	3.11 ± 0.836	1.32 ± 0.514
120 min	3.74 ± 0.644	0.828 ± 0.398

(M ± S.E., N=5)

Table 2 (a) Platelet and plasma 5HT concentration after chronic administration of reserpine (0.25mg/kg or 0.3mg/kg)

	platetet (μM/5·10^7 platelets)	plasma (μM)
before (N=5)	4.82 ± 1.56	1.21 ± 0.265
1 week (N=5)	0.388 ± 0.0921※	1.23 ± 0.238
2 weeks (N=4)	0.3 ± 0.079	0.797 ± 0.399

(M ± S.E.) ※ $p<0.05$, student's t-test

Table 2 (b) Platelet and plasma 5HT concentration aft chronic administration of saline.

platelet	platelet (μM/5·10^7 platelts)	plasma (μM)
before	5.0 ± 2.1	1.1 ± 0.29
1 week	3.8 ± 1.7	1.1 ± 0.43
2 weeks	2.9 ± 0.9	1.2 ± 0.24

(M ± S.E., N=4)

度の測定は，PRP中の血小板と血漿とを分離して，それぞれをopt法[1]に従って測定した。

〔結果〕 (1)血小板の5HT-induced shape change ①reserpine急性投与群（N＝6）血小板内5HT濃度は，Table 1 (a)に示すごとく，投与前に比し，投与30分後および120分後に減少傾向を示した。これに対して，血漿中5HT濃度は投与前に比し，投与30分後，120分後に増加傾向を示した。Control群（Table 1 (b)）では，血小板内，血漿中とも5HT濃度の明らかな変動は認められなかった。血小板の5HT-induced shape changeは，Fig. 1のように，投与30分，120分後に6例全例で著明な変化度の減少が認められた。これに対して，Control群（N＝3）では変化は認められなかった。②reserpine慢性投与群（N＝5）血小板内5HT濃度は，Table 2 (a)に示すごとく，reserpine投与前に比し，投与1週後，2週後とも減少傾向を示した。これに対して，血漿中5HT濃度は，投与1週後，2週後のいずれでも明らかな変動は示さなかった。また，Control群（Table 2 (b)）においては，血小板内，血漿中とも5HT濃度の明らかな変動は認められなかった。血小板の5HT-induced shape changeは，reserpine投与1週後，2週後とも，投与前に比して明らかな変動は認められなかった。Control群（N＝5）でも同様の結果であった。(2)血小板のLi-induced shape change（N＝6）5HTのかわりにLiClを投与し，shape changeを測定したところ，4から30mEq／Lの濃度で著明なshape changeがみられ，その程度は5HTを投与して生じる最大値を越えるものであった。また，このshape changeはdose-dependentであった（Fig. 2）。

〔考察〕Reserpineを投与して，血小板内5HT含量を減少させた場合，血小板のshape changeは，急性投与群（減少）と慢性投与群（不変）とでは，差異があることが認められた。この差異は，血小板内5HT濃度が両群ともに減少していて，血漿中5HT濃度は，急性投与群で増加，慢性投与群では不変であったことから，血漿中5HT濃度に依存しているように思われる。すなわち，血小板のshape changeは，血小板内ではなく，血漿中の5HT濃度に逆相関的に規制されている事が示唆された。ここでPletscherら[2]にならって，血小板を神経細胞血漿をsynaptic cleftに模して考察すると，synaptic cleft内の5HTが増加する時，神経細胞膜のreceptorの感受性が低下してhomeostasisを維持しようとしていると考えられる事を，血小板のshape changeがきわめて忠実に反映しているように思われる。換言すると，receptorの持つ一般的な性質のひとつであるdown regulationのメカニズムを血小板のshape change測定により知りえたことになる。また，うつ病患者においてこのshape changeを測定する事は，中枢の$5HT_2$ receptorの感受性を知る有力な手段のひとつとなるものと思われる。

次に，Liは5HT-induced shape changeに似たshape changeを誘発した。この時のLi濃度は，臨床的な有効濃度を越えたものであり，Liの薬効機序に直接関連するものとは考え難い。しかし，Liが$5HT_2$ receptorに対してagonist的作用を持つ可能性が示唆された。

〔文献〕 1．Drummond et al. (1974) Thrombos. Diathes. haemorrh. 31, 366-367. 2．Pletscher et al. (1983) Journal of Neural Transmission 57, 233-242.

82. 手綱核破壊ラットにおける haloperidol 慢性投与後の脳内 D_2 受容体の変化

西川　徹*,**・高嶋瑞夫**・融　道男***

(東京医歯大・医・神経精神*, 国立武蔵療・神経センター**, 信州大・医・精神***)

〔要　約〕

抗精神病剤投与後に生じる脳内D_2受容体増加の機序を調べる目的で、両側の手綱核を破壊したラットにhaloperidolを慢性投与し、線条体および中脳辺縁領域における[^{3}H]-spiperone結合能の変化を検討した。手術後8日より15日間haloperidolを投与し(1mg/kg, 1日1回腹腔内注射)、8日間休薬後に断頭して(±)sulpirideによって置換される[^{3}H]-spiperone結合を測定した。手綱核破壊自身は、線条体、中脳辺縁領域いずれの部位でも[^{3}H]-spiperone結合に有意な影響を与えなかった。偽手術群では、線条体においてhaloperidol慢性投与後に[^{3}H]-spiperone結合の増大(+22%)が認められたのに対して、手綱核破壊群では有意な変化はみられず、手綱核破壊群＋慢性haloperidol群の[^{3}H]-spiperone結合は偽手術＋慢性haloperidol群に比し、有意に低い値を示した。中脳辺縁領域では、偽手術群、手綱核破壊群いずれにおいてもhaloperidol慢性投与により[^{3}H]-spiperone結合の変化は認められなかった。以上の結果より、手綱脚路を介する情報伝達が抗精神病剤投与時における線条体D_2受容体の感受性調節に関与している可能性が示唆され、D_2受容体機能の生理的変化や病態を考える上で有用な所見と思われた。

Key word: cerebral D_2 receptors, repeated haloperidol treatment, habenula

実験動物では抗精神病剤の慢性投与により、脳内D_2受容体の最大結合定数が増大することが知られており(5)、長期間抗精神病剤を投与されたヒトや動物にみられる脳内ドーパミン機能亢進の生化学的背景と考えられている。この現象は、抗精神病剤のドーパミン受容体遮断作用に対する代償的変化と推測されるが、成立機序は明かでない。本研究では、ドーパミンニューロンの活動性を制御する神経回路が、抗精神病剤投与時のD_2受容体の感受性調節においてはたす役割を知る目的で、脳内ドーパミン神経伝達に抑制性影響を与えていると思われる手綱脚路(4)を破壊したラットにhaloperidol(HAL)を慢性投与し、線条体および中脳辺縁領域のD_2受容体結合能を調べた。

［方法］

実験には、Wistar系雄性ラット(手術時：230-250 g)を用いた。Pentobarbital麻酔下[30mg/kg,腹腔内投与(i.p.)]で単極性ステンレス電極(長さ0.5mm,外径0.35mm)を手綱核外側部(A＋4.0, V＋5.0, L±0.6；Konig & Klippelの図譜)に挿入し、3.5mAを15秒間通電することにより両側の手綱核を破壊した。偽手術群では手綱核より3mm上方に電極を挿入したが、通電は行なわなかった。破壊の有効性を確認するために、厚さ200 μmの前額断脳切片上で組織学的に観察するとともに、手綱核を経由して下行するアセチルコリンニューロンが終末を形成する脚間核内のコリンアセチル基転移酵素(CAT)活性をFonnumの方法(1)に従って測定した。破壊巣は内側および外側手綱核を含み、周囲の視床上部や海馬の一部に及んでいるところがあった。CAT活性は手綱核破壊群では偽手術群の7%以下に減少していることがわかっ

た(nmol/h/mg protein; 偽手術群 530±33, 手綱核破壊群 35±2)。

手術後8日より15日間HAL (1mg/kg,i.p.,1日1回) あるいは vehicleを投与し、8日間休薬後に断頭して、ただちに氷上で線条体および中脳辺縁領域(側坐核+嗅結節+中隔領域)を取り出した。D_2 受容体結合実験はSeemanらの方法(6)を改変して行なった。-80 ℃で冷凍保存しておいた脳組織に、25倍容の120mM NaCl,5mM KCl,1 mM MgCl ,2mM CaCl などお含む50mM Tris-HCl buffer(pH 7.4)を加え、ポリトロンを用いてホモジナイズした。2℃、48,000×gで15分間遠心分離した後上清を捨てる操作を3回繰り返し、得られた沈渣を同bufferに懸濁したものを膜標品とした。0.4ml [^{3}H] -spiperone(29.5 Ci/mmol), 0.4ml (±) sulpiride (最終濃度 20μM) あるいはbuffer、0.4ml の膜標品(0.05-0.09 mg protein/ assay) を加え、22℃で60分間インキュベートしたのちWhatman GF/Bフィルターで吸引ろ過し、10mlのbufferで洗浄した。フィルターは、10mlの液体シンチレーションカクテルに入れ、4℃で10時間以上放置したのち、放射活性を測定した。[H] - spiperone の特異的結合は(±) sulpiride の存在下、非存在下の差として求めた。(-) Sulpiride, (±) sulpiride, (+) sulpirideの [^{3}H] -spiperone結合に対する IC_{50} はそれぞれ130 nM, 200 nM, 2 μM であった。予備的実験において線条体および中脳辺縁領域で、[^{3}H] - spiperoneの濃度を0.02nM-0.45nM まで展開してScatchard 解析を行なった結果、結合部位は単一であることが示されたため(Fig. 1)、[^{3}H] - spiperone 濃度はこの範囲内に定めた。蛋白定量はLowry らの方法(3) によって測定した。統計的有意差は、Dunn法による多重比較を用いて検定した。

[結果]

Fig. 2に示したように、線条体における0.45nM [^{3}H] - spiperone の特異的結合は手綱核破壊自身では影響をうけなっかたが、偽手術群ではHAL慢性投与によって

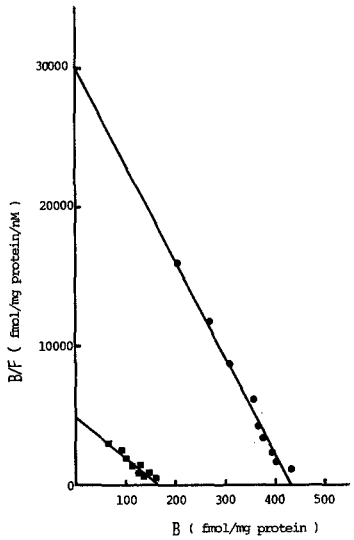


Fig.1 SCATCHARD PLOTS OF ^{3}H-SPIPERONE BINDING TO THE STRIATUM(●) OR MESOLIMBIC AREA(■)

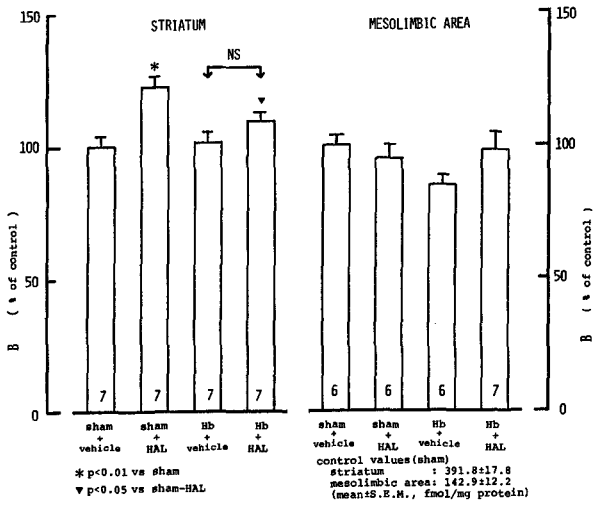


Fig.2. EFFECT OF CHRONIC TREATMENT WITH HALOPERIDOL ON STRIATAL AND MESOLIMBIC ^{3}H-SPIPERONE BINDING AFTER LESION OF THE HABENULA
[^{3}H-spiperone]:0.45nM

有意な上昇がみとめられた（＋22％）のに対して、手綱核破壊群ではＨＡＬによる有意な変化はなかった。また、手綱核破壊＋ＨＡＬ群の特異的結合は偽手術＋ＨＡＬ群に対して有意に抑制されていた。中脳辺縁領域における［^{3}H］- spiperone 結合は、偽手術群、手綱核破壊群ともにＨＡＬ投与による有意な変化を示さなかった（Ｆｉｇ２）。

線条体で、さらに［^{3}H］- spiperone 濃度を0.02nM-0.45nM まで展開したScatchard解析により、最大結合数（Bmax）および解離定数（Kd）をもとめたところ、Fig.2に示した変化はBmaxに対する影響を反映しており、Kd値はいずれの動物群でも有意な差異は認められないことがわかった（Table 1）。

TABLE 1. EFFECT OF CHRONIC TREATMENT WITH HALOPERIDOL ON STRIATAL D_2 BINDING AFTER LESION OF THE HABENULAR NUCLEI

Lesion	Drug	^{3}H-Spiperone Binding (%)	
		Bmax (fmol/mg protein)	Kd (pM)
Sham	Vehicle	392±17 (100)	16.4±1.0 (100)
Sham	Haloperidol (1mg/kg,i.p./ day, 15 days)	477±13* (122)	15.7±0.8 (96)
Habenula Lesion	Vehicle	399±15 (100)	17.0±0.3 (100)
Habenula Lesion	Haloperidol	430±12▼ (108)	16.0±1.3 (94)

mean±S.E.M. N=7

* p<0.01 vs sham-vehicle

▼ p<0.05 vs sham-haloperidol

［考察］

以上の結果から、手綱核を破壊した動物ではＨＡＬ慢性投与による線条体D_2受容体結合の増加が抑制されることが示された。手綱脚路の神経活動を急速に遮断すると、線条体のドーパミン代謝が亢進すること(4)、線条体へのドーパミン注入後外側手綱核における糖利用率が変化することなどの報告(2)を考え合わせると、手綱脚路は黒質線条体系ドーパミンニューロンの活動を制御することを介して線条体D_2受容体の感受性を調節している可能性があるといえる。一方、今回のＨＡＬ投与法では偽手術群で中脳辺縁領域におけるD_2受容体の増加は認められなかった。中脳辺縁領域では、線条体に比して抗精神病剤によるD_2受容体変化が生じにくいため、今後投与方法を変えて更に検討する必要がある。また、手綱脚路以外に脳内ドーパミン神経伝達を調節すると考えられる神経回路（たとえば線条体黒質路）が、D_2受容体の変動に及ぼす影響についても比較することが重要であろう。

［文献］

1）Fonnum,F.(1969) Biochem.J.115 465

2）Kozlowski,M.R.and Marshall,J.F.(1980) Brain Res. 197 167

3）Lowry,O.H. et al.(1951) J.biol.Chem. 193 265

4）西川 徹、Scatton,B.(1984) 神経化学 23 90

5）Seeman,P.(1980) Pharmacological Revlews 32 229

6）Seeman,P.et al. (1984) J.Neurochem. 43 221

83. 新しい抗精神病薬 OPC-4392；ドパミン受容体アゴニスト／アンタゴニスト

菊地哲朗・保田好信・鈴木成生・筒井正博
山田清文・桧山隆司・藪内洋一　　（大塚製薬・徳島研）

〔要　約〕

7-｛3-［4-(2,3-Dimethylphenyl)piperazinyl ］propoxy ｝-2(1H)-quinolinone(OPC-4392) は強力な中枢抗dopamine(DA)作用を有し，カタレプシー惹起作用が弱い新規化合物である。今回，OPC-4392の中枢作用について，生化学的及び行動薬理学的に検討を行った。

1)OPC-4392はDA生合成及びreserpine によって亢進したDA生合成を抑制した。2)OPC-4392はγ-butyrolactoneによって亢進したDA生合成を抑制し，この抑制作用はhaloperidol によって拮抗された。3)OPC-4392はDA代謝回転に対してほとんど影響を及ぼさなかった。4)OPC-4392はDA-sensitive adenylate cyclase活性に対する抑制作用が弱く，K_i 値は >860nMであった。一方，OPC-4392は^{3}H-spiroperidol 結合を用量依存的に阻害し，K_i 値は 5.8nMであった。5)OPC-4392はmethamphetamine による運動量増加を強力に抑制し，この抑制作用は低用量のhaloperidol により部分的に拮抗された。6)OPC-4392はapomorphine による運動量亢進及び常同行動を抑制した。以上の成績から，OPC-4392 は中枢DA神経系に対してagonist/antagonistとして作用することが示唆された。すなわち，OPC-4392はシナプス前部位のDA自己受容体に対してagonist として作用し，シナプス後部位のD_2受容体に対してantagonistとして作用することが示唆された。

Key word： OPC-4392, Dopamine autoreceptor, Dopamine synthesis

（実験方法）

実験材料としては，雄性ICR 系マウス及び雄性Wistar系ラットを使用した。

生化学的実験

1.DA生合成；DA 生合成に対する試験薬物の作用をNSD-1015(100mg/kg i.p.) 投与後30分のdopa蓄積量を指標として，無処置動物，reserpine処置動物及びγ- butyrolactone(GBL)[7]処置動物で検討した。マウスの場合，視交叉より前部を分離し前脳(forebrain) とした。ラットの場合，Glowinski and Iversenの方法[4] 及び Blumberg et al.の方法[2] に準じて frontal cortex(FC)，limbic forebrain(LF)及びStriatum(St)を分離した。分離した組織からWesterink and Mulderの方法[8] に準じて処理し，アミン画分を得て，電気科学検出器付の高速液体クロマトグラフィー(HPLC-ED) によりdopaを分離定量した。2.DA代謝回転；DA 代謝回転に対する試験薬物の作用をDA代謝物及びα-methyl-p-tyrosine(α-MT)処置後のDA消失速度を指標にしてマウス又はラットで検討した。マウスforebraine又はラットFC，LF 及びStを分離し，分離した組織中のDA代謝物である3,4-dihydroxyphenylacetic acid (DOPAC) 及びhomovanillic acid(HVA)をYasuda et al. の方法[10]に準じて分離定量した。また，α-MT 処置後のDA消失速度の場合，α-MT (250mg/kg i.p.) 投与後4 時間のマウス全脳におけるDA含量をWesterink and Mulderの方法[8] に準じてHPLC-ED によりDAを分離定量した。

3.DA受容体

DA-sensitive adenylate cyclase活性の測定(D_1 受容体)；Clement-Cormier et al.の方法[3] に準じて行った。すなわち，ラットStより酵素液を調製し反応液中にATP(0.5mM)

を添加して反応を開始した。37℃で 5分間反応させた後沸騰水中で反応を停止した。生成したcyclicAMP をラジオイムノアッセイで定量した。

^{3}H-spiroperidol 結合(D_2 受容体);Whitaker and Seeman の方法[9] を参考にしてラットStよりシナプトゾーム画分を分離し，Leysen et al. の方法[6] に準じてシナプトゾーム膜標品を調製した。^{3}H-spiroperidol の非特異的結合量は10^{-3}M DA存在下で測定した。

行動薬理学的実験

1.抗methamphetamine 作用；マウスに試験薬物経口投与 1時間後にmethamphetamine 3 mg/kg を皮下投与し，10分間隔で 2時間まで水平運動量を測定した。

2.抗apomorphine 作用

Reserpine処置マウスでの apomorphineによる運動量増加に対する作用；マウスにreserpine(1mg/kg)を皮下投与し，18時間後に試験薬物を経口投与した。その1 時間後に apomorphine 5mg/kg を皮下投与し，10分間隔で 1時間までの水平運動量を測定した。

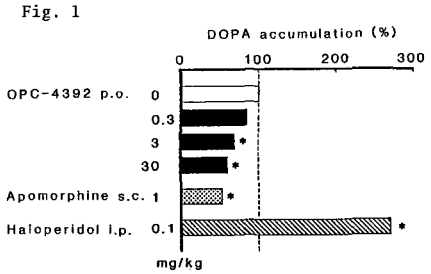
Apomorphine による常同行動に対する作用；マウスに試験薬物経口投与57分後に，apomorphine 1mg/kg を皮下投与し，その 3分後から15分間の常同行動を測定した。

(実験成績)

生化学的実験

1.DA生合成速度;OPC-4392 は無処置マウスのforebrain におけるDA生合成をapomorphineと同様に抑制した (Fig.1)。Reserpine(1mg/kg) をマウスに皮下投与すると投与18時間後には forebrain のDA生合成が1.8-2.6 倍に増加した。OPC-4392はこのDA生合成を用量依存的に抑制した。Apomorphine 及び選択的なDA自己受容体agonist であると報告されている3-PPP [5] もこのDA生合成を抑制した。同様にOPC-4392(3-30mg/Kg p.o.)はreserpine処置ラットでのFC,LF 及びStのDA生合成を用量依存的に抑制した。OPC-4392は0.3 mg/kg p.o.以上の用量からGBL によって増加したDA生合成をapomorphine 及び3-PPP と同様に抑制し,OPC- 4392のこの抑制作用はhaloperidol(0.1-1.0mg/kg i.p.)を併用することにより用量依存的に拮抗された。

Fig. 1



Effects of OPC-4392, apomorphine and haloperidol on dopamine synthesis in mouse forebrain
OPC-4392 was given 2 hr before sacrifice.
Apomorphine was given 1 hr before sacrifice.
Haloperidol was given 1 hr before sacrifice.
NSD-1015 (100 mg/kg i.p.) was given 30 min before sacrifice. *$p<0.05$.

2.DA代謝回転;OPC-4392(1-30mg/kg p.o.) はマウスforebrain のDOPAC 及びHVA を低用量で減少させる傾向が認められたが，α- MT処置後のマウス全脳DA消失速度に対してはほとんど影響を及ぼさなかった。OPC-4392は100mg/kg p.o. の用量で，ラットFCのDOPAC 及びStのDOPAC 及びHVA をわずかに増加させた。

3.DA受容体

D_1受容体；OPC-4392は10^{-5}M の濃度まででではadenylate cyclaseを活性化する作用は認められなかった。OPC-4392はDAによって活性化された adenylate cyclase活性を高濃度で抑制する傾向が認められた。各薬物の K_i 値をTable 1 に示した。

D_2受容体；OPC-4392は濃度依存的に特異的^{3}H-spiroperidol 結合を阻害した。各薬物のK_i 値をTable 1 に示した。

Table 1
Effects of OPC-4392, Chlorpromazine, haloperidol and sulpiride on dopamine-sensitive adenylate cyclase activity (D_1-receptor) in rat striatal homogenate and ^{3}H-spiroperidol binding (D_2 -receptor) in rat striatal synaptosomal membranes

D_1 -receptor		D_2 -receptor	
Drug	Ki (nM)	Drug	Ki (nM)
OPC-4392	>860	OPC-4392	5.8
Chlorpromazine	48	Chlorpromazine	7.0
Haloperidol	60	Haloperidol	4.6
Sulpiride	>8600	Sulpiride	150

行動薬理学的実験

1.抗methamphetamine 作用；OPC-4392は0.3 mg/kg p.o.以上の用量でマウスにおける methamphetamine による運動量亢進作用を抑制し，この抑制作用は低用量の haloperidol (0.03 mg/kg p.o.) を併用することにより減弱した。

2.抗apomorphine 作用;OPC-4392 はreserpine 処置マウスでの apomorphineによる運動量増加を 4mg/kg p.o.以上の用量で用量依存的に抑制した。また，OPC-4392はapomorphine による常同行動を16mg/kg p.o.以上の用量で用量依存的に抑制した。

(考察)

DA 受容体 agonistはDA神経細胞の発火頻度，DA放出及び生合成を抑制し，これは DA自己受容体又はシナプス後部位のDA受容体の興奮に起因すると考えられている。OPC-4392は他のDA agonistと同様に DA 生合成を抑制した。この作用は,OPC-4392 がシナプス後部位のDA受容体に対して agonistとして作用しないという事実(未発表) からpresynaptic な作用であると考えられる。さらにOPC-4392はfiringを遮断する GBL[7] 処置下でのDA生合成の亢進を抑制し，この抑制作用は,haloperidolにより完全に拮抗された。以上の成績はOPC-4392がDA自己受容体agonist であることを示唆するものである。OPC-4392は強力な抗 methamphetamine作用を有し，この作用は低用量の haloperidolを併用することにより部分的に拮抗された。行動薬理学的にはDA自己受容体の興奮は抗 methamphetamine 作用を示すと報告されている[1] 。OPC-4392の抗 methamphetamine 作用のある部分が DA 自己受容体を介することを示唆している。さらに OPC-4392 は抗 apomorphine 作用を有し，D_2受容体に対して高い親和性を有している。この成績からOPC-4392はシナプス後部分の D_2 受容体に対しては antagonist として作用すると考えられる。OPC-4392はDA代謝回転に対してほとんど影響を及ぼさないが，これはDA代謝回転に対するOPC-4392のDA自己受容体agonist 作用とシナプス後部位のDA受容体antagonist作用が相殺された結果であるかもしれない。

(1)Balsala,J.J.,Bapat,T.R.,Gada,V.P.and Chandorkar,A.G.(1982)Psychopharmacology 78,192.
(2)Blumberg,J.B.,Vetulani,J.,Stawarz,R.J. and Sulser,F.(1976) Europ.J.Pharmacol.37,357.
(3)Clement-Cormier,Y.C.,Parrish,R.G.,Petzold,G.L.,Kebabian,J.W.and Greengard,P.(1975) J.Neurochem.25,143.
(4)Glowinski,J.and Iversen,L.L.(1966) J.Neurochem.13,655.
(5)Hjorth,S.et al.(1981) Life Sci.28,1225.
(6)Leysen,J.E.,Gommeren,W.and Laduron,P.M.(1978)Biochem.Pharmacol.27,307.
(7)Walters,J.R.and Roth R.H.(1976) Naunyn-Schmiedeberg's Arch.Pharmacol.296,5.
(8)Westerink,B.H.C. and Mulder,T.B.A.(1981) J.Neurochem.36,1449.
(9)Whitaker,P.M.and Seeman,P.(1979)European.J.Phamacol.56,269.
(10)Yasuda,Y.,Shioya,Y.,Nakai,S.,Shintani,S.and Hiyama,T.(1982) Folia Pharmacol.Japon. 79, 163.

84. ラット脳シナプトゾームにおける内因性カテコールアミンの遊離に対するEGTAの影響

岡田三津子・片岡泰文・植木昭和*・藤原道弘

（福岡大・薬・応用薬理，九州大・薬・薬理*）

〔要　約〕

全脳シナプトゾーム分画におけるカテコールアミンの細胞外Ca^{2+}非依存性の遊離機構について検討し、以下の結果を得た。Ca^{2+}，Mg^{2+}を除いた条件下では、内因性Dopamine(DA),Norepinephrine(NE)の遊離はEGTAによって有意に増加した。この増強作用はLa^{3+}(200μM)，Mg^{2+} (1.3mM)，低Na^{+} (26mM)において抑制された。さらにミトコンドリアにおける、Na^{+}-stimulated Ca^{2+} releaseの阻害薬であるAmiloride(200μM)によっても、同様に抑制された。一方、シナプトゾーム内のfree Ca^{2+}濃度をQuin 2を用い測定した結果、EGTAによる影響は認められなかった。以上、カテコールアミンのEGTAによる遊離増強には、GABAと同様にCa^{2+}チャンネルを介したNa^{+}の流入が重要な役割を果たしていると考えられる。しかし、cytosol free Ca^{2+}濃度の増加は認められなかったことから細胞内のCaストア、特にミトコンドリアからのCa^{2+}の遊離の関与は、ほとんどないことが示唆された。AmilorideによるEGTA効果の抑制は、ミトコンドリアからのCa^{2+}遊離の阻害によるものではなく、むしろ、他の遊離因子 (eg. Protein Kinase C)に対する作用によるものであろう。

Key word：
Catecholamine release, EGTA, Synaptosome

神経伝達に関与するアミノ酸（特にGABA）の神経終末からの遊離機構にはCa^{2+}非依存性のものがあることが知られている。しかも、この遊離には細胞外液のNa^{+}濃度が重要な役割を果たしている（1，2）。一方、カテコールアミン含有神経からのCa^{2+}非依存性の機構については、いくつかの報告があるが、不明な点が多い（3，4）。そこで、我々はこの遊離機構を明らかにする目的で、ラットの全脳シナプトゾーム分画を用いて、Ca^{2+}非依存性の内因性のDopamine(DA),Norepinephrine(NE)の遊離量を測定し、さらに細胞内Ca^{2+}の動態について、併せて検討した。

【方法】

Wistar系雄性ラット（体重約250g）の全脳を0.32M Sucrose-5mM Hepes Buffer (pH7.4)でホモジナイズ後、Gray & Whittaker（5）らの方法に従ってシナプトゾーム分画を得た。3－4mg proteinのシナプトゾームをCa^{2+}及びMg^{2+}を除いたKrebs- Ringer bicarbonate溶液（37℃，95%O_2－5%CO_2）を用いて0.5 mℓ/minの灌流を行ない、灌流液を4分ごとに氷冷した0.5M $HClO_4$を含む試験管に集めた。灌流液中のNE，DAはアルミナ吸着し、HPLC－ECDで測定した。EGTA(100μM-200μM)を灌流開始の20分後から8分間加え、その後8分間元の灌流液に戻した。26mM Na溶液の場合は、NaClをLiClに置換し，$LaCl_3$使用の場合には、NaH_2PO_4をNaClに置換した。Amilorideは、灌流開始直後から終了時まで加えた。シナプトゾーム内のCa濃度変化は、Quin 2 AMを用いて、Ashley & Marchbanks（6）らの方法に従って測定した。

【結果　および　考察】

ラット脳ホモジネイトのシナプトゾーム分画をCa^{2+}，Mg^{2+}を除いた溶液で20分間灌流したのち、100 μMのEGTAを添加すると　内因性　Dopamine(DA)および、Norepinephrine(NE) の遊離は添加直後に比べ、それぞれ42％および24％増加した(Fig.1 ,2)。一方、このEGTAによるカテコールアミン遊離の増強効果は、1.2mM Mg^{2+}を添加することによって著明に抑制された。また、灌流液中の144mMNa^{+}濃度を 26 mM に下げる事によっても著明な抑制が見られた。このことからEGTAによる遊離増強作用にNa^{+}依存性があることがわかった。さらにCaチャンネルブロッカーである 200μM La^{3+}も同様にEGTAによるカテコールアミンの遊離に対して著明な抑制作用を示した(Fig.3 ,4)。以上の事から、このカテコールアミン遊離の増強作用はEGTAが膜に結合しているCa^{2+}にキレートすることによって、外液のNa^{+}がCaチャンネルを介してシナプトゾーム内に流入することが原因となっていると思われる。またシナプトゾームに流入したNa^{+}がミトコンドリアのNa^{+}－Ca^{2+} exchange 機構に影響を及ぼす結果もたらされる、 CytosolCa^{2+}の増加がカテコールアミンの遊離に関与していると考えられている。そこでAmiloride (200 μM)の影響を調べてみた。その結果、Amiloride はEGTAによるカテコールアミン遊離増強を著明に抑制した(Fig.5 ,6)。

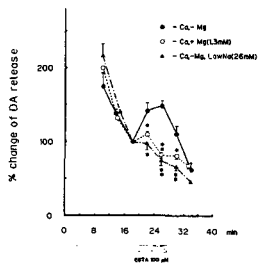


Fig.1 Effect of EGTA on the release of DA

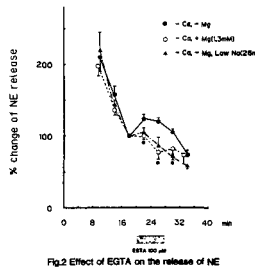


Fig.2 Effect of EGTA on the release of NE

Synaptosomes were superfused and stimulated for 8min by EGTA after the equilibrate period(20 min).
Data presented means ± S.E. (n=3).
Significantly difference from release found in the absence of Ca^{2+} and Mg^{2+}.
(*P<0.05, **P<0.01)

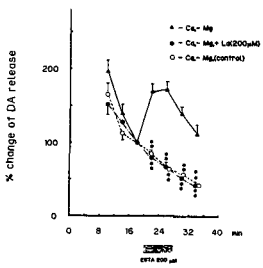


Fig.3 Effect of La on the release of DA stimulated by EGTA

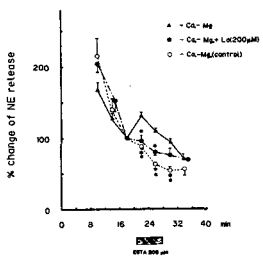


Fig.4 Effect of La on on the release of NE stimulated by EGTA

La^{3+} was present in the superfusing media from the the beginning of the superfusion.
Data presented means ± S.E. (n=3)
Significantly difference from release found in the absence of Ca^{2+} and Mg^{2+} and phosphate.
(*P<0.05, **P<0.01)

Amilorideは Ki 値約 200μM で細胞内に入りしかもミトコンドリアのNa^{+}－Ca^{2+} exchange を抑制する作用があること（７，８，９），伝達物質の遊離の促進に関与している Protein Kinase C を阻害する作用をも有する事が知られている（１０）。このことから、EGTAによるカテコールアミン遊離の増強効果に及ぼすAmilorideの抑制作用は、ミトコンドリアからのCa^{2+}遊離抑制作用、および Protein Kinase C の不活性化作用によるものと考えられる。

次にシナプトゾーム内のCa^{+}動態

を直接測定するためにCa^{2+}感受性蛍光色素であるQuin 2を用いた結果、EGTAによる細胞内のCa^{2+}の増加は認められなかった。

以上、シナプトゾーム外のCa^{2+}およびMg^{2+}を除いた条件下では、EGTAはカテコールアミン遊離作用を有し、しかも、これは外液Na^{+}濃度に依存することがわかった。このことは ^{3}H-GABAの遊離機構と一致していた。しかしながら、我々の実験結果からCytosol中のCa^{2+}の増加が認められなかった事より、EGTAによるカテコールアミンの遊離には細胞内のCaストア（特にミトコンドリア由来のCa^{2+}）が関与する可能性は少ないと思われる。むしろ、他の遊離機構の重要性が示唆された。

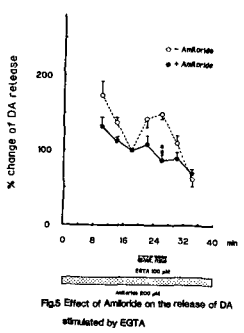


Fig.5 Effect of Amiloride on the release of DA stimulated by EGTA

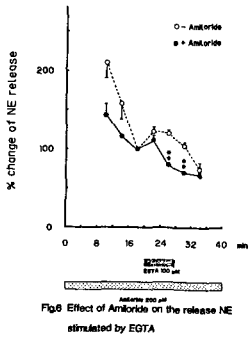


Fig.6 Effect of Amiloride on the release NE stimulated by EGTA

Amiloride was present in the superfusing media from the beginning of the superfusion. Data presented means ± S.E. (n=3) Significantly difference from release found in the absence of Ca^{2+} and Mg^{2+}. (*P<0.05, **P<0.01)

〔文献〕

1) Sandorol,M.E.(1980) J.Neurochem. 35,915-921
2) Arias,C. Tapia,R. et.al (1984) J.Neurochem. 42,1507-1514
3) Schoffelmeer,A.N. Mulder,A.H. et.al(1983) Naunyn-Schmiderberg' Arch Pharmacol.323,188-192
4) Schoffelmeer,A.N. Mulder,A.H.et.al (1983) J.Neurochem. 40,615-621
5) Gray,E.G. Whittaker,V.P.et.al (1962) J.Anat. 96,79-89
6) Ashley,R.H. Marchbanks,R.et.al (1984) Biochem.J. 219,149-158
7) Sordahl,L.A. Rex,K.A.et.al (1984) Am.J.Physiol. 246,c172-c176
8) Briggman,J.V. Gragoe,E.J.Jr.et.al (1983) Histochem. J. 15,239-255
9) Gill,D.L. Whitlow,G.L.et.al (1984) J.Biol.Chem. 259,10807-10813
10) Besterman,J.M. Casas,P.C.et.al (1985) J.Biol.Chem. 260,1155-1159

85. モノクローナル抗体で識別されるシナプス小胞に特異的な4種の蛋白質

小幡邦彦・児島伸彦・藤田　忍・白尾智明
西江　弘*・内薗耕二**
（群馬大・医・薬理，順天堂大・医・生理*，静岡女子大**）

〔要　約〕

モノクローナル抗体技術により，シナプス小胞を構成する未知物質の検出とその解析を試みた．モルモット大脳皮質からシナプス小胞を精製し，これを免疫原に用いてモノクローナル抗体を作製した。このうち20個は免疫組織化学において，中枢神経系でのシナプスの分布に一致する染色パターンを示した。これらは精製したシナプス小胞及び小脳皮質組織に対する免疫電子顕微鏡法により，シナプス小胞に結合することが示された．次いで電気泳動で分離されたシナプス小胞やその他の画分の構成蛋白についてイムノブロット解析を行ない，抗原物質の分子量と存在様式をしらべた．16個の抗体はすべて，分子量38,000のシナプス小胞蛋白に結合した．他の1個は分子量30,000，2個は36,000，1個は65,000のシナプス小胞蛋白に結合した．これらの抗原蛋白をそれぞれSVP38，30，36，65と呼ぶことにした．SVP30と36はシナプス形質膜にも存在するが，SVP38,65はシナプス小胞に特異的と考えられる．Triton処理でSVP65は可溶化され難かったが，他は容易に可溶化された．近年シナプス小胞に特異的な蛋白がいくつか報告されているが，SVP蛋白は上記の諸性質からこれらとは異なるものと考えられる．

Key word： Synaptic vesicles, monoclonal antibodies, immunoblot analysis

神経伝達物質の貯蔵，放出に関する分子機構を明らかにするために，シナプス小胞の神経化学的解析が行われる．シナプス小胞の分離，精製はWhittaker[7]以来，改良が加えられ，精製されたシナプス小胞について構成蛋白の分析が行われている[6]．

また以下のようなアプローチもある．Greengardら[2]は脳のリン酸化蛋白の研究から，Synapsin Iを発見し，これがシナプス小脳に特異的なものであることを明らかにした．近年発展したモノクローナル抗体技術も新物質の検出には有効であり，Matthewら[4]はシナプス形質膜に対するモノクローナル抗体を作製して，シナプス小胞とシナプス膜に共存する分子量65,000の蛋白を見出した．シナプス小胞を直接，免疫原として得たモノクローナル抗体としてはKellyら[1]が電気器官を材料として，分子量10－20万の糖蛋白に結合するものを得ている．

今回，われわれは哺乳類（モルモット）大脳皮質より小胞を精製してこれに対するモノクローナル抗体を作製し，シナプス小胞に存在する分子量30,000，36,000，38,000と65,000の蛋白を同定した．

〔実験方法〕

シナプス小胞画分の精製　西江らの方法[5]によった．すなわちモルモット大脳皮質から粗シナプトソーム画分を採取し，低張処理を施した後，不連続ショ糖密度勾配遠心分離を2回行った．0.16-0.32 Mの界面で回収し，純度は電子顕微鏡により確かめた．

モノクローナル抗体の作製　このシナプス小胞画分（0.3－0.5 *mg*蛋白）でBALB/cマウスを免疫し，2回の融合実験を行って常法によりモノクローナル抗体を作製した．抗体産生のスクリーニングは下記のように，免疫組織化学的に行った．ハイブリドーマ形成は

2回の実験で同様であったので，図1に第1実験のプロトコールを示す．

免疫組織化学　10%ホルマリンで灌流固定したモルモットから，各部位の中枢神経組織をとり出し，凍結切片を作製した．FITCで標識された抗マウス IgG（ヤギ，Cappel）を二次抗体として，間接螢光抗体法を行った．

免疫電子顕微鏡法　分離したシナプス小胞と小脳皮質について行った．前者ではビオチン化した抗マウスIgG（Vector）とアビジン結合フェリチンを用いて，フェリチン粒子で検出した．小脳組織は30 μmの切片をABC法（Vectastainキット）で染色した後，電顕用標本に作製した．

ゲル電気泳動とイムノブロット　精製したシナプス小脳画分，脳ホモジネート，シナプス膜画分，濃縮した上清について行った．SDSポリアクリルアミド電気泳動はLaemmliの方法によった。エレクトロブロットしたニトロセルロース膜の染色は二次抗体としてHRP標識した抗マウスIgG（Cappel）を用いて，クロロナフトールで発色させた．

〔結果〕

2回の融合実験により，神経組織に結合するモノクローナル抗体47個が得られ，このうち20個が次のような染色パターンから，シナプスに結合すると考えられた（第1実験では図1に示すように19個中7個）．すなわち小脳皮質では分子層がほぼ一様に染まり，プルキンエ細胞の周囲が点状に染まり，顆粒層ではglomeruliのみが染まる（図2A）．海馬では錐体細胞の細胞層は染まらないが，上下の樹状突起層が染まる（図2B）．その他の灰白質も点状に染まるが，それがニューロンや樹状突起の周囲に集っているのが特徴的である．白質は全く染まらない．これはシナプス小胞に結合しているのであることが電子顕微鏡により確かめられた．

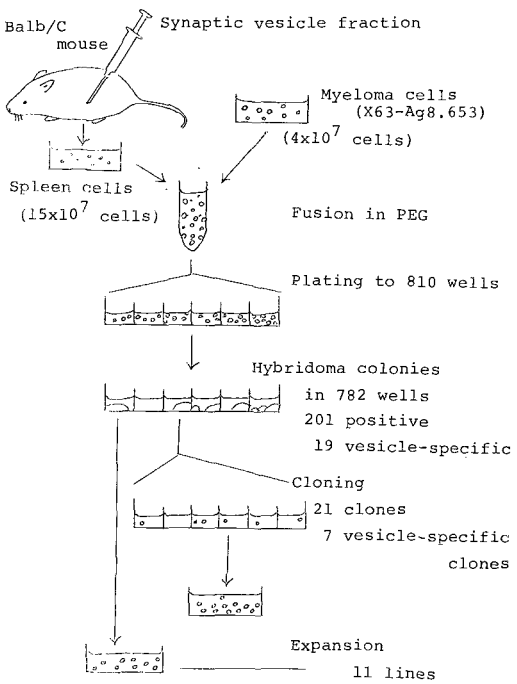


図1．　抗シナプス小胞抗体の作製

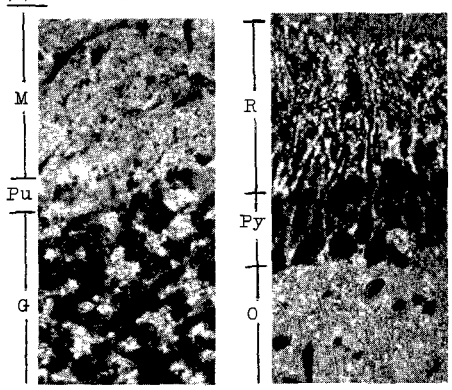


図2．抗体17—1B5による免疫組織化学．左：小脳皮質，右：海馬．M，分子層．Pu，プルキンエ細胞層．G，顆粒層．R，Stratum radiatum．Py，錐体細胞層．O，St.oriens．バーは50μm．

ついで抗原分子の解析をイムノブロットで行った。電気泳動で分離したシナプス小胞の蛋白群のうち，分子量38,000のものに16種の抗体が結合した（図3Aに示す1B5など）．

抗体3B10及び3F10は分子量36,000，抗体2B7は分子量65,000，抗体7H10は分子量30,000の蛋白と結合した．そこでこれらの抗原蛋白をそれぞれSVP(synaptic vesicle protein) 30,36,38,65と命名した．

これらの分子量はマーカー蛋白の電気泳動における移動度との比較で算出するが，緩衝液により変動する可能性がある．またシナプス小胞の精製過程で分解等が起こって生体内での状態と変っている可能性がある．そこでトリス緩衝液の他にリン酸緩衝液で，また大脳を摘出後直ちに電気泳動緩衝液でホモジナイズして分析したが，同一の結果が得られ，上の可能性は否定された．

伝達物質がシナプス小胞から開口分泌によって放出されるとすると，小胞膜はシナプス前終末の形質膜と共通成分を持つと予想される．低張処理後のシナプトソーム残渣からシナプス膜画分を調製し[3]，これについてもイムノブロット解析を行った（図3）．SVP36と30はシナプス小胞とシナプス膜に同程度に検出されたが，SVP38と65はシナプス膜にはわずかにしかまたはほとんど検出されなかった．

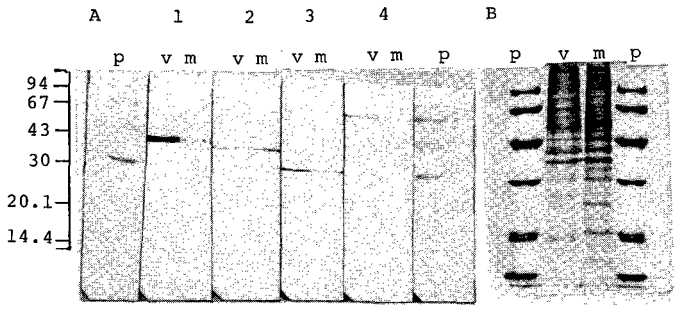


図3．シナプス小胞画分（v）とシナプス形質膜画分（m）のイムノブロット（A）及び蛋白分布（B；CBB染色）．p，蛋白マーカー．左に分子量をキロダルトンで示す．1，抗体17—1B5；2，24—3F10；3，24—7H10；4，24—2B7の結合．

SVP蛋白のシナプス小胞への結合状態をしらべるため，標品（0.32Mショ糖，8mM HEPES緩衝液に浮游）をTriton X—100（0.1，0.5，1%）及び高イオン強度（0.6M NaCl）処理を行った後，小胞沈渣と上清に分けてイムノブロットを行った．0.1—0.5% Triton処理で，SVP30,36,38は上清に遊離したが，SVP65は上清には出現しなかった．4蛋白とも高イオン強度下で小胞画分に保持された．

〔考察〕

SVP38,65はシナプス小胞に限局すると考えられるが，SVP30,36はシナプス形質膜にも存在し，Triton X—100で可溶化されることとも合わせて，シナプス小胞の膜蛋白であり，神経伝達物質放出の際膜融合によって形質膜へ移行すると推測される．Greengardら[2]のSynapsin Iは分子量86,000のシナプス小胞に特異的なリン蛋白で，高イオン強度下で小胞から解離し，リン酸化の各種条件が明らかにされている．SVP蛋白は高イオン強度下での小胞からの解離はみられなかったが，リン酸化，カルシウム結合能等を研究する必要がある．Matthewら[4]が同定したシナプス小胞蛋白は分子量がSVP65と一致するが，シナプス膜にも存在し，Tritonで可溶化される点でSVP65とは異なる．

1) Carlson,S.S. and Kelly,R.B. (1983) J. biol. Chem. 258: 11082-11091.
2) Huttner,W.B., Schiebler,W., Greengard,P. and de Camilli,P. (1983) J. Cell Biol. 96: 1374-1388.
3) Jones,D.H. and Matus,A.I. (1974) Biochim. Biophys. Acta 356: 276-287.
4) Matthew,W.D., Tsavaler,L. and Reichardt,L.F. (1981) J. Cell Biol. 91: 257-269.
5) Nishiye,H., Ozaki, T. and Uchizono,K. in preparation.
6) 田代朋子 (1984) 蛋白質核酸酵素 29: 1046-1055.
7) Whittaker,V.P., Michaelson,I.A. and Kirkland,R.J.A. (1964) Biochem. J. 90: 293-303.

86. ラット副腎凍結切片への ^{3}H－グルタミン酸結合について

中牟田弘道・荻田喜代一・小井田雅夫・米田幸雄
（摂南大・薬・薬理）

〔要　約〕

ラット副腎凍結切片を用いて^{3}H-グルタミン酸(GLU)結合実験を行った。

ラット副腎を0.32Mショ糖水溶液中で凍結後、クライオスタット中で凍結切片を作成した。ゼラチンを塗布したカバーグラス上に切片を貼布し、50mMトリス酢酸緩衝液(pH7.4)中で予備洗浄後、切片を^{3}H-GLUとインキュベートした。切片へ取り込まれる放射活性は予備洗浄の回数とともに増加し、3～5回でほぼ最大となった。また、10～30μmの間では切片の厚さに比例して取り込まれる放射活性も増加することが明らかとなった。反応温度30℃条件下では、4℃における結合に比べて4倍以上高い結合が得られた。30℃条件下での結合は反応時間60分でほぼ平衡状態に達っしたが、4℃では120分まで直線的に結合は増加した。L-GLU(10^{-8}-10^{-4}M)はこの^{3}H-GLU結合を著明に抑制したが、D-GLU(10^{-6}-10^{-4}M)は本結合に対して著明な影響を与えなかった。非特異的結合は^{3}H-GLUの濃度に比例して直線的に増加したが、特異的結合は用いた^{3}H-GLU濃度の間(25-1000nM)では飽和性を示した。以上の結果より、ラット副腎凍結切片上に立体特異性、飽和性および高親和性^{3}H-GLU結合部位が存在すること、および本方法が^{3}H-GLU結合部位のオートラジオグラフィーに応用出来ることが示唆される。

Key word：

^{3}H-Glutamate binding, Adrenal section, Autoradiography

L-グルタミン酸(GLU)は哺乳動物においては、中枢神経系における興奮性神経情報伝達物質としての可能性を示唆されているが(8)、その興奮性シナプス後電位の発生機序としてはシナプス受容体と共役したカチオンチャンネルのNaイオン透過性亢進が報告されている(7)。放射性同位元素で標識したGLUの特異的結合が、このシナプス受容体の生化学的指標になること(6)およびこの結合が種々のイオン類により著明に影響されること(1-3)などが次々と明らかにされている。一方筆者らも、^{3}H-GLUをリガンドとするレセプターアッセイにより、ラット脳においてGLU受容体とアニオンチャンネルの共役機構が存在すること(9)、このアニオンチャンネルを介してCaイオンが増強作用を発揮すること(10)、およびグルタチオンがGLU受容体に作用すること(5)などの可能性を見出した。さらに、中枢性神経組織ばかりでなく末梢性神経組織である下垂体と副腎に著しい^{3}H-GLU結合能が認められること(12)、およびこの末梢性GLU結合は中枢神経系の結合とは明らかに性質が異なること(11)が判明した。したがって本研究では、このラット副腎のGLU結合部位の生理的意義追究の一環として、その局在部位探索のためオートラジオグラ

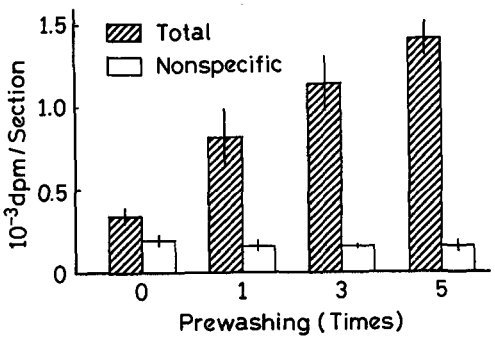


Fig.1. Effect of prewashing on ^{3}H-glutamate binding to rat adrenal sections.

フィー法開発の目的で、凍結切片への^{3}H-GLU結合について検討を加えた。<実験方法>Wistar系雄性ラット（体重250-300g）を断頭後副腎を摘出し、氷冷した0.32Mショ糖水溶液中で凍結させた。凍結組織はクライオスタット中(-25℃)で、ミクロトームを用いて種々の厚さ(10-30μM)の切片に薄切した。得られた凍結切片は、予めゼラチン（0.5%水溶液）を塗布したカバーグラス上に融解貼付した。これらの切片はさらに、0.32Mショ糖水溶液中-25℃で凍結保存し、24時間以内に実験に供した。凍結切片は室温融解後、氷冷した50mMトリス酢酸緩衝液(pH7.4)で10分間予備洗浄を行った。この予備洗浄操作を3回行ったのち、切片を100nM^{3}H-GLUを含む緩衝液1ml中で30℃、60分間インキュベートした。反応終了後、切片をさらに氷冷した緩衝液で3回洗浄した。切片に取り込まれた放射活性は、5mlのトルエン＝トリトンシンチレーター(10)を用いた液体シンチレーション法により測定した。1mM非放射性GLU存在下でも同様の実験を行い、得られた放射活性を非特異的結合として全結合より差し引くことにより特異的結合を算出した。また、オートラジオグラフィーの場合は、反応終了後副腎切片を2.5%グルタルアルデヒドアセトン溶液で固定し、乾燥後Ultrofilm（LKB社製）に密着させて4℃で10-20日間感光させた。フィルムを現像・定着後、その黒化度を顕微鏡下で観察した。<実験結果>予備洗浄の回数と^{3}H-GLU結合との相関性を検討したところ、全結合はその回数につれて増加したが、非特異的結合は予備洗浄回数を増加しても変動しなかった(Fig.1)。また、10-30μMの間では切片の厚さに比例して、全結合も非特異的結合も直線的に増加することが見出された(Fig.2)。この^{3}H-GLU結合は温度依存性を有し、反応温度30℃条件下では4℃条件下に比べて、2～4倍以上高い結合が得られた。30℃では反応は60分以内に平衡状態に達するのに対して、4℃では120分までほぼ直線的に結合が増加した(Fig. 3)。非特異的結合はいずれの反応温度においても、反応時間に関係なく一定であった。次いで、L-GLU(10^{-8}-10^{-6}M)とD-GLU(10^{-6}-10^{-4}M)の本結合に対する影響について検索を進めたところ、L-GLUは濃度依存的に著明な結合阻害作用を発揮したが、D-GLUは本結合に対して著変を与えなかった(Fig.4)。25-1000nMの^{3}H-GLU濃度間では、非特異的結合は直線的に増加するのに対して、特異的結合は飽和性を示すことが明らか

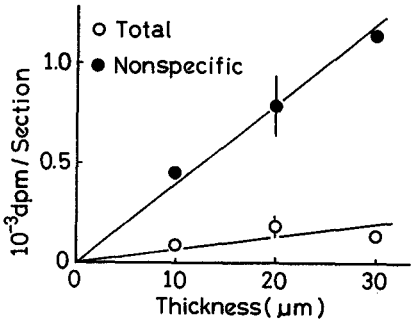


Fig.2. Effect of thickness of sections on ^{3}H-glutamate binding.

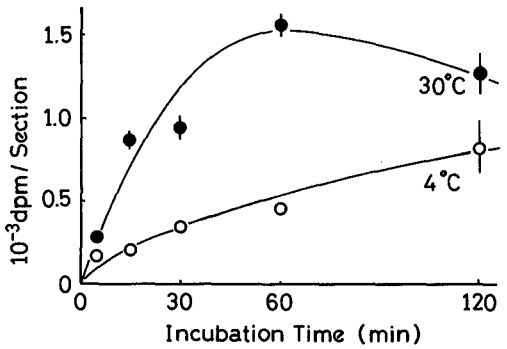


Fig.3. Effect of incubation time on ^{3}H-glutamate binding to rat adrenal sections.

となった(Fig.5)<考察>副腎凍結切片への^{3}H-GLU結合は、温度依存性、立体特異性、飽和性および高親和性を持つことが明らかとなった。これらの成績は、副腎膜標品を用いた研究結果(11, 12)との類似性から考えて、副腎内GLU受容体の性質を反映する可能性が高いものと思われる。膜標品への^{3}H-GLU結合は、GLU受容体アゴニストの1つであるキスカル酸によって著明に阻害され、N-メチル-D-アスパラギン酸(NMDA)で有意に増強されるので、同様に凍結切片への結合実験においても種々のGLU受容体アゴニストおよびアンタゴニストの影響についての検討が望まれる。特に、NMDA感受性GLU受容体は通常のシナプス膜標品を用いたレセプターアッセイでは検出出来ないのに対して、オートラジオグラフィー法では^{3}H-GLU結合はNMDAにより著明に阻害されることが知られている(4)ので、本研究の様な凍結切片への^{3}H-GLU結合測定法の有用性は高いと思われる。なお、本法を用いた副腎内^{3}H-GLU結合部位のオートラジオグラフィーについては、本研究室で現在解析中である。

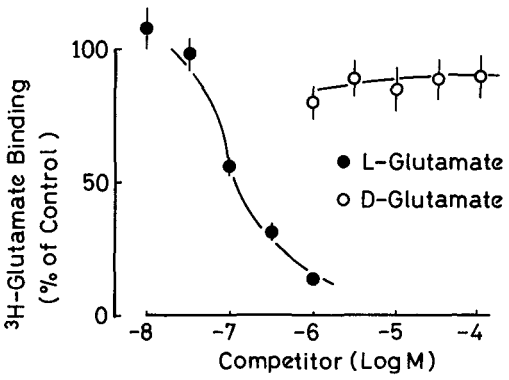


Fig.4. Effect of L-glutamate and D-glutamate on ^{3}H-glutamate binding to rat adrenal sections.

〔謝辞〕本研究の一部は文部省科学研究費(60770185)の援助のもとに行った。

〔文献〕1. Baudry,M., and Lynch,G. (1979) Nature 282, 748-750 2. Fagg,G.E., Foster,A.C., Mena,E.E., and Cotman,C.W. (1982) J.Neurosci. 2, 958-965 3. Mena,E., Fagg,G.H., and Cotman,C.W. (1982) Brain Res. 243, 378-381 4. Monaghan,D.T., Holets,V.R., Toy,D.W., and Cotman, C.W. (1983) Nature (Lond.) 306, 176-179 5. 荻田喜代一, 中牟田弘道, 小井田雅夫, 米田幸雄 (1985) 神経化学 24, 印刷中 6. Roberts,P.J. (1974) Nature (Lond.) 252, 399-401 7. Takeuchi,A., and Onodera,K. (1973) Nature New Biol. 242, 124-126 8. Watkins,J.C., and Evans,R.H. (1981)Annu. Rev.Pharmacol. 21, 165-204 9.米田幸雄, 荻田喜代一, 中牟田弘道, 福田美衛, 小井田雅夫 (1985) 神経化学 24, 印刷中 10. 米田幸雄, 荻田喜代一, 中牟田弘道, 小井田雅夫 (1985) 神経化学 24, 印刷中 11. 米田幸雄, 荻田喜代一, 中牟田弘道, 小井田雅夫 (1985) 神経化学 24, 印刷中 12. Yoneda,Y., Ogita,K., Nakamuta, H., and Koida,M. (1985) Excitatory Amino Acids (Roberts,P.J., Storm-Mathisen ,J., and Bradford,H.F., eds), in press, Macmillan Press, London

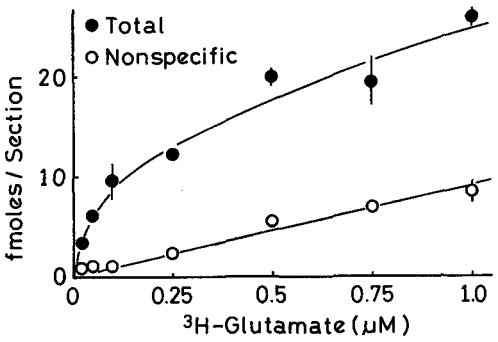


Fig.5. Effect of varying concentrations ^{3}H-glutamate on ^{3}H-glutamate binding to rat adrenal sections.

87. グルタミン酸受容体とアニオンチャンネルの関連性について

米田幸雄・荻田喜代一・中牟田弘道・福田美衛・小井田雅夫
（摂南大・薬・薬理）

〔要　約〕

ラット脳シナプス膜標品への ^{3}H-グルタミン酸結合に対する各種イオンの影響を検討した。

Naイオンは反応温度にかかわりなく本結合を著明に増強したが、Clイオン存在下、30°C条件下ではNaイオンは逆に抑制作用を発揮した。一方、Clイオンは温度依存性に結合を増強した。30°C条件下での結合は構造特異性を持ち、キスカル酸およびグルタミン酸ジエチルエステルで有意に抑制されたが、N-メチル-D-アスパラギン酸およびカイニン酸はともに結合に著変を与えなかった。他のアニオン類、およびアニオンチャンネル拮抗薬（ピクロトキシニン）やアニオン輸送阻害薬（エタクリン酸およびDIDS）を用いた分析より、Clイオンの増強作用はアニオンチャンネルを介した作用であることが判明した。また、コンピューターによるScatchard解析ではClイオンは親和力には影響せずに結合部位の増加を誘発することが明らかとなった。

以上の結果より、ラット脳においてグルタミン酸受容体とアニオンチャンネルの共役機構存在の可能性が示唆される。

Key word：　Glutamate receptor, Anion channel, Temperature dependency

甲殻類の神経系ばかりでなく哺乳動物の中枢神経系においても、L-グルタミン酸(GLU)は興奮性の神経情報伝達物質としての機能を示唆されているが(5)、そのシナプス後電位の発生機序としてはシナプス受容体と共役したカチオンチャンネルのNaイオン透過性亢進が報告されている(4)。しかしながら、このシナプス受容体とイオンチャンネルの共役機構に関しては、未だ充分に解明されたとは言えないのが現状である。一方、脳シナプス膜標品への ^{3}H-GLU結合がGLUシナプス受容体の生化学的指標となること(3)、およびこの結合が種々のイオン類によって影響されること(1)が近年明らかにされている。したがって本研究では、このイオン類の作用とイオンチャンネルとの関連性について、^{3}H-GLUをリガンドとするレセプターアッセイにより検討を加えた。<実験方法>ラット全脳より調製した粗シナプス膜標品(7)を50mMトリス酢酸緩衝液(p.H 7.4)に懸濁したのち、50,000×gで30分間遠心分離した。この洗浄操作を3回繰り返して得られた沈査を、0.32Mショ糖水溶液に懸濁して-80°Cで凍結保存した。使用時には、懸濁液を室温融解後2回洗浄操作を行い、上述の緩衝液に懸濁して実験に供した。懸濁液を2°Cまたは

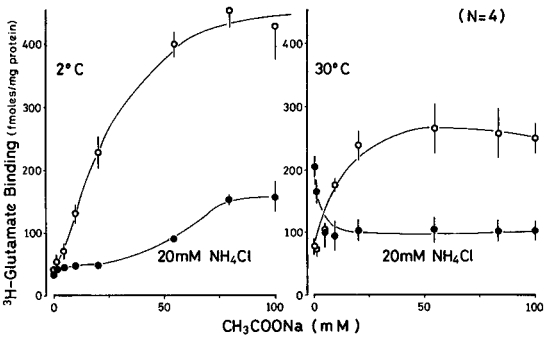


Fig.1. Effect of ammonium chloride on sodium acetate-induced enhancement of ^{3}H-glutamate binding.

30°Cで 10nM ^{3}H-GLUと60分間反応後、ワットマングラスフィルターを用いた吸引ろ過法(6)により反応を停止した。1mM非放射性GLU存在下の放射活性を非特異的結合として特異的結合を算出した。<実験結果>酢酸ナトリウム(1-100mM)の添加により^{3}H-GLU結合は著明に増強されたが、この増強現象は反応温度に関係なく観察された(Fig. 1)。2°C反応条件下では20mM塩化アンモニウムにより酢酸ナトリウムの作用は抑制されたが、30°Cでは塩化アンモニウムの増強作用に対して酢酸ナトリウムは抑制作用を発揮した。この塩化アンモニウムの増強作用は20-40mMで最大となり反応温度に依存した現象であった(Fig. 2)。30°C反応条件下での ^{3}H-GLU結合は立体特異性を持ち、GLU受容体アゴニストの1つであるキスカル酸(QA)およびQA型受容体拮抗薬のL-グルタミン酸ジエチルエステルで有意に阻害されたが、他のGLU受容体アゴニストであるN-メチル-D-アスパラギン酸(NMDA)やカイニン酸(KA)は本結合に対して著変を与えなかった(Fig. 3)。Clイオン以外の他のアニオンのアンモニウム塩についても検索を進めたところ、臭素イオンをはじめヨウ素イオン、硝酸イオンなどのアニオンチャンネル透過性イオンのみが結合増強作用を有し、ギ酸、硫酸、酢酸などの各イオンの様にアニオンチャンネル非透過性イオン類は結合に著明な影響を及ぼさなかった(Fig. 4)。さらに、アニオンチャンネル拮抗薬のピクロトキシニン(10^{-3}M)やアニオン輸送阻害薬のエタクリン酸(10^{-3}M)、DIDS(10^{-4}-10^{-3}M)はいずれもClイオンによる結合増強を有意に抑制した(Fig. 5)。しかしながら、DIDSはNaイオンによる結合増強に対しては有意な増強作用を発揮した。コンピューターを用いた Scatchard 解析により、10-1200nMの間ではGLU結合部位は単一成分から構成されることが判明し、その解離定数Kdは1.11±0.28 μM、最大結合数Bmaxは8.79±0.87pmoles/mg protein と算出された (Fig. 6)。Clイオンはこの Kd値に著変を与えずにBmax値のみを増加させるのに対して、Naイオンは Kd 値の上昇とBmax値の増加を誘発する作用を持つことが明らかとなった。 Clイオンにより増強されるGLU受容体が前述のいずれのサブタイプに属するものかを分析するために、QA、NMDA、KAの作用を検討したところ、Clイオン依存性の結合はQAにより著しく阻害されたが、NMDAやKAでは殆んど影響されなかった。<考察>本実験条件下においては、各種の GLU受容体のうちQA型の受容体が主に

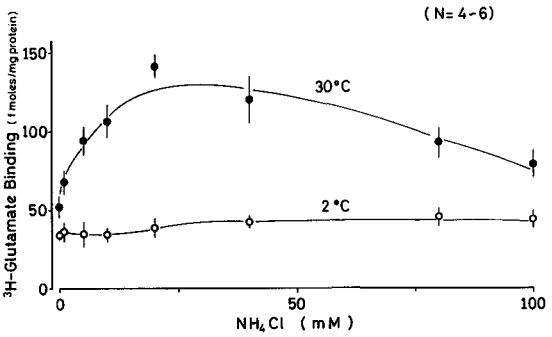


Fig.2. Effect of ammonium chloride on ^{3}H-glutamate binding.

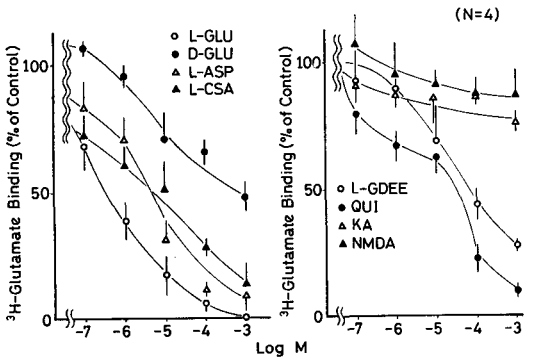


Fig.3. Effect of various conpounds on ^{3}H-glutamate binding.

検出されることは種々のアゴニストやアンタゴニストを用いた阻害実験からも明らかである。さらに、Clイオン依存性結合がQAによってのみ抑制されること、およびこのClイオンの作用が結合部位の増加に起因していることも、このQA型受容体の存在を強く支持するものである。その生理的意義の解明とともに各サブタイプの単離・精製は、今後の重要な検討課題であろう。また本研究では、イオンチャンネル拮抗薬やイオン輸送阻害薬を用いた解析から、Clイオンによる結合増強作用がアニオンチャンネルを介した現象であることが明らかとなった。バッタ筋肉においては、GLUにより過分極が生じるが、この過分極がClイオン透過性亢進に基づき、ピクロトキシンで阻害されること(2)が報告されている。本研究結果は、同様の共役機構が哺乳動物中枢神経系においても存在する可能性を示唆するものであり、GLUによるシナプス伝達機構の解明に大きな意義を持つものと思われる。

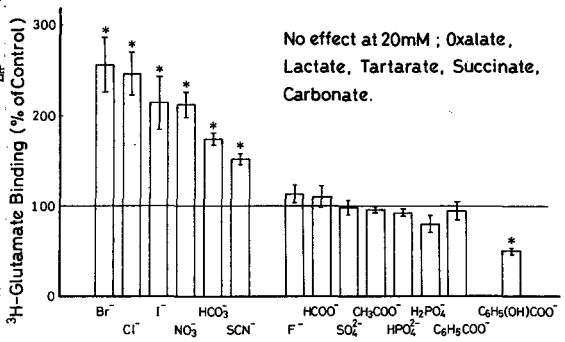


Fig.4. Effect of various anions (20mM) on ^{3}H-glutamate binding.

〔謝辞〕本研究の一部は文部省科学研究費(59770150)の援助のもとに行った。

〔文献〕1. Baudry, M., and Lynch, G. (1979) Nature 282, 748-750 2. Cull-Candy, S. G. (1976) Motor Innervation of Muscle (Thesleff, S., ed) 263-288, Academic Press, London 3. Roberts, P.J. (1974) Nature 252, 399-401 4. Takeuchi, A., and Onodera, K. (1973) Nature New Biol. 242, 124-126 5. Watkins, J. C., and Evans, R. H. (1981) Ann. Rev. Pharmacol. 21, 165-204 6. Yoneda, Y., and Kuriyama, K. (1980) Nature 285, 670-673 7. Zukin, S. R., Young, A. B., and Snyder, S. H. (1974) Proc. Nat. Acad. Sci. USA 71, 4802-4807

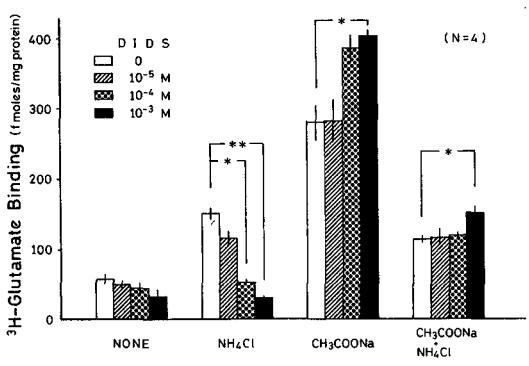


Fig.5. Effect of 4,4'-diisothiocyanatostilbene-2,2'-disulfonic acid (DIDS) on ^{3}H-glutamate binding.

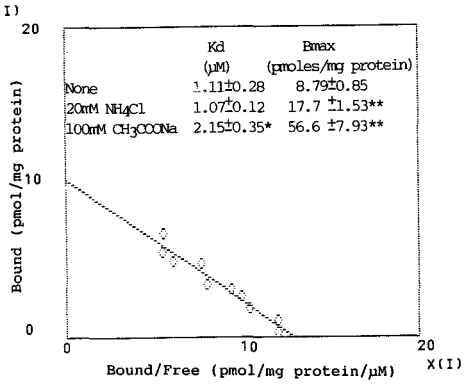


Fig.6. Scatchard plot of ^{3}H-glutamate binding.

88. カイニン酸誘発性線条体－黒質系 GABA ニューロン変性に伴う GABA 受容体結合の変化と活性酸素生成

高橋　守・栗山欣弥　（京都府医大・薬理）

〔要　約〕

我々はすでに，脳シナプス膜標品をホスホリパーゼ（PLase）A_2 及びCで前処置すると ^{3}H-muscimol 結合が著明に増強され，この増強効果の発現には，superoxide anion($O_2^{\cdot-}$) 又はhydroxyl radical(·OH)が重要な役割を演じていることを報告した。今回はこの現象の生理学的又は病態生理学的意義を追求するため，カイニン酸（KA）で線条体－黒質系を障害したラットを用いて検討を加えた。ラットの一側線条体にKAを微量注入した1週間後には，投与側線条体で ^{3}H－muscimol 結合の有意な増強が認められたが，黒質では変化が認められなかった。この場合 $O_2^{\cdot-}$ 生成量をみると，線条体，黒質共に投与側，非投与側との間に有意な差が認められなかった。一方，KA投与4週間後には，線条体では ^{3}H－muscimol 結合に変化が認められなかったが，投与側黒質では有意な結合増強が出現した。この結合増強は，GABA受容体の結合部位数の増加に基因するものであり，さらにこの場合線条体では投与側，非投与側で $O_2^{\cdot-}$ 生成量に有意な差が認められなかったが，投与側黒質では非投与側に比較して，$O_2^{\cdot-}$ 生成量の有意な増加が認められた。以上より，KA投与4週間後の黒質では，GABA受容体の結合部位数の増加に基因する ^{3}H－muscimol 結合増強が出現すること，またこの増強には線条体－黒質系GABAニューロンの変性に伴う黒質内 $O_2^{\cdot-}$ 生成の増加が重要な役割を演じている可能性が示唆される。

Key word：　superoxide anion 。　^{3}H-muscimol 結合 .　GABA受容体 。

我々は既にラット脳より調整したシナプス膜標品をPLase A_2 及びPLase Cで前処置すると，^{3}H－muscimol 結合が著明に増強され，この結合増強効果の発現にはPLaseの作用によって膜リン脂質から遊離される不飽和脂肪酸が必要であり，この遊離不飽和脂肪酸の作用には，遊離不飽和脂肪酸より発生する $O_2^{\cdot-}$ 又は·OHが重要な役割を演じていることを報告した（６）。　今回はこの現象の生理学的又は病態生理学的意義を追求するため，KAで線条体－黒質系を障害したラットを用いて検討を加えた。

〔方法〕　Wistar系雄性ラット（200~250ｇ）をpentobarbital（50 mg／kg i.p.）麻酔下で脳定位固定装置に固定し，Hamilton社製の微量注入器を用いて左側尾状核にKAを投与した。　投与位置はPellegrino and Cushman脳図譜に従い決定し，KAは人工脳脊髄液に溶解し，2 μg／μl を3分間にわたり緩徐に注入した（４）。　またKA投与後に出現したラットの特異的旋回運動の数を経時的に測定した。　KA投与1週間後及び4週間後にラットを断頭して得られた線条体，黒質の顆粒分画について，GF／B filtration法により ^{3}H－muscimol 結合能を測定した。　又，$O_2^{\cdot-}$ 生成量の測定は，Chan and Fishman法に基づいて行なった（１）。尚，KA投与4週間後の線条体についてはKlüver － Barrera染色（３），淡蒼球及び黒質についてはHolzer染色（２）を行ない，病理組織学的検索を加えた。

〔結果〕　線条体へのKA投与1週間後の ^{3}H－muscimol 結合は，KA投与側線条体で有意な増強を示したが，黒質では変化が認められなかった（Fig 1）。尚KA投与1週間後の線条体における ^{3}H－muscimol 結合増加は，GABA受容体の親和性（Kd値）の上昇によることはすでに報告した（４）。　尚 $O_2^{\cdot-}$ 生成量は，線条体，黒質共にKA投与側と非投与側との間で有意な差を示さなかった（Fig 2）。　一方線条体へのKA投与4週間後における ^{3}H－muscimol 結合をみると，線条体では変化が認められなかったが，KA投与側の黒質では有意な増強が認められた（Fig 3）。この黒質における結合増強はGABA受容体の親和性の変化によるものではなく，結合部位数の増加に基因するものであり（Fig 4），さらにこの場

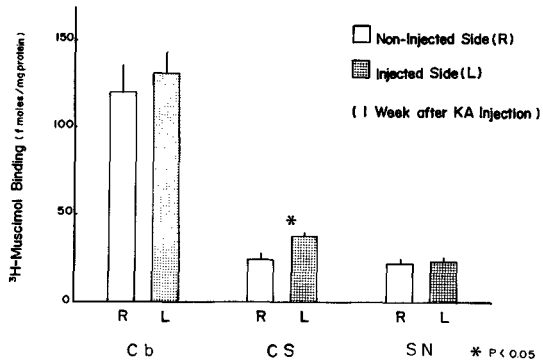


Fig 1 Effect of unilateral intrastriatal injection of kainic acid (KA) on specific binding of ^{3}H-muscimol in cerebellum (Cb), corpus striatum (CS) and substantia nigra (SN) determined 1 week after the injection.

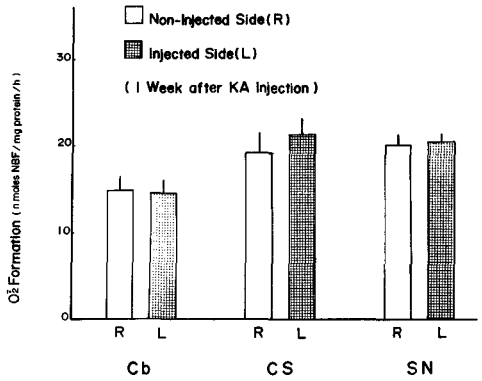


Fig 2 Effect of unilateral intrastriatal injection of kainic acid (KA) on superoxide anion(O_2^-) formation in cerebellum (Cb), corpus striatum (CS) and substantia nigra (SN) determined 1week after the injection.

合，線条体ではKA投与側と非投与側との間でO_2^-生成量に有意な差は認められなかったが，KA投与側の黒質においては，O_2^-生成量の有意な増加が認められた（Fig 5）。

KAの左側線条体内投与後の組織学的変化をみると，投与1週間後には左側線条体内神経細胞の変性と細胞数の著しい減少がみられるのみであったが，4週間後には左側線条体及び淡蒼球において，神経細胞体や突起の中にglia fiberを豊富に有する反応性のastrocytesが出現するのが確認された。また黒質緻密帯では組織学上特に顕著な左右差が認められなかったが，黒質網状帯では淡蒼球の場合と類似したgliosisの所見が認められた（Fig 6）。

〔考察〕 KAの左側線条体内投与4週後に組織学的検討を行なったところ，左側の淡蒼球及び黒質網状帯において神経細胞の細胞体は比較的よく保たれているのにかかわらず，反応性のastrocytesの出現が強く認められる

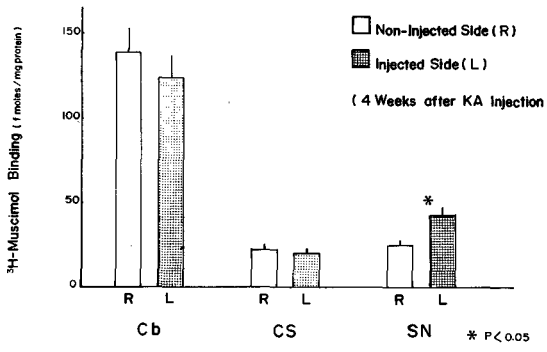


Fig 3 Effect of unilateral intrastriatal injection of kainic acid (KA) on specific binding of ^{3}H-muscimol in cerebellum (Cb), corpus striatum (CS) and substantia nigra (SN) determined 4 weeks after the injection.

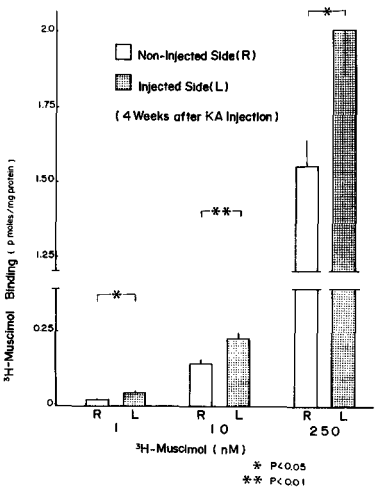


Fig 4 Effect of unilateral intrastriatal injection of kainic acid (KA) on ^{3}H-muscimol binding in substantia nigra determined in the presence of various concentrations of ^{3}H-muscimol.

ことから，これらの部位で認められたgliosisは，左側尾状核から淡蒼球や黒質網状帯に向かって走行している神経線維の変性に対応した変化を示すものと考えられる。 一方，KA投与1週間後の黒質では ^{3}H－muscimol結合能に変化が認められないが，4週間後の左側黒質では本結合能が有意な増強を示したこと，この結合増加がGABA受容体の結合部位数の増加に基因していたこと，またWaddington（5）らが本研究と類似のKA処置後の黒質では，GABA含量の有意な減少が認められたと報告していることなどを考え合わせると，KA投与4週間後の黒質においては，線条体－黒質系GABAニューロンの変性に伴いGABA受容体にdenervation supersensitivity現象が生じている可能性が示唆される。 さらにこの左側黒質においては，同時に$O_2^{\cdot-}$生成量の有意な増加が認められたことから考えると，本実験動物モデルで認められた様なGABAニューロンの変性とこれに随伴するGABA受容体の増加を伴うsuper－sensitivity現象の出現に，$O_2^{\cdot-}$生成の増加が重要な意義を持つ可能性が示唆される。

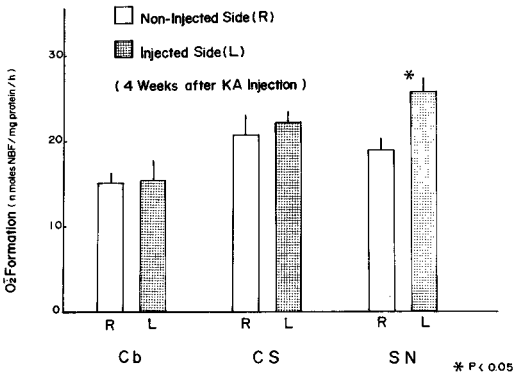


Fig 5 Effect of unilateral intrastriatal injection of kainic acid (KA) on superoxide anion ($O_2^{\cdot-}$) formation in cerebellum (Cb) and substantia nigra (SN) determined 4 weeks after the injection.

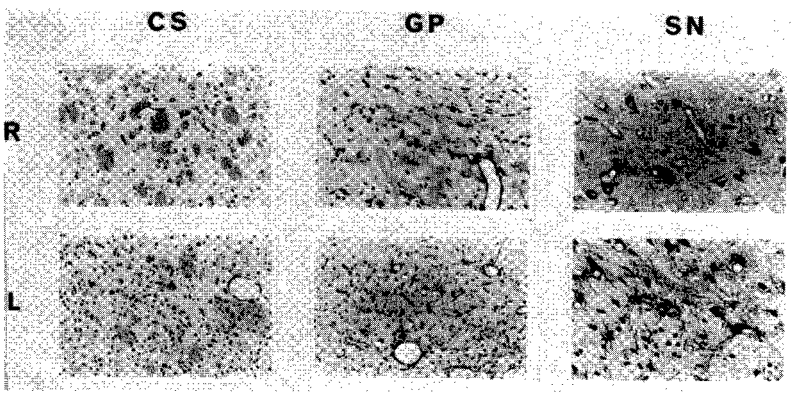


Fig 6
Photomicrographs of corpus striatum (CS), globus pallidus (GP), and reticular portion of substantia nigra (SN) 4 weeks after intrastriatal KA injection. CS: Klüver-Barrera stain; GP, SN: Holzer stain.

〔参考文献〕

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

(2) Holzer, W. (1921) Z. ges. Neurol. Psychiat. 69, 354.

(3) Klüver H., and Barrera, E. (1953) J. Neuropath, exp. Neurol. 12, 40.

(4) Kuriyama, K., Kurihara, E., Ito, Y., and Yoneda, Y. (1980) J. Neurochem. 35 (2), 343 - 348.

(5) Waddington, J.L., and Cross, A.J. (1978) Nature 276, 618 - 620.

(6) Yoneda, Y., Kuriyama, K., and Takahashi, M. (1985) Brain Research 333, 111 - 122.

89. ハルミンの行動薬理学的研究(第4報):アポモルフィン併用で生じるラットの Jumping における GABA 作動性神経系の関与

諸井佳代子・久我哲郎　　(千葉大・生物活性研・薬理活性)

〔要　約〕

ハルミン(Ha)およびアポモルフィン(Apo)の併用によって生じるjumping行動の発現機構に対するGABA作動性神経系の関与と、本行動発現と脳内ハルミン量との関連について検討を加えた。GABA作動薬ムシモール(0.05－0.1mg／kg)、ジアゼパム(0.2－1.0mg／kg)、及び抗抗薬であるピクロトキシン(0.1－0.5mg/kg)、ピククリン(0.1－0.5mg／kg)はともに用量依存性にjumping行動の発現を抑制、その持続を短縮した。GABAの生合成阻害薬セミカルバジドによっても抑制された。これらの結果はドパミン作動性神経系の作動薬がjumpingの増強に、遮断薬がjumpingの消失に働く結果とは異なるものである。脳内ハルミン量は高速液体クロマトグラフィーにて簡便にかつ感度良く測定され(限界濃度、0.05 pmole)、jumpingの度合と脳内ハルミン濃度間には密接な正の関係が示された(r＝0.985)。Haはベンゾジアゼパム(BZA)レセプターに対する^{3}H－ジアゼパムの結合を10uMで50％置換するが、HaとApo投与ラットの大脳皮質膜標品をもちいての結合活性の測定では、Ha(2－10mg／kg)は結合活性に影響を与えなかった。これらの実験結果からHaはBZAレセプターを介してGABA作動性神経系に作用したとは考えにくく、それ以外の部位、たとえばGABA取り込み機構やドパミン取り込み機構ーに働いて、jumpingを引き起こしていることが考えられる。

Key word :　Harmine,　Jumping behavior,　GABAnergic system

ハルミン(Ha)とアポモルフィン(Apo)をラットに同時併用すると投与数分以内に激しい鳴き声と共に突然jumpingが起こりゲージ内を暴走する。我々はすでに諸種の中枢作用薬を用いて本行動に及ぼす影響について検討した結果、Ha、Apoの単独投与では本行動は発現せず、ApoやL－DOPAによってドパミン(DA)作動性機能が促進している時のみHaによって誘発されること、そして本行動発現時には線条体のドパミン量が増加していることを見出だし発表している(1,2)。Haがベンゾジアゼピン(BZA)レセプターと密接な相互作用を持つβ－カルボリン骨格を有すること(3,4)、並びにHaにより誘発される振せんがBZAにより抑制されること、さらには中枢神経系におけるBZAの効果がGABA作動性神経を介して発現されるという知見が蓄積されつつあることから、今回は本行動発現機構を解明する研究の一環として、jumping発現時の脳内Ha量の変化と、本行動に対するGABA作動性神経系の関与について検討を加えた。

(実験方法)

(動物及び処置)体重180－220gのWistar系雄性ラットにHa(2－10mg／kg)及びApo(2mg／kg)を皮下投与、jumping行動はゲージ底面につけたMTピックアップをポリグラフにつなぎ、ゲージの振動を増幅し、5段階のスコアで定量化した(1)。ムシモール、ジアゼパム、ピクロトキシン、ピククリン、セミカルバジド、アミノオキシ酢酸(AOAA)

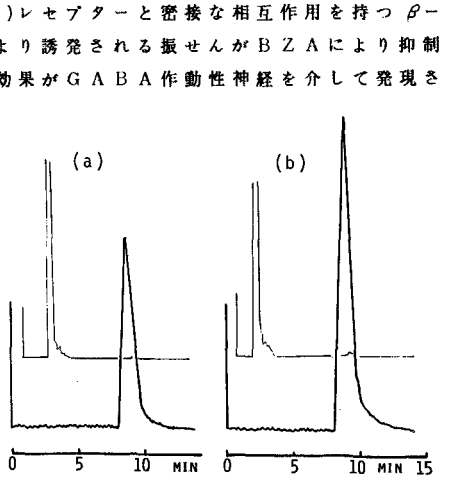


Fig.1. Chromatogram of brain harmine extracted from cortex (a) and (a) with standard harmine (b).

は蒸留水に溶解しHaとApo投与30分前に投与した。(ハルミンの定量)HaとApo投与10分後ラットを断頭致死、脳を7領域に分割した。組織は0.1NHClO$_4$(25%メタノール)にて1:20ホモジネートとし15,000rpm20分遠心、上清(2-10ul)を蛍光光度計付高速液体クロマトグラフィー(HPLC)に応用し、Haの定量を行った。カラム(Finepak C_{18}S)、移動相メタノール:0.2%りん酸(60:40)、1.0ml/min。励起波長320nm、蛍光波長420nm。図1に示すように脳内Haは標準物質と同じ所に溶出、測定限界は0.05pmoleであった。脳ホモジネートではHa以外のものは認められなかった。(結合実験)ラット脳組織は50mMトリス-クエン酸緩衝液にてホモジナイズし20,000rpm、20分遠心し膜標品を得た。2度洗浄後凍結、解凍、さらに緩衝液で3度洗浄遠心を繰り返しサンプルを得た。^{3}Hジアゼパム(1nM)およびムシモール(2nM)と

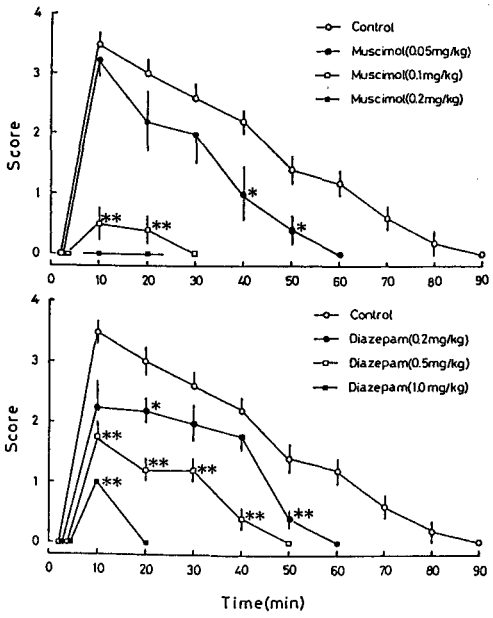


Fig.2. Effect of muscimol and diazepam on the jumping behavior induced by the combination of harmine (10mg/kg) and apomorphine (2mg/kg).

0°C30分インキュベート後グラスファイバー ろ紙にて急速ろ過し結合量を測定した。非特異的結合活性は10uMジアゼパム及び1mMGABA存在下測定した。

(結果)

1)GABA作動薬及びGABA拮抗薬のjumping行動に及ぼす影響: ムシモール、ジアゼパム及びAOAAをHa(10mg/kg)とApo(2mg/kg)投与30分前及び6時間前(AOAA)投与し、本行動に対する影響を検討したところ、図2に示すようにムシモール0.1mg/kg以上でjumping行動は著明に抑制された。又ジアゼパム前処置では0.2-1.0mg/kgで用量依存性にjumpingの抑制が見られた。AOAA50mg/kg前処置ではムシモール0.2mg/kgと同様jumping行動は発現しなっかた。GABA作動系を抑制する薬物であるピククリン、ピクロトキシンを用いてjumping行動に対する影響をみた結果、いずれも用量依存性にjumping行動の強度を減弱、及び持続を短縮した。又GABA生合成酵素であるglutamicacid decarboxylase活性を阻害し、GABAレベルを低下させるセミカルバジドの0.1-0.2mg/kgの前処置でjumping行動はやや減弱、0.5-150mg/kgでは著明に減弱した。

2)脳内ハルミン量とjumping行動の関連: Ha

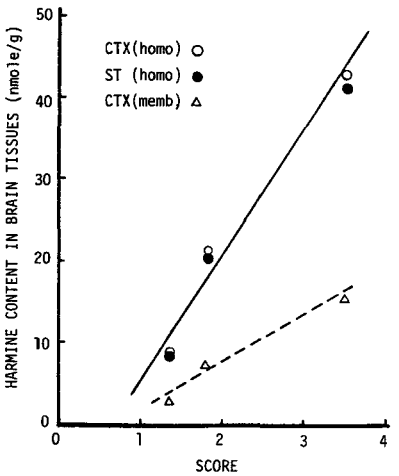


Fig.3. Relation between jumping activity and the brain harmine concentration.

2，5，10㎎／kgをApo(2㎎／kg)と併用投与10分後のHaの量は大脳皮質でそれぞれ9.0、21.3、43.1 nmole／g、線条体で8.2、20.5、41.3nmole／gを示し、HaとApo投与で生ずるjumpingの度合と脳Ha量との間には図3に示すように非常に高い相関が示された。r＝0.985(大脳皮質CTX)、0.984(線条体ST)。さらに5回洗浄で得られたCTX膜でのHaはホモジネートの30％へ低下したがjumpingスコアとは正の相関関係が保たれていた。さらに各領域におけるHa量はHaとApo併用投与時の方がHa単独投与に比し約20％の増加傾向を示した。

3)BZAレセプターに対する影響：　レセプター結合実験の結果HaはBZAレセプターに対し10uMで50％阻害を示すことがみられた。この値はBZAやβ-カルボリンエチルエステル(β-CCE)の1/1000－1/100である。HaとApo投与後のラット脳を用いての結合実験の結果、^{3}H－BZA結合活性及びムシモール結合活性はHa(2-5mg/kg)では対照群とほとんど変わらず、10mg/kgで10％低下する傾向がしめされたが有意差は認められなかった(図4)。

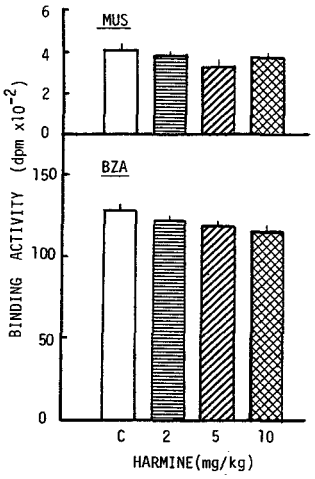


Fig.4. Binding activity of brain cortex membrane of rats treated with harmine and apomorphine.

（考察）

GABA作動性神経系に影響を与える種々の薬物をもちいての実験結果から、HaとApoで誘導されるjumping行動には、GABA神経系の関与が示された。すなわち、作動薬、拮抗薬ともに本行動を抑制するように働き、ドパミン作動性神経系の作動薬がjumpingの増強に、遮断薬がjumpingの消失に働く結果とは異なるものであった。　Haの作用部位としては、β-カルボリン骨格をもつ薬物がBZAレセプターに対して高い親和性を持ち、そのけいれん作用が本レセプターのBZA結合活性の阻害と関連していることから、BZAレセプターが考えられたが、本実験の結果ではBZAおよびGABAレセプターの結合活性に変化はみられなかった。　Haがβ-CCEなどに比しそのBZAレセプターに対する作用が弱いことと、今回の実験結果から考えるとHaがBZAレセプターを介してGABA作動性神経系に作用したとは考えにくい。Haの脳内濃度と、jumpingの度合の間には密接な正の相関関係が見られ、jumpingがHa量に依存して生じていることは明らかである。それゆえHaがBZAレセプター以外の部位－たとえばGABA取り込み機構やドパミン取り込み機構－に働きjumpingを引き起こしていることが考えられる。

(References)
(1) Takashi, K. and Kuga, T. (1981). Jap. J. Pharmacol. 31,677-688.
(2) 諸井佳代子、久我哲郎（1985）第58回日本薬理学会総会要旨集　pp。256
(3) Robertson, H.A. et al. (1981). Eur. J. Pharmacol. 76,281-284.
(4) Morin, A.M. et al. (1981). Life. Sci. 28, 2257-2263.

90. ラット下垂体キニン系に関する研究

仮家公夫・山内あい子・李　英培　　(神戸学院大・薬・薬理)

〔要　約〕

ラット下垂体のキニン系について検討した。正常動物においては下垂体前葉のキニン含量に性差は認められなかったが、後葉では雌性に多く存在した。去勢による影響を検討したところ、卵巣摘出により、雌性ラットの下垂体後葉のキニン含量は減少したが、前葉では偽手術動物の約3倍に増加した。一方、雄性動物においては両葉ともに睾丸摘除によるキニン含量の変動は認められなかった。

高速液体クロマトグラフィーにて下垂体キニンを分離し、その構成比を検討した。存在することが認められているブラジキニン(BK)、Met-Lys-BK(ML-BK)およびLys-BK(L-BK)は、両性ともに前葉および後葉においてその構成比率が異なり、性差がみられた。さらに去勢動物においては、雄性では前葉のBKの減少とML-BKの増加がみられたが、後葉では変化はなかった。一方、雌性では前および後葉ともにBKの減少とML-BKおよびL-BKの増加がみられた。これらの結果より、下垂体による性機能調節にキニン系の関与している可能性が示唆された。また、下垂体にはキニノゲナーゼのみならずキニン転換酵素活性が認められ、三種のキニンの存在がこれにより支持された。

Key word： Kinin system, Rat pituitary, Bradykinin

〔はじめに〕

中枢神経系におけるキニンの作用については、外因性にBKを実験動物脳内に投与することにより検討されてきた。例えば、行動上の一過性の興奮後の鎮静効果(1)、あるいはそれらの行動上の変化を伴う二峰性の血圧上昇作用(2)、および脳波上の変化(2,3)、さらに鎮痛(4)やバソプレッシン遊離作用(5)が知られている。

最近、我々は内因性のBKについて雄性ラット脳内には均一に分布していないことを報告した(6)。すなわち、組織別キニン含量は、大脳皮質＞延髄＞小脳＞中脳＞下垂体の順で存在していたが、組織重量でみると下垂体≫延髄＞小脳＞大脳皮質＞中脳の順で存在していた。そして組織重量あたり多量のキニンを含有する下垂体の後葉には前葉の約4倍量のキニンが存在していることが判明した。また、下垂体キニンを高速液体クロマトグラフィーにて分析し、BKのみならずL-BKおよびML-BKが存在していることを明らかにした(6)。

そこで、雌雄ラットの下垂体前葉および後葉におけるキニン含量とその種類、ならびにそれらの構成比について、正常および去勢動物を用いて検討した。

〔実験材料および方法〕

雄性あるいは雌性ラットは5－6週令のJcl:SD系を用いた。去勢は常法に従って行い、雄性では睾丸を、雌性では卵巣をエーテル麻酔下に摘出した。術後一週間に異常の認められなかったものを実験に供した。

キニンの抽出と測定

ラット頭部へのマイクロ波照射により致死せしめた後、脳組織を0.1M酢酸でホモジ

ナイズした。このものをn-ブタノールで抽出し、さらに石油エーテルと精製水を加えキニンを水層に移行させた。水層中のキニンをBK-ラジオイムノアッセイにより測定した。このイムノアッセイ系においては、BKを100%とするとML-BKおよびL-BKの交叉反応率は各々86%および57%であったが、他の種々生理活性ペプチドやBKフラグメントとの交叉反応はなかった(6)。

キニン類の分離

抽出されたキニンをμ Bondapack C-18 カラムを装備した高速液体クロマト装置に注入し、18%アセトニトリルを含む 0.04M 蟻酸トリエチルアンモニウム緩衝液 (pH 3.15)でイソクラテイクに溶出させ、分離した。

[結果・考察]

Table 1に示すように、正常ラットでは下垂体前葉のキニン含量において性差は認められなかった。しかし、去勢動物前葉においては雄性では影響がみられなかったのに対し、雌性においては著名なキニンの増加がみられた（Table 2）。雌性ラット後葉では雄性のものより約1.5倍多量のキニンが存在していたが（Table 1）、去勢することによりその差は消失した（Table 2）。

次に、下垂体キニンの種類とその構成比について検討した。正常なものについてはFig. 1に示すように、前葉において雄性と比較して、雌性のBKは1.8倍多く、L-BKは約40%多かった。しかし、後葉においては、雌性のBKは雄性より20%少なかったが、L-BKは1.4倍高濃度存在した。ML-BK量については両葉共に著しい性差は認められなかった。一方、去勢動物においては、Fig.2に示すように、前葉では雄性に比べ雌性のBK量は約2倍高かったが、L-BKは約40%低かった。一方、後葉においては、雌性の方がBK量は約50%低く、L-BKは1.6倍高かった。ML-BK量については、雌性ラット前葉では雄性の約1/2量であったが、後葉では1.6倍になっていた。

Table 1.
Immunoreactive kinin level in the pituitary gland of male and female rats

	Kinin content (pmol BK equiv./g)	
	Male	Female
Anterior lobes	6.12 ± 0.61	5.68 ± 1.09
Posterior lobes	28.18 ± 1.18	41.44 ± 2.75*

The kinin was extracted with n-butanol from acidified homogenate of pituitary lobes pooled from six rats per experiment, and determined by the radioimmunoassay. Results are expressed as the mean ± S.E. of three experiments.
*Significant difference vs. male (P<0.05).

Table 2.
Effect of castration on immunoreactive kinin level in the pituitary gland of male and female rats

	Kinin content (pmol BK equiv./g)	
	Male	Female
Anterior lobes		
Sham operated	5.54 ± 0.30	6.62 ± 0.67
Castrated	4.91 ± 0.42	22.80 ± 4.00*¶
Posterior lobes		
Sham operated	29.25 ± 2.99	40.42 ± 3.49*
Castrated	26.83 ± 2.59	27.45 ± 0.92¶

Animals were irradiated microwave one week after the operation. The kinin was determined as described in Table 1. Results are expressed as the mean ± S.E. of six experiments.
*Significant difference vs. male (P<0.05).
¶Significant difference vs. sham operated (P<0.05).

さらに正常と去勢ラットについて比較してみると、睾丸摘出動物前葉では約35%の減少がBK量においてみられたが、ML-BK量は約50%増加していた。後葉においては著しい変動はみられなかった。一方、卵巣摘出された雌性ラット前葉では正常動物に比べ、BK量は約20%減少していたが、ML-BKおよびL-BKでは約30%の増量がみられた。後葉においては、正常ラット含量に比べBK量は約45%減少していたが、ML-BKおよびL-BKは各々約75%と約20%増加していた。

従来、脳においてはBKを想定したキニン様物質の存在が示唆されていた。しかし、少なくとも下垂体においては、以上の結果からも明確なように、BK以外にML-BKおよびL-BKが存在することが明らかになった。また、これはカリクレインのようなキニノゲ

ナーゼだけでなく、アミノペプチダーゼのようなキニン変換酵素の存在を示唆している。すでにラット下垂体においては、前葉および後葉両葉にキニノゲナーゼ活性が認められており、前葉の酵素活性には性差があると報告されている(7)。今回の結果はこれを支持するものである。さらに我々は、腺性キニノゲナーゼとアミノペプチダーゼの基質として各々、Pro-Phe-Arg-MCA および Leu-MCA を使用した実験から、それらを分解する酵素活性を前葉ならびに後葉において確認している。しかし血漿性キニノゲナーゼの基質になる Z-Phe-Arg-MCA の分解活性は両葉においては見られなかった。

以上の結果は、下垂体には存在する三種のキニンの構成比に性差があり、また各々を生成する酵素が存在していることを示唆している。これら酵素の活性比などと共に分解不活性化酵素であるキニナーゼ活性についても検討中であり、合わせて報告する。

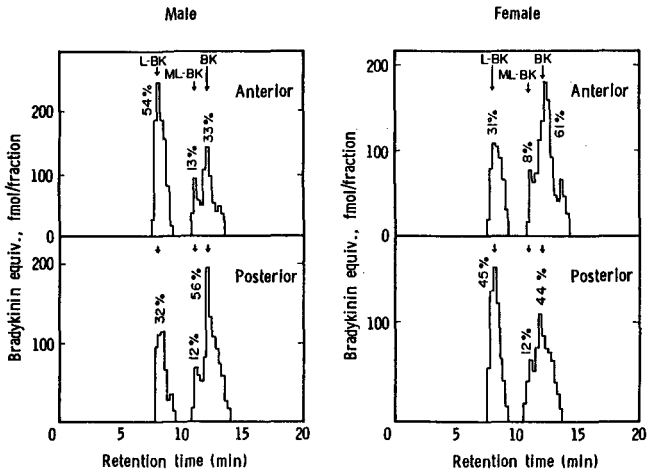


Fig. 1. Elution patterns of kinins in the normal rat pituitary glands using reversed phase HPLC with μ Bondapak C-18.

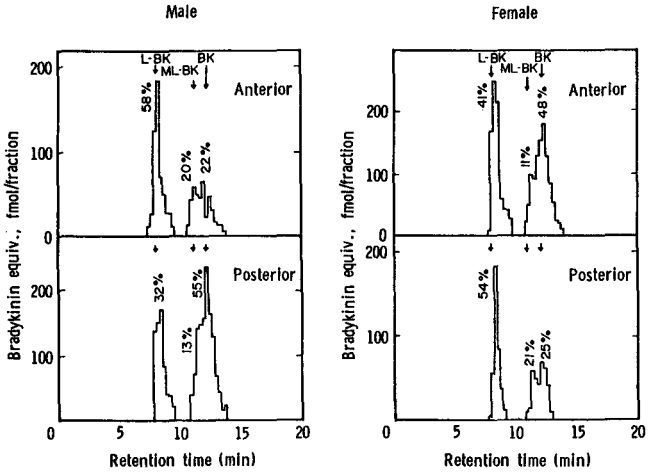


Fig. 2. Elution patterns of kinins in the castrated rat pituitary glands using reversed phase HPLC with μ Bondapak C-18.

[文献]

1.Graeff, F.G. et al. (1969) Br. J. Pharmacol. 37, 723-732

2.Kariya, K. and Yamauchi, A. (1981) Neuropharmacology 20, 1221-1224

3.Pearson, L. et al. (1969) Eur. J. Pharmacol. 8, 153-158

4.Ribeiro, S.A. et al. (1985) Neuropharmacology 10, 725-731

5.Hoffman, W and Schmid, P.G. (1978) Neuropharmacology 17, 999-1002

6.Kariya, K. et al. (1985) J. Neurochem. 44, 1892-1897

7.Powers, C.A. and Nasjletti, A. (1984) Endocrinol. 114, 1841-1844

91. 培養グリオーマ細胞水溶性蛋白の二次元電気泳動法による解析

本田千穂・田渕和雄・入江恵子・福岡高宏
三野章呉・吉岡純二・植田清隆・大本堯史
（香川医大・脳神経外科）

〔要　約〕

脳腫瘍、特にグリオーマの生物学的特性を究明しようとする試みの一つとして、二次元電気泳動法による培養グリオーマ細胞の水溶性蛋白分画の解析を行った。5種のヒトグリオーマ細胞株、3種のラットグリオーマ細胞株を用い、蒸留水中に浮遊させた細胞を、凍結融解を繰返すことによって破壊して、水溶性蛋白分画を抽出し、試料とした。二次元電気泳動はO'Farrellの方法に準じ、一部変法を加えて行い、泳動終了後、銀染色を行って、各蛋白スポットの量的並びに質的差異の解析を行った。この方法により、いずれの細胞株についても少くとも150種以上の蛋白（polypeptides）が分離可能であった。細胞骨格蛋白などは、各細胞株に共通に認められたが、ヒト細胞とラット細胞株間、また、ヒト細胞株相互間、ラット細胞株相互間でも蛋白の質的および量的差異が明らかであった。さらに、confluentとなった状態の細胞を、24時間無血清培地中において増殖を停止させたものと、対数増殖期の細胞とで、水溶性蛋白質地図を比較してみると、無血清培地中の細胞では、分子量35000、等電点5付近のスポットが消失しているなど、数個の蛋白でその減少あるいは増加が観察され、これらの蛋白が細胞の増殖に関与している可能性が考えられた。

Key word：glioma cells, two—dimensional polyacrylamide gel electrophoresis, protein map

［はじめに］

脳腫瘍、特にグリオーマの生物学的特性を究明しようとする試みは、種々の方面からなされているが、脳腫瘍蛋白の解析を行うことは、脳腫瘍特異抗原、腫瘍細胞の代謝、あるいは成長の制御因子などとも関連して極めて重要と思われる。一般に蛋白は、電荷と分子量による分離とを同時に行えば、それぞれ単一の蛋白を検出することが可能である。今回、我々は、こうした二次元電気泳動法を用いて、培養グリオーマ細胞の水溶性蛋白分画の解析を行い、グリオーマの特性を理解するうえで興味ある知見を得たので報告する。

［材料および方法］

5種のヒトグリオーマ細胞株（KY、KC、KH、118MG、ON）、3種のラットグリオーマ細胞株（C6、9L、RT10）を用いた。細胞は、いずれも10％牛胎児血清および抗生物質を含むEagle's minimum essential medium（MEM）を培養液とし、Falconプラスチックシャーレを用いて、37°C、5％炭酸ガス中で継代培養を行っている。これらの細胞は、血清を含まない培養液中では増殖することはできないが、生存は可能である。細胞をプラスチックシャーレで増殖させ、培養液を除いた後、PBSで洗浄し、蒸留水中に機械的に浮遊させた。この細胞浮遊液の凍結融解を繰り返して細胞を破壊し、5000 rpm、15 minの遠沈を行い、上澄を細胞の水溶性蛋白分画とし、蛋白濃度10 μg/μlに濃縮して、試料とした。また、confluentとなった状態の細胞を無血清MEMに交換し、24時間後の細胞からも同様に水溶性蛋白分画を得た。二次元電気泳動はO'Farrell[4, 5]の方法に準じ、一部変法を加えて行った[1]。すなわち、一次元目は、直径2.5 mm、長さ12 cm、2％Ampholine（pH3—10）、9M尿素、2％ NP40を含む4％ polyacrylamide gelを用い、O'Farrell[5]のnon—equilibrium pH

gradient（NEPHGE）法によって行った。試料はSDS（Sodium dodecil sulfate）化したのち9.5 M尿素を加え、2倍量のlysis buffer [4]を加えて、この20 μl（蛋白量53 μg）をloadした。1600 Vhrの泳動を行ったのち、SDS Sample buffer [4]中で15分間のequilibrationを行い、−80℃に保存して、後日2次元目の泳動を行った。二次元目は、14×15×0.1 cm、0.1％のSDSを含む8～15％密度勾配polyacrylamide gelを用いた。泳動終了後、銀染色キット（第一化薬製）を使用して染色を行い、マイクロコンピューターを用いた画像解析装置を使って、各蛋白スポットの量的ならびに質的差異の検討を行った。

［結果ならびに考案］

この方法により、いずれの細胞株においても100～150種以上の蛋白が分離可能であった（Fig.1）。この方法では、試料の処理に高濃度尿素、SDS等を用いているため、蛋白の高次構造は変化した状態で分離されており、こうして得られた泳動パターンは、ポリペプチド地図と呼ぶべきであるとされている[2]。しかし、一般には、O'Farrell法によって得られたパターンも蛋白質地図（protein map）と呼ばれることが多い。

各細胞株から得られた蛋白質地図を比較検討してみると、細胞骨格蛋白などは、各細胞株に共通に認められたが、ヒトグリオーマ細胞とラットグリオーマ細胞では、多数の蛋白スポットに質的および量的差異が認められた。たとえば、ヒトKC細胞とラット9L細胞を比べてみると、KC細胞では、分子量50～80×10^3の酸性蛋白領域に、9L細胞にはみられない蛋白スポットが検出された。逆に9L細胞では、分子量40×10^3以下の低分子量領域に、KC細胞にはみられない多数の蛋白スポットが出現した。また、ヒトグリオーマ細胞株相互間でも、蛋白質地図の差が認められたが、その差は、ヒト細胞とラット細胞間ほど著明ではなく、主として量的な差であった。また、ラットグリオーマ細胞株相互間を比較してみると、各細胞株間で、蛋白の量的のみならず質的差異が明らかで、特に9L細胞と、他の細胞株との違いが著明であった。これは、9L細胞が真のグリオーマではなく、肉腫の性格を合わせ持ったグリオサルコーマ株であるとされていることと関係があるのかもしれない。すなわち、腫瘍の組織型によって、それらの蛋白質地図には大きな差異が現れるものと思われる。今後検討を重ねることにより、腫瘍の組織型を、二次元電気泳動による蛋白質地図の立場から鑑別同定できる可能性が示されたものと考える。

また、9L細胞は、他の細胞株に比べ増殖力が強く、他の細胞株ではほとんど増殖がみられない、牛胎児血清の代りに無血清添加物（Ultroser G）を加えた培養液中でも、10％牛胎児血清加培養液中と同様の増殖が可能である。このことも、9L細胞と他の細胞株との蛋白質地図の相違の一因ではないかと考えられる。

10％牛胎児血清加培養液中で対数増殖中の細胞と、血清を含まない培養液中に24時間おいて増殖を停止させた細胞とで、蛋白質地図を比較してみると（Fig.2）、数個のスポットで明らかに量的変化が認められた。特に注目されるのは、対数増殖期の細胞で、分子量35×10^3、等電点5付近にみられたスポットが、MEM中に24時間おいた細胞ではほとんどみられない点である。このスポットは、分子量、等電点から推定して、DNA合成に深く関与していると考えられているProliferating cell nuclear antigen（PCNA）に相当するものではないかと考えられ、現在、同定を試みている。このように、増殖中の細胞と停止期の細胞とで大きな変化のみられる蛋白は、細胞の増殖に関係した蛋白の可能性があり、今後詳細な検討が必要と思われる。

[文献]

1. Ames, G.F. et al (1976) Biochemistry 15: 616-623
2. 真鍋敬 et al (1983)生物物理化学 27: 7-13
3. Matheus, M.B. et al (1984) Nature 309: 374-376
4. O'Farrell, P.H. et al (1975) J. Biol. Chem. 205: 4007-4021
5. O'Farrell, P.H. et al (1977) Cell 12: 1133-1142
6. Takasaki, Y. et al (1984) J. Exp. Med. 159: 981-992

Fig. 1 Protein (polypeptide) map of C6 Cells (a=actin)

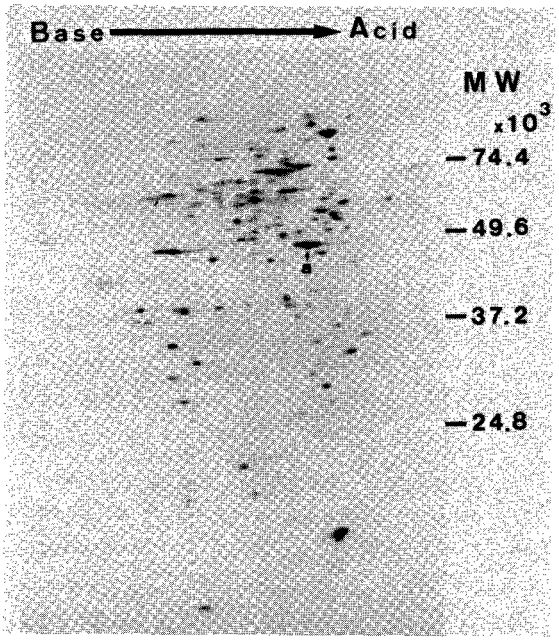
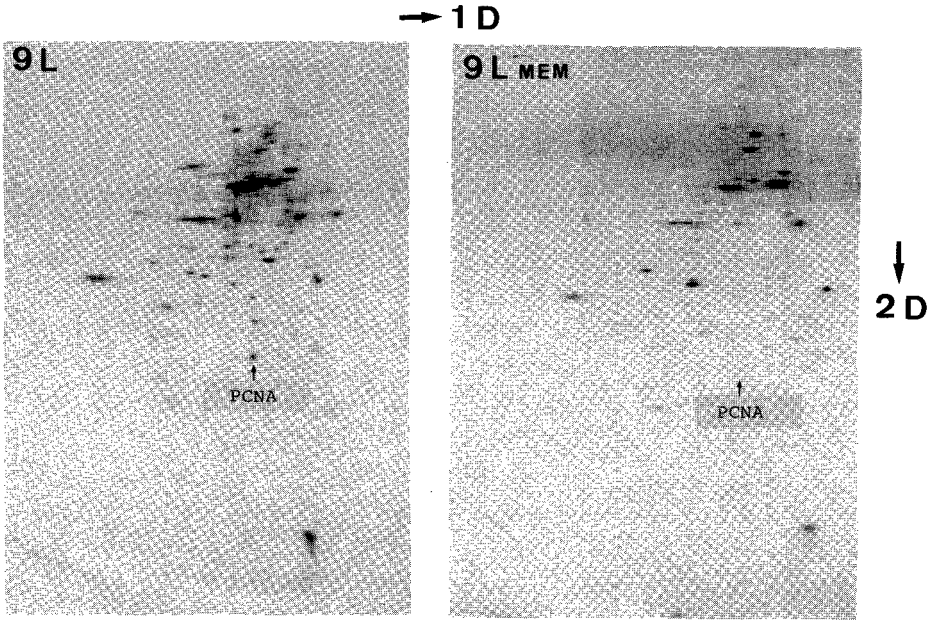


Fig. 2 Protein map of 9L cells before (lt.) and after (rt.) treatment with MEM.



92. ウシ末梢神経 Po 糖蛋白のアミノ酸配列

坂本　安・北村邦男・吉村和法・西島樹重・植村慶一
（埼玉医大・第一生理）

〔要　約〕

ウシP0糖蛋白のトリプシン、Lysyl endopeptidase, Staphylococcal protease各消化ペプチド及びブロムシアン分解ペプチドの分析により、推定 219残基中、未決定部分 2ヶ所を除く 187残基の配列を決定した。

P0蛋白の中央部分には極めて疎水性の高い領域が存在し、この部分が膜を貫通しているものと考えられた。この疎水性領域の N末端部分には、既に報告した糖鎖結合部配列が認められたことから、P0蛋白の N末端部分約 120残基が細胞外表面に露出していると推定された。

N末端部分は酸性アミノ酸が比較的多く、又糖鎖は硫酸化されていることを考慮すると、酸性領域を形成していると思われた。

疎水性領域の C末端部分は極めて親水性且つ塩基性の領域を形成していた。この細胞質側に存在すると考えられる塩基性領域は、ミエリン層において対じする内膜の酸性脂質と結合することによって、ミエリン層の内膜同士の接着（周期　線）に関与するものと推定された。

Key word :　Peripheral nerve myelin, Glycoprotein, Primary structure

P0蛋白（分子量2.8K）は末梢神経ミエリン膜構成蛋白重量の約半分を占める膜内在性糖蛋白であるが、その存在量の多いことからミエリン形成において主要な役割を演じていると考えられている。我々は現在までに、ウシP0蛋白の糖鎖結合部のアミノ酸配列、部分一次構造及び糖鎖構造等の蛋白化学的性質を報告してきた[1-3]。今回、ウシP0蛋白の一次構造に関してほぼ全貌が明らかになったので報告する。

〔実験方法〕

1)P0蛋白の調製：P0蛋白は既報の方法に従い[1]ウシ末梢神経ミエリンよりSDS ゲル濾過法によって精製した。

2)P0蛋白のリジル　エンドペプチダーゼ消化：P0蛋白を0.1M重炭酸アンモニア緩衝液中で37度C 、4 時間消化後、日立3013-0樹脂をもちいたHPLCによってKC-1からKC-11 の消化ペプチドを溶離した。

3)P0蛋白のブロムシアン分解：P0蛋白を70% ぎ酸中で常法によって分解後0.1M重炭酸アンモニア溶液に不溶性の画分と可溶性画分を得た。可溶性画分をBiogel P-10 によって分画しCB-11,CB-111のペプチドを分離した。CB-11,CB-111について重炭酸アンモニア緩衝液又はりん酸緩衝液中でStaphylococcus aureus (V8) プロテアーゼによって消化後ODS カラムをもちいたHPLCによってCB-11-V1からV3、CB-111-V1 からV3の各ペプチドを得た。同様の方法で末梢神経ミエリンの酸不溶性画分からも大量のCB-11,CB-111がえられたので上記の様に処理しアミノ酸配列分析に適用した。

4)アミノ酸配列分析：各ペプチドは手動エドマン法又は液相シークエネーター(JEOL JAS 47K)、気相シークエネーター(APPLIED BIOSYSTEMS model 470A) を用いた。

[結果および考察]

精製P0蛋白は界面活性剤非存在下では極めて不溶性であり、一次構造分析が困難であったが、前回報告したようにトリエチルアミン処理により可溶化することが出来[2]、酵素消化が可能となる。トリエチルアミン処理したP0蛋白をLysyl endopeptidaseで消化し、巨大網状型樹脂(Hitachi 3013-0)による高速液体クロマト(HPLC)で分離すると、およそ11のピークに分離された(図1)。Edman分解結果によると、peak 1及び6画分以外は均一なものであると判定された。peak 1は複数の親水性ペプチドより成り、peak 6は2つのペプチド(KC-6aおよび6b)を含んでいた。後者はODSカラムを用いたHPLCで分離可能であった。それらのアミノ酸組成を表1に示した。peak10と11の組成はほとんど同じであり同一のペプチドと考えられた。このような現象は、前回報告したP0蛋白のトリプシン消化ペプチドにおいても見られているが[2]、理由は不明である。

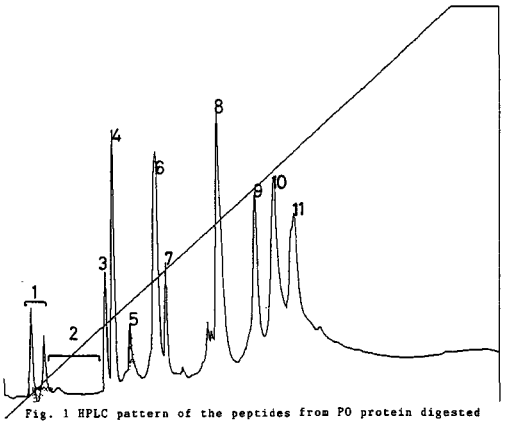


Fig. 1 HPLC pattern of the peptides from P0 protein digested with Lysyl endopeptidase

Column size	:	75 x 7.5 mm I.D.
Flow rate	:	0.5 ml/min
Detection	:	230 nm (range 1.28)
Primary solvent	:	0.1 % TFA in H_2O
Secondary solvent	:	0.1 % TFA in Acetonitrile
Gradient	:	5 % to 100 % Secondary solvent for 90 min
	:	100 % Secondary solvent for 10 min
Column temp.	:	60°C

一方、P0蛋白のブロムシアン分解物を0.1Mの重炭酸アンモニウム抽出すると、そのほとんどは不溶性であったが、可溶性ペプチドはBio-Gel P-10で2つ(CBII とCBIII)に分離可能であった。不溶性のペプチドのN末端部は分解前のN末端部配列と同じであり、CBIIにホモセリン(Hse)が認められ、CBIIIにはHseは認められなかったので(表2)、それらのならびはCBI-CBII-CBIIIであると推定された。CBIIおよびCBIIIは、更にstaphylococcal proteaseで消化後、ODSを用いたHPLCで夫々3つのペプチド(CBII-V1～V3およびCBIII-V1～V3)に分離することが出来た(アミノ酸組成は表2)。

以上のペプチドの分析を主とし、他にP0蛋白のトリプシン消化ペプチド(前回報告[2])およびstaphylococcal protease消化ペプチドの分析結果を参考にして配列分析を行なった。P0蛋白のN末端部配列は気相シークエンサーにて21番目を除き26段まで決定した。同時に(KC-3)-(KC-9)の並びを決定した。P0タンパクのstaphylococcal protease消化物より得たペプチドを用いて63～83までの配列を決定し、(KC-6a)-(KC-4)-(KC-6b)の並びを確定させた。又、P0蛋白のトリプシン消化ペプチドの分析から、80～109の

Table I
Amino acid composition of the peptides from P0 protein digested with Lysyl endopeptidase

Amino acid	KC-2	KC-3	KC-4	KC-6a	KC-6b	KC-9	KC-10	KC-11
Asx	2.0(2)	1.1(1)	1.0(1)	1.1(1)	6.3(6)	3.4(3)	1.5(1)	1.3(1)
Thr	0.3	1.2(1)	0.3	1.2(1)	2.0(2)	2.0(2)	2.1(3)	2.1(3)
Ser	0.5	0	0.5	0	1.3(1)	4.1(5)	2.6(3)	2.7(3)
Glx	0.4	0.2	1.9(2)	1.8(2)	0.5	4.1(4)	4.2(4)	4.3(4)
Gly	1.4(1)	0.2	1.5(1)	2.1(2)	3.9(3)	4.3(4)	5.2(5)	5.0(5)
Ala	0.3	0.1	0.4	0.2	0	3.0(3)	4.5(5)	4.7(5)
Val	1.0(1)	2.0(2)	1.2(1)	1.2(1)	2.7(2)	4.8(5)	6.9(9)	6.5(9)
Met	0	0	0	0	0	0	1.0(1)	1.1(1)
Ile	0.8(1)	0.6(1)	0.9(1)	1.0(1)	2.0(2)	2.4(3)	2.3(2)	2.2(2)
Leu	0.6	0.1	0.5	0.1	1.3(1)	3.3(3)	9.0(11)	9.1(11)
Tyr	0.1	1.1(1)	0	0.8(1)	1.3(1)	2.4(3)	3.5(4)	3.4(4)
Phe	0.1	0	0	1.0(1)	1.2(1)	2.4(3)	2.1(2)	2.2(2)
Lys	1.4(1)	1.2(1)	0.9(1)	1.0(1)	1.2(1)	1.2(1)	------	2.1(2)
His	0.4	0.1	0.9(1)	0.1	1.0(1)	1.6(2)	0.8(1)	0.7(1)
Arg	0.4	0.1	1.6(2)	0.3	0.2	2.4(2)	5.0(5)	5.0(5)
Pro	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Trp	ND	ND	ND	+	ND	ND	ND	ND
Position in sequence	102-109	1-7	68-79	56-67	80-101	8-55	110-170	110-170

配列および(KC-6b)-(KC-2)の並びを決定した。CBIIおよびCBIII に関しては、それらの N末端部分の液相シークエンサー分析により 169～189 の配列と(CBII-V1)-(CBII-V2)-(CBII-V3) の並び、および、 194～212 の配列と(CBIII-V1)-(CBIII-V2)-(CBIII-V3) の並びを決定した。個々のKCペプチドの配列は手動Edman 分析によった。 110～152 の配列は、昨年度報告したトリプシン消化ペプチドのpeak12[2]の気相シークエンサー分析で決定し、一部の配列は希酸分解ペプチドのメチル化物のGC-MASS 分析で確認した。(KC-9)-(KC-6a)の並びと(KC-2)-(KC10,11)の並びは未決定であったが、最近ラットのP0蛋白をコードするcDNAの構造が報告されたので[4]、その結果を基にこれらの並びを推定した。以上の結果とラットのP0蛋白の一次構造を図2 に示した。ウシP0蛋白の推定 219残基中、未決定部分 2ヶ所を除く 187残基の配列が決定されたが、決定された部分には14残基の置き換わりが見られ、その内Pro↔Trp(24),His↔Ser(77),Ala↔Leu(143)以外は全て一塩基置換で説明が可能であった。 P0蛋白の中央部分には極めて疎水性の高い領域が存在し、この部分が膜を貫通しているものと考えられた。この疎水性領域の N末端部分には、既に報告した糖鎖結合部配列[1]が認められたことから、P0蛋白の N末端部分約 120残基が細胞外表面に露出していると推定された。 N末端部分は酸性アミノ酸が比較的多く、又糖鎖は硫酸化されている[3]ことを考慮すると、酸性領域を形成していると思われた。疎水性領域の C末端部分は極めて親水性且つ塩基性の領域を形成していた。中枢神経ミエリンの主構造蛋白と考えられるプロテオリピド蛋白の細胞質側のE1領域も又塩基性であり[5]、これらの細胞質側に存在すると考えられる塩基性領域は、ミエリン層において対じする内膜の酸性脂質と結合することによって、ミエリン層の内膜同士の接着（周期線上）に関与するもの考えられる。

Table II
Amino acid composition of CNBr peptides

Amino acid	CB-II	CB-II-V1	CB-II-V2	CB-II-V-3
Asx	1.2(1)	0.2	1.1(1)	0.2
Thr	1.7(2)	0.1	0.8(1)	0.8(1)
Ser	1.2(1)	0.2	0.4	0.7(1)
Glx	1.8(2)	1.0(1)	0.4	1.2(1)
Gly	2.4(2)	0.3	1.2(1)	1.1(1)
Ala	2.7(3)	0.1	1.1(1)	1.8(2)
Val	1.6(1)	0.1	0.1	1.1(1)
Hse	+(1)	0	0	+(1)
Ile	0.3	0.1	0.1	0.1
Leu	2.0(2)	0.1	1.0	1.0(1)
Tyr	ND(1)	0	0.1	0.9(1)
Phe	0.1	0	0.1	0.1
Lys	4.6(5)	0.1	3.5(4)	1.3(1)
His	0.8(1)	0.1	1.0(1)	0.1
Arg	2.3(2)	0.1	0.2	1.9(2)
Pro	ND	ND	ND	ND
Trp	ND	ND	ND	ND
Yield(%)		34	13	16
Position in sequence		169	170-179	180-193

Amino acid	CB-III	CB-III -V1	CB-III -V2	CB-III -V3
Asx	1.9(2)	1.2(1)	0.4	1.3(1)
Thr	1.5(2)	0.8(1)	1.0(1)	0.1
Ser	2.2(3)	1.8(2)	0.2	0.8(1)
Glx	2.0(2)	1.2(1)	1.2(1)	0.2
Gly	2.0(2)	0.3	2.2(2)	0.3
Ala	2.1(2)	2.0(2)	0.4	0.1
Val	0.9	0.1	0.2	0.2
Hse	0	0	0	0
Ile	0.1	0.1	0.1	0.1
Leu	2.0(2)	1.1(1)	1.3(1)	0.1
Tyr	0.1	0.1	0.1	0
Phe	0.1	0.1	0	0
Lys	7.0(7)	1.0(1)	3.0(3)	3.0(3)
His	1.2(1)	1.0(1)	0.2	0
Arg	1.8(2)	1.1(1)	0.3	1.1(1)
Pro	ND	ND	ND	ND
Tre	ND	ND	ND	ND
Yield(%)		36	44	27
Posotion in sequence		194-205	206-213	214-219

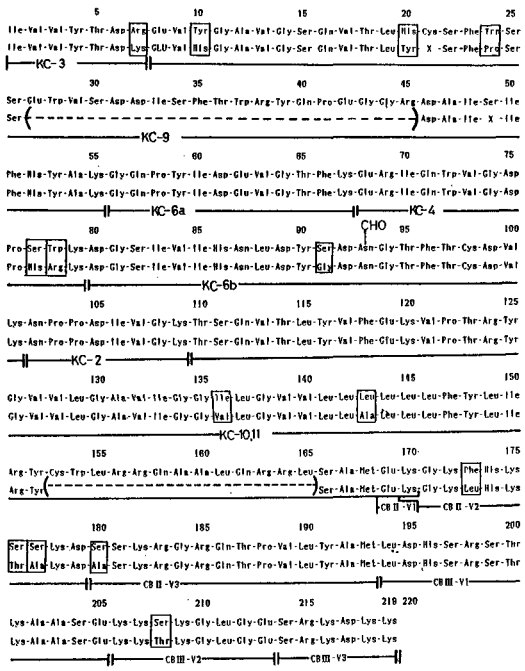


Fig.2 Amino acid sequences of bovine (lower line) and rat[4](upper Line) P0 proteins

〔文献〕

1)kitamura,K. et al. (1979) FEBS Lett. ,100,67

2)坂本安ら(1984)神経化学,23,228

3)北村邦男ら(1982)神経化学,21,282

4)Lemke,G & Axel,R.(1985)Cell,40,501

5)Laursen,R.A. et al.(1983) FEBS Lett. ,161,71

93. 軸索内を輸送される細胞骨格蛋白の相互関係

田代朋子・小宮義璋・黒川正則　(東京大・医・脳研・生化)

〔要　約〕

1．ラット第4腰髄(L_4)神経節にコルヒチン(4μg)を注入し、10分後に L-[^{35}S]メチオニンを注入して、遅い軸索内輸送で坐骨神経知覚繊維内を運ばれる細胞骨格蛋白に対するコルヒチンの作用を調べた。チューブリンには、NF蛋白とともに輸送される遅い成分と、独立なより速い成分の二成分が見られるが、両者ともほぼ完全にコルヒチンにより阻害された。

SDS 電気泳動像で、チューブリン位置に残存し、NF蛋白とともに移動する様に観察される蛋白は、チューブリンとは別個の蛋白NAP. である。

このようにチューブリン輸送が停止した状態でも、NF蛋白やアクチンの輸送は影響を受けないことから、これら細胞骨格構成分の輸送は微小管に依存せず、独立に起こり得ると考えられる。

2．NAP は、NF蛋白、GFA、ヴィメンチンなどの中間径フィラメント蛋白とは別個の細胞骨格成分である。神経系の中でも末梢神経に多く存在する。

Key word：　Axonal transport / Cytoskeletal proteins / Colchicine

イカ巨大神経を材料とした最近の in vitro 再構成実験により、速い軸索内輸送は微小管に沿った膜顆粒の動きとして解明されつつある(1,10,15)。このように、輸送機構の中心的役割を果す軸索内微小管については、高分子量 MAPS の欠如、低温下における安定性など、その特殊性が示唆されている。

我々は、微小管構成蛋白チューブリンがそれ自体、ニューロフィラメント(NF)蛋白やアクチンなど他の細胞骨格蛋白と共に、遅い軸索内輸送（速い輸送の約 1/100の速度）によって細胞体より供給されている(4,8) 点を利用して、遅い軸索内輸送の解析から、軸索固有のサブユニットの存在(11)、輸送速度・サブユニット組成・溶解度の異る二成分の存在(12)など、軸索内微小管の特徴を明らかにしてきた。

今回、更に、コルヒチン存在下における軸索内輸送実験より、NF蛋白との相互関係によって生じると考えられるチューブリン二成分の性質を調べた。

またこのうちの一成分のみに含まれる蛋白NAP についてこれがα、βチューブリン、NF蛋白の何れとも異なり、GFA、ヴィメンチンなど他の中間径フィラメント蛋白とも別個の新たな細胞骨格構成分であることを確認した。

＜方法＞

遅い軸索内輸送の解析：ウィスター系ラット(7週齢、雄）の第4腰髄(L_4)神経節に L-[^{35}S]メチオニン30～40μCi(0.25 μl)を注入し、坐骨神経知覚繊維内を輸送される蛋白を放射標識した(5)。コルヒチン処理群については、メチオニン注入10分前に 4μg (0.2μl)のコルヒチンを神経節に注入した。1-3週後に坐骨神経、L_4神経節、後根を摘

出し、3㎜ の連続切片に切断して、各切片に含まれる標識蛋白をSDS 電気泳動(7) により分離した。二次元電気泳動分析(9) には、切片を凍結破砕した後、2%Nonidet P-40, 9.5M尿素を含む試料液で抽出した。泳動後、フルオログラフィー(2) により、標識蛋白を検出した。

NAP の単離と抗体作成：ウシ脊髄の馬尾部分を凍結破砕後、1%Tritonを含む緩衝液でホモジェナイズした。 4°C、1 時間攪拌後、1,000 ×g,10分の遠心で沈渣を除き、上清を100,000 ×g,1 時間遠心して、Triton不溶性画分を得た。これを1M蔗糖を含む1%Triton緩衝液に懸濁し、100,000×g,1 時間遠心して細胞骨格蛋白を沈渣として回収した。これまでの操作でチューブリンは除去されているので、次に二次元電気泳動によりNAP を単離し、これを抗原としてウサギ抗体を作製した。

抗NF蛋白抗体：ラット坐骨神経より上記の方法で得た細胞骨格蛋白から尿素存在下ハイドロキシアパタイト分画、DE- セルロース・カラムクロマトでNF68K 蛋白を分離し(13)、更にSDS 電気泳動で精製して抗原とし、ウサギ抗体を作製した。

＜結果と考察＞

遅い軸索内輸送に対するコルヒチンの作用：速い軸索内輸送はコルヒチンでほぼ完全に阻止されるが、遅い軸索内輸送に対しては、その効果は部分的で、図１にみられるように NF 蛋白やアクチンの輸送は影響をうけず、チューブリンの輸送のみが選択的に阻害される(6)。 この時チューブリンの一部は、阻害をうけずにNF蛋白とともに輸送されるように観察されることから、無髄・有髄軸索間のコルヒチン感受性の差、或はコルヒチン耐性チューブリンの存在などの原因が考えられてきた(6)。 我々は、チューブリン輸送が二成分から成ることを見出した(12)ので、これら二成分のコルヒチン感受性について検討した。図２に正常状態での二成分、即ち、NF蛋白と同速度の遅い成分(a) と、より速い成分(b) を示した。遅い成分には速い成分にない蛋白NAP が検出される。コルヒチンの存在下では、どちらの成分からもチューブリンはほぼ完全に消失し（図２c,d)、SDS 電気泳動像で遅い成分のチューブリンの位置に残存するラベル（図１ｂ参照）は、総てNAP の寄与によることが判明した。NAP はペプチドマップからチューブリンには属さないことが確かめられている。この様に完全にチューブリン輸送が止った状態でもNF蛋白の輸送は続行されることから、両者の輸送は、独立に起こり得るものである。遅い輸送は、この点でも全面的に微小管に依存する速い軸索内輸送とは異なる機構をもつと考えられる。

末梢神経の細胞骨格成分NAP ：遅い輸送の成分として検出されたNAP は、末梢神経を低温でTriton処理することにより、チューブリンと分別して細胞骨格分画に回収することができる（図３)。 等電点のわずかに異なる分子種が存在するが、何れも同じペプチドマップを与える。ペプチドマップの比較から、３種のNF蛋白とは異なる蛋白であることが示唆されたが、更に抗NAP 抗体と抗NF蛋白抗体を用いたWestern blottingの比較により、これを確認した。抗NAP 抗体は、坐骨神経の細胞骨格分画のうち、単一、或は、ごく近接した doubletバンドを認識する。抗 NF 抗体は、精製 NF68K蛋白を抗原としたものであるが、NF68K の他に、NF160K及びその主要分解産物である 100K バンドを認識する。末梢神経、脊髄、大脳、小脳の細胞骨格分画の比較から、NAP は末梢神経に多いこ

とが示された（図４）。NAP は、神経系に存在する他の中間径フィラメント蛋白である GFA やヴィメンチンとも別個の蛋白であり、その細胞骨格内における位置づけは今後の重要な課題である。

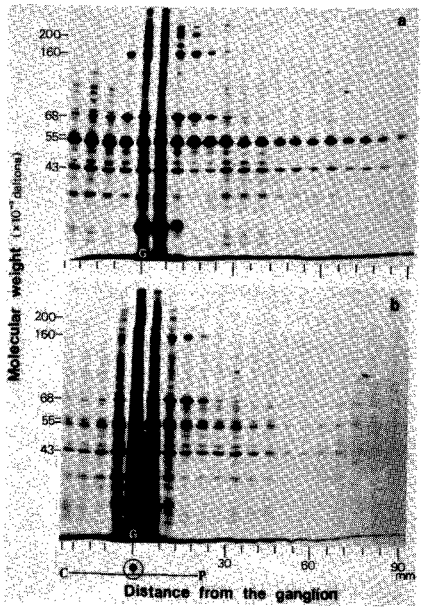


図１：放射標識９日後に坐骨神経内を輸送されている蛋白。
a)対照、b)コルヒチン(4μg)処理。

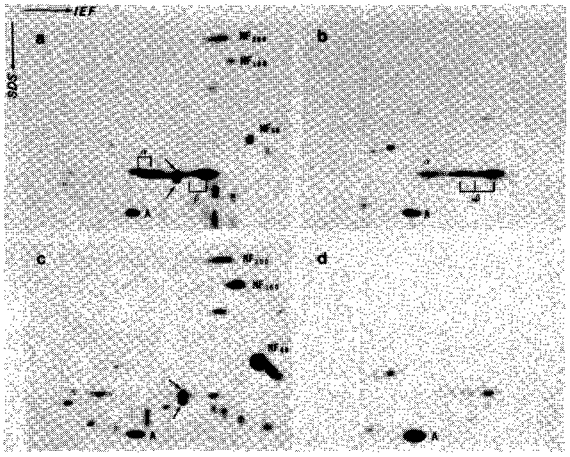


図２：遅い軸索内輸送で運ばれる標識蛋白の二次元電気泳動分析。放射標識２週間後に対照(a,b) 及びコルヒチン(4μg)処理(c,d) 神経のうち神経節からの距離が以下に相当する部分を分析した。 a)12-27mm,b)48-63mm,c)9-27mm,d)42-63mm。三種のNF蛋白(NF_{200},NF_{160},NF_{68})，α，βチューブリン，アクチン(A) を示す。遅い成分特有の蛋白NAP を矢印で示した。

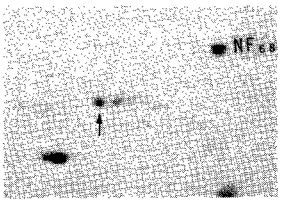


図３：低温Triton処理により得られたウシ馬尾細胞骨格分画の電気泳動。NAP を矢印で示した。

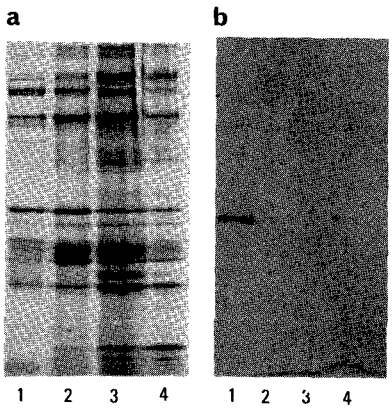


図４：ラット神経系細胞骨格分画中におけるNAP の分布。a)CBB 染色，b)ニトロセルローズ・シートにblotした後(14)，ウサギ抗NAP 抗体及びHRP-標識ヤギ抗ウサギ抗体IgG を反応させ，4-Chloronaphthol を用いて発色させた。
1)坐骨神経，2)脊髄，3)大脳，4)小脳

(1) Allen R.D., Weiss D.G., Hayden J.H., Brown D.T., Fujiwake H. and Simpson M. (1985) J. Cell Biol. 100, 1736 (2) Bonner W.M. and Laskey R.A. (1974) Eur. J. Biochem. 46, 83 (3) Hawkes R., Niday E. and Gordon J. (1982) Anal. Biochem. 119, 142 (4) Hoffman P.N. & Lasek R.J. (1975) J. Cell Biol. 66, 351 (5) Komiya Y. & Kurokawa M. (1978) Brain Res. 139, 354 (6) Komiya Y. & Kurokawa M. (1980) Brain Res. 190, 505 (7) Laemmli U.K. (1970) Nature 227, 680 (8) Mori H., Komiya Y. & Kurokawa M. (1979) J. Cell Biol. 82, 174 (9) O'Farrell P.H. (1975) J. Biol. Chem. 250, 4007 (10) Schnapp B.J., Vale R.D., Sheetz M.P. & Reese T.S. (1985) Cell 40, 455 (11) Tashiro T. and Komiya Y. (1983) Neuroscience 9, 943 (12) Tashiro T., Kurokawa M. & Komiya Y. (1984) J. Neurochem. 43, 1220 (13) Tokutake S., Liem R.K.H. & Shelanski M.L. (1984) Biomed. Res. 5, 235 (14) Towbin H., Staehelin T. & Gordon J. (1979) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 76, 4350 (15) Vale R.D., Schnapp B.J., Reese T.S. & Sheetz M.P. (1985) Cell 40, 559

94. 神経細胞体のニューロフィラメント蛋白質の高分子量成分

山本彰夫・佐武　明・豊島　至*・宮武　正*・藤田　忍**
(新潟大・脳研・神経化学，神経内科*，群馬大・医・薬理**)

〔要　約〕

神経細胞体のニューロフィラメント蛋白質(NFP)の高分子量成分の存在状態について検討し、以下の結果を得た。

1．ウシの脊髄神経節の神経細胞体を凍結乾燥切片から分離して二次元電気泳動を行い銀染色法で蛋白質像を見ると、軸索内のNFPの高分子量成分に一致するスポットは観察されなかった。

2．ウシ脊髄NFPの高分子量成分に対するウサギポリクロナル抗体を得て、神経細胞体の二次元電気泳動後の蛋白質に対し免疫ブロットを行うと、軸索高分子量成分の位置に斜めに連なる塩基性で、より低分子量の2つの成分が見出された。

3．軸索NFPの高分子量成分に特異的な2種のマウスモノクロナル抗体を得て同様の免疫ブロット分析を行うと、1種(3A8)は上記の成分全体を認識し、他の1種(82E10)は酸性側成分のみ認識することが明らかとなった。

4．この2種のモノクロナル抗体で免疫組織化学を行うと、3A8はウシ脊髄神経節と脊髄前角の全ての神経細胞体を染めるが、82E10は脊髄神経節細胞体の過半数を染め、前角細胞体を染めなかった。

Key word：　neurofilament，perikaryon，monoclonal antibody

神経軸索のニューロフィラメントは分子量の異なる3種のペプチドから成ることが知られているが神経細胞体ではどのような構成になっているのか、これまでの多くの免疫組織化学的検討によっても十分明らかになっているとは言えない(3，5，10，11)。諸報告は、ニューロフィラメント蛋白質(NFP)の低分子量成分が神経細胞体に存在することで一致しているが、中間と高分子量成分の存否については一致をみていない。我々はこの点を明らかにするため、神経細胞体を分離し電気泳動像を得て分析することを試み、NFPの中間分子量成分において軸索とは異なる成分が存在することを報告した(14)。今回は高分子量成分について同様の検索を行い、また免疫組織化学的検索との対応を試みたので報告する。

方法：ウシ脊髄神経節と前根・後根を得てドライアイス・n－ヘキサンで急速凍結し、30μm厚の凍結乾燥切片を作製した(7，13)。ミクロナイフで神経細胞体と前根を切り出し、電気泳動に供した。O'Farrellの方法(9)を改変して二次元電気泳動を行い、Oakleyの方法(8)を改変した銀染色を行い蛋白質を検出した(13)。

NFPの精製はLiemの方法(6)とChiuらの方法(2)を改変して行った。ウシ脊髄から精製したNFPを日本産白ウサギに免疫してポリクロナル抗体を得た。

またBALB/cマウスに免疫してモノクロナル抗体を得た(3A8)。82E10は鶏胚を免疫して得たモノクロナル抗体で、藤田ら(4)によって報告されたものである。

免疫ブロットは二次元電気泳動後、ゲル(4×5 cm)中の蛋白質をニトロセルロース膜に転写して行い(12)、アビジン・ビオチン法を用いて抗原を検出した。

免疫組織化学的検索もアビジン・ビオチン法を用いた。迅速凍結あるいは4%パラホルムアルデヒド固定後の神経組織をクライオスタットで薄切し、2種のモノクロナル抗体で染

色した。

結果：ウシ前根の凍結乾燥切片から約2μg蛋白質相当を切り出し、ウシ脊髄の精製NFPと二次元電気泳動像を比較し"triplet"を同定した(図1A矢頭)。両者は同様で76kDa，170kDa，220kDaで、この順で酸性側から塩基性側に並んでいた。抗体の反応性をみると、ウサギポリクロナル抗体は170kDa，220kDa 2つの成分を染め、マウスモノクロナル抗体3A8と82E10は220kDa成分のみを染めた。

ウシ脊髄神経節の凍結乾燥切片から約200個の大型と中型の神経細胞体をとり出して二次元電気泳動を行った(図1B)。76kDa成分は前根と同様であったが、170kDa成分は少なく、150kDaで塩基性の成分が近接して存在し、150kDaと170kDa成分の間を結ぶ成分もみられた(14)。220kDa成分そのものは全く認められなかった。脊髄神経節の神経細胞体のウサギポリクロナル抗体による免疫ブロット分析では、150－170kDa成分が染色されるほかに、220kDa成分に斜めに連なる塩基性の、より低分子量の2つの成分が染め出された(図1C)。これらをband 1，2とすると、band 2はband 1に比しこの抗体に対する抗原性が低いように思われた。以前得た抗170kDaポリクロナル抗体が150kDa－170kDa成分のみを染めることは(14)，band 1，2が軸索高分子量成分に関係が深いことを示すように思われた。このことは、マウスモノクロナル抗体3A8がband 1，2を染めることにより確認された(図1D)。これに対し82E10はband 1の酸性部分とのみ反応し、band 2とは反応しなかった(図1E)。

ウシの脊髄神経節を2種のモノクロナル抗体で染めると、3A8では太い軸索細い軸索、大・中・小型神経細胞のいずれもほぼ均一に染まるのに対し、82E10では軸索の染色性は同様であるが、大型神経細胞体の多くを染めず小型になるほど強い反応性を示す傾向がみ

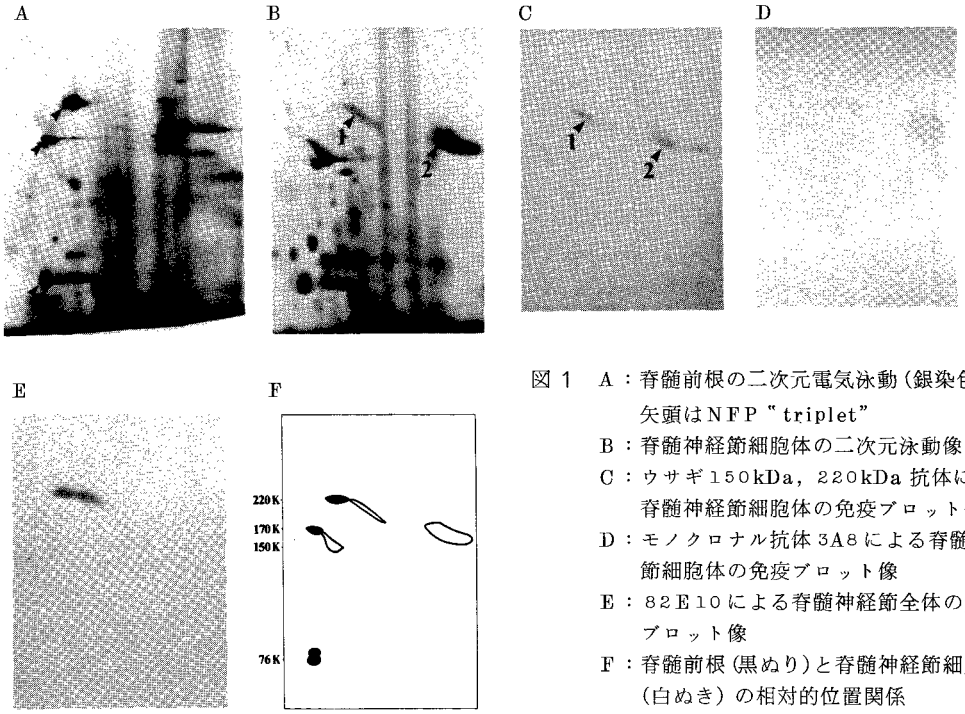


図1　A：脊髄前根の二次元電気泳動(銀染色)。矢頭はNFP"triplet"
B：脊髄神経節細胞体の二次元泳動像
C：ウサギ150kDa，220kDa抗体による脊髄神経節細胞体の免疫ブロット像
D：モノクロナル抗体3A8による脊髄神経節細胞体の免疫ブロット像
E：82E10による脊髄神経節全体の免疫ブロット像
F：脊髄前根(黒ぬり)と脊髄神経節細胞体(白ぬき)の相対的位置関係

られた。ウシ脊髄前角では、3A8では大型の神経細胞体が強く染まり、周辺のneuropilと前索内の前根が染まるのに対し、82E10では細胞体はほとんど染まらなかった。

考察：図1Fに脊髄前根と脊髄神経節細胞体のNFPの相対的位置関係を示す。NFPは軸索流によって神経細胞体から軸索遠位部へと運ばれることから考えると、NFPの中間と高分子量成分は、塩基性低分子量成分から酸性高分子量成分へと順次変化するpost translational modification をうけているものと考えられる。最近Bennetらは、鶏胚脊髄ニューロンで中間分子量成分が塩基性低分子量側から酸性高分子量側に移行する際にリン酸化を伴うことを示しており(1)、今回みた高分子量成分の差異も同様の現象によるものと思われる。この仮定が正しいとすると、ウシ脊髄神経節と前角の細胞体の82E10に対する染色性の差異は、これらの神経細胞体におけるNFPのリン酸化の程度の差を反映していることを示唆しているように思われる。

文献：
1) Bennett, G.S. et al. (1985) J. Cell. Biol. 100, 1799-1804.
2) Chiu, F-C. & Norton, W.T. et al. (1982) J. Neurochem. 39, 1252-1260.
3) Dahl, D. (1983) Exp. Cell. Res. 49, 397-408.
4) Fujita, S. & Obata, K. (1984) Shinkeikagaku 23, 276-278.
5) Hirokawa, N. et al. (1984) J. Cell. Biol. 98, 1523-1536.
6) Liem, R.K.H. (1982) J. Neurochem. 38, 142-150.
7) Lowry, O.H. & Passonneau, J.V. (1972) in A Flexible System of Enzymatic Analysis.
8) Oakley, B.R. et al. (1980) Analyt. Biochem. 105, 361-363.
9) O'Farrell, P.H. (1975) J. Biol. Chem. 250, 4007-4021.
10) Schlaepfer, W.W. et al. (1981) Brain Res. 226, 259-272.
11) Shaw, G. & Weber, K. (1981) Exp. Cell. Res. 136, 119-125.
12) Towbin, H. et al. (1979) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 76, 4350-4354.
13) Toyoshima, I. et al. (1983) Biomedical Res. 4, 459-466.
14) Toyoshima, I. et al. (1984) Biomedical Res. 5, 459-464.

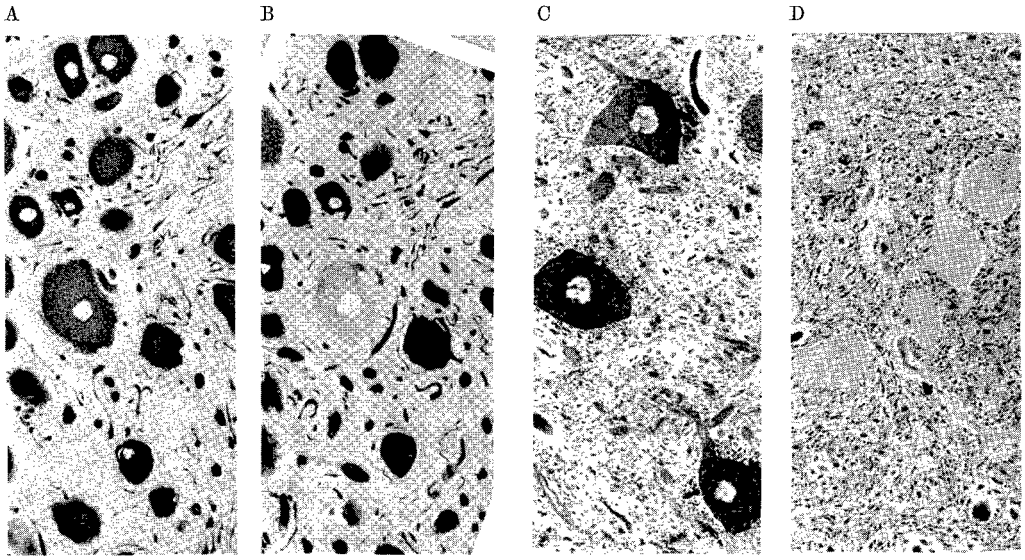


図2　脊髄神経節(A, B)と脊髄前角(C, D)の3A8(A, C)と82E10(B, D)による免疫組織染色。アビジン・ビオチン法。A, Bは同部位の連続切片。

95. 早期ヒト胎芽における γ-enolase の局在

篠原春夫・仙波禮治*・加藤兼房**・柏俣重夫*・田中　修
（島根医大・解剖，愛知県コロニー研・周生期*，生化**）

〔要　約〕

従来γ－エノラーゼは神経細胞のみに存在するとされ，neuron-specific enolase と呼ばれて来た．しかし，神経内分泌細胞や血小板のほかいくつかの細胞にも存在するという報告がなされ，neuron-specific という呼称は疑問視されてきている．我々は早期ヒト胎芽 4例（体長 4-24 mm，Carnegie stage13-21）を用いて，γ－エノラーゼの局在を免疫組織化学的に検討した．その結果，早期ヒト胎芽の外胚葉組織では，神経管の他に表皮細胞が抗γ－エノラーゼ抗血清によって免疫染色され，内胚葉組織では，消化管上皮及び気管上皮が染まったが，肝細胞は染まらなかった．また，中胚葉組織では，脊索，心筋，横紋筋，軟骨，中腎なども染色性を示した．しかし，胎芽の発育につれて，神経組織の染色性が増強するのに対して，これらの組織の多くはその染色性を次第に失う傾向を示した．例えば，表皮細胞では最初全ての細胞が抗γ－エノラーゼ抗体で染まったが，やがて染まらない細胞が現れ，発育に従ってその割合が増加した．一方，中腎では中腎管と中腎細管は染色性を示したが，糸球体は染まらなかった．また原始生殖細胞と思われる大型の細胞も染色性を示した．

Key word：γ-enolase, human embryo, development

解糖系酵素の一つであるエノラーゼは，免疫化学的にことなる 3つのサブユニット（α，β，γ）より成る二量体である(8)．このうちのγ－エノラーゼは，従来神経組織特異蛋白質14-3-2と呼ばれていたものと同一物質であることが報告され(1,2,9)，更に神経組織中では，これに対する抗体によって神経細胞のみが染色され，グリア細胞は染色されないことから，neuron-specific enolase とも呼ばれてきた(12)．このγエノラーゼは神経系の発育に伴って増量し，また未熟な神経細胞がα－エノラーゼを持っているのに対して形態的，機能的に分化した神経細胞がγ－エノラーゼを持つ(11)ことから一種の maturation markerとする考え方もある．しかし一方では，神経細胞以外の神経内分泌細胞(13)や血小板(7)の他，種々の脳腫瘍組織（例えば neuroblastoma, gliomaなど）や APUDoma組織にもγ－エノラーゼの存在が報告されており(10,14)，“neuron－specific”という呼称を疑問視する考え方も出て来ている．今回，我々は早期ヒト胎芽におけるγ－エノラーゼの局在を検討したので報告する．

（材料と方法）

人工妊娠中絶に際して得られた早期ヒト胎芽 4例（体長 4,6,7, 24 mm，Carnegie stage 13,14,15,21）を用いた．手術後直ちにSchmechel 等の固定液(11)にて固定した後，トリス緩衝液で洗浄し，エチルアルコールでの段階的脱水，0.3% H_2O_2 での内因性peroxidase活性の不活化処理の後にパラフィン包理し，厚さ 5μm の連続切片とした．組織切片は 1,000倍稀釈した抗ヒトγ－エノラーゼ抗血清(5)で一夜インキ

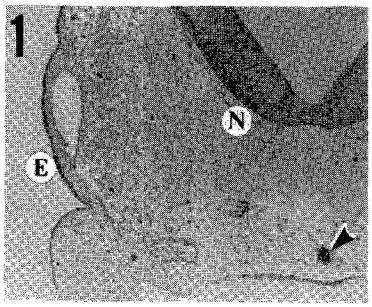
ュベートしたのち，Hsuの ABC法（4）で染色した．対照血清としては，非免疫家兎血清，並びに吸収抗血清を用いた．

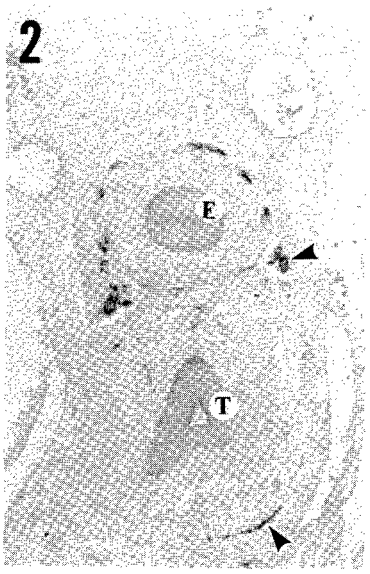
（結果）

抗γ－エノラーゼ抗体による染色の結果，何れかの時期に陽性反応を示したものを（＋）として Tableに示した．体長 4 mmの胎芽標本では，外胚葉系の細胞のうち神経管，表皮（Fig. 1），水晶体板，耳胞の細胞が染色された．この内，神経管については胎芽の成長とともに染色性が高まったのに対し，表皮についてはやがて抗γ－エノラーゼ抗体に染まらない細胞があらわれ，次第にその割合が増加した．水晶体と耳胞は胎芽のstage が進むにつれてその染色性が減少した．内胚葉系の細胞では，消化管上皮細胞及び気管上皮細胞が染まった（Fig. 2）が，成長につれてその染色性が減少していった．肝細胞は染まらなかった．中胚葉系の細胞では，脊索がはじめ強染したが次第にその染色性は減少した．体長24mmの胎芽では脊索周辺の軟骨細胞が染色性を示した．また心筋と骨格筋も弱い染色性を示した．中腎では中腎管及び中腎細管が抗γエノラーゼに対する染色性を示したが糸球体は染まらなかった．また，原始生殖細胞と思われる大型の細胞が染色性を示した（Fig. 3）．

Table Distribution of γ-enolase in early human embryos

Ectoderm	
neural tube	+
cranial ganglion	+
paraganglion	+
surface ectoderm	+
lens vesicle	+
otic vesicle	+
Endoderm	
intestinal epithelium	
foregut	+
midgut	+
hindgut	+
tracheal epithelium	+
liver	-
Mesoderm	
cartilage	+
muscle	
skeletal	+
heart	+
smooth	-
mesonephros	
mesonephric duct	+
mesonephric tubule	+
glomerulus	-
notochord	+





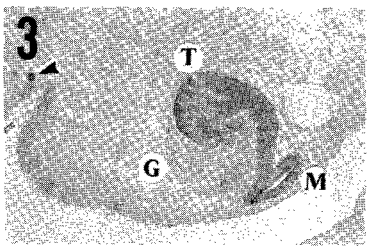


Fig. 1. Cross section of a human embryo (4 mm length, Carnegie stage 13) stained with anti-γ-enolase antibody. Surface ectodermal cells (E) and notochord (arrowhead) as well as neural tube (N) are stained.
Fig. 2. Cross section of a human embryo (7 mm length, Carnegie stage 15) at thoracic level. Esophageal epithelium (E) and tracheal epithelium (T) are stained. Arrowheads indicate para-tracheal and para-esophageal ganglion cells.
Fig. 3. Cross section of the same embryo as shown in Fig. 2. at abdominal level stained with anti-γ-enolase antibody. Mesonephric duct (M) and mesonephric tubule (T) are stained, but not glomerulus (G). Arrowhead indicates a primordial germ cell.

（考察）

これまでγ－エノラーゼは成熟した神経細胞，神経内分泌細胞等に限局すると考えられて来た．一方 Kato らは酵素免疫測定法によって，妊娠 6-8日のラット胎芽にもかなりの量のγ－エノラーゼが存在することを見出した(6) が，この時期にはまだ神経細胞は形成されておらず，どの細胞がγ－エノラーゼを持つかは明らかにされていない．我々は今回の検討で，早期ヒト胎芽では，神経管の他に，脊索，表皮，気管上皮，腸管上皮，筋肉，軟骨，中腎細管，中腎管，原始生殖細胞など数多くの細胞がγエノラーゼを持っていることを示した．この内，神経系の細胞では成長に伴ってγ－エノラーゼの染色性が高まっていくのに対し，他の細胞では一般に次第に低下していった．脊索についていえば，体長 4mm の胎芽では全身のどの組織よりも強い染色性を示したが，次第に低下していった．しかし，脊索の遺残組織が腫瘍化して出来るとされている脊索腫細胞が抗γ－エノラーゼ抗体で強染するという報告がある(14)ことは，この蛋白が腫瘍胎児共通抗原としての性質を持つことを示唆している．このことからすると，成体の組織ではγ－エノラーゼを持たないとされている消化管や皮膚などについてもこれら由来の未分化癌ではこの抗原を持つことが考えられ，γ－エノラーゼの臨床的意義に新しい示唆を与えると思われる．体長 7mmでの原始生殖細胞が抗γ－エノラーゼ抗体で染まったが，Haimoto 等(3) はヒト成人の精細管では，基底膜に近い部位に存在する生殖細胞は抗γ－エノラーゼ抗体で染まるが，それより内腔側の細胞及びセルトリ細胞は染まらないと報告している．このことから，原始生殖細胞はγ－エノラーゼを持っているが，分化に伴ってそれを失うと思われる．

（文献）

(1) Bock, E. et al. (1975) Scand. J. Immunol. 4 (Suppl 2):31-36
(2) Bock, E. et al. (1978) J. Neurochem. 30:181-185
(3) Haimoto, H. et al. (1985) Lab. Invest. 52:257-263
(4) Hsu, S.M. et al. (1981) J. Histochem. Cytochem. 29:577-580
(5) Kato, K. et al. (1983) Clin. Chim. Acta 127:353-363
(6) Kato, K. et al. (1984) Neurochem. Int. 6:51-54
(7) Marangos, P.J. et al. (1980) J. Neurochem. 34:1254-1258
(8) Marangos, P.J. et al. (1978) Brain Res. 150:117-133
(9) Marangos, P.J. et al. (1976) Biochem. Biophys. Res. Commun. 68:1309-1316
(10) Odelstad, L. et al. (1981) Brain Res. 224:69-82
(11) Schmechel, D.E. et al. (1980) Brain Res. 190:195-214
(12) Schmechel, D. et al. (1978) Science 199:313-315
(13) Sheppard, M.N. et al. (1982) Histochemistry 74:505-513
(14) Vinores, S.A. et al. (1984) Arch. Pathol. Lab. Med. 108:536-540

96. ラット大脳切片におけるオルニチン代謝生成物の量的変化と調節

松澤健夫・笠原正男*・小原嘉彦**
（藤田学園保衛大・医・生化，病理*，名城大・農**）

〔要　約〕

Gyrate atrophy発症の分子機構研究の一環として，網膜よりも条件を組立てやすい脳切片を用いてオルニチン代謝を調べた。先づ，ラット大脳におけるオルニチン・ケト酸・アミノ基転移酵素（OAT）と⊿'—P5C還元酵素（P5CR）の活性分布を調べた。また大脳切片を用いてオルニチン添加メディウム中では如何なるアミノ酸が生成するかを定量した。(1)OATは視床下部，海馬，視床，大脳皮質に高い活性を認めた。P5CRは視床下部，小脳に高い活性を認め，その他の部位は中等度の活性を示した。(2)オルニチン添加によって，グルタミン酸，グルタミン，プロリン，GABAの増加が認められた。さらにα－ケトグルタル酸の添加はプロリンの生成を著しく増加させた。アスパラギン酸，グリシン，アラニンは増加せずOAT反応は専らα－ケトグルタル酸をアミノ基受容体とすることが認められた。(3)高K^+メディウム中ではアスパラギン酸，グルタミン，プロリンは減少し，グルタミン酸は増加したが，GABAは変化しなかった。高K^+による総アミノ酸量の変化は生成，放出，取込の総和として起っている。(4)オルニチンをアルギニンに置きかえるとプロリンの生成は著しく抑制された。これはOATのGABAによる阻害が切片レベルで起きるためである。

Key word： Ornithine aminotransferase, Proline, GABA

Gyrate atrophyはOATの遺伝的欠損によって，高オルニチン血症と網膜脈絡膜に進行性の変性萎縮を来す疾患である。私達は発症の分子機構を明らかにするために本酵素の代謝的役割をトレーサー実験によって追究し，オルニチン—プロリン代謝経路の存在を明らかにした(1)。しかし生成物の精密な量的関係や経路の調節についてはさらに立入った検討が必要であった。OATはケト酸としてα－ケトグルタル酸以外にグリオキシル酸・ピルビン酸などもアミノ基受容体にするので、これらケト酸から生成するアミノ酸生成量はどうか，α－ケトグルタル酸量変化の影響，P5CRの段階はNADHとNADPHのいずれと共役しやすいか，オルニチンをアルギニンに置き変えるとどうか，また本代謝経路の制御の概要などについてラット大脳切片を用いて検討を加えた。

〔実験方法の概容〕　ラット大脳の各部位は定法に従って分離し，OAT及びP5CRの活性を測定した(1)。ラット大脳切片はAmesの反応ボート(2)に入れ，Krebs—Ringer液（2㎖反応液：グルコース10mM，α－ケトグルタル酸5mM：高K^+の場合，KCl70mM）中で好気的に37℃，60分振盪反応した。TCAで反応停止後，上清の総アミノ酸量をポストOPA法による新HPLC法(3)で定量した。

〔成績と考察〕　(1)酵素活性及びスライス実験。オルニチン代謝系の酵素活性は大脳皮質，視床下部，海馬に高い活性が認められた（表1）。OATとP5CR活性は必ずしも平行して存在せず，小脳の様にP5CRの方が高い部位が認められた。大脳皮質を除いた視床下部－海馬－線状体のスライスを用いてオルニチンを基質にすると，プロリン，グルタミン酸，グルタミン，GABAの生成が認められた（図1）。さらにα－ケトグルタル酸を加えることにより著しいプロリン生成の増加が見られた（図1,3）。また同時にグルタミン酸とGABAも有意に増加した。その際，アスパラギン酸，グリシン，アラニンは増加せず，OAT反応は専らα－ケトグルタル酸をアミノ基受容体にするこ

Table I Distribution of Enzymes in Rat Brain

Regions of brain	Ornithine aminotransferase	Δ¹-Pyrroline-5-carboxylate reductase
Hypothalamus	1.34 ± 0.10 (n=4)	12.16 ± 2.24 (n=5)
Hypocampus	1.33 ± 0.16 (n=3)	7.63 ± 1.41 (n=6)
Olfactory bulb	1.23 ± 0.07 (n=5)	8.54 ± 1.27 (n=6)
Midbrain; Thalamus	1.17 ± 0.12 (n=4)	8.66 ± 1.13 (n=6)
Striatum	0.95 ± 0.06 (n=3)	6.97 ± 1.14 (n=5)
Pons; Medulla oblon.	0.85 ± 0.04 (n=5)	4.99 ± 1.61 (n=6)
Frontal cortex	1.45 ± 0.29 (n=3)	6.91 ± 0.54 (n=6)
Occipital cortex	1.38 ± 0.08 (n=3)	7.20 ± 0.63 (n=6)
Cerebellum	0.90 ± 0.19 (n=5)	12.57 ± 0.79 (n=6)
Spinal cord	0.60	3.73 ± 0.33 (n=3)
Tractus opticus	0.75	1.93 ± 0.18 (n=2)

Specific activity(mU/mg protein) 1.0 10

とが確認された。70 mMのK^+メディウム中ではプロリン，アスパラギン酸，グルタミンの減少がみられ，グルタミン酸の増加が認められた。しかしＧＡＢＡは不変であった。このK^+効果はスライスでは高垣らによって，放出されたグルタミン酸が再び取込まれることが示された(4)。本実験ではグリアで生成したグルタミンが分解してできたグルタミン酸が放出，取込の過程を経て増加しているものと解釈される。アスパラギン酸とプロリンの減少は高K^+によって影響されたα－ケトグルタル酸の代謝によってもたされたものであろう。プロリン，グルタミン酸生成に及ぼすα－ケトグルタル酸濃度の影響はＧＡＢＡ生成への影響と異なって，α－ケトグルタル酸濃度に強く依存している（図３）。

(2)調節。オルニチンをアルギニンに置き換えた所，プロリン生成は著しく抑制された（図２）。α－ケトグルタル酸をさらに添加してもプロリンは増加しなかったが，グルタミン酸とＧＡＢＡは増加した。われわれはＧＡＢＡがオルニチンと拮抗してＯＡＴを阻害することを見出している（図５）。アルギニンに置き換えた場合，生成した低濃度のオルニチンによってアルギナーゼに生成物阻害がかかり，さらに高濃度に存在するＧＡＢＡによってＯＡＴに阻害がかかるために，プロリンの生成が強く阻害されるものと解釈される。オルニチン：アルギニン：ＧＡＢＡ濃度比は事実，ヒト視床下部で１：５：50であり，マウス大脳で１：４：80である。この仮説（図４）の妥当性を検討中である。

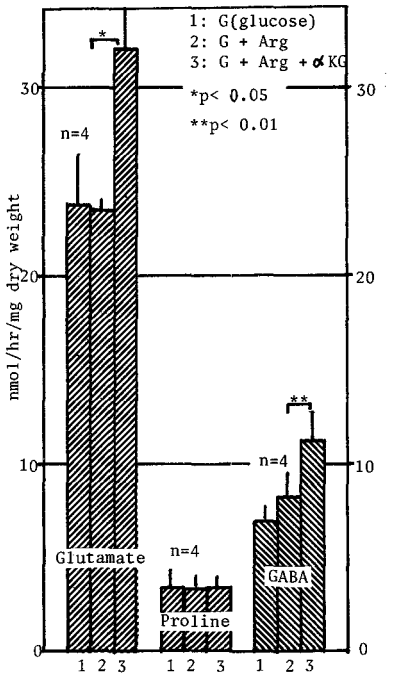


Fig. 2 Amino acids formed from arginine

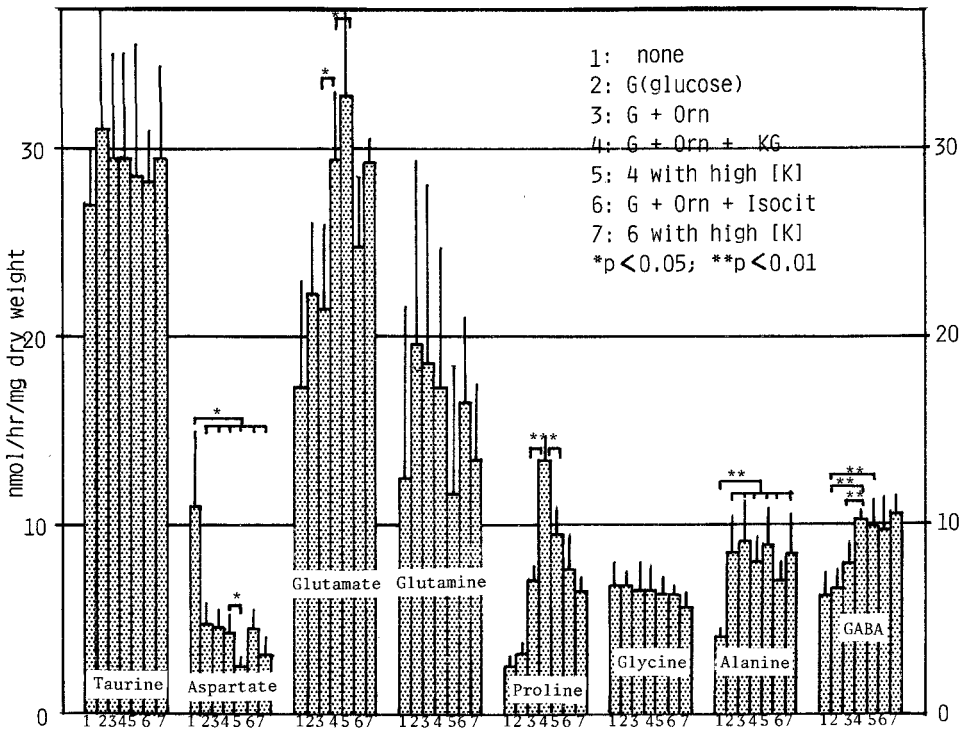


Fig. 1 Amino acids synthesis from ornithine with rat brain slices

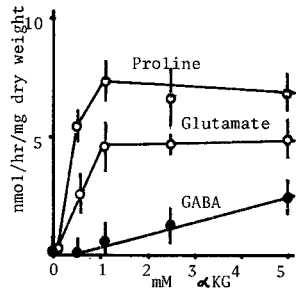


Fig. 3 Effect of αKG concentration

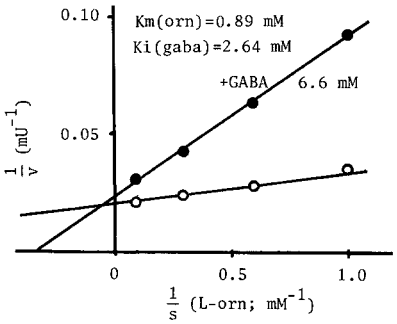


Fig. 5. Inhibition of rat brain OAT by GABA (Lineweaver-Burk plot)

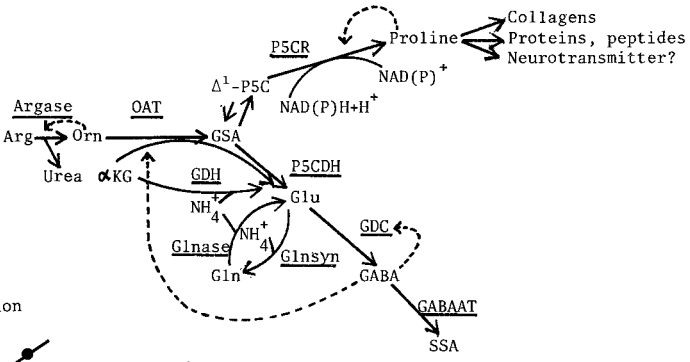


Fig. 4 Brain ornithine metabolism

References

(1) T. Matsuzawa and K. Iwasaki (1983) Bull. Jap. Neurochem. Soc., 26, 429-431.
(2) A. Ames III and F. B. Nesbett (1981) J. Neurochem., 37, 867-877.
(3) M. Fujiwara and Y. Ishida (1983) Shimadzu Rev., 40(4), 217-224.
(4) G. Takagaki and H. Konagaya (1984) Bull. Jap. Neurochem. Soc., 27, 369-371.

97. ラット脳内鉄の分布と神経伝達物質合成酵素活性

石田裕一・野田行文　（中外製薬・新薬研）

〔要　約〕

中枢神経系における鉄の生理的，病理的意義の解明を目的として，ラット脳内鉄分布の組織化学的検討，ならびに鉄欠乏食，鉄過剰食で長期間飼育したラット脳の神経伝達物質合成酵素活性の検討を行った。

（1）脳内鉄分布：特に高濃度の非ヘム鉄は，黒質，淡蒼球，小脳核等に認められた。また，主に染色された細胞はグリア細胞であった。（2）長期鉄欠乏，鉄過剰ラット：2カ月齢より鉄欠乏食，鉄過剰食で14カ月あるいは23カ月飼育した。頭頂皮質の非ヘム鉄含量は，鉄欠乏食群，鉄標準食群，鉄過剰食群の順に高値を示した。また，鉄標準食群と鉄過剰食群では加齢による鉄の蓄積傾向が認められた。ChAT活性は，各食餌群間に顕著な差は認められなかったが，線条体，側坐核の鉄標準食群で加齢に従って低下する傾向が認められた。23カ月飼育群のGAD活性では，鉄過剰食群は鉄標準食群と比較して頭頂皮質で55．1%，海馬で55．3%，黒質で52．2%，線条体で43．5%，側坐核で34．6%と顕著な低下を示し，逆に鉄欠乏群では各部位で軽度上昇傾向を示した。TH活性は，23カ月飼育群で黒質，線条体，側坐核において鉄過剰食群が鉄欠乏食群より有意に低下し，黒質，線条体において鉄過剰食群が鉄標準食群より有意な低下を示した。さらに，これらの部位の鉄標準食群のTH活性は加齢に伴い低下する傾向が認められた。以上の成績から，鉄がGABA neuron，Dopamine neuronの機能に関与する可能性が示唆されるとともに，長期の鉄過剰状態は病理的意義を有することが示唆された。

Key word： brain iron, aging, neurotransmitter-synthetic enzyme

鉄は生体内含量の最も多い金属で，脳内にも多量に存在しているが，中枢神経系における生理的役割は，ほとんど解明されていない。一方，高濃度の鉄は Haber-Weiss 反応などを介して hydroxyl radical を生成し，細胞障害性に作用する。また，加齢に伴ない脳内に鉄が蓄積することや，Alzheimer's disease(5), Huntington's chorea(6), Parkinson's disease(3), Hallervorden-Spatz's disease(8), Multiple sclerosis(2) などで，過剰の脳内鉄の蓄積が認められることが報告されており，病因や疾病の進展との関係が注目されている。 今回，我々は中枢神経系における鉄の生理的，病理的意義の解明を目的として，ラット脳内の鉄の分布を組織化学的に検討すると共に，鉄欠乏食，鉄過剰食で長期間飼育したラット脳の神経伝達物質合成酵素活性を検討した。

［実験方法］

実験にはFischer 系F344雄性ラットを使用した。鉄染色：4カ月齢のラットを麻酔下に，PBSで灌流後，4%formaldehyde-4%glutaraldehydeで脳を灌流固定して，クリオスタットにて40－50μmの脳切片を作製した。脳内非ヘム鉄は，切片を4%hydrochloride-4%potasium ferrocyanide mixture と 20分間反応させ，洗浄後，過酸化水素を含む3,3-diaminobenzidine tetrahydrochloride (20mg／100 ml Tris buffer,pH7.6) 中で10分間反応させて染色した。長期鉄欠乏／過剰ラット：鉄欠乏食は日本クレア製の合成飼料を，鉄標準食は市販飼料（鉄含量360 ppm ）を，鉄過剰食は市販飼料に硫酸第一鉄を加えて調製した飼料（鉄含量 3600 ppm ）を用いた。飲料水には脱イオン蒸留水を与えた。2カ月齢のラットを各飼料で14カ月および23カ月飼育した。また，5カ月齢の鉄標準食飼育ラットを対照として用いた。動物をice-cold saline で灌流後，大脳を摘出し，0．6 mm slice より氷冷下において König & Klippelのアトラスに従って頭頂皮質，海馬，黒質，線条体，側坐核を分取し，測定まで－90° Cに保存した。Choline acetyltransferase （ChAT）活性は Fonnumの方法(4)を，Glutamic acid decarboxylase （GAD）活性は Albers & Brady の方法(1)を，Tyrosine hydroxylase（TH）活性は Waymire

らの方法(9)を用いて測定した。蛋白量定量には，Lowry ら(7)の方法を用いた。統計的解析には，student's t-test あるいは welch's t-test を適用した。

［結果］

（1）脳内鉄分布

ラット脳内の種々の部位で異なる程度に非ヘム鉄が染色されたが，特に高濃度の非ヘム鉄は，黒質，淡蒼球，小脳核をはじめ線条体，上丘，嗅球，嗅結節，赤核，上オリーブ核等に認められた。主に染色された細胞はグリア細胞であった。

（2）長期鉄欠乏，鉄過剰ラット

2カ月齢より鉄欠乏食，鉄過剰食で飼育したラットの頭頂皮質の非ヘム鉄含量は，鉄欠乏食群，鉄標準食群，鉄過剰食群の順に高値を示した（Ｆｉｇ．１）。また，１４カ月飼育群と２３カ月飼育群を比較すると，鉄欠乏食群にはほとんど差は認められないが，鉄標準食群と鉄過剰食群では鉄含量の増加傾向が認められた。ＣｈＡＴ活性は，１４カ月飼育の側坐核で，鉄標準食群が鉄欠乏食群，鉄過剰食群より有意な高値を示したが，頭頂皮質，海馬，線条体では各食餌群間に有意な差は認められなかった。また，線条体，側坐核の鉄標準食群のＣｈＡＴ活性は加齢に従って低下する傾向が認められた（ＦＩＧ．２）。GAD活性は，１４カ月飼育群では各食餌群間に著明な差はみとめられなかったが，２３カ月飼育群では，鉄過剰食群は鉄標準食群と比較して頭頂皮質で５５．１%，海馬で５５．３%，黒質で５２．２%，線条体で４３．５%，側坐核で３４．６%と顕著な低下を示し，逆に鉄欠乏群では各部位で１１６%から１２２%と上昇傾向を示した（ＦＩＧ．３）。ＴＨ活性は，２３カ月飼育群で黒質，線条体，側坐核において鉄過剰食群が鉄欠乏食群より有意に低下し，黒質，線条体において鉄過剰食群が鉄標準食群より有意な低下を示した（ＦＩＧ．４）。さらに，これらの部位の鉄標準食群のＴＨ活性は加齢に伴い低下する傾向が認められた。

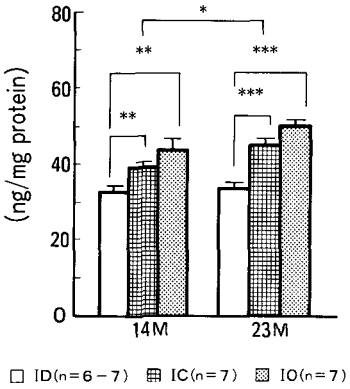


Fig.1 Non-heme iron content in the parietal cortex from 5 month-old(5 mo) rats and the rats fed with iron-deficient(ID),iron-control(IC) or iron-overload (IO) diet for 14 months(14M) or 23 months(23M).

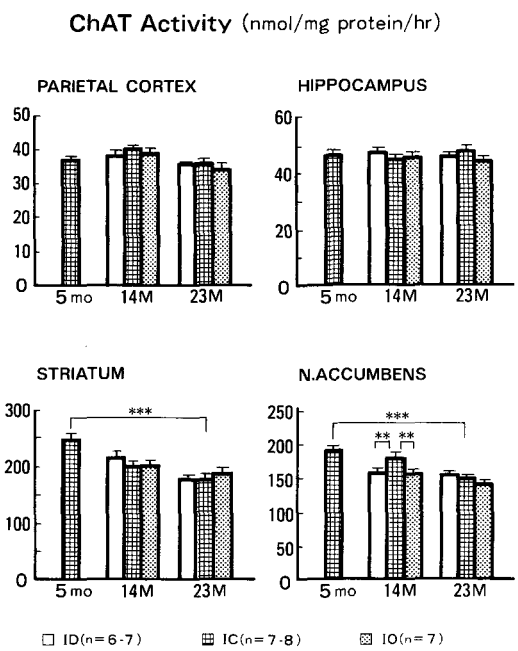


Fig.2 Effects of chronic iron deficiency of iron overload on the activities of choline acetyltransferase.

［考察］

鉄は中枢神経系にも多量に存在しているが，その分布はむしろ特定の構造に局在しており，神経伝達物質の分布との比較からDopamine系，GABA 系との相関を指摘する報告が多いが，どちらの系とも完全な相関は認められず，複数の伝達物質系に関与する可能性も考えられている。我々の成績でも，Dopamine系やGABA系の活性の高い部位に高濃度の鉄が存在していることが確認された。また，鉄は神経細胞よりもグリア細胞に局在しているが，グリア自身の代謝上鉄を必要としているのか，あるいは隣接する神経細胞の機能を支持するために存在しているのか不明である。しかし形態学的には差の見られないグリア細胞も脳内部位によ

り化学的には異なった性質を有しており，しかもある種の神経伝達物質と高い相関性が見られたことは，鉄を介して神経細胞とグリア細胞が特定の神経伝達物質の代謝上密接な相互作用を有している可能性が考えられる。また鉄欠乏食，鉄過剰食で長期間飼育したラット脳の神経伝達物質合成酵素活性を検討し，２３カ月飼育ラットにおいて食餌中鉄含量と GAD活性とが逆相関を示す成績を得た。さらにＴＨ活性にも同様の傾向が認められた。これらの成績は鉄がGABA neuron あるいはDA neuron の機能に何らかの役割を果たしている事を関接的に示唆するものであると考えられる。また，２３カ月間の鉄過剰食飼育ラットに認められたGAD活性の顕著な低下はGABA neuron の機能低下あるいは変性を意味するものと考えられ，そのメカニズムとして鉄を介する過酸化反応による細胞障害性の亢進が一つの可能性として考えられる。神経細胞が直接障害されるのか，あるいはグリア細胞の障害を介して二次的に障害されるのか，今回の成績では明らかではない。以上，鉄がGABA系，Dopamine系に生理的役割を果たしている可能性が示唆されたが，逆に長期の鉄過剰状態あるいは加齢に伴う鉄の蓄積が中枢神経障害をもたらす可能性も示唆された。

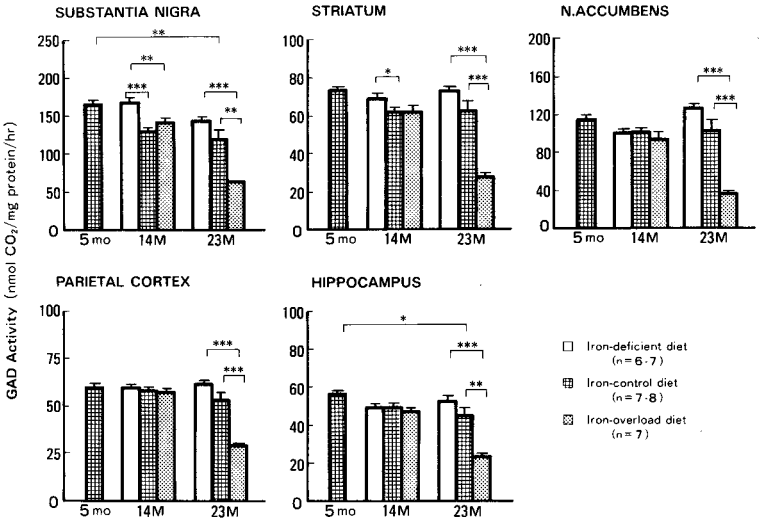


Fig.3 Effects of chronic iron deficiencv of iron overload on the activities of glutamic acid decarboxylase.

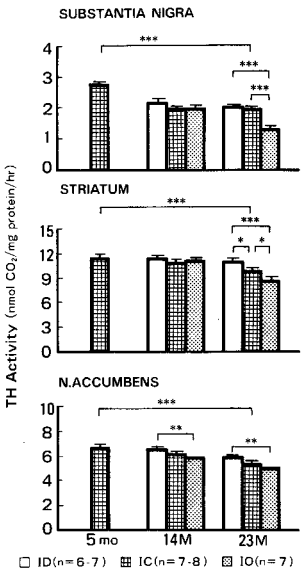


Fig.4 Effects of chronic iron deficiency or iron overload on the activities of tyrosine hydroxylase.

［文献］
(1) Albers,R.W. and Brady,R.O. (1959) J. Biol. Chem. 234, 926-928
(2) Craelius, W. (1982) Arch. Pathol. Lab. Med. 106, 397-399
(3) Earle, K.M. (1968) J. Neuropath. exp. Neurol. 27, 1-14
(4) Fonnum, F. (1975) J. Neurochem. 24, 407-409
(5) Goodman, L. (1953) J. nerv. ment. Dis. 117, 97
(6) Klintworth, L.K. (1973) Advances in Neurology Vol.1, 353-368
(7) Lowry,O.H. et.al. (1951) J. Biol. Chem. 193, 265-275
(8) Spatz, H. (1922) Z.ges. Neurol. Psychiat. 77, 261-399
(9) Waymire, J.C. (1971) Anal. Biochem. 43, 588-600

98. ウサギにおける，ミエリン塩基性蛋白上の脳炎誘発部位の検討

吉良潤一・ R.E. Martenson*・ M.W. Kies*・ E.C. Alvord, Jr.**
（九州大・医・神経内科， Lab. of Cerebral Metab., NIMH, USA*，
Lab. of Neuropath., Univ. of Washington, USA**）

〔要　約〕

純系動物ではないウサギは，遺伝的背景が個々で異なっているため，ミエリン塩基性蛋白（ＭＢＰ）によって誘発される脳脊髄炎（ＥＡＥ）の感受性が一様ではない．従ってこれまでに種々の脳炎誘発部位が報告されている．今回我々はウサギにおける脳炎誘発部位の数と位置を決定するために，ＭＢＰに由来する種々の長さのペプチドを用いて系統的にウサギを免疫し，臨床病理学的に検討した．ペプチド１－４４，４５－８７の抗原性は確認されたが，８８位以降のペプチドではＥＡＥは誘発されなかった．ペプチド１５－４４および１－３１は強いＥＡＥを誘発したが，ペプチド１－１４，１８－３８，１４－２５，１－２１および２２－４４では，臨床的にＥＡＥは誘発されず，病理学的に軽度のＥＡＥの所見がみられたに過ぎなかった．従ってペプチド１－４４に存在する主脳炎誘発部位は１５－３１位にあることが明らかとなった．２１位のメチオニンを酸化またはメチル化してもＥＡＥの誘発性は大きく変化はせず，２１位のメチオニンは抗原性の発現には重要ではないと結論された．

Key word： Experimental allergic encephalomyelitis, Myelin basic protein, Encephalitogenic determinant

〔実験方法〕

１）ペプチドの精製．ＭＢＰおよびウサギペプチド１－１４，１５－４４，４５－８７，１－８８，８９－１６７，１５２－１６８は，Ｍａｒｔｅｎｓｏｎらの方法（５，８）によって精製した．ペプチド１－３１はＬａｗらの方法（４）によって作製したものを，０．１Ｎ　ＨＣｌで平衡したセファデックスＧ－５０で２回ゲル濾過して精製した．ペプチド１－３９，１１９－１６７は，モルモットＭＢＰをＳｔａｐｈｙｌｏｃｏｃｃｕｓ　ａｕｒｅｕｓ　Ｖ８　ｐｒｏ－ｔｅａｓｅで切断し，Ｄｅｉｂｌｅｒらの方法（８）により分離精製した．ペプチド１１６－１６９は，牛ペプチド８９－１６９をＢＮＰＳ－ｓｋａｔｏｌｅで切断して作製した（７）．ペプチド１－４４をＭａｒｔｅｎｓｏｎらの方法（６）によりＢｒＣＮでペプチド１－２１と２２－４４に切断し，ＣＭ２３イオン交換クロマトグラフィーを用いて分離精製した．ペプチド１８－３８は，ウサギペプチド１５－４４にペプシンを作用させて作製し，ＣＭ２３イオン交換クロマトグラフィーで精製した．ペプチド１４－２５，６６－７５は豚ペプチド１－９８よりＫｉｒａらの方法（３）により精製した．２１位のメチオニン残基は．Ｎｅｕｍａｎｎの方法（１０）により酸化し，メチオニンスルフォキシドとした．さらにメチオニンスルフォキシドは，Ｈｏｕ－ｇｈｔｅｎらの方法（２）により約半量をメチオニンに還元した．２１位のメチオニンのメチル化は，Ｒｏｔｈｇｅｂらの方法（１１）によりCH_3Iを用いて行った．

２）動物の感作　Ｎｅｗ　Ｚｅａｌａｎｄ　Ｗｈｉｔｅ　Ｒａｂｂｉｔ（雌，３－５月齢）を，各種ペプチド抗原とＦｒｅｕｎｄ完全アジュバンドで感作した．ウサギは感作後，ＥＡＥが極期に達した時点または，６－９週後に殺し，病理組織学的に脳および脊髄を検索した．

（結果）

ＭＢＰのＮ側の２部位（１－４４，４５－８７）のいずれかを含むペプチドは，全てＥＡＥを誘発した．しかし８８位以降のＣ側のペプチドでは，ＥＡＥは全く誘発されなかった（表１，表２）．さらにペプチド１－４４の脳炎誘発部位を決定するために行った実験（表２）では，ペプチド１－３１および１５－４４は４０ｎｍｏｌで高度のＥＡＥを誘発した．ペプチド１－２１は臨床的にはＥＡＥを起こさなかったが，病理学的には軽度のＥＡＥ所見を示した．ペプチド１－１４，２２－４４，１８－３８，１４－２５はＥＡＥを誘発しなかった．従ってペプチド１－４４の脳炎誘発部位は，Ｎ側が１４－１８位の間で始まり，Ｃ側が２６－３１間で終わることが示された．２１位のメチオニン残基をメチオニンスルフォキシドとしたペプチド１５－４４では，ＥＡＥの誘発能力は軽度低下した．再度メチオニンスルフォキシドをメチオニンに還元した際には元の１５－４４位のペプチドと同程度のＥＡＥ病変を示した．２１位のメチオニン残基のメチル化によっては，病理学的なＥＡＥ所見の重症度は変化しなかった．ペプチド６６－７５では１匹が中等度のＥＡＥ病変を示した．

（考案）

純系動物ではないウサギでは，ＥＡＥに対する感受性が個々のウサギで異なるため，脳炎誘発部位の数と位置を決定することは容易ではない．今回のシリーズでは，少なくとも２つの部位（１５－３１位と６６－７５位）が同程度に強い脳炎誘発部位であることが明らかとなった．他の部位では強い脳炎誘起性は見られなかった．この成績からウサギでは，ＭＢＰ上に複数個の異なった脳炎誘発部位が存在すると考えられる．純系のモルモットやマウスではＳｔｒａｉｎによって特異的な脳炎誘発部位が異なっている．従ってある１つの動物種においても複数個の全く異なる脳炎誘発部位が存在すると考えられるので，Ｍｏｏｒｅら（９）のいうように脳炎誘起性が，ｒｅｖｅｒｓｅ　ｔｕｒｎのような単一の構造に依存しているかどうかは疑問である．２１位のメチオニンを修飾して抗原性を変化させようと試みたが，臨床的な症状の軽減にもかかわらず，病理学的なＥＡＥ病変はほとんど変化しなかった．メチル化や酸化のような小さな修飾では，脳炎誘起性は破壊されないと思われた．

（文献）

1) Deibler, G.E., Nomura, K., and Kies, M.W. (1982) J. Neurochem. 39, 1090-1100.

2) Houghton, R.A., and Li, C.H. (1979) Anal. Biochem. 98, 36-46.

3) Kira, J., Deibler, G.E., Krutzsch, H.C., and Martenson, R.E., (1985) J. Neurochem. 44, 134-142.

4) Law, M.J., Martenson, R.E., and Deibler, G.E., (1984) J. Neurochem. 42, 559-568.

5) Martenson, R.E., Kramer, A.J., and Deibler, G.E. (1975) Biochemistry 14, 1967-1973.

6) Martenson, R.E., Deibler, G.E., Kramer, A.J., and Levine, S. (1975) J. Neurochem. 24, 173-182.

7) Martenson, R.E., Deibler, G.E., and Kramer, A.J. (1977) Biochemistry 16, 216-221.

8) Martenson, R.E., Lüthy, V., and Deibler, G.E. (1981) J. Neurochem. 36, 58-68.

9) Moore, M.J., Chapman, B.E., James, G.E., Khanarian, G., Margeston, S.A., Mack, P., Pasaribu, S.J., and Westall, F.C. (1981) in New approaches to nerve and muscle disorders: Basic and applied contributions (Kidman, A.D., Tomkins, J.K., and Westerman, R.A., eds.), pp.198-207. Excerpta Medica Int. Congr. Series 546, Amsterdam.

10) Neumann, N.P. (1967) Methods Enzymol. 11, 485-487.

11) Rothgeb, T.M., Jones, B.N., Hayes, D.F., and Gurd, R.S. (1977) Biochemistry 16, 5813-5818.

Table 1. Encephalitogenic Activity of BP Fragments in Rabbits

Fragment[a,b]	Amt. Inj. (nmol)	Clinical No. Pos./No. Tested	Histologic No. Pos./No. Tested
G (1-88)	20	2/3	2/3
R (1-14)	120	0/2	0/2
B (1-36) + (1-42)	10	3/6	3/6
G (1-39)	45	0/2	2/2
G (1-38)	45	4/4	3/3
B (43-88)	10	0/4	2/4
	50	0/2	2/2
G (45-88)	40	1/2	2/2
G (89-167)	25	0/3	0/3
B (116-169)	55	0/2	0/2
G (119-167)	40	0/2	0/2
R (152-168)	25	0/2	ND

[a]All fragments were obtained by peptic cleavage except guinea pig peptides 1-39 and 119-167 (V8 protease) and bovine peptide 116-169 (BNPS-skatole).

[b]G, guinea pig; B, bovine; R, rabbit

ND, not determined

Table 2. Encephalitogenic Activity of BP Fragments in Rabbits

		Clinical		Histologic	
Fragment[a]	Amt. Inj. (nmol)	No. Pos./ No. Tested	Avg. Severity[b]	No. Pos./ No. Tested	Avg. Severity[c]
R (1-44)	40	2/4	3.0	3/4	1.5
R (15-44)	40	2/3	3.0	2/3	2.3
R (1-31)	40	3/3	2.7	3/3	2.3
R (1-14)	40	0/2	--	0/2	0
	200	0/2	--	1/2	0.5
R (1-21)	40	0/2	--	2/2	0.5
	200	0/2	--	2/2	1.3
R (22-44)	40	0/4	--	1/4	0.5
	200	0/2	--	0/2	0
R (18-38)	40	0/3	--	1/3	0.5
	200	0/2	--	0/2	0
P (14-25)	200	0/3	--	0/3	0
	500	0/3	--	0/3	0
R (15-44) OX	40	0/5	--	3/5	0.8
R (15-44) OX, RED	40	1/5	3.0	3/5	1.3
R (1-44) Methyl	40	1/7	3.0	5/7	1.4
R (45-87)	40	3/4	2.7	4/4	1.8
P (66-75)	200	1/3	2.0	1/3	1.0

[a] R, rabbit; P, porcine

[b] Clinical grade, positive animals only
1 : Weakness of hind limbs
2 : Moderate weakness of hind limbs with or without incontinence
3 : Paralysis of hind limbs with incontinence

[c] Histologic grade, positive animals only
0 : 0
0.5 : ±, fewer than 5 lesions
1 : ±, 5 or more lesions
1.5 : ± to +
2 : +
2.5 : + to ++
3 : ++

99. PC12 細胞の内因性 Ca^{2+} 依存性タンパクリン酸化

野路久仁子・田中　亮　　（名古屋市大・医・第一生化）

〔要　約〕

PC12細胞のホモジネートについて、内因性Ca^{2+}依存性蛋白リン酸化の主なバンドは95kと50～55kであった。95kのリン酸化の一部分と50～55kのリン酸化は、Ca^{2+}／calmodulin依存性kinaseが関与していると考えられた。95kのリン酸化はCa^{2+}に対するKmが約0.2μM，50～55kのそれは約1.5 μMであった。PC12細胞と同様の95kと50～55kのリン酸化がいくつかのneuroblastomaのcell lineについてもみられ、これは神経性細胞に共通であるように思われた。

一方、伝達物質放出の条件であるhigh K^+による脱分極刺激で、intactなPC12細胞において95kのリン酸化が認められたが、放出能のないneuroblastomaの細胞では認められなかった。この条件下で$^{45}Ca^{2+}$ influxもPC12細胞だけにしか認められなかった。Ca-ionophore添加によってもPC12細胞の95kのリン酸化がみられた。以上のことから、生理的条件下でおこる細胞内Ca^{2+}濃度の上昇が95kタンパクリン酸化のひきがねになると考えられる。従ってこの95kのタンパクリン酸化が、伝達物質放出、あるいはその調節に役割を担っている可能性が考えられる。

Key word： PC12, protein phosphorylation, neuroblastoma cells

脳や分泌性細胞の特異的タンパクリン酸化反応がよく研究されてきて、神経伝達物質の合成、放出にも、タンパクリン酸化が関与しているという考え方が提唱されてきた。特に、副腎髄質細胞を用いた実験結果が最近報告された(1)。我々は神経伝達物質放出能をもつPC12細胞を用いて、その内因性Ca^{2+}依存性リン酸化反応とintact cellにおける脱分極依存性リン酸化反応とを検討した。また、neuroblastomaのcell lineについても検討した。

［方法］

(1)細胞培養：10 %牛胎児血清、DMEMを用い、Costarの培養フラスコにて、37℃,5%CO_2中で行った。(2)細胞ホモジネートのリン酸化反応：フラスコから集めた細胞を50mM HEPES,pH7.0,5mM $MgCl_2$, 1mM DTT でホモジナイズした。リン酸化は、上の反応液にふつうは4 mM EGTAを加え、4 mM $CaCl_2$の有無で、計0.1mℓ,37℃,1分間の条件で行った。50μℓの反応停止液［9% SDS,9% β-mercaptoethanol, 30% glycerol,50 mM Tris-Cl, pH 6.8, 0.01% BPB］を加えて85℃，10分間温置した。(3)intact cellのリン酸化反応：Costar 12-well plateに細胞をsubcultureした。HEPES-saline［130 mM NaCl, 5.4 mM KCl, 0.8 mM $MgCl_2$, 5.5 mM glucose, 50 mM HEPES, pH 7.4］中、50 μCi ^{32}Pi／0.5 mℓを加え37℃，30分間温置し、続いて50 mM KClになるように反応液0.5 mℓを加え1分間反応させた。反応停止液を加えて細胞を回収した。(4) assay：10%または7.5-15% gradientのpolyacrylamide gelを用い、Kingらの方法(3)でSDS-PAGEを行った。gelを染色、乾燥後autoradiographyを行い、クロマトスキャナ CS-900で測定した。(5)^{45}Ca取込み：Kilpatrickらの方法(2)で測定した。12-well plate上で50 mM KClと^{45}Caを含む反応液を加え、室温で3分の^{45}Ca取込みを調べた。

Abbreviations：CaM, calmodulin; DMEM, Dulbecco's modified Eagle's medium; TFP, trifluoperazine

［結果］

PC12細胞の内因性Ca^{2+}依存性リン酸化：PC12細胞のホモジネートはEGTA存在下でも^{32}Pでラベルされるバンドが多数みられた。Ca^{2+}を添加すると、新たなリン酸化バンドが出現、あるいはリン酸化が増加した（Fig.1）。このCa^{2+}依存性リン酸化の主なバンドは95 kと50～55 kの数本であった。Ca^{2+}の効果はcalmodulin阻害剤であるtrifluoperazie (50 uM) の添加によって95 kは約25%、50～55 kは100%阻害され、さらにexogenousのcalmodulin添加によって阻害が回復した。Ca^{2+}／calmodulin依存性kinaseが少くとも部分的には関与していると思われる。他のcell lineのリン酸化をPC12細胞と比較してみると、neuroblastoma細胞には共通して一致した95 kのCa^{2+}依存性リン酸化がみられ、50～55 kのバンドはわずかな違いはあるものの、Ca^{2+}によるリン酸化の増加が共通してみられた（Table 1）。50 k以上のバンドはすべてpronase消化によって消失した。

リン酸化反応のCa^{2+}感受性：95 kバンドのリン酸化のCa^{2+}に対するKmは約 0.2 μM で最もCa^{2+}感受性が高かった。50～55 kのバンドについてのKmは約1.5 μMであった（Fig.2）。

Intactな細胞のリン酸化：PC12細胞に^{32}Piを取込ませて、high K^+の条件にすると、95 kのバンドが脱分極依存性にリン酸化された。またCa-ionophore (A23187) によっても、95 kのリン酸化がみられた（Fig. 3）。これらの条件下で、PC12細胞はcatecholamineを放出する。しかし、放出能のないneuro2aやN1E－115細胞で同じ実験を行っても、95 kその他のバンドに変化は全くみられなかった。上の結果は別に行った$^{45}Ca^{2+}$取込みの実験結果と一致した（Table 2）。即ち、high K^+の条件にした時、PC12細胞だけに$^{45}Ca^{2+}$取込みが検出された。

［考察］

伝達物質放出能のないneuroblastoma細胞では、脱分極条件下でのCa^{2+}influxが認められず、脱分極依存性95 kタンパクリン酸化も認められなかった。しかし、ホモジネートのCa^{2+}依存性95 kタンパクリ

Fig.1

Autoradiograms and densitometric profiles of phosphorylated proteins of PC12 cell homogenate

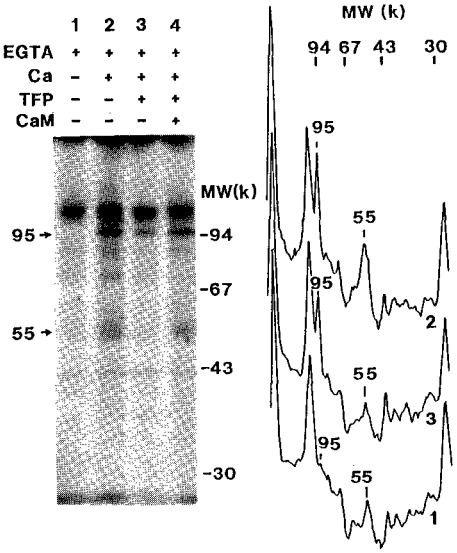
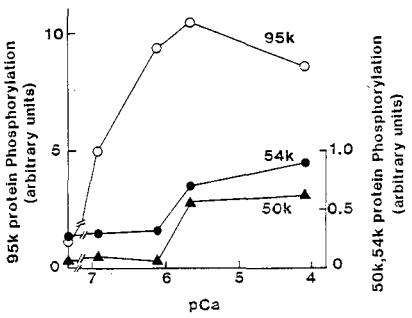


Fig.2

Effects of Ca^{2+} concentration on protein phosphorylation of PC12 cell homogenate



ン酸化はみられた。同じ神経性細胞であるPC12では、脱分極依存性のCa^{2+}influxと95kタンパクリン酸化が認められた。従って、神経性細胞では、生理的条件下でおこる細胞内Ca^{2+}濃度の上昇が95kタンパクリン酸化のひきがねになることは確からしい。このリン酸化反応の関係する過程としては伝達物質放出の調節などが考えられる。よく似た分子量のタンパクリン酸化について、insulinoma細胞におけるinsulinの放出との関連が示唆された[4]。また副腎髄質細胞で、60kと95kのタンパクリン酸化がcatecholamineの放出と平行しておこると報告された[1]。

95kタンパクは未同定であるが、phosphorylase bと共存させた実験の結果、phosphorylase bではないとわかった。別の実験でdBcAMPの効果を調べた結果、cAMP依存性kinaseは95kタンパクのリン酸化に関与していないことがわかった。protein kinaseCを活性化する条件でも95kのリン酸化の増加はみられなかった。結局、このリン酸化には少部分のCa^{2+}/calmodulin依存性kinaseが関与してはいるが、それ以外のCa^{2+}依存性kinaseの関与を考える必要があると思われる。

一方50～55kのタンパクリン酸化は主にCa^{2+}/calmodulin依存性kinaseが関与していると思われる。53k付近のバンドは、β-tubulin共存のリン酸化実験により、移動度と^{32}Pラベルの増加から、β-tubulinの可能性はあるが、まだ確定するには至ってない。

PC12細胞を御供与下さった岐阜薬大の林恭三先生に感謝致します。

「文献」

(1) Amy,C.M.and Kirshner,N. (1981)J.Neurochem. 36, 847 - 854

(2) Kilpatrck,D.L.,Slepetis,R.J.,Corcoran,J.J., and Kirshner,N. (1982) J.Neurochem. 38, 427 - 435

(3) King,J. and Laemmli,U.K. (1971) J.Mol.Biol. 62, 465 - 573

(4) Schbart,U.K.,Erlichman,J. and Fleisher,N. (1980) J.Biol.Chem. 255, 4120 - 4124

Fig.3

Depolarization-dependent protein phosphorylation of PC12 Cells

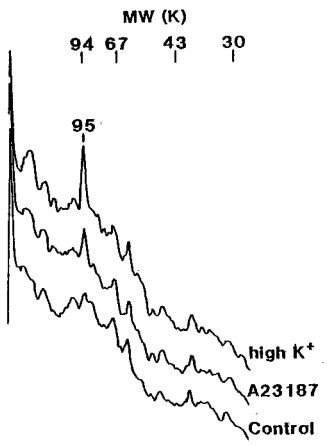


Table 1. Comparison of Ca^{2+}-dependent protein phosphorylation[a)]

Cell line		95k	82k	61k	55(54)k	53(52,50)k
PC12	Ca	8.0	-	1.5	1.8	2.0
	TFP	5.9	-	1.0	0.9	0.9
NG108-15	Ca	10.2	1.4	-	1.5	1.8
	TFP	7.9	1.7	-	0.7	1.2
Neuro2a	Ca	4.6	-	-	-	3.0
	TFP	4.8	-	-	-	ND
NAs-1	Ca	9.4	-	-	-	-
	TFP	3.5	-	-	-	-
C6	Ca	1.8	-	-	1.2	1.7
	TFP	1.5	-	-	0.6	0.7

a) Relative densities to those obtained under the condition of EGTA alone (Fig. 1). Estimated from densitometric profiles of autoradiograms.

Table 2. $^{45}Ca^{2+}$ uptake by PC12 or Neuro2a cells

	Ca^{2+} uptake (n mol/mg)	
	Control	K^+(50 mM)
PC12	1.89 ± 0.35	5.27 ± 0.66
Neuro2a	3.21 ± 0.25	3.09 ± 0.16

100. 免疫組織化学及び酵素免疫測定法によるカルシニューリンのラット脳内分布の検討

後藤　恵・三原洋祐・井上信博・松角康彦・宮本英七*
（熊本大・医・脳神経外科，第一薬理*）

〔要　約〕

Ca^{2+}，カルモデュリン依存性脱リン酸化酵素であるCalcineurin のラット脳内局在を、免疫組織化学にて検索した。我々の用いたＰＡＰ法では、免疫染色はグリア系胞には全く認められず。神経細胞に特異的に存在していた。また、一般的に、その細胞質及び神経突起（樹状突起、軸索）内に染色がみられた。脳内各部位によって免疫染色強度に差異が認められ、尾状核、被殻、海馬、黒質（pars reticulata）及び大脳皮質に強い染色が得られた。淡蒼球、小脳にも中等度の染色を認めた。しかし視床、視床下部、嗅索、側坐核、扁桃核、膝状核、青斑核、縫線核、及び黒質(pars compacta, pars lateralis) のそれは低いものであった。また、部位によっては、黒質(pars reticulata)、淡蒼球の如く、神経細胞体は染まらず、周囲の神経線維のみが染まっている部位もあった。

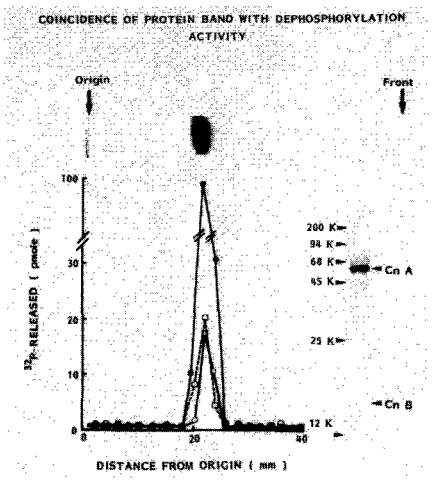
Calcineurin に対する酵素免疫測定法を確立した。その測定感度は～１ng (13fmol)of Calcineurin であった。これを用いて、ラット脳内各部位での定量を行ったが、結果は免疫組織化学の所見と一致しており、尾状核、被殻、海馬に著明に多く存在していた。大脳皮質、黒質、小脳にも比較的多く含まれていたが、その他の部位にもあまねく存在していた。これらの所見は、Calcineurin が、基底核、海馬を始めとする、種々の神経機能に広く関与していることを示唆するものと思われる。

Key word：Calcineurin,　Immunohistochemistry,　Enzyme-immunoassay

〔緒言〕Ca^{2+}、calmodulin依存性脱リン酸化酵素である Calcineurin (CaN)（４）、脳に著明に多く存在しており（５，６）、神経機能において重要な役割を演じていると推察される。その生理的機能を知る上で、脳内分布及び細胞内局在を調べることは重要である。我々は、ラット脳よりこの酵素を精製し、これに対する抗血清を用いて、成熟ラット脳での免疫組織化学的検索を行った。また、Calcineurin に対する酵素免疫測定法を確立し、ラット脳各部位での定量を行ったので併せて報告する。

〔方法〕　CaN は Klee らの方法に準じ、新鮮ラット脳より精製した（１，４）。精製酵素標品はＳＤＳ－ＰＡＧＥにてＡ，Ｂ両サブユニットのみを呈し、Davis 法では単一バンドを示し、酵素活性と一致した(Fig.1)。このCaN 標品を用い家兎に免疫し抗血清を得た。その特異性は、イミュノブロット法及びＥＬＩＳＡにて確認した。免疫組織学的検索には、CaN affinity columnにてさらに精製した抗体を用いた。新鮮、成熟ラット脳をホルマリン固定パラフィン包埋後、4 μm の切片を作製し、3, 3'diaminobenzidine （ＤＡＢ）をchromogenとしたＰＡＰ法により染色し、光顕的に観察した。

Fig. 1



酵素免疫測定（ＥＩＡ）は、ＭＩＮＩＦＯＬＤ（Schleicher＆ Schuell社）を用い、抗原をニトロセルロース膜に吸着させた後（２，３）、抗CaN抗体（IgG 分画）を一次抗体として用い、DABをchromogen としたＡＢＣ法にて染色、その後、Schimadzu ;Dual-Wave length ＴＬＣ-Scanner（ＣＳ－９１０），Chromatopac(Ｃ－Ｒ２Ａ）にて分析を行った。

〔結果及び考察〕　免疫染色は神経細胞に特異的に存在し、星状細胞、乏突起細胞、脳室上衣細胞等のグリア系細胞には認められなかった。しかし、全ての神経細胞に染色が得られるわけではなく、その染色強度も様々であった。神経細胞内では、概して、細胞質及び神経突起内に染色が得られた。脳内各部位における染色強度には著明な差異が認められ、特に、被殻－尾状核（Fig.2A）、大脳皮質、海馬及び黒質（Fig. 3.A.B)に強い染色が得られた。被殻－尾状核（Fig.2F）では、ほとんど全ての神経細胞が強い染色性を呈しており、稀には核に染色を有するものもあった。この部位の、特に、背外側部が強く染まっている印象を受けた。淡蒼球（Fig.2E）は、弱い染色性を呈し、神経細胞体は全く染まっておらず、周囲の神経線維のみに染色が認められた。大脳皮質（Fig.2B）では、Ⅲ．Ⅴ．Ⅵ層に強い染色が得られ、錐体細胞、多形性細胞(Fig.2.C.D)が強く染まっていた。嗅索及び嗅球の染色性は低いものであった。海馬は、強い染色性を呈し（Fig.3.A.B)、とりわけ、Stratum pyramidale (Fig.3.D)， radiatum 、 lacunosum moleculare (Fig.3C) に強く染まっていた。
歯状回にも中等度に染色が得られた（Fig.3C）。扁桃核及び膝状核は弱い染色を示した。視床及び視床下部には、ほとんど染色は得られていない。黒質にも強い染色が得られているが（Fig.3.A.B)、この部位は、網状部であり、ドーパミン作動性ニューロンを含有する緻密部、外側部にはほとんど

Fig. 2

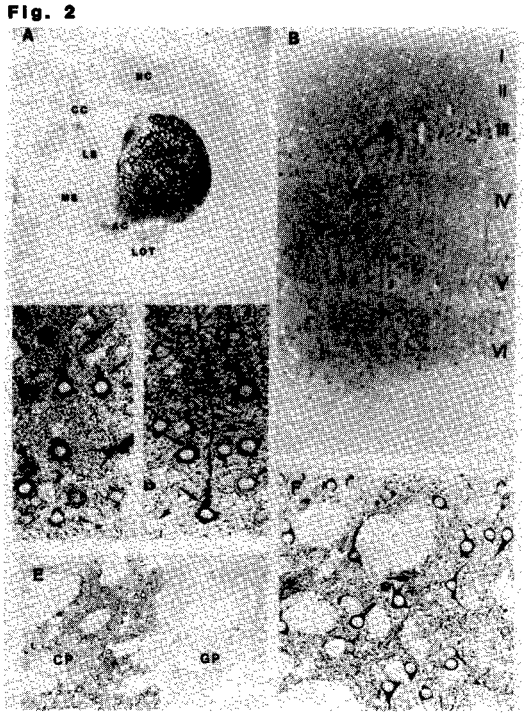
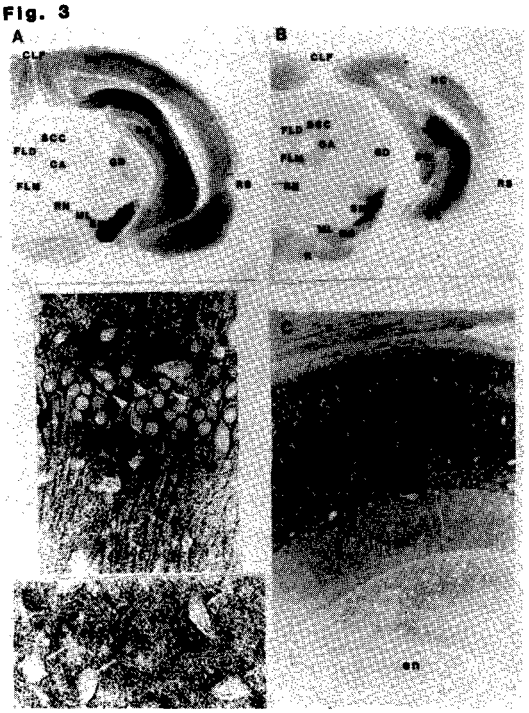
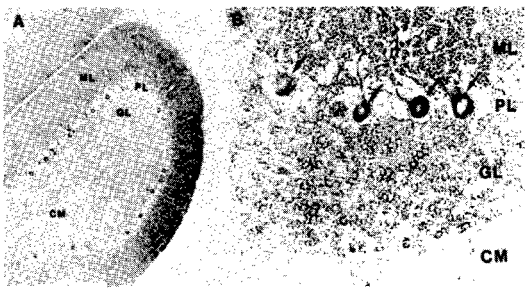


Fig. 3



染色は認められなかった。また、この部も淡蒼球と同様、神経細胞体は全く染まっておらず、周囲の神経線維のみに染色がみられた（Fig.3E）。また、縫線核、青斑核には染色はみられなかった。小脳（Fig.4.A.B）、では分子層、プルキンＩ層、顆粒層の3層とも中等度に染色を呈していた。今回、我々が確立した酵素免疫法（ＥＩＡ）の感度は～1ng(1 3fmol)of calcineurin(Fig.5) であり、ＲＩＡに匹敵するか、それ以上であると思われる。また、radioisotopeを使う必要がなく、安全、簡便、迅速な測定方法である。ラット脳を液体窒素にて凍結した後、スライスを作製し、脳各部位をpunched out 法にて採取、ホモゲナイズの後、100,000g上清を得、それぞれの CaN量をＥＩＡにて測定した(Table. 1)。免疫組織化学に一致した所見であり、尾状核、被殻、海馬に著明に多く存在しており、大脳皮質、黒質及び小脳がこれに続いている。

Fig. 4



[ABBREVIATIONS] NC, neocortex; CC, corpus callosum; CP, caudatoputamen; LS, lateral septum; MS, medial septum; AC, anterior commisure; LOT, lateral olfactory tract; CLF, central longitudinal fissure; SCC, superior collicular commisure; FLD, faciculus longitudinalis dorsalis; FLM, faciculus longitudinalis medialis; CA, cerebral aqueduct; GD, geniculate body; DG, dentate gyrus; HI, hippocampus; RN, red nucleus; RS, rhinal sulcus; EC, entorhinal cortex; ML, medial lemniscus; SN, substantia nigra; CC, crus cerebri; R, raphe; GP, globus pallidus; so, stratum oriens; sp, stratum pyramidale; sr, stratum radiatum; slm, stratum lacunosum moleculare; ec, ectal limb of dentate gylus; en, endal limb of dentate gyrus; ML, molecular layer; PL, Purkinje layer; GL, granular layer

以上、 CaNのラット脳内局在を免疫組織化学及び酵素免疫測定法を用いて示した。神経細胞に特異的に存在し、その脳内分布から観て、基底核及び海馬の機能を始めとする、種々の神経機能に広く関与している可能性が示唆された。

本研究の一部は、第26回日本神経病理学会総会にて報告した。

Fig.5 STANDARD CURVE FOR THE ASSAY OF CALCINEURIN

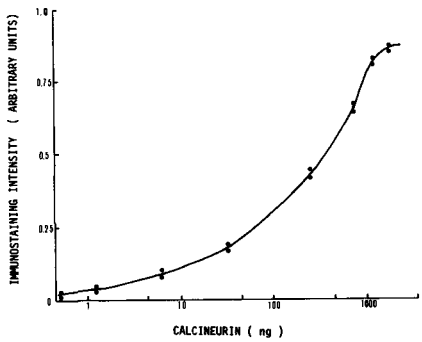


Table 1; Level of Calcineurin in Various Rat Brain Regions as Determined by Enzyme-linked Immunosorbent assay.

Regions	Calcineurin (μg/mg of protein)
Cerebrum	
Grey matter	0.54 ± 0.05
White matter	0.23 ± 0.03
Caudate nucleus	1.73 ± 0.42
Putamen	1.65 ± 0.50
Globus pallidus	0.71 ± 0.05
Hippocampus	1.45 ± 0.39
Thalamus	0.26 ± 0.04
Hypothalamus	0.14 ± 0.04
Substantia nigra	0.50 ± 0.11
Olfactory bulb	0.19 ± 0.05
Cerebellum	0.42 ± 0.11
Pons	0.25 ± 0.04
Medulla oblongata	0.24 ± 0.05
Spinal cord	0.19 ± 0.02

The data represent the mean ± standard deviation on regions from two rats. Each determination was duplicated.

REFERENCES:
1) Goto S. et al. (1985) J. Neurochem. 45, 276-283.
2) Hawkes R. et al. (1982) Anal. Biochem. 119, 142-147.
3) Huet J. et al. (1982) J. Biol. Chem. 257, 2613-2619.
4) Klee C.B. et al. (1983) Method Enzymol. 102, 227-244.
5) Wallace R.W. et al. (1980) Biochemistry 19, 1831-1837.
6)Wood J.G. et al. (1980) J. Cell Biol. 84, 66-76.

101. ラット大脳皮質におけるプロスタグランジン D 合成酵素の免疫組織化学的局在の加齢に伴なう変化

裏出良博・藤本　昇・早石　修・金子武嗣*
小西　昭*・水野　昇*
（新技術開発事業団・早石プロジェクト，京都大・医・第一解剖*）

〔要　約〕

ラットの中枢神経系の主要プロスタグランジンであるプロスタグランジンD_2の合成酵素に対する抗体を用い，生後１週齢から８週齢のラット大脳皮質における本酵素の免疫組織化学的局在の変化を調べた。

生後１週齢では皮質第１層を除くほぼ全層にわたり多数の反応陽性の神経細胞が認められた。２週齢では陽性反応を示す神経細胞の数は減少したが個々の染色性は強くなった。３週齢では中央部および深部の陽性神経細胞はより少なくなり染色性も低下した。しかし，新たに皮質第１層に反応陽性の神経細胞が認められた。４週齢になると中央部および深部の神経細胞の反応性はさらに低下し，逆に小型で円形のグリア細胞に陽性反応が検出されるようになる。生後８週齢の成熟ラットでは表層部の小型の神経細胞と中央部および深部のわずかの錐体細胞を除いてほとんどの神経細胞から陽性反応が消失し，陽性所見の主体はグリア細胞へと移行していた。このグリア細胞は各種指標蛋白の分布との比較および電顕観察の結果オリゴデンドログリアと同定された。

以上の結果はプロスタグランジンD_2がこれらの細胞において中枢神経系の発育の特定の時期に，それぞれ異なった機能に関与することを示唆している。

Key word：Prostaglandin D Synthetase , Immunohistochemistry , Developmental Change

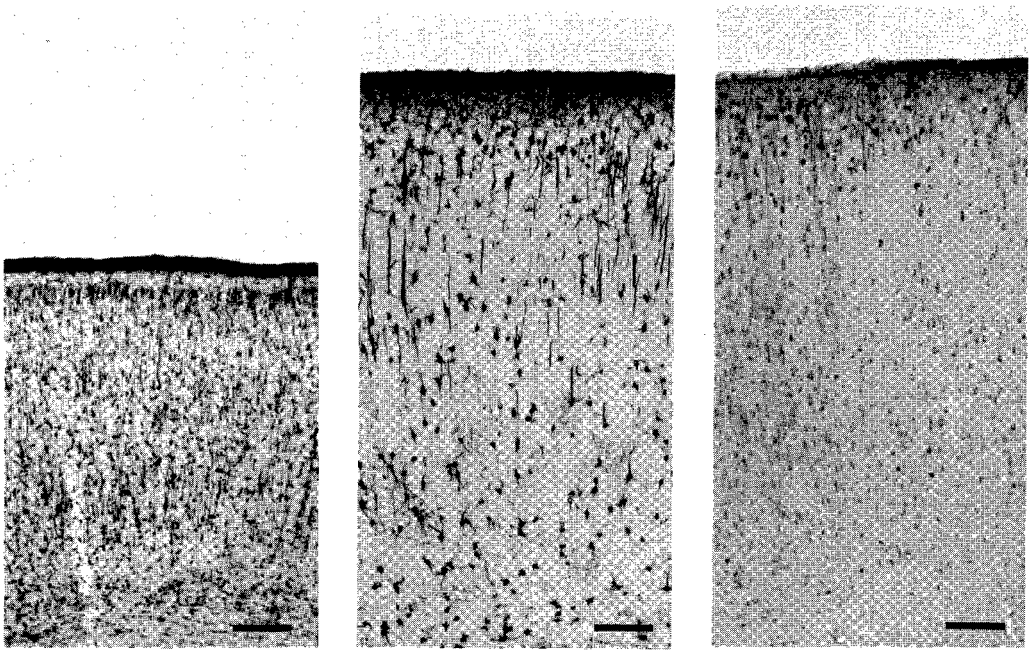
プロスタグランジンＤ合成酵素はラットの中枢神経系に特異的に分布し，ラットおよび人の中枢神経系の主要プロスタグランジンであるプロスタグランジンD_2の生合成反応を触媒する酵素である。我々はラット脳より精製した本酵素を兎に免疫して抗プロスタグランジンＤ合成酵素抗体を調製し(1)，ラット脳における本酵素の免疫組織化学的局在を調べた結果，その局在が幼若動物の神経細胞から成熟動物のグリア細胞へと大きく変化することを見い出した（2，3）。今回は，生後１週齢から８週齢のラット大脳皮質を中心とした所見について報告する。

〔材料および方法〕

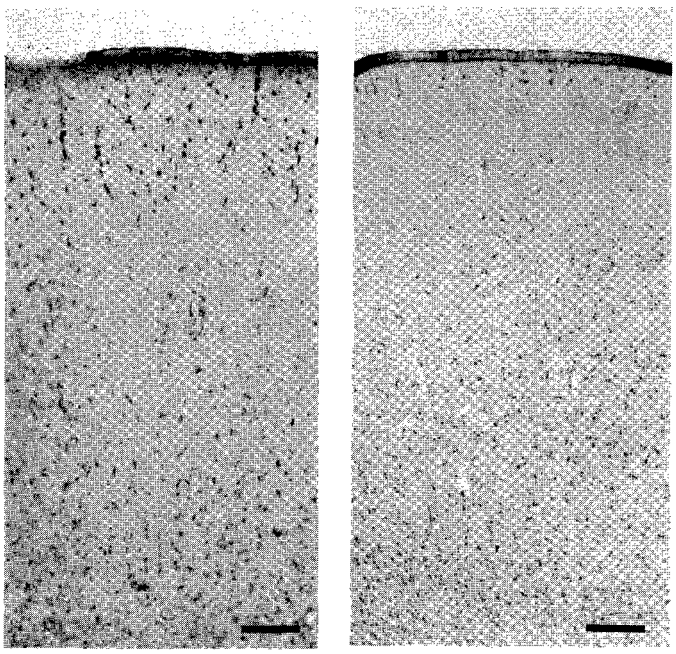
実験には生後１週齢から８週齢のSPFのKBL：Wistar雄ラットを用いた。麻酔下でRinger液による還流放血を行なった後，７５％飽和ピクリン酸を含むZamboni固定液で還流固定し，取り出した脳をpH3.5のBouin固定液で３日間の後固定をした。その後，２０％ショ糖溶液中で凍結保護処理を行ない，４０μmの凍結切片を作製して，Free－floatingの状態で抗プロスタグランジンＤ合成酵素抗体と反応させ，PAP法による酵素抗体染色を行なった。免疫電顕観察の場合，還流固定後の組織を用いて１００μm のビブラトーム切片を作製し同様の染色を行なった。Controlとしては免疫していない兎から回収したIgG画分および，過剰量の精製酵素と反応させ特異抗体を吸収した後の抗体画分を用いた染色を行ない，全ての所見について陽性染色の消失を確認した。

〔結　果〕

生後１週齢から８週齢のラット大脳皮質におけるプロスタグランジンＤ合成酵素の免疫組織化学的局在の変化を図１に示した。生後１週齢では（上段左），第１層を除く



1 週齢　　2 週齢　　3 週齢



4 週齢　　8 週齢

図 1. 生後 1 週齢から 8 週齢のラット大脳皮質前頭頭頂部運動領野におけるプロスタグランジン D 合成酵素の免疫組織化学的局在の変化. Bar : 200 μm.

ほぼ全層の錐体神経細胞に巾広く陽性染色が認められる。2週齢になると（上段中央），陽性神経細胞数は減少するが，星状神経細胞にも陽性反応が見られ，個々の細胞の陽性反応は非常に強くなる。3週齢では（上段右），中央部および深部の陽性神経細胞はより少なくなり染色性も低下する。しかし，表層にはかなりの数の陽性神経細胞が観察され，第1層の神経細胞も陽性を示すようになる。4週齢になると（下段左），中央部および深部の神経細胞の陽性反応はさらに低下し，逆に，小型で円形のグリア細胞に陽性反応が現れる。そして生後8週齢の成熟ラットでは（下段右），神経細胞における染色性の低下はさらに顕著になり，皮質第1層および2層上部の小型の星状神経細胞と中深層の錐体神経細胞の一部に陽性反応が検出されるのみで，その陽性細胞の主体はグリア細胞へと移行する。このような染色性の変化は生化学的に測定したラット終脳における本酵素活性の加齢変化（図2）とよく一致する。成熟ラットの陽性所見の主体をなすグリア細胞は，灰白質に比べ白質に分布密度が高く，各種グリア細胞指標蛋白の分布との比較および電顕観察の結果（図3）からオリゴデンドログリアと同定された。

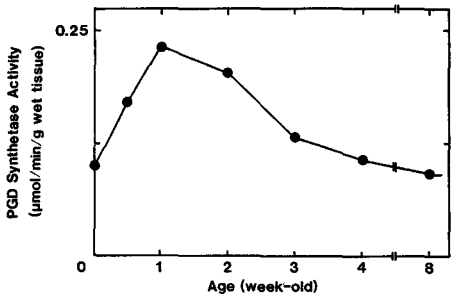


図2．ラット終脳でのプロスタグランジンD合成酵素活性の加齢変化

〔考　察〕

このようにプロスタグランジンD合成酵素は数多くの神経細胞において，幼若期の一時期一過性に高濃度に存在する。従ってプロスタグランジンD_2は中枢神経系の発育あるいは分化に関与している可能性が考えられる。一方，本酵素はオリゴデンドログリア細胞においても成熟動物では高濃度に存在するようになる。その出現時期はこの細胞の他の指標蛋白（ミエリン指標蛋白）に比べ，かなり遅れている。この事実は，この細胞がミエリン形成終了後，さらに新たな機能を果していることを示し，ミエリン形成後獲得する機能にプロスタグランジンD_2が関与している事を示唆している。

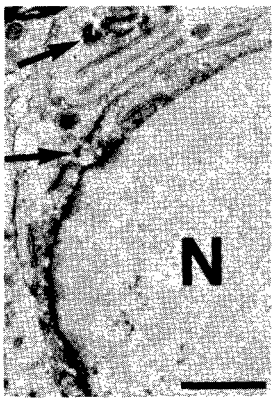


図3．プロスタグランジンD合成酵素に対する免疫反応陽性のオリゴデンドログリアの電顕像
N：核，Bar；1μm
（反応産物は矢印で示したER膜及び核膜に観察される。）

〔文　献〕

1．Urade, Y. et al.（1985）J. Biol. Chem. in press.
2．裏出良博ら（1984）神経化学 23, 216−218.
3．Urade, Y. et al.（1985）Advances in Prostaglandin, Thromboxane, and Leukotriene Research 15, 549−551.

102. 低酸素後の脳内モノアミン代謝回転に及ぼす S-adenosylmethionine (SAMe : FO-1561) の効果

石川敏三・西山芳憲・阿部政則・前川剛志
坂部武史・武下　浩　　(山口大・医・麻酔)

〔要　約〕

低酸素による脳内モノアミン代謝障害に対するS-adenosylmethionine (SAMe) の効果を検討するため、ラットを用い低酸素(Pao_2 ：31～35mmHg, 15分間）後再酸素化60分時のモノアミン代謝回転を測定した．SAMeは再酸素化開始 3分後に100mg/kg（定速静注）で投与した．

1) モノアミン代謝過程：Probenecid投与後の代謝物蓄積は，対照（笑気麻酔のみ）群に比べ，非治療群ではノルアドレナリン系(MHPG が低値）及びドパミン系(DOPAC/DA, HVA/DA 比が低値）の代謝障害が起きた．SAMe治療群ではMHPGおよびDOPAC/DA, HVA/DA比は対照群と差がなく，DOPAC, HVAは対照群より高値となった．セロトニン系は非治療及びSAMe治療群共に対照群と差がなかった．製剤に含まれるmannitolを除いても同じ結果であった．

2) モノアミン合成過程：Pargyline ・HCℓ投与後のカテコラミン蓄積は，対照群に比べ非治療群ではNAとDAが高値であったが，SAMe治療群ではNAは対照群より低値となり，DAは対照群と差がなかった．

以上から，SAMeは低酸素による脳内カテコラミン代謝障害及びそのレベル調節の負のフィードバック機構の異常を修飾する可能性が示唆された．

Key word : Hypoxia, brain monoamine turnover, S-adenosylmethionine

脳は低酸素に対し感受性が高く，軽度の低酸素でも行動障害が起き，脳内モノアミン代謝障害を伴うとされている(2)．S-adenosylmethionine (SAMe) は脳内モノアミン代謝のメチル基転移反応に補酵素として作用し，転移酵素活性を調節する重要な役割を持っている．そこで，低酸素によるモノアミン代謝障害に対し，SAMeがどのような効果を持つかを調べた．

実験方法

Wistar系雄ラット（体重250-400g）44匹を用い，ハロセン－笑気麻酔下，大腿動静脈にビニル細管を留置し，動脈圧(mBP) 測定，採血及び薬物注入に供した．気管切開ののち，d-Tubocurarineで非働化し人工呼吸を行った．頭部を定位装置に固定し，頭皮を切開，剥離した．手術終了後笑気70% 麻酔とし少なくとも60分間観察し，動脈血酸素分圧(Pao_2) を80mmHg以上に，炭酸ガス分圧($Paco_2$) を35-40mmHg に，直腸温は37℃となるよう調節した．その後Control 群（笑気麻酔のみ），低酸素後再酸素化時非治療群(Reoxygenation Non-treated:RNT)，再酸素化時SAMe治療群(Reoxygenation SAMe M,mannitolを含有：RSM およびReoxygenation SAMe M free,mannitolを含有しない：RSMF) とに分けた．低酸素は吸入酸素濃度を6-10% にし（笑気を70% とするため窒素で置換した），Pao_2 を31-35mmHg として15分間低酸素状態とし，その後30% 吸入酸素濃度で再酸素化を行った．SAMeは再酸素化 3分より100mg/kg, 定速静注(0.1mℓ/min) を10分間で投与した．再酸素化60分後に断頭した．断頭前 5分からPontenの方法により脳をin situ で凍結し，断頭後は－40℃で分析操作まで保存した．非治

療及びSAMe治療群について代謝回転測定は以下のように行った．

① モノアミン代謝過程：Control 群(n=9)，RNT群(n=7)，RSM群(n=9) 及びRSMF群(n=5) に分け，Probenecid(200mg/kg,腹腔内) 投与後90分に断頭し，3-methoxy-4-hydroxyphenylglychol(MHPG)，dehydroxyphenylacetic acid(DOPAC)，homovanilic acid(HVA)および5-hydroxyindolacetic acid(5-HIAA) の脳内蓄積を測定した．同時にnoradrenalin(NA)，dopamine(DA)および5-hydroxytryptamine(5-HT) も測定し，DOPAC/DA，HVA/DA及び5-HIAA/5-HT を算出した．

② モノアミン合成過程：Control 群(n=4)，RNT群(n=6) 及びRSM 群(n=4) に分け，Pargyline ・HCℓ（75mg/kg,腹腔内）投与後90分に断頭し，NA及びDAの蓄積を測定した．

すべての群で低酸素前，低酸素15分及び再酸素化60分時にmBP，Pao_2 ，$Paco_2$ ，及び直腸温を測定した．脳標本は－20℃下Glowinski らの方法で分画した．カテコラミン系は大脳皮質(cortex)，視床下部(hypothalamus)及び線状体(striatum)を，また5-HT系はcortex，hypothalamus及び中脳(midbrain)の濃度を測定した．血液ガス及びpHは電極法で測定した．モノアミン及び代謝物は冷温下で坪量し，クエン酸で均質化し冷却遠沈したのち，上澄をそれぞれインドールアミンはフィルター(0.22 μ) を通しODS 5 μカラムで分離精製させ，CAは活性アルミナに吸着させ，また代謝物は酢酸エチルで抽出し，それぞれ電気化学検出器を付属させた高速液体クロマトグラフィーで定量分析した．結果の統計は実験条件については一元配置分散分析法（最小有意較差）を，またモノアミンはMann-Whitney rank sum testを用い，$P<0.05$を有意差とした．

結果

①実験条件

モノアミン代謝過程の各群で，mBP はRNT 群の低酸素時と再酸素化時およびRSM 群の低酸素時で低下した． Pao_2 は各群低酸素時31-35mmHg であり，全ての群でpHが低下した．$Paco_2$ は37-42mmHg 及び直腸温は36.4-37.6 ℃であった．モノアミン合成過程の各群では低酸素時 Pao_2 は31-32mmHg で，RSM 群では$Paco_2$ とpHが低下した．

②モノアミン

1)モノアミン代謝過程：結果を図１(MHPG)及び図２(DOPAC,HVA) に示した．RNT 群ではhypothalamusとstriatumのMHPGが低値となり，またstriatumのDOPAC/DA及びHVA/DA比も低値であった．RSM 群はRNT 群に比べhypothalamusとstriatumのMHPGが高値となりControl 群と差がなかった．HypothalamusのDOPAC 及びHVA またstriatumのHVAはControl 群より高値となった．StriatumのDOPAC/DA，HVA/DA及びcortexのHVA/DAはControl 群と差がなかった．5-HIAA，5-HTおよび5-HIAA/5-HT 比はRNT 群でControl 群と差がなく，RSM およびRSMF群もcontrol 群と差がなかった．RSM とRSMF群はstriatumのDAを除く全ての物質及び部位で両者に差がなかった．

2)モノアミン合成過程：結果を図３に示す．RNT 群ではControl 群に比べ測定全ての部位のNA及びcortexとstriatumのDAが高値となった．RSM 群ではcortexのDAを除きすべてでRNT 群より低値を示し，またNAのすべての測定部位はControl 群より低値であった．

考察

本実験で行なわれた程度の低酸素でもMHPGおよびDOPAC の低下がみられ(3)，CAの代謝異常が示唆されている．一方，低酸素後の脳障害には低酸素中のみならず，再酸素化時にみられる変化も重要な因子であると考えられる．脳エネルギー代謝からみてこの程度の低酸素を再酸素化したときの変化は約60分で回復するとされている．しかし，本研究から明らかなように約60分後でも，CAの代謝障害とCAの蓄積がみられた．すなわち，hypothalamusのNA系およびnigro-striatal DA 系の代謝障害が起こり，負のフィードバック機構の異常がみられた．SAMeは脳内モノアミン代謝のメチル基転移反応（COMT及びN-methyl化）に補酵素として作用して転移酵素活性を調節する重要な役割を持っている．最近外来的に投与したSAMeが脳－血液関門を通過し(5)，COMT及びN-methyl化酵素活性を亢進させCAの代謝障害を修復する可能性が示唆されている(6)．本実験では，SAMe脳内濃度及びCOMTやN-methyl化等の活性測定は行ってないが，SAMeがNA及びDAの代謝回転を亢進させて，再酸素化時の脳内CA代謝障害及び異常合成を修飾させる可能性が判った．脳局所的にhypothalamusのNA,DA 代謝回転が活性化したことは，SAMeの脳内分布がhypothalamus及びhypophysisに集積すること(4) と関連しているかも知れない．Algeriら(1) は正常ラットにSAMeを36時間に 200mg/Kg を投与し，hypothalamusのNA及びforebrain の5-HTの代謝回転亢進を認めている．われわれは5-HTについては再酸素化時に明らかな変化を認めず，したがって，SAMeの影響も明らかでなかった．SAMe製剤に含まれるmannitol(38%含有）は脳保護作用が示唆されており，本研究ではその因子を除外するためmannitolを含まないSAMe(RSMF 群）についても調べたが，同様な効果を示した．

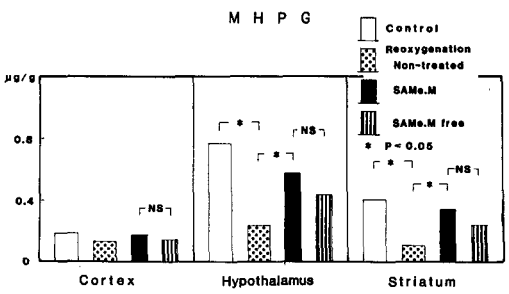


図1

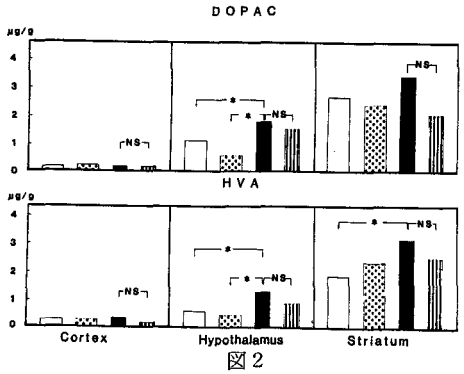


図2

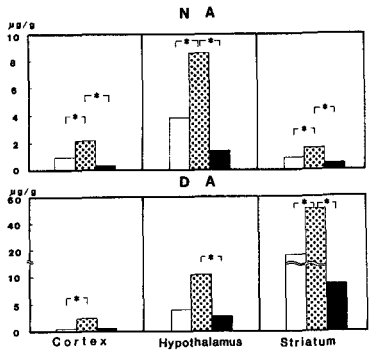


図3

文　献

1. Algeri,S.,Catto,E.,Curcio,M.,Ponzio,F. and Stramentinoli,G.(1979) Biochemical and Pharmacological Roles of Adenosyl-methionine and the Central Nervous System. Edited by Zappia,V.,Usdim,E.and Salvatore,F. P81-87, Pergamon Press.
2. Brown,R.N.,Snider,S.R.and Carlsson,A. (1974) J Neural Transmission 35:293-305
3. Ishikawa,T.,Nishiyama,Y.,Sakabe,T., Takeshita,H. (Unpublished)
4. Stramentinoli,G.(1977) Arzneim.Forsch/ Drug Res. 27(11)9,1680
5. Stramentinoli,G.(1977) Commun.Psychopharmacol. 1:89-97
6. Wong,D.L. and Ciaranello R.D.(1984) Clinical Neuropharmacology 7(Suppl 1):96-97

103. ハロペリドールによるラット線条体スライスからのドパミン遊離に対するコリン系の関与

山田茂人・小島秀樹・横尾秀康・堤　哲之
高向和宜*・西　彰五郎・安楽茂己・稲永和豊*
(久留米大・医・脳研, 精神*)

〔要　約〕

ラット線条体における haloperidol (HPD) による dopamine (DA) 代謝回転の亢進に対する choline 系の関与を調べるため灌流装置を用いて実験をおこなった。HPD を含む Krebs 液でラット線条体を灌流すると、5×10^{-6} M HPDから内因性 DA 遊離の増加が dose dependent に認められた。10^{-5} M HPDによるDA遊離作用は 10^{-6} M TTXの存在下で有意に抑制された。このDA遊離抑制作用は 10^{-6} M atropine (AT)、10^{-7} M AT+2×10^{-5} M d-tubocurarine (d-TC) の存在下でも有意に抑制された。又、ラット線条体には高濃度の DA、acetylcholine (Ach) が含まれていた。以上の結果から、HPDによってひきおこされるDA代謝回転の亢進は線条体内 choline 系の関与が示唆された。ただし、TTX、AT、AT＋d－TCによってもHPDによる遊離増加は約60％抑制されるに止まる。この事実からHPDによるDA遊離増加は choline系以外の機構も関与している可能性は否定できない。

Key word： dopamine release, haloperidol, atropine

＜緒言＞

抗精神病薬の投与により、線条体 dopamine (DA) 神経終末におけるDA代謝回転の亢進が起こる事はよく知られている。これは抗精神病薬によりDA受容体が遮断されその結果、negative feed back 機構の脱抑制あるいは presynaptic DA autoreceptorの遮断によると想定されているが詳細は不明である。我々は抗精神病薬によるDA代謝回転の亢進の機序を明らかにする目的で、灌流装置を用いてラット線条体スライスからの内因性DA遊離に対する haloperidol (HPD) の影響を調べ、更に choline 系の関与を検討するため以下の実験をおこない興味ある結果を得たので報告する。

＜方法＞

1．実験装置：Wistar 系雄性ラット (180－250 g) を断頭後、直ちに脳を取り出し 0.4 mm の前額断スライスを作成、3 mm の円盤上の線条体切片をテフロンシリンジに封入し実験に供した。この灌流槽を 0.3 ml/min の流速で 95％ O_2 5％ CO_2 飽和したKrebs 液で灌流し、流出してくる灌流液をスピッツに 20 分度に分取した。各フラクション中のDAはKissingerらの方法(3)を一部変更した方法(7)で alumina 吸着法により抽出した。得られた試料は高速液体クロマトグラフ (Yanako K-2000, Yanagimoto) に注入し、電気化学検出器 (VMD-101, Yanagimoto) で測定した。カラムは C_{18} 逆相カラム (ODS-A, Yanapac, Yanagimoto) を使用し、移動相には 0.1 M phosphate-buffer (pH 3.1) を用いた。DA 量は内部標準物質として用いた dihydroxybenzylane に対するピーク高の比から算出し、ng／mg protein／10 min あるいは基礎遊離量からの増加率を％で表示した。

2．灌流実験：薬物を含まないKrebs 液を９０分間灌流し、DA遊離が安定した時点から

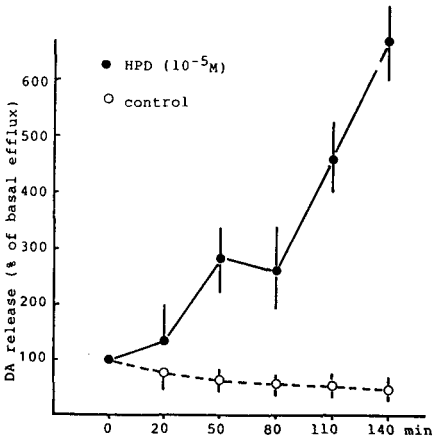


Fig.1 Effect of HPD(10^{-5}M) on DA release from rat striatal slices.

0.5 %のクエン酸で溶解したHPDの原液（2×10^{-2} M）から調整した10^{-6}M、5×10^{-6}M、10^{-5}MのHPDを還流し、20分度に流出液を分取した。次の実験では10^{-7}M、10^{-6}Mのatropine（AT）、2×10^{-5}Mのd-tubocurarine（d-TC）、10^{-7}M AT＋2×10^{-5}M d-TCを予め40分間還流し、その後に10^{-5}M HPDを加えて60分間還流した。

3．ラット線条体のDA、およびAchの定量：DAおよびその代謝産物はYokooらの方法(9)、Achおよびcholineは八尾らの方法(8)を用いて定量をおこなった。

＜結果＞　ラット線条体内のDAは160.5±5.8 ng／mg protein、Achは46.25±3.05 pmol／mgであった。DAの灌流槽からの基礎遊離量は459±88 pg／mg protein／10 min fraction（mean±SEM、n＝20）であり、d-TC、ATの灌流による基礎遊離量の変化はなかった。HPDを還流すると10^{-6}Mの濃度ではDA遊離増加は認めなかったが、5×10^{-6}MではHPD灌流開始40分後には基礎遊離量の40％、10^{-5}Mでは250％のDA遊離の増加が認められた（Fig. 2）。10^{-5}MのHPDを140分間持続還流するとDA遊離は増加し続け140分後には基礎遊離量の10倍に達した（Fig. 1）。10^{-5}MのHPDによるDA遊離の増加は10^{-6}MのATで60％減少した（Fig. 3）。10^{-7}MのATでは減少傾向を示すものの有意差はなかった。しかし10^{-7}M AT に2×10^{-5}M d-TCを加えるとDA遊離の有意な減少が認められた（Fig. 4）。またTTX（10^{-6}M）の灌流によっても有意な減少が観察された（Fig. 5）。

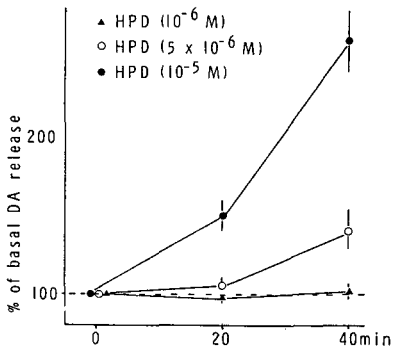


Fig.2 Effect of various concentration of HPD(10^{-6}M, 5x10^{-6}M and 10^{-5}M) on DA release from rat striatal slcies. DA release was expressed as % of basal release. (n=6)

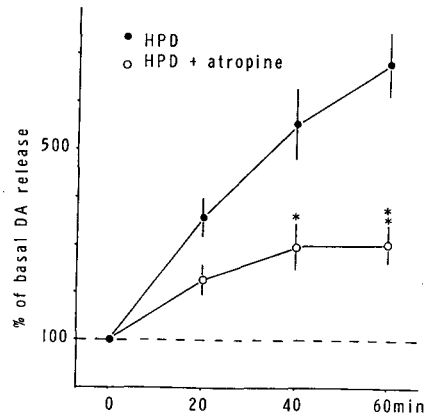


Fig.3 Effect of atropine(10^{-6}M) on HPD(10^{-5}M)-induced DA release from rat striatal slices. (n=6)

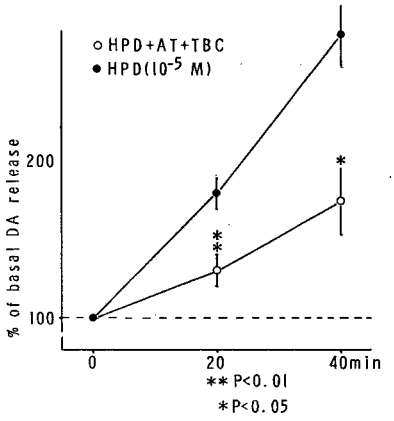


Fig.4 Effect of 10^{-7}M AT + $2x10^{-5}$M d-TC on HPD-induced DA release from rat striatal slices.(n=6)

＜考察＞ 抗精神薬物によるDA代謝回転の亢進はCarlsson(1)らによって初めて示されその後HPD投与後のHVA，DOPACの増加(2)，d-MT投与後のDA螢光強度の減弱(10)などが報告されており、抗精神病薬のDA遮断効果がその薬理作用と密接な関連があるという有力な証拠となっている。灌流装置を使った実験でHPDの灌流によりDA遊離の増加が起こる事が示された。この増加は灌流開始20分後から徐々に始まる傾向がありmethamphetamine（MAP）のように急激な増加は示さない(7)。MAPはDA神経終末に直接働いてDA遊離をひきおこすといわれているが、HPDによるDA遊離作用の時間的な遅れは、その遊離作用にneuronal feed back機構の介在が想定される。またTTXによりDA遊離が抑制される事はHPDによるDA遊離がニューロンの発火を介して起きている事を示しており上記の想定と矛盾しない。今回の実験ではHPDによるDA遊離増加に対してAT(10^{-6}M)が抑制的に働くという結果となった。更に薄い濃度(10^{-7}M)のATでもd-TCを加える事により有意な減少を認めた。線条体内にはDAばかりでなくAchも高濃度に含まれており、HPDによるDA遊離増加の少なくとも一部にcholine系が関与している可能性を示唆している。Nomuraら(5)はAchの灌流でラット線条体からのDA遊離が増加しATにより抑制される事を報告し、今回の我々の結果と矛盾しない。しかし今回の実験では、DA遊離の増加がAT、AT＋d－TC、TTXによって完全に抑制されるわけではなく、ATの存在下でも非存在下の約40％のDA遊離の増加が観察される。この事はHPDによるDA遊離増加には種々の酵素阻害作用のような抗精神病薬の持つ非特異的な作用が関与している可能性も否定できない。尚、電気刺激により誘発されるDA遊離に対してはHPDが増加させるという報告(4)や減少させるという報告(6)があり一定の結論は出ていない。

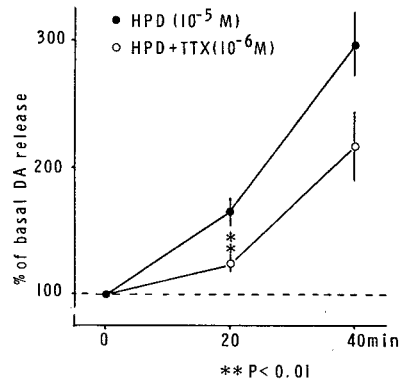


Fig.5 Effect of 10^{-6}M TTX on HPD-induced DA release from rat striatal slices.(n=6)

＊Achを測定していただいた柳本製作所、西野博仁氏に謝意を表します。

1)Carlsson,A. et al.(1963)Acuta.Pharmacol.Toxicol.,20:140-144,2)Kehr,W.,et al.,(1972)J.Pharm.Pharmacol.,24:744-747,3)Kissinger,P.T.,et al.,(1973)Anal.Lett.,6:465-477,4)Kuhr,W.G.,et al.,(1985)JPET,232:388-394,5)Nomura,Y.,et al.,(1981)Dev.Brain Res.,1:171-177,6)Seeman,P. et al.,(1975)Science,188:1217-1219,7)Yamada,S.,et al.,(1985)Kurume Med.J.,in press,8)Yao,T.(1983)Anal.Chem.Acuta,148:27,9)Yokoo,H.,et al.(1985) Kurume Med.J.,in press.10)Yoshida,M.,et al.,(1981)Experimentia,37:491

104. 電撃ストレッサーへの予測可能性がラット脳内ノルアドレナリン放出に及ぼす影響

津田　彰・田中正敏・辻丸秀策・小口雅申・長崎信行
（久留米大・医・薬理）

〔要　約〕

電撃ストレッサーに対して、灯り信号によって電撃が生じる時期を予知できる時（予測可能）とそれが出来ない時（予測不可能）とでは、たとえ電撃を等しく受けたとしても、その際の生体反応は違ってくる。今回は、これら電撃ストレッサーに対する予測可能性の有無といった純心理的要因と脳内noradrenaline(NA)作動性神経活動との関連性について、神経化学的側面から検討した。1組3匹のラットを予測可能群（灯り信号によって合図される電撃を受ける）、予測不可能群（信号によって合図されない電撃を受ける）と対照群（電撃を受けない）に分け、変間隔2.5分スケジュールによる電撃ストレスを6時間負荷し、脳内各部位におけるNAの主要代謝産物である3-methoxy-4-hydroxyphenylethyleneglycol sulfate(MHPG-SO_4)含量を蛍光法で定量した。予測可能群と予測不可能群ラットのすべての部位で、MHPG-SO_4含量の増加を認めたが、これらMHPG-SO_4含量の増加の程度は視床下部、視床、扁桃核、海馬、青斑核(LC)部において、予測可能群ラットの方で著明であった。本結果から、電撃ストレッサーへの予測可能性の有無といった純心理的現象が脳内NA代謝回転に反映されること、脳内NA作動性神経系が恐怖・不安反応を中継している可能性などが示唆された。

Key word： SHOCK PREDICTABILITY, PSYCHOLOGICAL STRESS, RAT BRAIN NORADRENALINE

脳内noradrenaline(NA)作動性神経活動とストレス状況での心理的要因との関連性が近年強調されている(4, 6)。私達は、電撃が間欠的に長時間加えられるようなストレス状況では、電撃を制御するために有効な対処学習を成立させうるかどうかといった心理的要因－対処可能性(controllability)の有無－が、ラット脳内NA代謝に強い影響を及ぼすことを見出だし、この神経化学的変化が恐怖・不安のような情動性と関連していることを示唆した(7)。

今回は、ストレス状況におけるもう一つの心理的要因である、電撃ストレッサーに対する予測可能性(predictability)の有無がラット脳内NA代謝回転といった神経化学的変化に反映されるのかどうか、もしそうだとするならば、電撃の到来を予測できる場合とそうでない場合とで、脳内NA代謝回転の亢進はどのように異なるのか、神経化学的側面より検討した。

【方　法】

被験体と装置

Wistar系雄性ラット(200-230 g)24匹を対象とし、防音個室に置かれたアクリル製ラットホルダー(8)に入れた。

手続き

脳内NA代謝回転に及ぼす電撃の身体的な直接効果と電撃に対する予測可能性の有無

本研究の一部は、昭和59年度、昭和60年度文部省科学研究費（課題番号 59710089, 60710097）による援助を受けた。

の純心理的効果とを区別するために、トリアディックデザインにしたがって、ラットを3群に分けた(Fig. 1): 信号あり電撃群－10Wの白色灯によって、10秒前より合図された電撃を尻尾に受け、電撃の終結時に灯り信号も停止する。電球の点灯と電撃の生起は常に随伴しており、したがって電撃が生じる時期を予測できる; 信号なし電撃群－灯り信号(12秒間持続)とは無関係に生じる尻尾への電撃を、信号あり電撃ラットと直列に配線された電極を通じて同量受ける。点灯と電撃の開始との間には随伴性がなく、したがって電撃が生じる時期を予測できない; 電撃なし群－灯り信号のみを受け、電撃を受けない。電撃の強度は1.2mA、持続時間は2秒であった。電撃の呈示は6時間に渡って、平均2.5分に1回の割合で生じるようにした。実験は1組3匹づつ、計8組について行った。

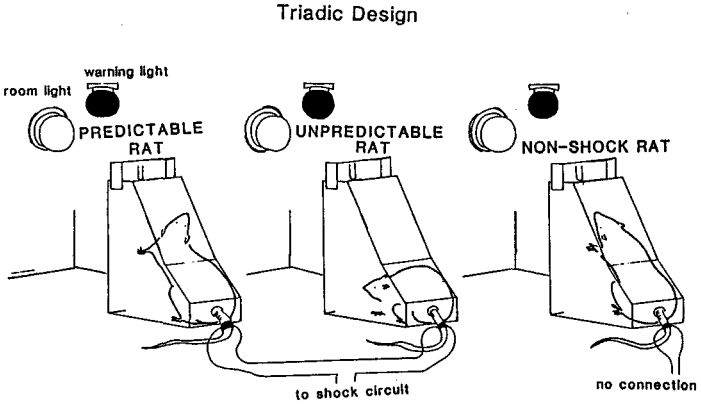


FIG. 1. Shown schematically, the triadic design for distinguishing psychological dimension from shock stressor conditions.

電撃ストレス終了後、ラットを断頭し、脳をGispenらの方法(1)に準じて、次の8部位に分割した: 視床下部、視床、扁桃核、青斑核(LC)部、海馬、大脳皮質、中脳、基底核。これらの部位のNAの主要代謝産物である、3-methoxy-4-hydroxyphenylethyleneglycol sulfate(MHPG-SO_4)含量を蛍光法で定量した(3).

統計的有意差検定には、一元配置分散分析とTukeyの多重比較法を適用した。

【結　果】

Fig. 2に示す通り、測定したすべての部位のMHPG-SO_4含量は2つの被電撃群(信号あり電撃、信号なし電撃)で有意に増加した。これらの部位の内でも、視床下部、扁桃核、海馬、視床、LC部のMHPG-SO_4含量の増加の程度は、受けた電撃の性質(予測可能か予測不可能か)によって異なった。すなわち信号あり電撃ラットは、電球の点灯によって電撃が起こる時期を事前に予知できたが、この群のMHPG-SO_4含量は電撃の生起を予測できなかった信号なし電撃ラットと比べて、上述の部位において著明に増加した。中脳、基底核、大脳皮質のMHPG-SO_4含量に関しては、信号あり電撃と信号なし電撃ラットとの間に有意差を認めなかった。

【考　察】

本実験から、純心理的現象――電撃という物理的ストレッサーが生じる時期を生体が予め予知できるかどうか(ストレッサーへの予測可能性 vs 予測不可能性)といった心理的ストレス――が、脳内NA作動性神経活動の変化に敏感に反映されることが示された。これらの要因は電撃への対処可能性の有無といった心理的効果(7)と同様に、

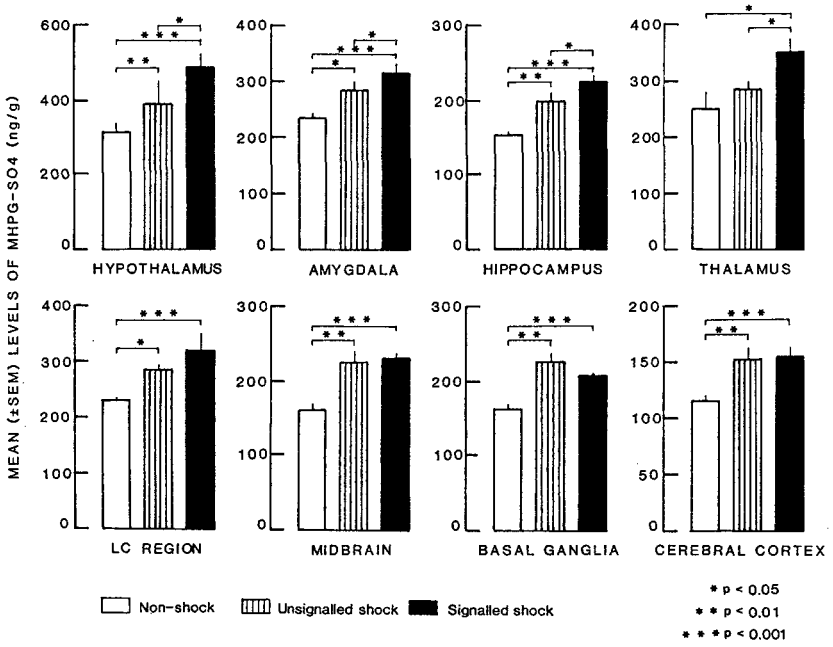


FIG. 2. The mean (± SEM) levels of MHPG-SO_4 in various brain regions for the non-shock, unsignaled shock, and signaled shock rats.

電撃によって生じる脳内NA代謝回転の亢進に対して異なった影響を及ぼすことが明らかになった。

信号あり電撃ラットのNA代謝回転が信号なし電撃ラットと比べて、視床下部や扁桃核など恐怖・不安といった情動反応と密接に関連した部位で(5)、著明に亢進したことから、電撃に対する予測可能性を有することがかえって、電撃を合図する信号に対して強い恐怖条件づけを引き起こし、それゆえに電撃の有害性を高めたように思われる。しかしながら、予測可能な電撃を受けたラットほど、胃潰瘍の発生が軽症で済むという報告(2,9)もある。今後さらに、ストレッサーの予測可能性の効果について、中枢と末梢における反応性の違い、電撃を負荷するストレスの長さ、電撃を合図する信号の時期など調べていく必要があると思われる。

【 引用文献 】

1. Gispen WH, Schotoman P and De Kloet ER 1972 Neuroendocrinology 9: 285-296.
2. Guile MN and McCutcheon NB 1984 Behav Neurosci 98: 695-702.
3. Kohno Y, Matsuo K, Tanaka M et al 1979 Analyt Biochem 97: 352-358.
4. 田中正敏・井田能成・津田 彰 1984 医学と薬学 12: 1670-1682.
5. Tanaka M, Kohno Y, Tsuda A et al 1983 Brain Res 275: 105-110.
6. 津田 彰 1982 行動の異常(平井 久編) 東大出版会 Pp 101-128.
7. Tsuda A and Tanaka M 1985 Behav Neurosci 99: in press.
8. Tsuda A, Tanaka M, Nishikawa T et al 1983 Physiol Behav 30: 805-808.
9. Tsuda A, Tanaka M, Nishikawa T et al 1984 Physiol Psychol 11: 287-290.

105. ラット脳内ノルアドレナリン代謝回転及び末梢臓器に対する昼間時，夜間時拘束ストレスの差

辻丸秀策・田中正敏・津田　彰・佐藤洋美
白尾一正・長崎信行・稲永和豊*
（久留米大・医・薬理，精神神経*）

〔要　約〕

拘束ストレスによつて引き起こされる脳内noradrenaline(NA)代謝回転亢進や末梢臓器の変化に昼夜で差がみられるかどうかについて検討するため、昼間時及び夜間時にそれぞれ金網による拘束ストレスを負荷して、脳内各部位のNA含量とその主要代謝産物である3-methoxy-4-hydroxyphenylethyleneglycol sulfate(MHPG-SO_4)含量を蛍光法で同時定量した。この際、steady stateにおける、脳内NA代謝回転の昼夜差を検討するためprobenecidを用いて、MHPG-SO_4の蓄積量を測定した。さらに末梢臓器（胃粘膜、副腎、脾臓、胸腺重量）の変化についても測定した。その結果、脳各部位のMHPG-SO_4含量は、視床下部、扁桃核、海馬で夜間時ストレスが昼間時に比べて有意な高値を示した。NA含量は、今回検討した脳部位では昼夜の差はなかつた。またprobenecidによるMHPG-SO_4の蓄積量に昼夜の差はみられなかった。ストレス反応としての末梢臓器の変化（胃粘膜損傷、副腎重量の増加、胸腺重量の減少）は、夜間時ストレスの方が昼間時より強く現れた。以上の結果から、ストレスによつて引き起こされる脳内NA放出亢進や、末梢臓器の変化は、夜間時ストレスの方が昼間時に比べてより顕著であることが示唆された。

Key word：　RAT BRAIN NORADRENALINE, STRESS, CIRCADIAN VARIATION

各種ストレスにより、ラットに胃粘膜損傷(6)、胸腺重量の減少(8)など末梢臓器の変化がみられ、脳内各部位のnoradrenaline(NA)代謝回転が亢進すること(7)を我々は既に報告した。しかし従来のこれらの報告の多くは、昼間時にストレスを負荷していた。ところが、ラットは夜行性動物で摂食行動や運動活動の多くは夜間時に集中していることから、ストレスによる末梢臓器の変化や、脳内NAニューロンの反応性にも昼間時、夜間時で相違がみられる可能性がある。そこでこの点を明らかにするために、ラットに昼間時、夜間時に拘束ストレスを負荷し、まずストレスによる末梢臓器（胃粘膜、副腎、脾臓、胸腺重量）の変化について比較検討した。次に、脳内各部位のNA含量及びその主要代謝産物である3-methoxy-4-hydroxyphenylethyleneglycol sulfate(MHPG-SO_4)含量の変化について比較検討した。また、この際、たとえMHPG-SO_4含量に昼間時、夜間時で差がみられたとしても、もし、もともと昼夜においてNA代謝回転に差が存在するならば、それの単なる反映である可能性もある。そこでMHPG-SO_4の脳からの能動的輸送を阻害するprobenecid(5)を使用して、昼夜におけるMHPG-SO_4の蓄積量についてさらに検討を加えた。

【方法】

実験動物として、室温24±1℃，湿度50±10％の部屋で点灯午前7時、消灯午後7時の照明条件下で飼育した、生後7週齢のWistar系雄性ラットを対象とした。ストレスとしては、金網による拘束ストレスを用いた。以下の3つの実験を別々に行った。実験1では、ラットを12時間絶食させたあと、昼間時は午前7時から午後7時まで、夜間時は午後7時から午前7時までそれぞれ12時間の拘束ストレスを負荷し、断頭後、胃、副腎、脾臓、胸腺

を摘出した。胃は、粘膜損傷(出血)の有無を検査し、各ラットあたりの損傷の個数で表した。副腎、脾臓、胸腺については、その重量を計測し、絶対重量で表示した。実験2では、拘束ストレスを昼間時は午後1時から、夜間時は午前1時からそれぞれ30分、60分間負荷し、拘束終了後に断頭した。断頭後、速やかに摘出した脳を氷上でGispenら(2)の方法により各部位に分割した。各部位のNAならびにMHPG-SO_4含量をKohnoら(3)の方法により、蛍光法で同時定量した。実験3では、昼間時は午後1時、夜間時は午前1時にprobenecid 250mg/Kgを腹腔内に投与し1時間後に断頭し、実験2と同様の方法で各部位のMHPG-SO_4の蓄積量を測定した。統計的解析は、Student's t-testを用いた。

【結果と考察】

実験1の結果を表1に示す。各種ストレスで、胃粘膜損傷、副腎重量の増加、脾臓、胸腺重量の減少を示すという報告(6,8)は多い。今回の結果では、ストレス負荷によって胃粘膜損傷、脾臓重量の減少は昼間時、夜間時ともみられたが、副腎重量の増加は夜間時ストレスのみでみられた。ストレス群間の比較では、夜間時ストレスの方が昼間時に比べて、胃粘膜損傷、胸腺重量の減少、副腎重量の増加が有意に大きかった。このことは、夜間時ストレスの方が、昼間時よりもストレス反応としての末梢臓器の変化をより強く引き起こすものと思われ、明期(昼間時)に比べて暗期(夜間時)にストレスを負荷した方が胃粘膜損傷が有意に高かったという報告(1)とも一致する。実験2の結果を図1に示す。脳各部位のMHPG-SO_4含量は、ストレス負荷前では昼間時、夜間時で有意な差はみられなかった。ストレス負荷後のMHPG-SO_4含量は、今回検討したすべての部位で30分もし

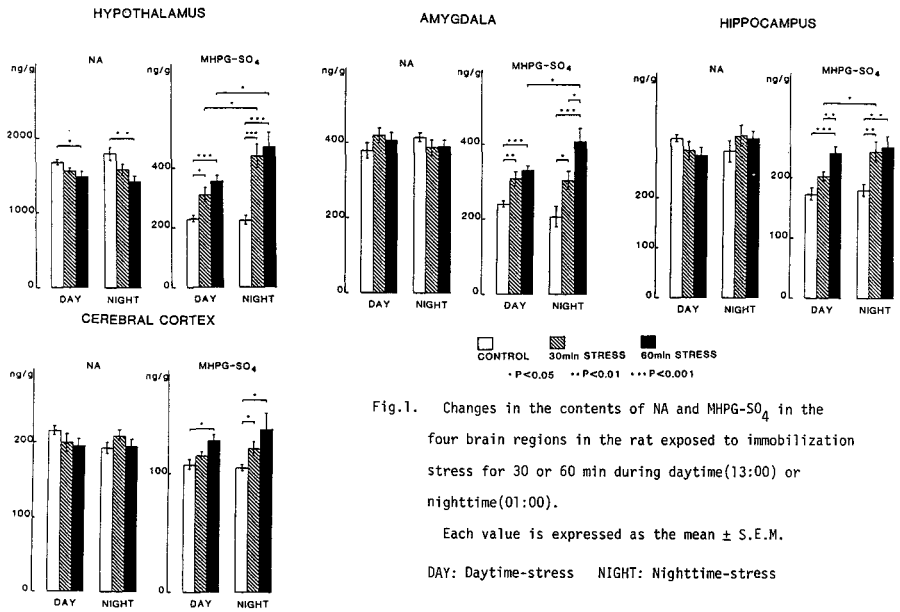


Fig.1. Changes in the contents of NA and MHPG-SO_4 in the four brain regions in the rat exposed to immobilization stress for 30 or 60 min during daytime(13:00) or nighttime(01:00).

Each value is expressed as the mean ± S.E.M.

DAY: Daytime-stress NIGHT: Nighttime-stress

くは60分でストレス負荷前に比べて昼間時、夜間時とも有意な増加を示し、しかもストレス負荷30分において、視床下部、海馬で夜間時が昼間時に比べて有意な高値を示した。また、ストレス負荷60分においても、視床下部、扁桃核で夜間時が昼間時に比べて有意にMHPG-SO_4含量が高かった。NA含量は、ストレス負荷前では、昼夜で有意な差はみられず、ストレス負荷においても昼夜の差はなかった。ストレス負荷前のNA及びMHPG-SO_4含量に昼夜の差がみられなかったことは、視床下部、大脳皮質、橋・延髄のNA及びMHPG-SO_4含量に日内変動がみられないという従来の我々の報告(4)とも一致する。このように、昼間時でも夜間時でも拘束ストレスによりNA放出が亢進することが示されたが、今回の結果では、夜間時ストレス負荷の方が昼間時ストレス負荷より、視床下部、扁桃核、海馬でNA放出の亢進がより著明であった。つまり、拘束時間の長さはたとえ同一でも、それが負荷されるのが昼間時なのか夜間時なのかで、ラットの脳内NAニューロンの反応性に差がみられ、ラットにとって夜間時拘束ストレスの方が昼間時に比べてより強いストレス状況であったことが考えられる。実験3の結果を図2に示す。今回検討したすべての部位で、昼夜におけるMHPG-SO_4の蓄積量には差はみられず、steady stateにおけるNA代謝回転には昼夜で差がみられないことが示唆された。このことから、実験2の結果で昼夜で差がみられたのが、steady stateにおけるNA代謝回転の昼夜差に由来するという可能性は否定されると思われる。

以上の結果から、ストレスによって引き起こされる末梢臓器の変化や、脳内NA放出亢進は、夜間時拘束ストレスの方が昼間時に比べてより著明となることが示唆された。

Table 1 Changes in peripheral organs in the rat exposed to stress during daytime or nighttime

	Gastric lesion per rat	Adrenal gland weight(mg)	Spleen weight(mg)	Thymus weight(mg)
DAYTIME				
control	0 ± 0	23.0 ± 1.1	529.4 ± 16.0	538.0 ± 25.2
stress	1.3 ± 0.4	24.2 ± 1.2	443.2 ± 20.3[a]	526.8 ± 17.0
NIGHTTIME				
control	0 ± 0	25.4 ± 0.8	528.1 ± 21.4	516.7 ± 35.9
stress	3.4 ± 0.6[b]	27.8 ± 0.9[a b]	425.2 ± 12.9[a]	466.9 ± 22.8[b]

Each value is expressed as the mean ± S.E.M.
Statistical significances are: a vs.control; b vs.daytime-stress: $P< 0.05$ or less.

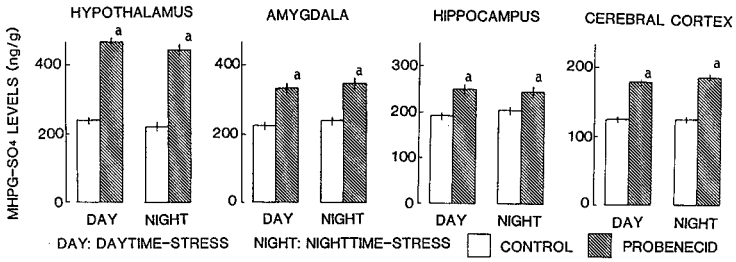


Fig. 2. Accumulated values of MHPG-SO_4 in four brain regions of the rat induced by probenecid during daytime or nighttime.
Each value is expressed as the mean ± S.E.M.
Significantly different from control. [a] $p<0.001$

[REFERENCES]
1. Fukusima,M., Sakata,T., Tsutsui,K., Arase,K., Gomita,Y. and Asano,c. (1981) Physiol. Behav., 27:915-920
2. Gispen,W., Schotman,P. and de Kloet,E.R. (1972) Neuroendocrinology., 9:285-296
3. Kohno,Y., Matsuo,K., Tanaka,M., Furukawa,T. and Nagasaki,N. (1979) Anal. Biochem., 97:352-358
4. Kohno,Y., Tanaka,M., Nakagawa,R., Toshima,N., Takeda,S. and Nagasaki,N. (1980) Kurume. Med. J., 27:227-232
5. Meek,J.L. and Neff,N.H. (1973) Pharmac. Exp. Ther., 184:570-573
6. Nakagawa,R., Tanaka,M., Kohno,Y., Noda,Y. and Nagasaki,N. (1981) Pharmac. Biochem. Behav., 14:729-732
7. Tanaka,M., Kohno,Y., Tsuda,A., Nakagawa,R., Ida,Y., Iimori,K., Hoaki,Y. and Nagasaki,N. (1983) Brain Res., 275:105-115
8. Tsuda,A., Tanaka,M., Nishikawa,T., Iimori,K., Hoaki,Y., Ida,Y., Nakagawa,R.,Kohno,Y. and Nagasaki,N. (1982) Physiol. Behav., 28:349-352

106. Age- and sex-related changes in histamine in the central nervous system

R. Cacabelos・大和谷　厚*・渡辺建彦**・播口之朗
西村　健・和田　博*
（大阪大・医・精神，第二薬理*，東北大・医・第一薬理**）

〔要　約〕

SUMMARY

Age- and sex-related changes in histamine have been studied in 20 different parts of the central nervous system in Wistar rats aged 3 weeks, 3 months, 16 months, and 26 months. Histamine was measured by high-performance liquid chromatography with a cation exchanger and an automated fluorometric detection system. In the hypothalamo-hypophyseal system, histamine increased with age in areas of transit and release, such as the anterior hypothalamic region, median eminence, adenohypophysis and neurohypophysis, but tended to decrease in the posterior hypothalamic region where the histaminergic neurons are located. The greatest increases were in the median eminence and neurohypophysis, where histamine augmented from 4.7 and 2.8 nmol/g, respectively, in infant rats to 17.6 and 18.2 nmol/g in old animals. In the hippocampus, histamine decreased from 2.2 to 0.3 nmol/g. Sex-related differences in histamine were mainly found in the hypothalamo-hypophyseal system, where its concentration was slightly higher in young females than in young males.

These observations suggest that the modifications in the concentration of histamine in old animals are part of the overall deterioration of the central nervous system observed in mammals. The impairment of the histaminergic system under these circumstances can bring about serious repercussions on the histaminergic mechanism controlling the neuroendocrine system.

Key word : Histamine, age, sex, central nervous system, high-performance liquid chromatography.

INTRODUCTION

Brain histamine (HA) is linked to important central functions, such as neuroendocrine control (1,2), central sympathetic activity, thermoregulation, cardiovascular control, immune response, the sleep-awakefulness cycle and behavioral reactions (3,4,5). All these functions seem to be mediated through H_1-, H_2- (6), and H_3(auto)-receptors (7,8). Most central activities deteriorate to some extent with age. Histaminergic functions are not exceptions, and there is already some evidence that the histaminergic system is involved in the aging process of brain (9).

We studied age- and sex-related differences in histamine (HA) in the central nervous system (CNS) in an attempt to find some connection between deterioration of histamine functions in the brain and changes in concentration of this amine in specific areas of the CNS. A sensitive HPLC-fluorometric detection system was used for determination of HA.

MATERIALS AND METHODS

Wistar rats of both sexes aged 3 weeks (n=7), 3 months (n=8), 16 months (n=7), and 26 months (n=4) were used. The animals were decapitated between 8:00 and 11:00 a.m. and their neuroaxis was removed and dissected under a stereomicroscope into 20 different parts as shown in table I. Tissues were homogenized in 10 v/w of ice-cold 3% perchloric acid containing 5mM EDTA-Na_2 in a Polytron homogenizer, and centrifuged at 10,000 x g for 15 min at 4°C and the supernatants were stored at -80°C for analysis. Histamine was measured by high-performance liquid chromatography (HPLC) with a cation exchanger and an automated Shore's fluorometric detection system as described elsewhere (10,11). Samples of 10-100 µl were injected directly into the HPLC column. The minimum detection limit by this method was 0.05 pmol and the interassay coefficient of variation was about 2%.

RESULTS

Results are shown in table I and figures 1 and 2.

Age-related changes in histamine in the CNS

In the hypothalamo-hypophyseal system (HhS), including the anterior (AHR) and posterior (PHR) hypothalamic regions, median eminence (ME), adenohypophysis (Ah) and neurohypophysis (Nh), clear changes of HA with age were evident. HA increased in areas of transit and release, such as the AHR, ME, Ah, and Nh, but decreased slightly in the PHR, where the histaminergic neurons with their apparatuses for HA synthesis are located. The greatest increases were in the ME and Nh, where HA increased from 4.7 ± 0.7 and 2.8 ± 0.1 nmol/g, respectively, in infant rats to 17.6 ± 1.8 and 18.2 ± 2.1 nmol/g in old animals. In other regions of the CNS, HA tended to decrease throughout life. It is noteworthy that in the hippocampus, HA decreased from 2.2 ± 0.4 in infant rats to 0.3 ± 0.03 nmol/g in old rats and that in the spinal cord, the HA concentration was highest in young and adult animals.

Sex-related differences in histamine in the CNS

In the HhS, where the highest concentration of HA was found, its concentration was slightly higher in young females than in young males, except in the ME, where its concentration was higher in males than in females (4.14 vs 3.97 nmol/g). In the spinal cord and olfactory bulb, its concentration in infant rats tended to be higher in males than in females, but HA levels in adult and old rats were similar in the two sexes.

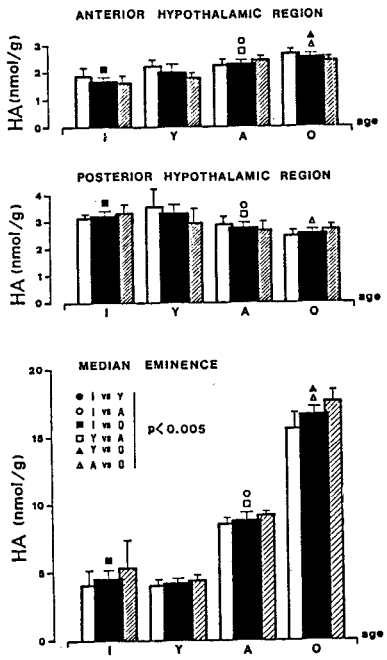


Figure 1.- Concentrations of HA in the anterior and posterior hypothalamic regions and median eminence in infant (I), young (Y), adult (A), and old (O) rats. ((□)=females; (▨)=males; (■)=mean value).

DISCUSSION

It is clear that in those regions where HA seems to be more important (e.g., in the HhS), its synthesis and release show a progressive imbalance with age. This is probably due to impaired receptors activity to establish efficient short and ultrashort feedback loops with hypothalamo-hypophyseal neurosecretory cells and terminals.

HA is known to cause release of vasopressin, ACTH and LH, which are hormones whose physiological activities deteriorate with age. The extent of participation of HA in this deterioration process is unknown, but it is very likely to be related to this phenomenom, because reduction of neuronal HA by administration of alpha-fluoromethylhistidine resulted in apparent abolishment of syntheses and release of ACTH and vasopressin in adrenalectomized animals (12,13). In a similar manner, ovariectomy and orchidectomy resulted in activation of the central histaminergic response, which was less apparent in

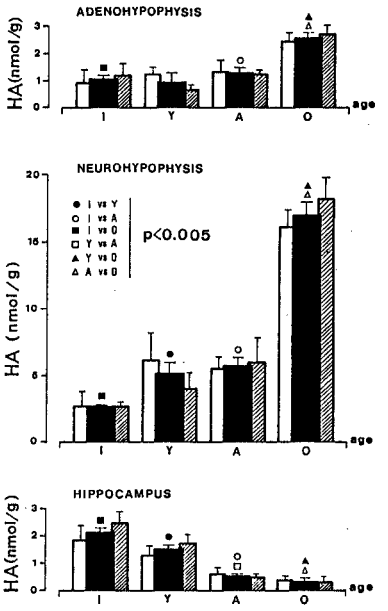


Figure 2.- Concentrations of HA in the adenohypophysis, neurohypophysis and hippocampus in infant (I), young (Y), adult (A), and old (O) rats. ((□)=females; (▨)=males; (■)=mean value).

TABLE I.- AGE- AND SEX-RELATED CHANGES IN HISTAMINE IN THE CENTRAL NERVOUS SYSTEM

REGION	INFANT		YOUNG		ADULT		OLD	
	Female	Male	Female	Male	Female	Male	Female	Male
Anterior hypothalamic region	1.86±0.37	1.63±0.32	2.28±0.17	1.83±0.12	2.30±0.09	2.40±0.07	2.65±0.13	2.44±0.09 *
Posterior hypothalamic region	3.20±0.18	3.32±0.30	3.63±0.86	2.94±0.53	2.92±0.29	2.70±0.31	2.50±0.23	2.70±0.74
Median eminence	4.04±1.15	5.39±1.06	3.97±0.22	4.14±0.34	8.47±0.92	9.25±0.75	15.70±2.49	17.62±1.94
Adenohypophysis	0.92±0.45	1.27±0.66	1.26±0.20	0.55±0.05	1.27±0.42	1.25±0.07	2.50±0.21	2.74±0.31
Neurohypophysis	2.86±1.64	2.80±0.30	6.22±2.87	3.90±1.25	5.68±1.05	6.10±1.83	16.20±1.97	18.15±2.08
Thalamus	1.61±0.41	2.35±0.91	3.16±0.78	1.56±0.29	0.87±0.16	0.86±0.13	0.65±0.01	0.61±0.02
Hippocampus	1.85±0.88	2.57±0.78	1.39±0.37	1.71±0.31	0.51±0.20	0.47±0.03	0.35±0.03	0.31±0.01
Striatum	1.63±0.48	1.78±0.27	2.64±1.42	1.69±0.20	0.46±0.09	0.43±0.05	0.50±0.02	0.48±0.05
Frontal cortex	0.75±0.35	1.02±0.35	0.53±0.11	0.72±0.01	0.27±0.05	0.31±0.03	0.40±0.01	0.35±0.04
Temporal cortex	0.43±0.15	0.52±0.06	0.42±0.02	0.54±0.03	0.25±0.02	0.21±0.02	0.40±0.01	0.39±0.02
Parietal cortex	0.46±0.10	0.45±0.09	0.81±0.02	0.52±0.05	0.32±0.01	0.29±0.01	0.20±0.02	0.18±0.01
Occipital cortex	0.41±0.13	0.55±0.18	0.44±0.01	0.49±0.04	0.30±0.01	0.31±0.02	0.35±0.07	0.32±0.04
Cerebellum	0.20±0.21	0.17±0.03	0.21±0.09	0.56±0.01	0.22±0.01	0.21±0.01	0.23±0.03	0.22±0.03
Mesencephalon	0.84±0.05	0.45±0.13	0.27±0.03	0.42±0.02	0.33±0.02	0.30±0.01	0.35±0.04	0.31±0.02
Pons	0.25±0.04	0.34±0.06	0.16±0.06	0.53±0.07	0.14±0.01	0.21±0.03	0.22±0.02	0.20±0.01
Medulla oblongata	0.21±0.05	0.34±0.06	0.19±0.08	0.52±0.05	0.23±0.07	0.29±0.05	0.27±0.06	0.29±0.05
Cervical spinal cord	0.59±0.29	0.97±0.44	0.82±0.08	0.87±0.06	1.01±0.06	0.93±0.07	0.71±0.12	0.88±0.09
Thoracic spinal cord	0.49±0.03	1.22±0.55	1.06±0.25	1.73±0.15	0.76±0.45	0.81±0.09	0.49±0.06	0.54±0.12
Lumbar spinal cord	0.43±0.16	0.49±0.21	0.30±0.07	0.31±0.06	0.22±0.09	0.30±0.07	0.09±0.01	0.06±0.01
Olfactory bulb	0.95±0.09	0.35±0.06	0.84±0.06	1.33±0.21	0.47±0.04	0.51±0.05	0.60±0.14	0.67±0.09
(*) nmol/g ± SD	n=3	n=4	n=4	n=4	n=3	n=4	n=2	n=2

adult animals than in young ones (Cacabelos et al., unpublished results).

The clear-cut reduction of HA in the hippocampus might be related with impairment of memory functions in connection with alteration of vasopressin and ACTH observed in elderly subjects (14,15).

These observations suggest that HA plays some role in the aging process. Another interpretation of our results is that the modifications in HA levels detected in old animals are a secundary result of overall deterioration of the brain with age, which has repercussions on the histaminergic mechanism controlling the neuroendocrine system.

REFERENCES

(1) ROBERTS, F., CALCUTT, C.R. Neurosci. 9:721-739 (1983).
(2) CACABELOS, R. JANO Med. Hum. 638:46-61 (1984).
(3) HOUGH, L.B., GREEN, J.P. In: Handbook of Neurochemistry, vol.6, LAJTHA, A. ed., Plenum, NY, pp. 145-211 (1984).
(4) CACABELOS, R. JANO Med. Hum. 638:62-82 (1984).
(5) CACABELOS, R. Med. Clin. (Barc) 84:524-527 (1985).
(6) GREEN, J.P. In: Handbook of Psychopharmacology, vol.17, IVERSEN, L. et al., eds., Plenum, NY, pp.385-420 (1983).
(7) BERTACCINI, G., CORUZZI, G.J. J. Clin. Gastroenterol. 5:57-70 (1983).
(8) ARRANG, J.M. et al., Frontiers in Histamine Research, Paris, Abs.49 (1984).
(9) MAZURKIEWICZ-KWILECKI, I.M., PRELL, G.D. Agents Actions. 14:554-557 (1984).
(10) YAMATODANI, A. et al., Biochem. Pharmacol. 31:305-309 (1982).
(11) YAMATODANI, A. et al., J. Chromat. Biomed. Appl. (Submitted)
(12) CACABELOS, R. et al., Bull. Jpn. Neurochem. Soc. 23:403-405 (1984).
(13) CACABELOS, R. et al., Biogenic Amines (in press) (1985).
(14) De WIED, D. Proc. R. Soc. Lond. B 210:193-195 (1980).
(15) Van WIMERSMA GREIDANUS, Tj. B. et al., Pharmac. Ther. 20:437-458 (1983).

107. Methamphetamine 連続投与による dopamine および serotonin 神経系の感受性の変化について —Phencyclidine との比較—

深谷公昭・鍋島俊隆・古川　宏*・亀山　勉
（名城大・薬・薬品作用，薬化*）

〔要　約〕

Methamphetamine(MAP)の3または15 mg/kgの連続投与(連投)によりphencyclidine(PCP)の惹起する常同行動がどのような影響を受けるか、また、その時のdopamine(DA)およびserotonin(5-HT)神経系の機能はどのように変化しているのかを検討した。その結果、MAP 3および15 mg/kgのどちらの用量を連投した場合にも、PCPの惹起するhead weaving, turningおよびbackpedallingの発現回数はsaline(SAL)連投群に比べて増加した。また、MAP 3 mg/kgの連投により、MAPの作用が増大したが、DA agonist(apomorphine, APO)および5-HT agonist(5-methoxy-N,N-dimethyltryptamine, 5-MeODMT)の惹起する行動の強さには影響はみられなかった。一方、MAP 15 mg/kgを連投した場合には、MAPの惹起する行動の強さばかりでなく、APOおよび5-MeODMTの惹起する行の強さも増強した。以上の結果より、MAPの低用量を連投した場合にはDA神経系の機能のみが、また、高用量を連投した場合にはDAおよび5-HT両神経の機能が亢進したため、そのどちらの場合にもPCPの惹起する常同行動の発現回数が増加したと考えられる。

Key word： methamphetamine　phencyclidine　repeated treatment

Methamphetamine(MAP)およびphencyclidine(PCP)は、ともに、乱用され、しばしば精神異常を惹起する。ヒトの精神分裂病症状は、動物におけるstereotyped behavior(常同行動)に対応すると言われている。MAPの低用量をげっ歯類に投与した場合に惹起される常同行動には、sniffing, rearing, licking, gnawingおよびbitingなどがあり、さらに、高用量を投与すると、serotonin(5-HT)依存性の行動が発現する。また、PCPによりsniffing, head weaving, head twitch, turning, backpedallingなどの常同行動が惹起され、その多くは5-HT依存性と言われている行動に似ており、低用量のMAPなどにより惹起されるdopamine(DA)依存性の常同行動とはタイプが異なっている(3)。一方、MAPを連投すると、その作用に対する感受性が増大するが(2)、PCPを連投すると、DA神経系の機能が亢進し、逆に5-HT神経系の機能は低下する(1)。そこで、今回、両薬物の作用機序の相違を明らかにするために、MAPの低用量または高用量を連投した動物でPCPの惹起する常同行動の変化を検討した。

〔実験材料および実験方法〕

実験には、8週齢のFischer系雄性ラット(日本チャールズリバー)を使用した。ラットに、MAP 3および15 mg/kgを腹腔内にそれぞれ12および4日間連投し、その後24時間休薬した後各種薬物を投与し、それぞれの薬物によって惹起される行動の変化を観察した。また、対照群には、SALを同様のスケジュールに従って連投した。

(1) PCPにより惹起される行動の観察法

PCPを単独に投与した場合に観察される行動については、ラットを30x35x17cmの白色プラスチックケージ内に1匹ずつ入れ、sniffing, head weaving, head twitch, backpedallingおよびturningについて経時的に観察した。また、backpedallingおよびturningについては15分間の発現

回数を、head weavingおよびhead twitchについては15分毎に3分間ずつ発現回数をカウントした。またsniffingについては、強度により0から3までの4段階のスケールによってスコア化した。

(2) DA agonistsにより惹起される常同行動の観察法

行動観察は、ラットを、床に濾紙を敷いた30x20x13cmのアクリル樹脂性の透明ケージ内に1匹ずつ入れ、経時的に行った。sniffing, lickingおよびbitingについては薬物投与後15分毎に1分間観察し、各々の行動について0から5までの6段階のスケールによってスコア化した。

(3) 5-HT agonistsにより惹起される常同行動の観察法

行動観察は、ラットを前述の白色プラスチックケージ内に入れ、head weaving, head twitch, turningおよびbackpedallingについて経時的に観察した。なお測定は、backpedallingおよびturningについては、15分間の発現回数を、さらにhead twitchおよびhead weavingについては、15分毎に3分間ずつの発現回数をカウントした。

なお、行動観察を始める前に少なくとも10分間は、動物を観察ケージに入れ、ケージに慣らしておいた。

〔実験結果〕

(1) PCPの惹起する常同行動に対するMAP 連投の影響

ラットにMAP 3または15 mg/kgを連投した後、PCP 2.5または5 mg/kgを投与して、惹起される常同行動を観察したところ、どちらの用量の場合もMAP連投群のhead weaving, turningおよびbackpedallingの発現回数はSAL連投群に比べ、有意に増加していた。

Tablel Changes in sterereotyped behaviors following repeated MAP administration

	PCP		MAP		APO		5-MeODMT		PCA
Behaviors	L	H	L	H	L	H	L	H	L
Sniffing	±	±	⇧	⇧	±	⇧			
Licking			±	⇧	±	⇧			
Turning	⇧	⇧					±	⇧	±
Head weaving	⇧	⇧					±	⇧	±
Head twitch	±	±					±	±	±
Backpedalling	⇧	⇧					±	⇧	±

L: Repeated administration of MAP(3 mg/kg) once a day for 12 days.

H: Repeated administration of MAP(15 mg/kg) once a day for 4 days.

⇧: Potentiation , ±: Non-effect

(2) DA agonistsの惹起する常同行動に対するMAP連投の影響

MAP 3 mg/kgを連投した後、MAP 1.25 mg/kgを投与すると、SAL連投群に比べMAP連投群のsniffingのスコアは有意に増加した。また、15 mg/kgを連投した後、MAP 2.5 mg/kgを投与した

時も、sniffingおよびlickingのスコアは有意に増加していた。一方、APOの惹起する常同行動については、MAP 3 mg/kgの連投の影響は見られなかった。しかし、MAP 15 mg/kgを連投した場合には、SAL連投群に比べsniffingおよびlickingのスコアが有意に高くなっていた。

(3) 5-HT agonistsの惹起する常同行動に対するMAP連投の影響

MAP 15 mg/kgを連投した場合5-MeODMTの惹起するhead weaving, turningおよびbackpedallingは、MAP連投群の方がSAL連投群よりも有意に高い値を示した。また、MAP 3 mg/kgを連投した後、5-MeODMT 2 mg/kgまたは、PCA 2.5 mg/kgを投与しても、head weaving, head twitch, turningおよびbackpedallingの発現回数にはMAP連投の影響は見られなかった。

〔考察〕

MAPの低用量と高用量を連投した場合に、PCPの場合と同じ様に、DAおよび5-HT神経系の機能の変化に違いが見られるかどうか、また、その時PCPの惹起する常同行動がどのような影響を受けるのかを検討した。その結果、MAP 3 mg/kg連投群に、DA indirect agonistであるMAPを再投与するとその作用は増強された。しかし、APOおよび5-HT agonistの作用には連投の影響は見られなかった。また、上記ラットに、PCP 5 mg/kgを投与するとhead weaving, turningおよびbackpedallingの発現回数が増大した。これらのことから、MAP 3 mg/kg連投群では、DAを遊離する機能が亢進しているが、5-HT神経系の機能には変化がないものと考えられる。一方、MAP 15 mg/kgを連投した群では、DA agonistのMAPおよびAPOのみならず、5-HT direct agonistの5-MeODMTの作用も増大したことから、高用量の連投では、DAおよび5-HT神経のpostsynaptic receptorがsupersensitivityになっているのではないかと考えられる。上記ラットにPCP 2.5 mg/kgを投与した場合にhead weaving, turningおよびbackpedallingの発現回数が増加した。これは、MAP連投によりDAおよび5-HT両神経系の機能が亢進したラットにPCPを投与したため、PCPによる、DA indirect agonistおよび5-HT agonist様作用により常同行動が増強されたものと考えられる。

先に、われわれは、PCPを連投すると、DA神経系の機能が亢進し、逆に5-HT神経系の機能は低下することを報告しているが、今回の結果からは、MAPの低用量および高用量のどちらを連投した場合にも、PCPを連投した時と同じような神経系の機能の変化は見られなかった。

以上のことから、PCPとMAPは、同一の神経系を介して、行動を発現するが、それらの神経系に対する作用機序が異なるために、PCPとMAPでは連投後の神経系の機能変化のパターンが異なるのではないかと考えられる。

〔文献〕

(1) 鍋島俊隆, 山口和政, 平松正行, 杉本　晃, 吉田　茂, 深谷公昭, 古川　宏, 亀山　勉: Phencyclidine慢性投与による耐性および感受性増大, 第58回日本薬理学会総会プログラム・要旨集, 東京, 1985, P.315

(2) Segal, D.S. and Mandell, A.J. Long-term administration of d-amphetamine: Progressive augmentation of motor activity and stereotypy. Pharmacology, Biochemistry and Behavior, 1974, 2: 249-255

(3) 融　道男: 精神機能と神経伝達—臨床神経伝達物質学, 共立出版, 東京, 1981, P.65

108. ラット大脳皮質鉄塩投与後の脳内カテコールアミン，セロトニン及びアミノ酸について

福島正登・平松　緑・加太英明・枝松　礼・森　昭胤
（岡山大・医・脳研・機能生化）

〔要　約〕

ラット大脳皮質左感覚運動領野に0.1M塩化第二鉄溶液を5μl注入後、大脳皮質、海馬、視床下部、中脳、橋延髄及び小脳のカテコールアミン(CA)及びセロトニン(5-HT)を投与15分、30分、60分、2ヶ月後に測定した。また左大脳皮質と小脳のアミノ酸を2ヶ月後に測定し次の結果が得られた。(1) 5-HTは投与15分後に橋延髄で増加し、30分後に中脳で増加したが、大脳皮質では低下していた。また投与2ヶ月後では小脳の5-HTが増加していた。(2) CAは鉄塩投与15分から2ヶ月後までは変化は認められなかった。(3) アミノ酸は小脳のバリンのみが投与2ヶ月後に低下している以外、著明な変化は認められなかった。

以上の実験結果より、鉄塩によるてんかん源性焦点の形成発現機構には、5-HT neuronが関与しており、CAやGABAやグルタミン酸などのアミノ酸系のneurone は関与しないことが示唆された。

Key word： Ferric ion, epileptic focus, serotonin

Willmoreら[9]により、ラット大脳皮質に鉄塩を投与するとてんかん様発作波が出現することが報告されて以来、鉄塩によるてんかん様発作波の発現機構は、鉄塩により生じた活性酸素（$\cdot O_2^-$, $\cdot O_2H$, $\cdot OH$, H_2O_2）が膜を構成している不飽和脂質の二重結合に作用して過酸化物を生じるが、その際、一連のフリーラジカル反応が細胞膜を障害することによると考えられている[5,10]。また一方、脳内のモノアミンがけいれん発作発現機構に関与しているという多くの報告がある[7]。

今回は鉄塩投与後のラットについて、脳内のカテコールアミン(CA)、セロトニン(5-HT)、及びアミノ酸の分析を行ない、鉄塩によるてんかん様発作波の発現機構について検索を行なった。

実験方法

(1) 実験動物：　体重250gのラット(Sprague-Dawley, 雄）を使用した。

(2) 鉄塩によるてんかん源性焦点の作成：　ラットをethyletherl麻酔下で脳定位固定器に固定後、左大脳皮質感覚運動領野に0.1M $FeCl_3$ 5μlをマイクロシリンジで1分間に1μlの速さで注入した。

(3) 試料の作成：　ラットを断頭後、直ちに氷上で大脳皮質、海馬、視床下部、線条体、中脳、橋延髄、小脳に部位別し、分析開始迄 -80℃に保存した。

(4) CA及び5-HTの分析：　CA及び5-HTの分析は、組織よりCA及び5-HTをそれぞれ抽出後、高速液体クロマトグラフィーで行なった[3]。

(5) アミノ酸の分析：　アミノ酸の分析は、鉄塩投与2ヶ月後の左大脳皮質と小脳の組織をピクリン酸処理し、アミノ酸自動分析計を用いて行なった[4]。

Table 1. Effect of Fe^{3+} on serotonin and catecholamine levels in the rat brain

	Time	Serotonin		Norepinephrine		Dopamine	
		control	Fe	control	Fe	control	Fe
Cerebellum	15min.	61± 13	83± 26	172± 54	145± 31	6± 1	7± 3
	30min.	67± 11	72± 15	150± 21	140± 36	7± 3	6± 2
	60min.	83± 34	78± 10	136± 20	139± 23	6± 3	5± 1
	2mon.	54± 4	84± 10[a]	218± 53	197± 27	8± 1	8± 0
Medulla oblongata	15min.	486± 52	592± 51[a]	406± 49	353± 33	47± 8	46± 5
	30min.	454± 44	417± 81	374± 63	382± 93	41± 8	34± 12
	60min.	577± 48	580± 25	364± 50	358± 58	45± 17	40± 5
	2mon.	493± 51	486± 26	561±105	486± 70	46± 11	43± 8
Hypothalamus	15min.	1080±199	1110±109	1000± 99	917±164	334± 30	331± 49
	30min.	637±135	540± 55	1000±155	1010±232	360± 39	324± 58
	60min.	927±167	1055±112	1100±182	1270±299	328± 88	320± 55
	2mon.	966± 80	968± 58	1690±417	1620±343	449±151	388± 73
Midbrain	15min.	683±113	688± 81	356± 71	311± 33	99± 29	91± 18
	30min.	530± 59	731±107[a]	358± 47	324±116	169± 55	152± 61
	60min.	614± 72	801±186	314± 60	341± 84	110± 33	120± 30
	2mon.	611± 75	590± 34	569±135	553±148	199±110	142± 80
Hippocampus	15min.	431± 62	498± 25	228± 29	225± 32	13± 4	17± 7
	30min.	427± 43	393± 56	274± 27	237± 50	22± 6	20± 7
	60min.	403± 62	478± 38	232± 33	234± 36	18± 8	20± 7
	2mon.	377± 56	370± 36	448± 64	414± 84	29± 5	34± 17
Striatum	15min.	500± 48	468± 25	166± 59	181± 40	4320±395	3920±333
	30min.	379± 57	355± 63	191± 30	218± 53	3810±606	3750±819
	60min.	442± 63	526± 68	265± 73	266± 73	3180±763	3610±492
	2mon.	506± 49	481± 79	317± 79	303± 83	5620±897	5840±952
Cortex	15min.	316± 43	343± 26	196± 24	178± 33	291± 65	223± 66
	30min.	195± 14	163± 17[a]	146± 31	126± 24	166± 49	163± 43
	60min.	235± 34	298± 77	116± 25	127± 24	132± 35	149± 55
	2mon.	246± 35	226± 17	369± 80	337± 40	247± 99	258± 46

a. $p<0.05$, compared to control. mean±SD, ng/g tissue wet weight, n=3-6.

結果

(5) 5-HT. 5-HTは鉄塩投与15分後には橋延髄で対照群に比べて増加していた。鉄塩投与30分後には、5-HTは中脳で増加していたが、大脳皮質では逆に低下していた。投与60分後には各部位の5-HTは対照群と相違がないが、投与2ヶ月後には、小脳の5-HTが増加していた。海馬、視床下部及び線条体では鉄塩投与による5-HTの変化は認められなかった。

(2) CA. ドーパミン(DA)とノルエピネフリン(NE)は、鉄塩投与15、30、60分及び2ヶ月後のいずれの過程においても、脳7部位で対照群との間に有意差が認められなかった。

(3) アミノ酸. 鉄塩投与2ヶ月後における左大脳皮質のアミノ酸は、対照群との間に有意差がなかった。同様に小脳においては、バリン(Val)のみが対照群に比べて有意に低下していた。

考察

鉄塩をラット左大脳皮質感覚運動領野に投与すると、投与7分後からてんかん様発作波が出現し、投与5～6ヶ月頃までてんかん様発作波は持続して出現していることを大脳皮質脳波記録により、観察している[6]。今回の実験で鉄塩投与15分後には橋延髄の5-HTが増加していることを認めた。この時期にはCAは変化が認められていない。さらに投与30分後には中脳の5-HTが増加しているが、一方大脳皮質の5-HTは低下していた。さらに投与2ヶ月後では、小脳の5-HTが増加していたが、一方Valが小脳で低下しているのみで、他のCA及びアミノ酸は、鉄塩投与2ヶ月まで変化が認められなかった。Pathakら[8]は、鉄塩投与8～23日後にてんかん源性焦点組織中のGABA-transaminase(GABA-T)活性を測定しているが、彼らの報告によるとGABA-T活性は変化が認

Table 2. Effect of Fe^{3+} on amino acid levels in the rat brain

	Left cortex		Cerebellum	
	Control	Fe	Control	Fe
Tau	5.933±0.609	6.550±0.927	4.183±0.412	4.633±0.700
Urea	3.800±3.578	3.417±3.326	2.750±2.630	2.617±2.337
Asp	2.917±0.203	3.070±0.099	2.272±0.276	2.492±0.066
Thr	0.588±0.069	0.637±0.114	0.654±0.124	0.660±0.098
Ser	0.908±0.082	0.964±0.121	0.551±0.098	0.533±0.082
Asn[2]	0.113±0.027	0.137±0.049	0.086±0.022	0.080±0.020
Glu	10.733±0.499	11.255±0.998	9.553±0.831	9.852±0.823
Gln[2]	4.825±0.503	5.288±0.502	5.333±0.515	5.262±0.693
Pro	0.051±0.020	0.075±0.027	Tr~0.07	0.072±0.021
Gly	0.807±0.048	0.883±0.088	0.837±0.050	0.871±0.088
Ala	0.686±0.044	0.716±0.067	0.637±0.051	0.617±0.041
Val	0.077±0.009	0.076±0.009	0.064±0.003	0.050±0.010[a]
Met	0.024±0.006	Tr~0.039	0.023±0.009	0.017±0.006
Cysta	0.021±0.004	0.020±0.005	0.326±0.100	0.289±0.068
ILeu	0.034±0.005	0.034±0.007	0.027±0.010	0.025±0.005
Leu	0.077±0.012	0.076±0.015	0.064±0.012	0.060±0.010
Tyr	0.055±0.009	0.058±0.013	0.059±0.010	0.055±0.009
Phe	0.048±0.011	0.049±0.009	0.048±0.006	0.050±0.004
GABA	2.228±0.284	2.487±0.250	1.862±0.173	1.853±0.254
Orn	0.012±0.005	0.011±0.003	0.021±0.005	0.018±0.008
Lys	0.150±0.021	0.164±0.025	0.271±0.042	0.269±0.043
1-M-His	0.112±0.041	0.126±0.044	0.079±0.026	0.079±0.025
His	0.087±0.015	0.105±0.018	0.083±0.012	0.080±0.018
Arg	0.114±0.022	0.125±0.028	0.151±0.015	0.147±0.013

a.$p<0.05$, compared to control. mean±SD, nmol/g tissue wet weight. n=6.

められていない。我々も鉄塩投与後2ヶ月までに、GABAに変化を認めなかった。今回の実験成績から鉄塩によるてんかん源性焦点の形成には抑制性Tau neuronが最も大きく関与していることが示唆される。

さきに我々は鉄塩投与5分後に電子スピン共鳴(ESR)法でperoxyl radical($\cdot O_2H$)が鉄塩投与部位で著明に増加していることを認め[5]、又malondialdehydeも同様に増加していることを明らかにし、この時期には過酸化ラジカル反応がこう進していることを示した[7]。最近、膜の過酸化がGABA receptor bindingを減少させること[11]、GABAやグルタミン酸のuptakeを減少させること[1,2]が報告されている。今回の実験成績から、鉄塩によるてんか源性焦点形成の機構としては、鉄塩によりまず過酸化ラジカル反応がこう進して細胞膜障害が生じ、やがててんかん源性焦点が形成されたものと考えられるが、その際特異的に5-HT neuronが何らかの形で活性化され、興奮を抑制しようとするために、Tauが各部位で増加したものと想定される。

(1) Braughler, J.M. (1985) J. Neurochem. 44, 1282-1288. (2) Chan, P.H., Kerlan, R. and Fishman, R.A. (1983) J. Neurochem. 40, 309-316. (3) Hiramatsu, M. (1981) Folia Psychiat. Neurol. Jpn. 35, 261-266. (4) Hiramatsu, M., Niiya-Nishihara, H. and Mori, A. (1982) Neurosciences 8, 289-294. (5) Hiramatsu, M., Mori, A. and Kohno, M. (1984) Neurosciences 10, 281-284. (6)高知宏喜 (1983) 岡山医誌 95, 271-282. (7) 森昭胤 (1985) 病態生理 4, 343-350. (8) Pathak, D.N., Ray, D. and Singh, R. (1984) Biochem. Int. 9, 59-68. (9) Willmore, L.J., Syepert, G.W. and Munson, J.B. (1978) Science 200, 1501-1503. (10) Willmore, L.J., Hiramatsu, M., Kochi, H. and Mori, A. (1983) Brain Res. 277, 393-396. (11) Yoneda, Y., Kuriyama, K. and Takahashi, M. (19084) Brain Res, 333, 111-122.

109. 高速液クロによるカルボキシ末端アミド化ペプチドの検出について

高野宏美・西島樹重・北村邦男・植村慶一

(埼玉医大・第一生理)

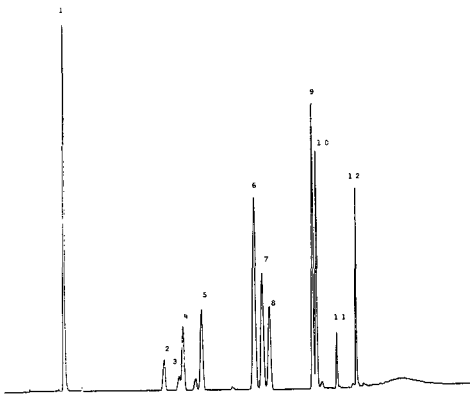
〔要　約〕

生理活性を示すペプチドには、そのカルボキシ末端がアミド化されているものがかなり多い。今回、カルボキシ末端アミド化ペプチドの高感度な検出、分析法を検討した。　ペプチド試料をエンドペプチダーゼで酵素分解して、カルボキシ末端のアミノ酸アミドを遊離させ、ダンシル化の後、ダンシルアミノ酸アミドを選択的に抽出した。ダンシルアミノ酸アミド、および加水分解後のダンシルアミノ酸は、Develosil C8-5を用いた逆相系高速液クロによるメタノールの濃度勾配溶出、蛍光検出によって分析した。　標準の Substance P および CCK8 について検討した結果、分解酵素として Thermolysin、Subtilisinが有効であり、遊離されたダンシルアミノ酸アミドは pmol レベルでの検出が可能であった。　ウシ脊髄のペプチド画分の分析の結果、Asn、 Met、 Leu、 Ile のアミド化合物が検出され、そのペプチド画分のBiogel P2カラムによる細画分の分析では、Leu-amide および Met-amide をそれぞれふくむ画分がえられ、さらに検討をすすめている。この方法は、新しい活性ペプチドの検出に利用が可能と考えられる。

Key word :　Carboxy-terminal amidated peptide, HPLC, neuropeptide

生体内に種々の活性ペプチドが存在し、それらが情報伝達やその調節に重要な役割をもつことが明らかになりつつある。生理活性をもつペプチドには、Substance P, CCK8, Bombesinなどペプチドのカルボキシ末端のアミド化されている例が多く知られている。このようなペプチドの化学的特徴をとらえて、活性ペプチドの検出や分析を行う方法は、従来の BIOASSAY 法とともに、有用な手段であろう。最近カルボキシ末端のアミド化ペプチドの化学的分析より、PHI、NPY などが発見されている（３，４）。私達は、カルボキシ末端にアミド化アミノ酸をもつペプチドを、酵素分解して、遊離したアミノ酸アミドをダンシル化し、高速液クロによって、高感度で迅速な分析法を検討したので報告する。

Fig.1



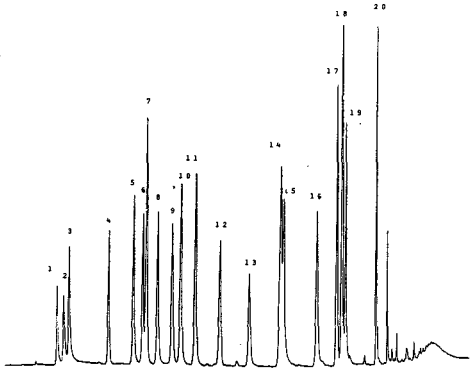
1 Dns-OH, 2 Dns-Ser-amide, 3 Dns-NH_2, 4 Dns-Gly-amide, 5 Dns-Ala-amide, 6 Dns-Pro-amide, 7 Dns-Val-amide, 8 Dns-Met-amide, 9 Dns-Leu-amide, 10 Dns-Phe-amide, 11 X, 12 di-Dns-Tyr-amide

［実験方法］

［Ｉ］カルボキシ末端アミド化ペプチドの分解、ダンシル化と抽出：これらの方法は原理的にTatemotoの方法にしたがった。即ち、試料をSubtilisin、Thermolysin、Chymotrypsinなどの蛋白分解酵素で分解し

て、カルボキシ末端のアミド化アミノ酸を遊離させ、ダンシル化した後、アルカリ条件下の酢酸エチル抽出によって、アミド化アミノ酸を選択的に分離した。

Fig.2



1 Dns-Cysteic acid, 2 Dns-Asp, 3 Dns-Glu, 4 Dns-OH, 5 Dns-Asn, 6 Dns-(hydroxy)Pro, 7 Dns-Gln, 8 Dns-Ser, 9 Dns-Gly, 10 Dns-Thr, 11 Dns-Ala, 12 Dns-Arg, 13 Dns-Pro, 14 Dns-Val, 15 Dns-Met, 16 Dns-Trp 17 Dns-Ile, 18 Dns-Leu, 19 Dns-Phe, 20 di-Dns-Tyr

［II］ダンシルアミノ酸およびアミノ酸アミドの分析：ダンシルアミノ酸の分析は逆相系高速液クロ(HPLC)を用いたKANEDAらの方法を改良して行なった（２）。即ち、Develosil C8-5 (250X4.6mm)カラムを用い、Ａ溶媒［10mM Tris-HCL (pH 7.75): Methanol = 10:3(v/v) ］100%で平衡化し，Ｂ溶媒［Methanol］ 0% －25% まで 0.5%/min 、25% － 100% まで 5%/min の勾配とＢ溶媒 100% 20min 溶出し、励起340nm 、蛍光 530nmの蛍光検出で、ダンシルアミノ酸の分析を行った。ダンシルアミノ酸アミドの検出には、Ａ溶媒 90%：Ｂ溶媒 10%で平衡化し，Ｂ溶媒 10%－40% まで 0.67%/min、 40%－ 100% まで 3%/min の勾配と 100% 15min で溶出を行った。

［III］ウシ脊髄よりペプチドの抽出：ウシ脊髄(1Kg) より塩酸アセトン抽出によって、ペプチド画分を得た（１）。

Biogel P2 カラムによって、ペプチド画分を、Kav= 0.1, 0.2, 0.3にそれぞれ相当するＡ、Ｂ、Ｃ画分に細分画した。

Fig.3

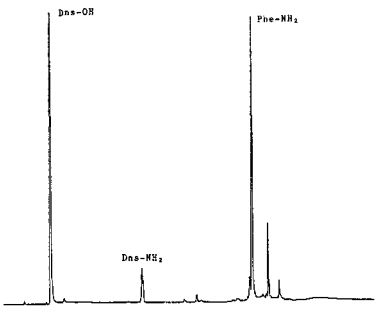
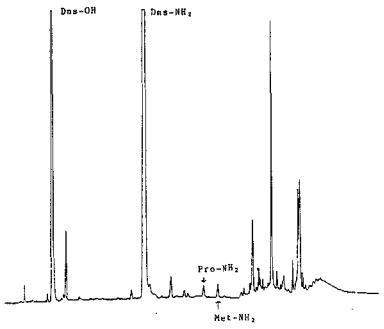


Fig.4



［実験結果と考察］

ａ）標準アミノ酸アミドおよびアミノ酸のダンシル化誘導体のHPLC

標準アミノ酸アミドをダンシル化して、逆相系Develosil C8-5カラムを用いたHPLCで蛍光分光検出器で分離したパターンを示した（第１図）。ダンシルアミノ酸アミドは一般にアミド化されていないダンシルアミノ酸より遅れて溶出されるので、この場合の分離にはより高濃度のグラディエント系を用いた。この系で９個のダンシルアミノ酸アミドの分離は良好であった。ダンシル化のアミノ酸の分離分析系では、19個のダンシルアミノ酸の分離は良好であった（第２図）。

ｂ）標準試料の分析

標準試料としてSubstance P について、

Subutilisin 酵素分解、ダンシル化、アルカリ条件下で酢酸エチル抽出後、ダンシルアミノ酸アミドのHPLCを行った結果、Met-NH2 が検出され、更に加水分解後、ダンシルアミノ酸の HPLC を行った結果、Met と一致するピークが検出された。 同様にCCK-8 について、Thermolysin による分解の後、アミド系の分析で Phe-NH2 （第３図）、加水分解後の分析で Phe が検出された。 ペプチドの分解に用いる酵素としては、 Thermolysin, Subtilisin, Chymotrypsin など比較的特異性のひくいエンドペプチダーゼが効果があり、 Streptomyces griseus protease (Sigma) やエキソペプチダーゼ類は多分デアミダーゼの混入のため、この分析には不適当であった。また、未知のペプチド試料の分析には、２種類の酵素を併用する方法が有効であった。ダンシル化のあと、アルカリ条件（ｐＨ 8.0）で酢酸エチル抽出を行なうことにより、ダンシルアミノ酸を水層にのこして、ダンシルアミノ酸アミドを選択的に 96%の収率で抽出することが可能であった。

Fig.5

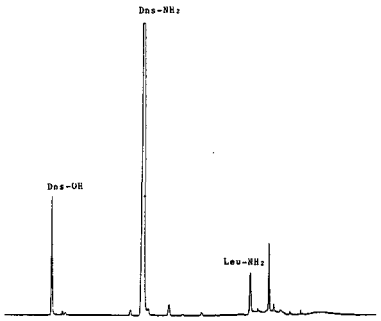
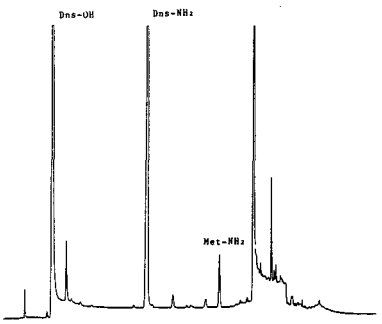


Fig.6



Ｃ）脊髄のペプチド画分についての分析

牛脊髄の酸アセトン抽出画分およびその細画分について、それぞれ酵素分解－ダンシル化－アルカリ性酢酸エチル抽出を行い、その抽出物の分析を行った。その結果、酸アセトン抽出画分のダンシルアミノ酸分析ではLys 、Tyr 、Leu 、Phe 、Ile 、Met 、の他 Ala 、Gly 、Ser に一致するピークが認められた。また、その細画分のダンシルアミノ酸アミド分析では、Ａ画分には微量の Pro-NH2, Met-NH2 （第４図）、Ｂ画分には主に Leu-NH2 （第５図）、Ｃ画分には Met-NH2 （第６図）に一致するピークが認められた。 これらのペプチドが既知のものか、未知のものかについて、更に今後の分析を進めてゆきたい。

［謝辞］ 本研究は文部省科研費（試験研究）の援助を一部受けた。

［文献］

1)Cheng,M.M. & Leeman,S.E. (1970) J.Biol.Chem. 245,4780
2) Kaneda,N.,Sato,M, & Yagi,K. (1982) Anal.Biochem. 127,49
3) Tatemoto,K., Carlquist,M. & Mutt,V. (1982) Nature 296,659
4) Tatemoto,K.,Jornvall,H.,McDonald,T.J. et al.(1984) FEBS Lett. 174,258
5) Tatemoto,K. & Mutt,V. (1978) Pro.Natl.Acad.Sci. 75,4115

110. 低体温動物モデルにおける脳内 TRH の変化

奥田千恵子・溝部俊樹・宮崎正夫・木村　宏*・栗山欣弥**
（京都府医大・麻酔，滋賀医大・第二解剖*，京都府医大・薬理**）

〔要　約〕

動物の体温変化と脳内 thyrotropin releasing hormone（TRH）含量の変化との関係を追求するため，ラットをいろいろな温度の水槽に拘束浸水し，脳内各部位のＴＲＨ含量をＲＩＡ法により測定した。また免疫組織化学的方法によりＴＲＨの細胞内局在の変化も検討し，以下の結果を得た。

1. 38℃の水槽に拘束水浸した群（normothermia群）においては，非拘束の contro 1 群に比べて脳内ＴＲＨ含量に有意な変化はみられなかったが，体温が約35℃の群では，視床下部および中脳において有意な低下がみられた。しかしさらに体温の低下した群では，このようなＴＲＨ含量の低下は観察されなかった。
2. 体温約35℃におけるＴＲＨ含量の低下は，動物を復温することにより元のレベルに回復した。
3. 免疫組織化学的方法により検討すると，視床下部背内側核におけるＴＲＨ陽性の神経終末が低体温下で normothermia 群に比べて有意にその密度および染色性が減少していた。

以上の結果より，軽度の低体温下ではＴＲＨ作動性神経活動が上昇し，ＴＲＨの遊離がふえることにより，特に視床下部においてＴＲＨの含量が低下すると考えられる。

Key word： hypothermia , cerebral TRH, immunohistochemistry

動物を寒冷曝露すると，血漿ＴＳＨの急激な上昇が起こるが，この反応は通常 thyrotropin-releasing hormone（TRH）を介していると考えられている。[1,2] しかし，寒冷曝露後の視床下部ＴＲＨ含量には変化がなかったという報告もある。[3,4] またＴＲＨが体温上昇作用を持ち，体温調節に生理的な役割を演じていると考えられているが，環境温によりその作用が異なることが示唆されている。[5] 著者らは従来より用いられているラットの拘束水浸ストレスモデルを改変して，水温を調節することにより体温を変化させる方法[6]を用いて，動物の体温と，脳内ＴＲＨ含量の関係を求めようと試みた。

【実験方法】Wistar系雄性ラット（180~220g）の直腸に体温計を挿入したのち，拘束ケージに入れて38℃の水槽に６０分浸水し初期のストレス条件を一定したのち，水温を38℃~20℃に変化させ，さらに６０分後に断頭して，すばやく脳を摘出した。

Glowinski と Iversen の方法[7]に従って摘出脳を７分画し，湿重量測定後，10倍量の 0.1N HCl-Ethenol（1：1）中でポリトロンによりホモゲナイズし，遠心後得られた

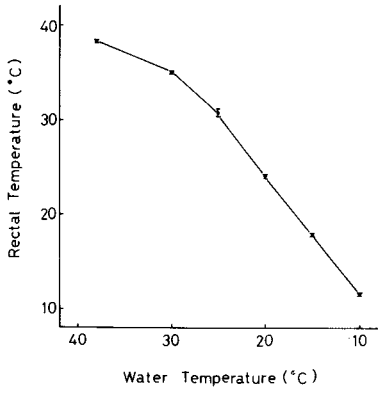


Fig.1. Changes in rectal temperature in rat restrained and immersed in water bath of various temperatures.

上清を遠心濃縮機により蒸発乾固させ保存した。TRH様免疫活性（以下TRHと略す）は，乾固させた上記の脳抽出物を測定直前にRIA用リン酸緩衝液に再溶解し，二抗体法によるRIA法にて測定した。また低体温および復温の影響を経時的に調べるため，2時間低体温にしたラットを90分間かけて復温し，同時間38℃の水槽に拘束したnormothermia群を対照として，各時点での脳内TRHの変化を検討した。

さらに，同様の系を用いて，免疫組織化学法により，TRHの細胞内局在の変化を調べた。一定時間体温を変化させたラットをペントバルビタール麻酔下に開胸し，既報の方法[8]に従って脳を潅流固定した後，クリオスタットで20μmの切片を作成した。RIAで用いたと同じTRHの特異的抗血清（10.000倍希釈）と1週間インキュベートした後，ABC法によりジアミノベンチヂン－ニッケルの呈色反応を観察した。

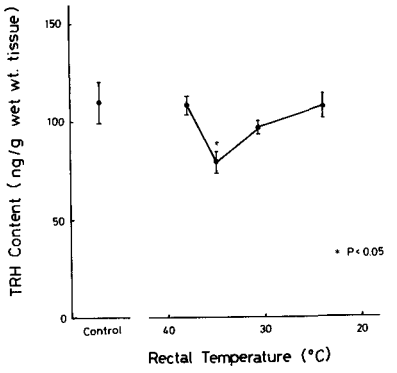


Fig.2. Effect of changes in rectal temperature on contents of TRH in hypothalamus of rat restrained and immersed in water bath of various temperatures

【実験結果】本実験で用いた冷却法では，低体温そのもの以外に，拘束水浸されることによる肉体的，心理的ストレスが同時に加わることになるが，水温38℃に保つと体温は正常に保たれるので，この群（normothermia群）を対照とすることにより体温変化のみによる影響が求まると考えた。Fig.1に示すごとく，水温30℃以下では，体温は水温の低下とともに直線的に降下した。Fig.2は動物の直腸温と視床下部TRH含量の間係を示している。

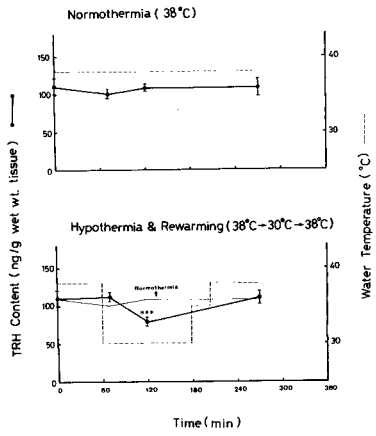


Fig.3. Changes in content of TRH in hypothalamus of rat restrained and immersed in water bath of 38 C and 38°C→30°C→38°C.

Normothermia群（体温38℃）におけるTRH含量はcontrol群（非拘束）に比べて有意な差異を示さなかったが，体温が約35℃の群ではcontrol群およびnormothermia群に比べて明らかに低下した。しかし，さらに体温が低下した動物においては，このようなTRH含量の変化はみられなかった。これと同様な変化は中脳においても観察されたが，他の脳内部位ではどの温度においても変化はなかった。昨年の本学会では，同一の実験系において体温が約35℃の時血漿TSH値がcontrol値に比べて有意に上昇するにもかかわらず，それ以下の体温の動物ではcontrol値までもどってしまうことを報告したが，[9]今回の視床下部TRHの低下がTRH作動性神経からのTRHの遊離の増加を反映するものとすれば，両

者の変化はよく一致する。また上記の体温約35℃における視床下部TRH含量の低下は，復温により normo thermia 群のレベルまで回復した（Fig.3）。

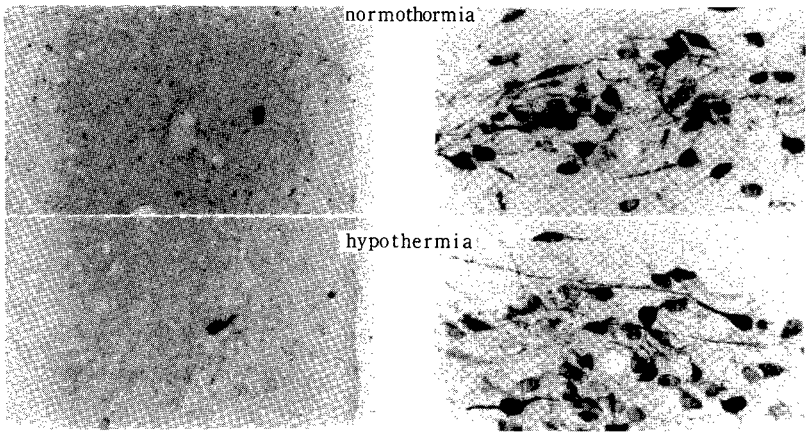


Fig.4. A typical example of histochemical micrograph showing TRH-like-immunoreactivity. — nucleus dorsomedialis hypothalami (DMH) —

Fig.5. same as Fig.4. — zona incerta (ZI) —

TRHの免疫組織化学的変化に関しては control 群と normothormia群の間に有意な変化は見られなかったので，以後各温度で30分～2時間拘束した群（hypothermia群）と同時間38℃にて拘束した群（normothermia群）の間で比較検討を行なった。12組の比較の結果，10組において hypothermia群で視床下部背内側核（DMH）内 TRH陽性神経終末における有意な免疫反応性の減少が観察されたが（Fig.4），このような顕著な変化は他の視床下部内部位では観察されず，とくにTRH 陽性細胞体では両群ともに有意の差は認められなかった。Fig.5 は上述の DMH を含む同一切片で認められた不確帯（ZI）の陽性細胞体である。

【考察と結論】体温が低下すると視床下部および中脳のTRH 含量が低下するが，体温が約35℃以下に低下した動物では元のレベルにもどる。この変化はＴＲＨ作動性神経からのＴＲＨの遊離を反映していると思われる。免疫組織化学的方法により，神経細胞内のTRHは，体温がさらに低下した動物においても低下している部位が観察されたことから，低体温下におけるTRH作動性神経活動の生理的な意義を求めるにはさらに限局された部位でのＴＲＨ含量の変化について検討を加える必要があると思われる。

【文献】

1) Jobin, M., Ferland, L. and Labrie, F. (1976) Endocrinology 99, 146-151
2) Arancibia, S., Tapia-Arancibia, L., Assenmacher, I. and Astier, H. (1983) Neuroendocrinology 37, 225-228
3) Bassiri, R.M. and Utiger, R.D. (1974) Endocrinology 94, 188-197
4) Koivusalo, F. and Leppäluoto, J, (1979) Neuroendocrinology 29, 231-236
5) Prasad, C., Matsui, T. Williams, J. and peterkofsky, A. (1978) Biochem, Biophys. Res. Commun. 85. 1582-1587
6) OKuda, C., Saito, A., Miyazaki, M. and Kuriyama, K. (1986) Pharmacol. Biochem. Behav. in press
7) Głowinski, J. and Iversen, L.L. (1966) J. Neurochem. 13, 655-669
8) Kimura, H., McGeer, P.L., Peng, J.H. and McGeer, E.G. (1981) J. Comp. Neurol. 200, 151-200
9) 奥田千恵子，斉藤朗子，宮崎正夫，栗山欣弥（1984）神経化学，23, 81-83

111. 牛副腎髄質初代培養細胞のリン酸化とエンケファリンの動態

竹田二美代・竹田　稔・島田明範・倉岡幸令
内海　晃・紺野邦夫・相内敏弘*・中村泰治*
(昭和大・医・生化，薬・生物化学*)

〔要　約〕

副腎髄質にはカテコールアミン(CA)を含有するアドレナリン細胞(Acell)とノルアドレナリン細胞(NAcell)の存在が知られている。これらの細胞には又、ニューロトランスミッターあるいはニューロモジュレーターとして考えられているエンケファリン(Enk)の共存も明らかになっている[7]。我々はこの副腎髄質初代培養細胞内のCAの放出はCa^{++}依存性の開口分泌によって行なわれ、又この放出機構はタンパク質のリン酸化が関与しておりhighK^+刺激により促進され、更にこの条件でEnkはCAと同時に放出されることを報告した。今回培養細胞を用いて種々の条件下で細胞内リン酸化反応を検討した。リン酸化は$CaCl_2$濃度2.5mMで最大活性を示した。オートラジオグラムにより基質タンパク質を分析すると少くとも20のタンパクバンドがリン酸化され、分子量3万前後と6~6.5万のタンパク質に強くリン酸化が見られた。これらのタンパク質は60mM K^+30秒脱分極刺激でタンパクへのリンの取り込みが増加した。Invitroに於るリン酸化反応では細胞質に分子量6万に強くリン酸化されるタンパク質が検出された。又、クロマフィングラニュール膜のリン酸化はPhosvitin,Caseinで強く阻害され、Histoneにより活性化された。

Key word：Adrenal medullary cell culture-Enkephalin-protein phosphorylation -Depolarisation-Calcium

副腎髄質はパラニューロンのモデルとして刺激受容機序と放出連関の作働様式はニューロンと本質的に同一である[1]。又、副腎髄質細胞はCAとEnkの共存が知られており[7]、刺激に応じて放出される際同時に放出される可能性もあり、これらの物質が単に神経伝達物質として機能するのみならずニューロモジュレーターあるいはホルモン様作用を営んでいるか次第に明確になって来た[2][5][10]。我々は内因性オピオイド物質であるエンケファリンの中枢及び末梢に於る取り込み機構について研究し、牛脳尾状核のSVへのLeu-Enkの取り込み及び牛副腎髄質クロマフィン顆粒膜へのMet-Enkの取り込みは2価陽イオンとATPに依存した取り込み機構であることを明らかにした[12][13]。又、昨年の本学会では副腎髄質初代培養細胞のMet-Enkの取り込みは細胞内ATP及びNaイオンが必須であることを明らかにした[11]。今回取り込まれたEnk及びCAが刺激に対応して放出される際にCa^{++}に依存した細胞質内タンパクのリン酸化について検討を行った。

(実験方法)

牛副腎髄質細胞の培養　副腎髄質初代培養細胞はWaymireらの原法[14]に従って行なった。調製した細胞はD-MEMに10%FBS培地で単層培養した。細胞は培養3日から10日目のviability85%以上のものを用いた。

In vivo リン酸化反応

上記の細胞を145mM $NaC\ell$／4.7mM $KC\ell$／2.5mM $CaC\ell_2$／0.5mM $MgC\ell_2$／10mM Glucose／10mM Hepes，PH7.4に懸濁し、～50μℓ；0.5mCi／mℓ(^{32}P)H_3PO_4と共に95%O_2-5%CO_2で37℃通常45分間反応を行なった。

In vitro リン酸化反応

cytosol 分画及びクロマフィン顆粒膜は100μℓ incubation medium 中5μM(γ^{32}-P)ATP と25℃ 15分間反応した。

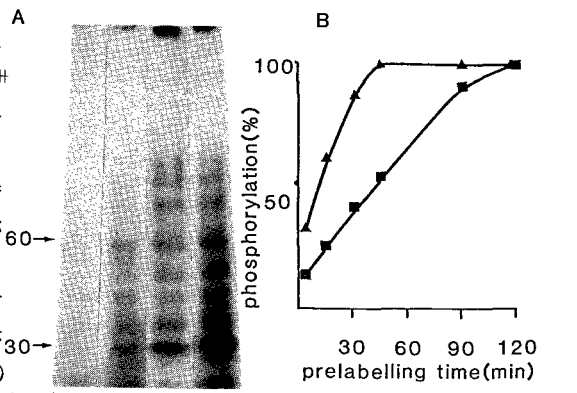
SDS−PAGE

^{32}P存在下でリン酸化を行なった細胞は200mH Tris／8.0％SDS／77mM mercaptoethanol ／6mM EGTA／28％ glycerol／bromophenol blue, PH6.8 を加えて反応を停止させ、直ちに100℃、3分間加熱し試料とした。0.1％SDS を含む7.5～15％ ポリアクリルアミドスラブゲル（厚さ2mm, 10×13.5cm）は Laemmli の方法に従って調製した[6]。電気泳動は8mH／スラブゲルで 時間行なった。泳動後タンパク質はクマシーブルー(R-250)で染色することにより検出した。更にオートラジオグラフィーを行なうため、ゲルは80℃、吸引減圧下で乾燥後、X-線フィルム(kodak RP Royal X-Omat) で5～10日間低温下で密着させ、感光させた。

（結果と考察）

初代培養した副腎髄質細胞を(^{32}P)H_3PO_4 存在下で incubation を行なうと速やかに^{32}Pの細胞内へ取り込みが見られた。Fig 1 は細胞内への^{32}Pの取り込みを反応時間を変えて検討した結果である。^{32}Pの取り込みは90分まで直線的に増加が見られ、細胞のタンパク質量に比例して^{32}Pの取り込みの増加がみられた。transmitter の放出とリン酸化を明らかにするために37℃, 45分間pre incubation を行なった後60mM K^+ で脱分極を起させたところFig2 に示すように5秒後に分子量6万のタンパク質が強くリン酸化された。そこでこのリン酸化タンパク質が細胞内のどのfractionで行なわれているかを調べる目的で を取り込ませた細胞の細胞分画を行ない、核(N)、ミトコンドリア(Mt)、ミクロソーム(膜)(MC)、細胞質(Cyt)の各分画についてリン酸化を検討した結果、Cyt 分画から分子量約6万のタンパク質が強くリン酸化され、このタンパクは最近報告されたTH[8][4]の可能性もある。又、副腎髄質より Smith らの方法[9]に従ってクロマフィン顆粒を調製し、更に低張処理によりクロマフィン顆粒膜を得た[3]。リン酸化反応は通常5μM(γ-^{32}P) ATP で25℃、15分間の incubation で行なった。この取り込みに付するCa^{++}の影響を調べてみるとCa^{++}が取り込みを増加させた。これは脱分極によりCa^{++}が細胞内に流入して取り込みが増加すると考えると、初代培養細胞の場合に脱分極により取り込みが増加するのと矛盾しない。このクロマフィン顆粒膜のリン酸化反応に及ぼす環状ヌクレオチドの影響はTable 1 に示したように C-AMP (1μM), C-GMP (20μM) ではあまり強い影響はなかった。しかし、phosphatidyl serine (24 μg) ではわずかにリン酸化が促進された。

Fig1
Rate of incorporation of phosphate into protein



A:Autoradiograph
B:Scanned Autoradiograph
total protein phosphorylation(■)
phosphoprotein 60(▲)

更に外部基質に対する影響はHiston type Ⅲ(240μg)ではcontrolの1.5倍の活性があり、phosvitine(240μg),Casein(240μg)で夫々強く阻害された。これらの結果からリン酸化酵素はC-kinaseの可能性が高い。又、これら3種の分画から得られた分子量約6万のリン酸化タンパク質の共通性と、transmitterの放出に対する挙動と共に詳しく検討したい。

Fig 2
Effect of depolarisation on protein phosphorylation

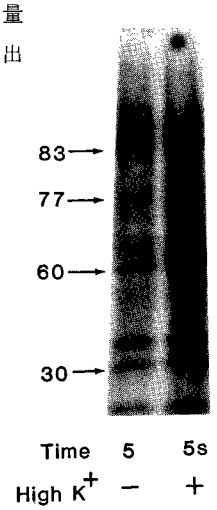


Table 1 Effects of reagents on chromaffin granule membrane phosphorylation

Addition	Activity(cpm)	% of control
none Ca^{++}(0.4mM)	2000	100
EGTA (0.8mM)	1288	64.4
c-AMP (1uM)	1964	98.2
c-GMP (20uM)	1826	91.3
Phosphatidyl serine (24ug)	2200	110
Histone (240ug)	2950	147.5
Phosvitin (240ug)	1620	81.0
Casein (240ug)	1704	85.2

References

(1) Fujita,T.,(1977) Arch.histol.jap.,40,Suppl. 1-12

(2) Frederickson,R.C.A.,(1977)Life Sci.,21,23-42

(3) Giraudat,J.,Roisin,M-P. and Henry,J-P.(1983)Biochemistry 19,4499-4505

(4) Haycock,J.W.,Meligeni,J.A.,Bennett,W.F. and Waymire,J.C.(1982)J.Biol.Chem. 257,12641-12648

(5) Hughes,J.,Smith,T.W.,Kosterlitz,H.W.,Fothergill,L.A.,Morgan,B.A. and Morris,H.R. Nature,258,577-579

(6) Laemmli,U.K.(1970)Nature 227,680-685

(7) Livett,B.G.,Day,R.,Elde,R.P. and Howe,P.R.C.(1982)Neuroscience 7,1323-1332

(8) Pocotte,S.L.,Frye,R.A.,Senter,R.A.,TerBush,D.R. and Lee,S.A.(1985) Proc. Natl. Acad. 82,930-934

(9) Smith,A.D. and Winkler,H.(1967) Biochem.J.103,480-482

(10) Stern,A.S.,Lewis,R.V.,Kimura,S.,Rossier,J.,Gerber,L.D.,Brink,L.,Stein.S. and Udenfriend,S.(1979) Proc.Natl.Acad.Sci. 76,6680-6683

(11) Takeda,F.,Takeda,M.,Shimada,A.,Nishida,H.,Konno,K.,Aiuchi.T. and Nakamura,Y. (1984) Bulletin Jap.Neurochem.Soc. 23,418-420

(12) Takeda.F.,Takeda.M.,Shimada,A.Konno,K.(1985)Brain Res.344,220-226

(13) Takeda M.,Takeda.Matsumoto,F.,Tanaka.R. and Konno,K.(1982)Brain Res.234.319-326

(14) Waymire.J.C.,Wamire,K.G.,Boehme,R.,Noritake,D. and Waedell,J J. in Structure and Function of Monoamine Enzymes(eds. Usdin,E.,Weiner,N. and Youdin,M.B.H.) (1977)Dekker,New York pp 32~-363

112. ストレスによるラット脳内メチオニンエンケファリン含量の変化に関する研究

車地暁生・高嶋瑞夫・渋谷治男*・融　道男**
（国立武蔵療・神経センター・疾病3部，
東京医歯大・医・精神*，信州大・医・精神**）

〔要　約〕

Wistar 系雄性ラットにストレスを負荷し、鎮痛いき値、脳内Met－enkephalin（Met－Enk）含量および脳内グルタミン酸含量の変化に関する実験を行なった。

ストレスは、ラットを拘束用ケージに入れ、25℃の水に3時間浸し、拘束水浸ストレスを負荷した。鎮痛いき値は、tail-flick test を用いて測定した。ストレス負荷により、tail-flick latencyの有意な延長が見られ、鎮痛いき値が上昇していた。脳内Met－Enk含量と脳内グルタミン酸含量は、ラットを断頭した後、それぞれＲＩＡ法と酵素蛍光法で測定した。Met－Enk含量は、ストレス負荷によりhypothalamusとhippocampus において有意に減少し、thalamusにおいても減少傾向が見られた。グルタミン酸含量は、ストレス負荷によりfrontal cortex、septum、striatum、およびhypothalamusにおいて有意な減少が見られた。

ストレス負荷によるhypothalamus、hippocampus のMet－Enk含量の減少はおもに遊離増加を反映すると思われ、鎮痛いき値の上昇との関係について考察した。また、ストレス負荷により、脳内グルタミン酸の合成や代謝に変化が生じている可能性が示唆された。

Key word：　stress、Met-enkephalin 、 analgesia

（はじめに）

ラットにストレスを負荷すると、さまざまな神経伝達物質の活性に変化が生じることが知られている。例えば、ラットに拘束水浸ストレスを負荷すると、striatumとhypothalamusにおいてγ-aminobutyric acid（ＧＡＢＡ）含量が増加し、グルタミン酸含量が減少することや（９）、striatumのＧＡＢＡニューロンの自己受容体の感受性が高まっていることが報告されている（２）。さらに、ラットにストレスを負荷すると鎮痛効果が生じることも知られている（３）。このため脳内の生理作用として鎮痛作用をもつ opioid peptide のストレスによる変化が、特に注目をあつめてきている（６）。

今回、ラットに拘束水浸ストレスを負荷し、tail-flick test により鎮痛いき値の変化を調べると同時に、脳内Met－Enk含量と脳内グルタミン酸含量を測定することにより、拘束水浸ストレスの鎮痛効果とMet－Enkニューロンへの影響について考察を行ない、グルタミン酸含量の変化に関してYonedaらの報告（９）と比較検討した。

（方法）

Wistar 系成熟雄性ラットを用いて実験を行なった。ストレスは、ラットを拘束用ケージ（シナノ製作所）に入れ、25℃の水に3時間浸し、拘束水浸ストレスを負荷した。ストレス負荷後は、以下のtail-flick test を行ない、直ちに断頭した(14:00 - 15:00 pm)。

Tail-flick test は、tail-flick test 用装置（室町機械）を用いて行なった。

Tail-flick latencyは、ラットの尾部に焦点があたるように光源を照射し、ラット

が反射的に尾部を逃避させるまでの時間をストップウォッチで測定した。光源はラットの尾部末端３cmから1.5 cmおきに５回照射し、最大値と最小値を除いた３回の平均をtail-flick latencyとした。Baseline latencyが２－３秒になるように光源の強さを調整し、cut-off timeは７秒とした。なお、baseline latencyはストレス負荷30分前に測定した。

ラットは断頭後、０℃の冷凍箱内で脳を速やかに取り出し－80℃に凍結保存した。それぞれの脳部位は、既報（７）と同様に厚さ600 μmの前額断凍結切片を作成した後、ナイフまたはパンチを用いて分割した。分割した脳は、20mM塩酸を含む１Ｎ酢酸を用いて15分間煮沸した後、超音波破砕した。この一部を蛋白測定用に取り分けた後、遠心分離した上清を用いて、Met－Enkとグルタミン酸を測定した。Met－EnkはＲＩＡ法で測定した。上清をpH7.3 －7.8 に調整した後、適当量に最終2,000 倍に希釈したMet－Enk家兎抗血清、および[^{3}H]-Met－Enk（20,000cpm ,34.4Ci/mmol,NEN）を加え、0.25% ＢＳＡと0.5% 2-mercaptoethanolを含む0.05Mリン酸Buffer（pH7.5）で総量0.5ml とし、０℃で２日間インキュベーションした。これをcharcoal分離し、結合型[^{3}H]-Met－Enkを液体シンチレーションカウンターで測定した。　使用したMet－Enk抗血清は、Leu-enkephalin,α-endorphin, β-endorphin, γ-endorphinおよびβ－lipotropinに交叉感受性を示さず、最小感受性は0.03pmolであった。

グルタミン酸は、適当量の上清を凍結乾燥した後、Nitschらの方法（４）に従って酵素蛍光法で測定した。反応液は0.4M hydrazine Buffer (pH9.0)；35μl、8mM ＮＡＤ；25μl, 0.8mM ＡＤＰ；25μl、5mg/mlグルタミン酸脱水素酵素；15μlで合計100μlとして、測定試料と40分間38℃でインキュベーションした後、１mlの再蒸留水を加えて反応を止め、直ちに励起光340nm 、測定波長450nm で測定した。蛋白定量はLowry法により、統計計算はMann-WhitneyのU-testで行なった。

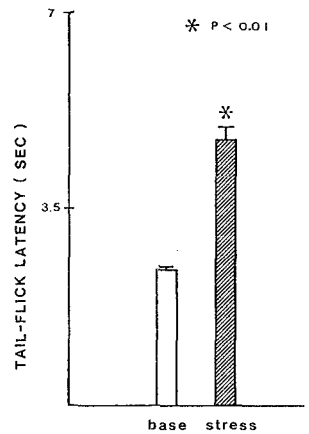


Fig. 1　Tail-flick test

Table 1　脳内Met－enkephalin含量

	methionine-enkephalin (pmol / mg prot)	
	No stress	Stress
Frontal cortex	0.45 ± 0.043	0.39 ± 0.024
Mesolimbic area	4.0 ± 0.32	3.7 ± 0.40
Striatum	6.7 ± 0.51	6.5 ± 0.54
Septum	2.8 ± 0.25	2.4 ± 0.14
Globus pallidus	32 ± 3.6	30 ± 3.6
Hypothalamus	6.5 ± 0.20	5.3 ± 0.30**
Thalamus	0.68 ± 0.046	0.54 ± 0.044
Amygdala	1.6 ± 0.11	1.4 ± 0.085
Hippocampus	0.51 ± 0.018	0.43 ± 0.025*
Substantia nigra	1.3 ± 0.061	1.1 ± 0.080
Ventral tegmental area	2.1 ± 0.11	1.9 ± 0.11
Hypophysis	23 ± 1.8	23 ± 1.7

**P < 0.02　　*P < 0.05

（結果）

Tail-flick test の結果をFig. 1 に示す。拘束水浸ストレス負荷後のtail-flick latency (4.60sec) は、baseline latency(2.56sec)の約２倍に延長し、有意な変化

であった。　脳内Met－Enk含量の結果を　Table 1に示す。脳内Met－Enk含量は不均一な分布を示し、Hongらの報告（1）とほぼ同様なパターンを示した。拘束水浸ストレス負荷によりMet－Enk含量は、hypothalamusとhippocampus において有意に減少し、thalamusにおいて減少傾向(P<0.1）が認められた。

脳内グルタミン酸含量の結果をFig.2に示す。脳内各部位のグルタミン酸含量は、ほぼ均一な分布を示し、Yonedaらの報告（9）とほぼ同様な値であった。拘束水浸ストレス負荷によりグルタミン酸含量は、frontal cortex、septum、striatum、hypothalamusにおいて有意に減少していた。

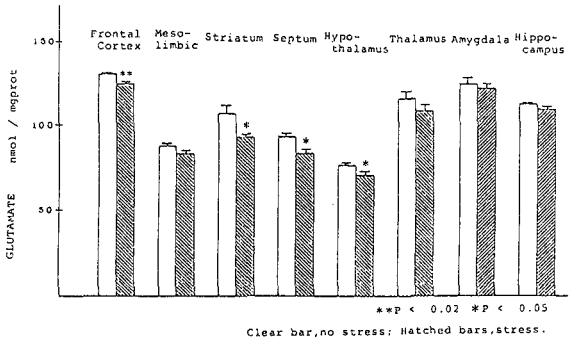


Fig.2　脳内グルタミン酸含量

（考察）

拘束水浸ストレス負荷により、tail-flick latencyが延長し、鎮痛効果を生じていた。脳内Met－Enk含量は拘束水浸ストレス負荷によりhypothalamusとhippocampusで有意に減少し、thalamusにおいて減少傾向が見られたが、この減少はおもにMet－Enkの遊離増加を反映していると思われる。Seegerら（6）もautoradiography を用いた実験で、footshock やcold water swim によりラットのmedial hypothalamus やthalamusにおいて、[^{3}H]-diprenorphine binding が有意に減少し、これはopioid peptideの遊離が増加したことによると報告している。また、morphineの脳内局所注入実験で、caudal hypothalamus やmedial thalamus において鎮痛効果がみられたという報告（5、8）もあり、hypothalamusやthalamusのMet－Enk遊離増加が、拘束水浸ストレスの鎮痛効果に関与している可能性があり、今後さらに検討していく必要があると思われる。

脳内グルタミン酸含量は拘束水浸ストレス負荷により、Yonedaらの報告（9）と同様にstriatumやhypothalamusで減少していたが、さらにfrotal cortex とseptumにおいても減少が認められ、この4部位においてグルタミン酸の合成や代謝に変化が生じていることが示唆された。

（文献）

1) Hong,J.S.et al(1977) Brain Res.,134;383　2)Kuriyama,K.et al(1984) J.Neurochem.,42;943　3)Lewis,J.W.et al(1980) Science,208;623 4)Nitsch,C.et al(1979) Neurosci.Lett.,11;295　5)Pert,A.and Yaksh ,T. (1974) Brain Res.,80;135　6)Seeger,T.F. et al(1984) Brain Res.,305;303 7)Toru,M.and Takashima,M.(1985) Neurophamacol.,24;231　8)Yaksh,T.L, et al(1976) Brain Res.,114;83　9)Yoneda,Y.et al(1983) J. Neurochem.,40;350

113. ラット脳における心房性ナトリウム利尿ポリペプチドの存在及び分布について

森井成人*・中尾一和*,**・坂本　誠*・菅原　照*
伊藤　裕*・山田敬行*・塩野尚三*・井村裕夫*
(京都大・医・第二内科*, RI 総合センター**)

〔要　約〕

最近、種々の心房性ナトリウム利尿ポリペプチド（ ANP）がヒト及びラット心房より単離同定され、その生理的意義が注目されている。本報告では、α－rat ANP （α－rANP）に特異的なradioimmunoassay （RIA ）を用いて、 ANPが、ラット脳内に広範に分布することを明らかにするとともに、脳内 ANPの存在様式について高速ゲル濾過（HP-GPC）を用いて検討した。更に絶水時の脳内 ANP含量の変動についても検討した。α－rANP様免疫活性（ -LI）は視床下部、中隔に高濃度存在し（21-23 ng/g tissue ）、更に、中脳、大脳皮室、嗅脳、視床、橋延髄及び海馬でも検出された （2-8 ng/g）。線条体、小脳及び下垂体ではα－rANP－LIは検出されなかった。HP-GPCによる解析の結果、脳内α－rANP－LIの主要な成分は、α－rANPの溶出部位に一致して溶出される small molecular weight form であることが明らかにされた。この結果は、心房でのα－rANP－LIの主要な成分が、high molecular weight form のγ－rANPであることと対照的であった。 5日間の絶水により心房内α－rANP－LI含量は有意の減少を示し（10.3± 2.8μg V.S 17.3± 2.3μg 対照群、P < 0.05）、これと平行して腎臓のα－rANP－LI含量も有意に減少した（2.0 ± 0.5 ng/kidney V.S 4.6± 0.5 ng/ kidney 対照群、P < 0.01）。これら心臓及び腎臓のα－rANP－LI含量の変動とは対照的に脳各部位のα－rANP－LI含量には、有意の変動を認めなかった。以上の成績より、 ANPが脳内に広く分布することが明らかになり、脳内 ANPが心臓に由来するものでなく脳で合成されること、更に脳内 ANPの生合成、分泌調節が心臓のそれらと異なることが示唆された。

Key word： atrial natriuretic polypeptide　radioimmunoassay　rat brain

［目的］心房抽出物中に強力なナトリウム利尿活性及び血管平滑筋弛緩活性が存在することが明らかになって以来（1 ）、種々の心房性ナトリウム利尿ポリペプチド(ANP) が、ヒト及びラット心房より単離同定され（2,4 ）、水、電解質及び血圧調節における生理的、病態生理的意義が注目されている。私達はα－human ANP （ α－hANP）及びα－ rat ANP （ α－rANP）に特異的なradioimmunoassay (RIA) を確立し、ヒト及びラット心房に多量のα－ ANP様免疫活性(-LI) の存在することを報告した（9 ）。また、私達は、ラット腎臓にもα－rANP－LIの存在すること（11）、更にANP が心臓より分泌されるホルモンであること（12）を明らかにした。

近年、種々の生理活性ペプチドが末梢組織及び中枢神経系の相方に存在することが明らかにされているが、この知見は、ANP もまた中枢神経系に存在し得る可能性を示唆する。本報告にて、私たちは ANP がラット脳内に広範に分布することを明らかにすると共に、その存在様式についてゲル濾過を用いて検討した。更に、私たちは水制限の脳内ANP 含量への影響を検討し、同時に測定した心房内及び

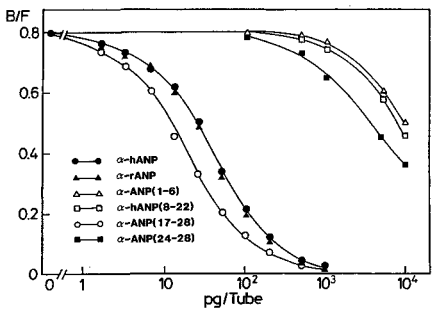


Fig. 1. Typical standard curves of α-rANP and α-hANP and cross-reactivities of their related fragments.

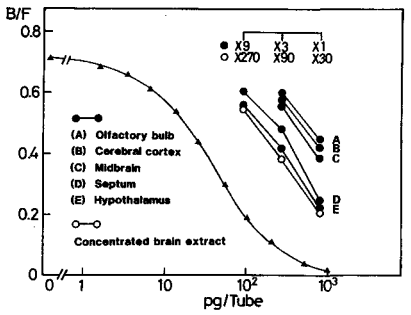


Fig. 2. A standard curve of α-rANP and dilution curves of the extracts from whole brain and respective brain regions.

腎臓内ANP 含量と比較した。

［方法］　対象：12週齢の雄性Wistar系ラットを用いて検討した。水制限実験では５日間の絶水を施行後、断頭にて脳、心臓及び腎臓を摘出した。組織抽出：脳は摘出後直ちにGlowinski-Iversenの方法（３）に準じて分割し、心臓は心房部分を切離した。組織は10倍量の0.1 M 酢酸中にて５分間煮沸後homogenizeし、18000 x g, 30 分間の遠沈分離後の上清を抽出物とし、α－rANP－LI含量を測定した。また、脳内ANP の存在様式を明らかにするため、全脳抽出物及び視床下部抽出物をそれぞれSep-pak(Waters) にて濃縮後、高速ゲル濾過（HP-GPC）に供した。

RIA ：抽出物中のα－rANP－LI含量はα－rANPに特異的な RIAを用いて測定した。RIA は既に報告した方法に従い行なった（7,9 ）。本実験に用いたRIA は、α－rANP及びα－hANPを同等に認識し、モル比でα－ANP(17-28)と100%の交叉率を示した。α－ANP(1-6), α－hANP(8-22)及びα－ANP(24-28）との交叉率はモル比でそれぞれ0.05%、0.2 %及び0.09%であった（図１）。

Table 1. Regional distribution of α-rANP-like immunoreactivity in rat brain and pituitary

Region	Tissue weight mg	α-rANP-LI ng/g
Hypothalamus	52 ± 2.6	22.7 ± 1.48
Septum	18 ± 0.9	21.9 ± 0.80
Midbrain	107 ± 5.0	7.5 ± 0.43
Cerebral cortex	725 ± 19.7	5.5 ± 0.24
Olfactory bulb	62 ± 2.5	5.4 ± 0.34
Thalamus	108 ± 5.6	5.2 ± 0.27
Pons-Medulla	205 ± 5.2	2.5 ± 0.17
Hippocampus	127 ± 5.2	2.3 ± 0.25
Striatum	66 ± 6.0	< 1.5
Cerebellum	223 ± 4.3	< 1.5
Pituitary gland	8 ± 0.4	< 1.5
Whole brain	1470 ± 21.3	5.5 ± 0.24

Values are mean ± SEM from 10 male Wistar rats.

高速ゲル濾過（HP-GPC）：HP-GPCはTSK-GEL G2000SW を用いて、既に報告した方法に従って行なった（９）。

［結果］（脳内分布及び存在様式）　ラット全脳抽出物及び脳各部位の組織抽出物の希釈曲線とα－rANPの標準曲線とに良好な平行関係が認められた（図２）。表１にα－rANP－LIの脳内分布を示す。α－rANP－LIは視床下部、中隔に高濃度存在し、中脳、大脳皮質、嗅脳、視床、橋延髄及び海馬にもα－rANP－LIを検出した。線条体、小脳及び下垂体ではα－rANP－LIは検出されなかった。図３にラット全脳、視床下部及び心房の抽出物中のα－rANP－LIのHP-GPCによる溶出パターンを示す。全脳抽出物中のα－rANP－LIの主要な成分は、α－rANPの溶出部位に一致して溶出された。分子量13k 及び3kから5kに相当する部位には、それぞれγ－rANP, β－rANPと考えられる２つの小ピークを認めた（図３Ａ）。視床下部抽出物中のα－rANP－LIの溶出パターンも、全脳抽出物のそれとほぼ同様の結果を示し、視床下部のα－rANP－LIの主要な成分がα－rANPの溶出部位に一致して溶出される low molecular weight form であることが明らかになった（図３Ｂ）。以上に示した脳内α－rANPの存在様式は、心房内のそれと明らかな対照を示した。即ち、ラット心房抽出物中のα－rANP－LIの溶出パターンでは、主要ピークは分子量13k のγ－rANPに相当する部位に溶出され、α－rANPの溶出部位には少量の免疫活性しか検出されなかった。

（水制限実験）　５日間の絶水後、ラット体重は157 ± 1.7g で、飲水を許可された対照群の259 ± 1.4g に比べ著しく減少した。表２に絶水後の脳各部位、心房及び腎臓の組織重量、α－rANP－LI濃度と含量を、対照群のそれらとともに示す。心房では、組織重量当たりのα－rANP－LI濃度は、絶水群と対照群で有意差を示さなかったが、心房内α－rANP－LI含量は、絶水にて有意に減少した（ P< 0.05）。腎臓では絶水によりα－rANP－LI濃度及び含量共に有意の減少を認めた（P<0.05 ,P<0.01）。

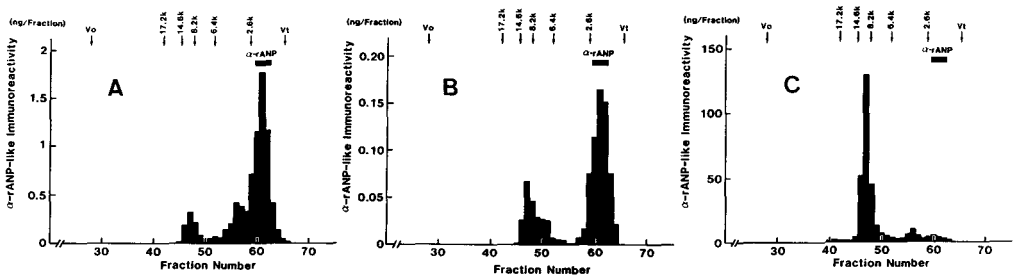


Fig. 3. Gel filtration profiles of the extracts from rat whole brain (A), hypothalamus (B) and rat atrium(C). Arrows show the elution positions of a series of myoglobins with their molecular weights expressed in k daltons.

一方、絶水後の脳各部位のα－rANP－LI濃度及び含量は共に、対照群と比べ有意の差を示さなかった。

Table 2. Effects of water-deprivation on concentration and content of α-rANP-like immunoreactivity in rat brain

Tissue	Control rat Weight	α-rANP-LI Concentration	α-rANP-LI Content	Water-deprived rat Weight	α-rANP-LI Concentration	α-rANP-LI Content
Hypothalamus	51 ± 4.9	23.2±3.6	1.15±0.19	53 ± 2.5	20.6±1.6	1.07±0.08
Septum	19 ± 1.6	20.6±1.3	0.40±0.04	18 ± 1.0	18.8±0.8	0.33±0.03
Midbrain	110 ± 7.9	8.2±0.6	0.92±0.13	104 ± 6.6	7.2±0.5	0.75±0.09
Cerebral cortex	742 ±21.4	5.8±0.6	4.29±0.32	707 ±33.7	5.7±0.2	4.00±0.18
Olfactory bulb	60 ± 3.9	4.9±0.5	0.28±0.02	63 ± 3.5	5.4±0.5	0.34±0.03
Thalamus	113 ± 7.2	4.9±0.5	0.49±0.05	102 ± 8.6	4.4±0.7	0.43±0.04
Pons-Medulla	206 ±11.0	2.4±0.3	0.51±0.08	205 ± 1.5	2.5±0.1	0.52±0.03
Hippocampus	120 ± 4.6	2.1±0.4	0.26±0.06	113 ± 9.1	2.4±0.3	0.33±0.06
Striatum	78 ± 8.0	<1.5		54 ± 5.2	<1.5	
Cerebellum	225 ± 6.0	<1.5		221 ± 6.6	<1.5	
Whole brain	1500 ±30.2	5.6±0.5	8.31±0.70	1438 ±25.4	5.5±0.2	7.84±0.20
Kidney	1139 ±35.2 (mg)	4.1±0.5 (pg/mg)	4.60±0.50 (ng)	767 ±15.4** (mg)	2.6±0.7* (pg/mg)	2.00±0.50** (ng)
Atrium	89 ± 4.4 (mg)	209±24.4 (ng/mg)	17.3±2.30 (μg)	50 ± 2.7** (mg)	195±12.4 (ng/mg)	10.3±2.8* (μg)

Vaues are mean ± SEM from 5 male Wistar rats weighing 200-250 g.
Significantly different from corresponding value in control rats, *P <0.05; ** P <0.01

［考察］　本成績より、心臓から単離同定されたANP がラット脳内にも広範に分布することが明らかになった。このRIA による成績は免疫組織化学を用いて検討したANP の脳内分布の成績ともよく一致した（5,6 ）。ANP が視床下部及び中隔に高濃度に存在することは、これらの部位が中枢性の　水、電解質及び血圧調節に重要な役割を担っている点を考慮すると極めて興味深い結果と考えられる。最近私達は、ラットにおいて、α－hANPの側脳室投与によってangiotensin II投与後、あるいは絶水後の飲水行動が有意に抑制されることを観察した（8 ）。これらの成績は、ANP が中枢神経系に於いても　水、電解質代謝あるいは血圧調節に関与することを示唆する。

HP-GPCによる解析の結果、脳内 ANPの存在様式は心房のそれと異なり、α－rANPの溶出部位に一致して溶出されるsmall molecular weight form が主要な成分であることが明らかになった。更に、水制限実験によって、絶水時の脳内ANP 含量の変動は心房及び腎臓のそれらと異なっていることが明らかにされた。絶水による心房内α－rANP－LI含量の減少は、既に報告されているラットANP 前駆体のmRNAの減少（10）、あるいは心房抽出物中のナトリウム利尿活性の減少（13）と一致する。絶水により、心房内ANP 含量が減少し、これと平行して腎臓内のANP 含量が減少したのと対照的に、脳内ANP 含量には有意の変動を認めなかったことは、脳内ANP が心臓に由来するものでなく脳で合成されること、更に、脳内ANP の生合成、分泌調節が心臓のそれらと異なることを示唆した。以上の成績より、ANP は心臓から分泌されるホルモンとしてのみならず、神経ペプチドとして中枢神経系においても生理的意義を有するものと思われ今後の検討が期待される。

［文献］

1. de Bold, A.J., Borenstein, H.B., Veress, A.T., and Sonnenberg, H. (1981) Life Sci. 28:89
2. Flynn, T.G., de Bold, M.L., and de Bold, A.J. (1983) Biochem. Biophys. Res. Commun. 117:859
3. Glowinski, J., and Iversen, L.L. (1966) J. Neurochem. 13:655
4. Kangawa, K., Fukuda, A., and Matsuo, H. (1985) Nature 313:397
5. Kawata, M., Ueda, S., Nakao, K., Morii, N., Kiso, Y., Imura, H., and Sano, Y. (1985) Histochemistry in press
6. Kawata, M., Nakao, K., Morii, N., Kiso, Y., Yamashita, H., Imura, H., and Sano, Y. (1985) Neurosci. in press
7. Morii, N., Nakao, K., Sugawara, A., Sakamoto, M., Suda, M., Shimokura, M., Kiso, Y., Kihara, M., Yamori, Y., and Imura, H. (1985) Biochem. Biophys. Res. Commun. 127:413
8. Nakamura, M., Katsuura, G., Nakao, K., and Imura, H. (1985) Neurosci. Lett. in press
9. Nakao, K., Sugawara, A., Morii, N., Sakamoto, M., Suda, M., Soneda, J., Ban, T., Kihara, M., Yamori, Y., Shimokura, M., Kiso, Y., and Imura, H. (1984) Biochem. Biophys. Res. Commun. 124:815
10. Nakayama, K., Ohkubo, H., Hirose, T., Inayama, S., and Nakanishi, S. (1984) Nature 310:699
11. Sakamoto, M., Nakao, K., Kihara, M., Morii, N., Sugawara, A., Suda, M., Shimokura, M., Kiso, Y., Yamori, Y., and Imura, H. (1985) Biochem. Biophys. Res. Commun. 128:1281
12. Sugawara, A., Nakao, K., Morii, N., Sakamoto, M., Suda, M., Shimokura, M., Kiso, Y., Kihara, M., Yamori, Y., and Imura, H. (1985) Biochem. Biophys. Res. Commun. 129:439
13. Thibault, G., Garcia, R., Cantin, M., and Genest, J. (1983) Hypertension 5(Supp I):I-75

114. 向精神薬投与後のラット前頭葉皮質の VIP 含量の変化

三ツ汐 洋・高嶋瑞夫・俣賀宣子・融 道男*
(国立武蔵療・神経センター・疾病3部, 信州大・医・精神*)

〔要 約〕

Vasoactive intestinal polypeptide(ＶＩＰ)に対する特異的な抗体を作成し、ラジオイムノアッセイ系を確立した。これを用いて数種の向精神薬を急性あるいは慢性に投与したときの前頭葉皮質におけるＶＩＰ含量の変化を検討した。作成した抗体はＶＩＰ(18-28)NH_2,PHI(20-27),secretinとは交叉反応性を示さず、porcine CCK-33とは0.05%の交叉反応性を示した。希釈倍率1:100,000で、最少感受性は10 fmol/assayであった。急性投与ではハロペリドール(ＨＡＬ)1 mg/kg ipとカルバマゼピン(ＣＢＺ)50mg/kg ipの併用投与でＶＩＰが114%に増加していた。ＨＡＬとＣＢＺの単独およびトリヘキシフェニディール(ＴＲ),イミプラミン(ＩＭＩ),デジプラミン(ＤＥＳ)の投与では変化はなかった。40日間の経口慢性投与後ではＨＡＬで115%に増加しており、ＴＲの併用はこの増加を一部回復していた。三環系抗うつ剤ではＩＭＩでは変化はみられなかったが、ＤＥＳの19および37mg/kg/day投与でそれぞれ86%と80%に減少していたが、59 mg/kg/dayでは有意の減少ではなかった。これらの結果は向精神病薬のうちあるものは、ＶＩＰニューロンの活動性を変化させていることを示唆しており、脳内ＶＩＰの機能および向精神薬の作用機序を知る手がかりとなるものと思われる。

Key word： VIP, psychotropic drugs, radioimmunoassay

ＶＩＰは中枢神経系において神経伝達物質、あるいは神経修飾物質として働いていると考えられるが、その脳内における機能については充分明らかにされていない。今回数種の中枢神経系に働く薬物を急性あるいは慢性に投与して脳内ＶＩＰに対する影響を検討したので報告する。

［ 方法 ］

実験にはWistar系雄性ラットを用いた。脳は0°Ｃの冷凍箱内で速やかに取り出し-80°Ｃで凍結保存した。前頭葉皮質はKönig & Klippel の図譜 のA10500μmより尾側に向う600μmのスライス3枚から嗅球と白質を除いた部位を-15℃の冷凍箱内で切り出した。組織に沸騰した20mM HClを含む1 M 酢酸1.5 mlを注ぎ、100℃15分間煮沸したのち超音波破砕し、一部を蛋白測定用に取り分け、8,800xg,30分間遠心分離し上清20μlをポリスチレンチューブに分注し凍結乾燥した。

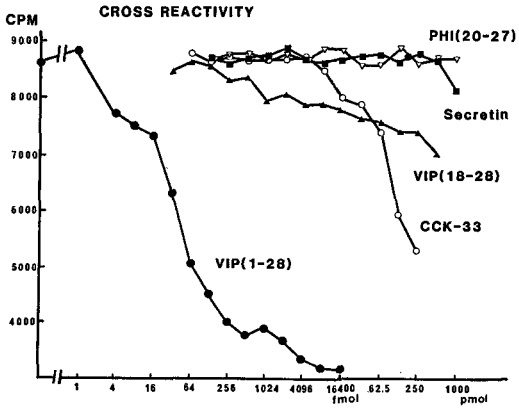


Fig. 1. Cross reactivity of anti-VIP antiserum to the related peptides.

ＶＩＰ抗血清は家兎4匹にcarbodiimideを用いてウシthyroglobulinとconjugateしたＶＩＰを反復皮内注射して得た。これらのうち２種はＶＩＰ(18-28)NH_2，と交叉反応性が認められたため使用せず、残りのうち希釈倍率の高いものを測定に用いた。こ

の抗血清はsecretin, PHI(20-27)とは交叉反応しなかった。また、4種の抗血清のいずれもがCCK-33(porcine)と0.05%の交叉反応を示した(Fig. 1)が、これは入手したCCK-33にＶＩＰが混入していたためと考えられた。標識抗原はlactoperoxidaseを用いてＶＩＰを^{125}Ｉで標識し、Sephadex G 25 superfine(11x550 mm)カラムをもちいて100 mM NH_4HCO_3(pH6.0, 0.5% BSA, 0.025M EDTA, 0.05% NaN_3を含む)でゲルろ過したのち、0.2 M sucroseを等量加え、CM Sephadex C25(bed volume 2 ml)カラムで50 mM-250 mM NH_4HCO_3のgradient で溶出した。

アッセイはauthenticＶＩＰ(1 fmol～16 pmol)あるいは凍結乾燥した試料をbuffer(0.05 M NaH_2PO_4, 0.08 M NaCl, 0.25% BSA, 0.025 M EDTA, 0.05% NaN_3, pH 7.4)に再溶解し、標識抗原20,000 cpmと抗血清（最終希釈1:100,000)を加え、全量500μlとし、4℃で48時間インキュベートした。B/F分離は1%ウシγ-globulin 100μlを加えたのち、BSAとEDTAを含まないbufferに溶かした23% polyethyleneglycol 1 mlを加えてかくはんし、4℃,2500xgで20分間遠心分離し、沈渣の放射活性を測定した。統計検定はStudentのt-test（両側）を用いた。

薬物投与方法　１．ＨＡＬ,ＴＲ,ＣＢＺの単独あるいは併用投与：急性投与群はＨＡＬとＴＲは1mg/kg,ＣＢＺは50mg/kgを単独あるいはＨＡＬ＋ＴＲ，ＨＡＬ＋ＣＢＺとして腹腔内に投与した。慢性投与群は、飼料1kgにＨＡＬ，ＴＲは50mg、ＣＢＺは5gを混入し急性投与群と同じく単独あるいは併用投与し、40日間飼育し断頭した。　２．三環系抗うつ薬：急性投与群はＩＭＩとＤＥＳを10 mg/kgと20 mg/kg腹腔内投与し1時間後に断頭した。慢性投与群は飼料1 kgあたりにそれぞれの薬物を0.25, 0.5, 1.0 gを混じたものを40日間投与し、断頭した。慢性投与時の体重、摂食量、薬物摂取量をTable 1,2に示す。

Table 2. Body weight, amount of food and drug intake after 40-day administration.

	Body weight mean sd(g)	Food intake (g/kg/day)	Drug intake (mg/kg/day)
Control	336 ± 14	76.5	—
HAL	259 ± 21	82.2	4.1
HAL+TR	261 ± 15	78.8	3.9+3.9
TR	277 ± 43	82.5	4.1
CBZ	270 ± 23	87.8	440
HAL+CBZ	222 ± 37	75.9	380+3.8

Table 3. Body weight, amount of food and drug intake after 40-day administration.

	Body weight mean ± sd(g)	Food intake (g/kg/day)	Drug intake (mg/kg/day)
Control	355 ± 21	103	—
IMI 0.25	250 ± 15	79.9	20.0
IMI 0.5	225 ± 14	71.8	35.9
IMI 1.0	195 ± 6	62.9	62.9
DES 0.25	248 ± 25	77.4	19.4
DES 0.5	224 ± 14	73.7	36.9
DES 1.0	187 ± 13	59.2	59.2

［結果］

急性投与では前頭葉皮質のＶＩＰはＨＡＬ+ＣＢＺで14%の有意の増加がみられたがＨＡＬ,ＣＢＺでは増加傾向、ＴＲでは減少傾向がみられたがいずれも有意ではなかった。三環系抗うつ薬では変化はなかった(Fig. 2a, 3a)。

慢性投与ではＨＡＬで15%増加しており、ＴＲを

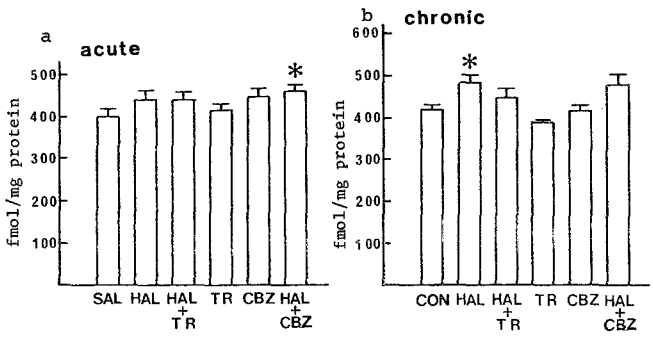


Fig. 2. VIP content a: 1 hour after ip injection of haloperidol, trihexyphnidyl and carbamazepine b: after 40-day administration.
*: $p < 0.05$ vs. SAL(saline treated) or CON(control).

併用するとこの増加はみられなかった。TRでは減少傾向があったが有意ではなかった。CBZは影響を与えなかった(Fig.2b)。抗うつ薬はIMIでは変化がなかったがDES 0.25, 0.5群でそれぞれ14%と20%の有意の減少がみられた。しかし1.0群では11%の減少であり有意ではなかった(Fig. 3b)。

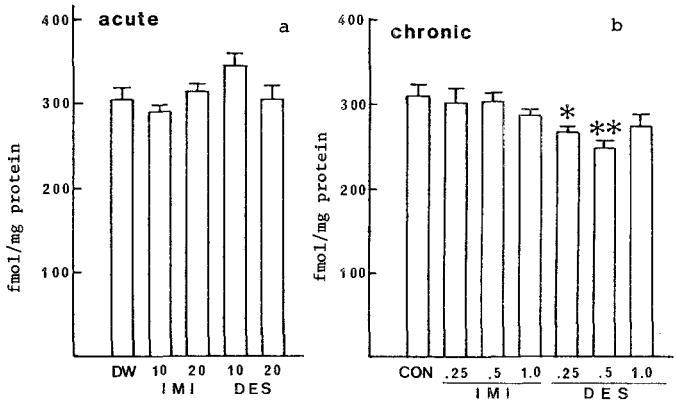


Fig. 3. VIP content a: 1 hour after ip injection of imipramine or desipramine b: after 40-day administration. *: $p < 0.05$, **: $p < 0.01$ vs. DW(distilled water treated) or CON(control).

[考察]

VIPのC端とは交叉反応しない抗体を用いて、薬物のVIP含量に及ぼす影について調べた。急性投与ではHAL+CBZでVIPが増加していたが、これはHAL, CBZとも単独でも上昇傾向があったので、これらの相加効果のためと考えられる。慢性投与でもHALでVIPの増加がみられた。ドーパミンとVIPの関係については、線条体でドーパミンニューロンの破壊後にVIPによるcAMPの合成が著しく減少すること[3]が報告されている。今回の結果は、線条体だけでなく、前頭葉皮質においても両者が相互作用をもつことを示唆するものと思われる。抗コリン薬に関してはアトロピンの慢性投与で皮質において、VIPの含量は減少し、レセプターは増加すること[1]が報告されている。今回、同じく抗コリン作用を持つTRでは慢性投与で減少の傾向はみられたが有意ではなかった。この理由の一つには投与量の違いがあるかもしれない。一方、IMIでは変化がなく、DESでVIPの減少がみられたことはIMIの方が抗コリン作用は強いので、抗コリン作用からは説明できない。VIPはノルアドレナリン(NA)と共働してcAMP合成を高めること[2]が知られており、DESの方がNAの取り込み阻害作用は強いので、NAニューロンに対する影響をみるため、同じ動物の青斑核のNAと代謝産物の3-methoxy,4-hydroxyphenylglycolをHPLCで測定したところ、代謝産物には変化はなく、NAはIMIでもDESでも同じ程度用量依存性に減少していた。したがってNAニューロンを介したものとは言いがたく、この点については今後の検討の余地がある。

以上のことからいくつかの向精神薬はVIPニューロンの活動性にも影響を及ぼしており、VIPの機能および薬物の作用機序を知るうえで、ひとつの手がかりになるものと思われる。

[謝辞]

VIP(18-28)NH_2,PHI(20-27)を御供与いただいた矢内原昇先生に感謝いたします。

[文献]

1) Abens, J. et al., Peptide, 5, 375-377, 1984.

2) Deschodt-Lanckman M. et al., FEBS Lett., 83, 76-80, 1977.

3) Quick M. et al., Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmac.306, 281-286, 1979.

115. 脳障害とリソゾーム
—遺伝性高ビリルビン血症 Gunn ラットにおける小脳リソゾームの変化—

佐藤　浩・慶野宏臣・青野幸子・仙波禮治・柏俣重夫
（愛知県コロニー研・周生期）

〔要　約〕

遺伝的に黄だんを発症する Gunn ラットでは生後10日頃より小脳の発育が停止し，小脳リソゾーム酵素活性は対照ラットに比べ著しく高い値を示す．これらのリソゾーム酵素は活性増加の割合と密度勾配遠心における分布の違いから acid phosphatase, β-glucuronidase, arylsulfataseを代表とする 3つの酵素群に区別できる．黄だんラットの小脳ホモジェネイトに Triton X-100 を加えると acid phosphatase に比べてarylsulfatase, β-glucuronidaseでは新たに出現する酵素活性の割合が多く，それぞれの酵素によってリソゾーム内での存在状態が異なっていることが示唆された．酵素組織化学的検索により acid phosphatase は黄だんラットに現れるミクログリアに強い活性が認められる他，対照ラットのプルキンエ細胞，小脳核細胞にも比較的強い活性が検出された．β-glucuronidaseはミクログリアに強い活性がみられたが，プルキンエ細胞，小脳核細胞にはほとんど活性が認められなかった．これらの実験結果からプルキンエ細胞や小脳核細胞とミクログリア細胞ではリソゾームに含まれている酵素の種類や存在状態が異なっていることが示唆された．

Key word : LYSOSOMES, CEREBELLUM, BILIRUBIN

先天性ビリルビン代謝異常により高ビリルビン血症をひきおこすGunnラットホモ接合体(jj)ではビリルビンによる小脳発育障害（低形成）が生後10日頃より顕著になる(1,2,3,4).この時期の小脳リソゾーム酵素活性とその Percoll密度勾配遠心による分布パターンを調べたところ(5), acid phosphatase, α－およびβ-mannosidase, acid lipaseなどは比重 1.05 付近の軽いところに分布し，jjではヘテロ接合体(j+)に比べて僅に高い活性がみられた． arylsulftase と cathepsinは比重 1.10 と1.05に二相性の分布をし，jjでは j+ の 2-3倍の活性を示した．またβ-glucuronidaseは比重 1.10と 1.03 に分布し，jjで著しく強い活性が認められた．本報告ではホモジェネート中の acid phosphatase, α-mannosidase, arylsufatase, β－glucuronidase 活性に与える界面活性剤の影響を調べ，acid phosphataseとβ-glucuronidaseについては酵素組織化学的な検討をおこなった．

［実験材料と方法］

生後15および20日齢の Sprague-Dawley 系の Gunn ラットを用いた(6).小脳は 9 vol. の 0.25 M しょ糖を加え 0℃，約2,000 rpm で同一の Potter-Elvehjem型ホモゲナイザーを用いて 5回上下してホモゲナイズした．Triton X-100 (0.1%) での処理は 37 ℃，1 時間おこなった．α-mannosidase活性は Zanettaらの方法によって測定した(7).他の酵素は以前報告した方法で活性を測定した(5). acid phosphatase 活性

本研究の一部は厚生省神経疾患研究委託費及び心身障害研究委託費の援助を受けた．

測定には基質として p-nitrophenylphosphate を用いた．組織化学につかわれたラットはクロロホルム麻酔後 0.1% $CaCl_2$ を含む 4% ホルマリン液にて灌流固定しさらに小脳虫部を同じ固定液で 24 時間固定し，Holtの Gum－しょ糖液で 24 時間洗った後ビブラトームを使って厚さ 15 μm の切片とした．acid phosphataseは naphthol AS-TR phosphate を基質として pH 6.0 ，β-glucuronidaseは naphtol AS-BI glucuronideを基質として pH 5.0 の条件下で Bark-Andersen法にてそれぞれの活性を検出した (5,6).

[結果]

図1Aにjj小脳ホモジェネートを10,000 x g，30分間遠心した後，上清にくる活性の全活性（ホモジェネートに 0.1% Triton を加えた時の活性）に対する割合を示した．acid phosphatase, α-mannosidaseはそれぞれ 40 および 51%と高値を示したが，arylsulfatase,β-glucuronidae はおのおの 11 および 14 %と低い値であった．図1Bに Triton 処理により新たに jj のホモジェネートに現れる活性の割合を示した．acid phosphatase, α-mannosidaseは Triton 添加により大きな活性の変化はなかったが arysulftase, β-glucuronidaseではそれぞれ 102および 72%の活性の増加が認められた．図 2に小脳における acid phosphatase,β-glucuronidaseの分布を示した．15日齢の j+ では acid phosphatase 活性がプルキンエ細胞，小脳核細胞に比較的強くめられた（図 2A,B). それに比べてβ-glucuronidaseは プルキンエ細胞，小脳核細胞において僅な活性しか示さなっかった（図2D,E）．jjのみに出現するミクログリアと考えられる S細胞(4) では acid phosphatase,β-glucuronidaseとも強い活性が認められた（図2C,F).

[考察]

jjであまり活性の高くない acid phosphatase やα-mannosidaseは軽いリソゾームに属する酵素であるが(5)，ホモジェネート上清にすでに多くの活性がみられ（図1A) Triton処理なしでも大部分の活性が出現した（図1B). jj で活性が高い arylsulfatase とβ-glucuronidaseは主として重いリソゾームに含まれる(5) が，ホモジェネート上清の活性は少なく，Triton処理することによって初めて強い活性が現れた．jjで出現する S細胞に含まれるリソゾーム

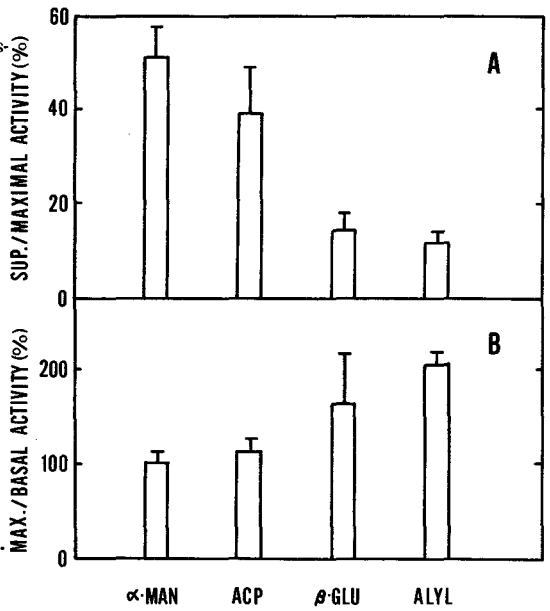


Fig.1 (A) Effect of homogenization on the appearance of enzyme activities in the 10,000 x g supernatant from cerebellar homogenate of 15-day-old homozygous Gunn rats. The maximal enzyme activity of the homogenate was determined after incubation for 1 h in the presence of 0.1 % Triton X-100. (B) Ratio in % of the basal (without Triton X-100) to the maximal activity. Means ± S.D. of 7 determinations are given. SUP., supernatant; MAX., maximal activity; α-MAN, α-mannosidase; ACP, acid phosphatase; β-GLU, β-glucuronidase; ALYL, arylsulfatase.

はその中に膜様の構造を多数含んでおり両群で見られる界面活性剤やホモジェナイズすることによる影響の違いはリソゾームの構造上の違いのためかもしれない．組織化学的に acid phosphatase の存在を調べるとS細胞のみでなくプルキンエ細胞，小脳核細胞に活性が分布したが（図2A,B C），β-glucuronidaseはほとんどS細胞に限局して存在した（図2 D. E. F）．従って jj/j+ の活性比を見た場合，β-glucuronidaseはj+でほとんど活性がないので高い値となるが，acid phosphatase では j+ でもプルキンエ細胞や小脳核細胞に多量の酵素が存在するために jj で S細胞の出現によって新たな活性が加わっても活性比はあまり大きな値とならないのであろうと思われる．今後 arylsulfataseとβ-glucuronidaseおよび acid phosphatase 間で jj における活性の増加の程度や密度勾配における分布の違いが生じる理由についても検討したい．

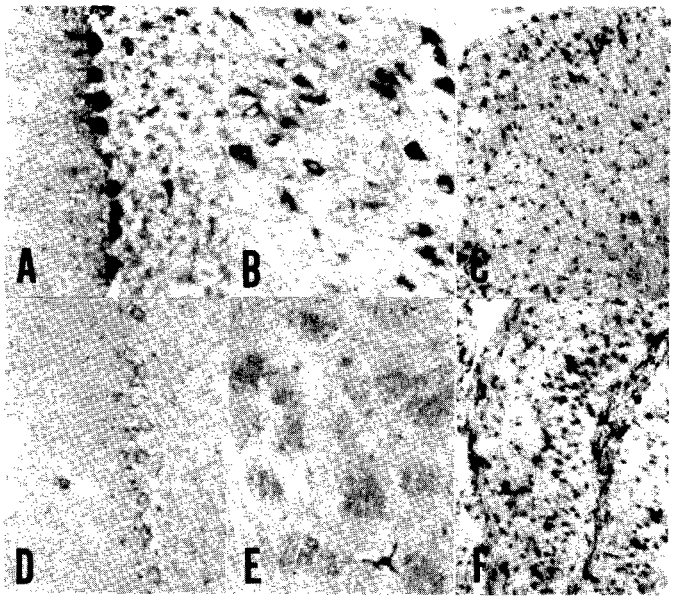


Fig. 2 Enzyme-histochemical demonstration of acid phosphatase (A, B and C) and β-glucuronidase (D, E, F) in cerebellum of 15-day-old heterozygous (A, B, D, E) and homozygous (C and F) Gunn rats. A and D, Purkinje cells; B and E, cerebellar nuclear cells; C and F, S cells (7). x 100.

［文献］

1. Shutta, H. S. and Jhonson, L. (1967) J. Neuropath. Exp. Neurol. 26, 377－396.
2. Sato, H. et al. (1977) Biol. Neonate 32, 158-165.
3. Katoh-Semba, R. et al. (1982) Biomed. Res. 3, 319-329.
4. Keino, H. (1982) Cell Tissue Res.223, 593-601.
5. 佐藤浩ほか （1984）神経化学，23. 159-161.
6. 柏俣重夫ほか （1985）日本疾患モデル動物研究会記録 1，28-34.
7. Zanetta, J-P. et al. (1980) J. Neurochem. 34, 831-834..
8. 斎藤多久馬 （1975）新組織化学（小川和朗，武内忠男，森富編）朝倉書店 220-273.
9. Hayashi, M. et al. (1964) J. Histochem. Cytochem. 12, 293-297.

116. 脳のアミロイド

徳武　哲・羽賀誠一・石井　毅・亀谷富由樹*・篠田友孝*
（東京都精神研・神化・超微，東京都立大・理・生化*）

〔要　約〕

1．Alzheimer 病および老人痴呆症患者の剖検脳に見出される老人斑(Senile Plaque:SP)と原線維変化(Neurofibrillary Tangle:NFT)を構成するタンパク質の化学的性質を明らかにするため，その精製を試みた。

2．SPとNFT の確認は，試料溶液一滴と1% Congo red溶液一滴をスライドグラス上にとり，よく混合してから，偏光顕微鏡を用いて観察した。SPもNFT もともに黄色あるいは青白色に輝く部分とオレンジ色に着色する部分から構成されるという特徴により確認出来たが，形態的にはSPはほぼ球形であったのに対し，NFT の形態は幾つかの紡錘形をした線維束からなりSPと区別することが出来た。

3．SPもNFT もポリトロンでホモジェナイズしてもほとんどこわれず，堅固な構造を持っているものと推定された。精製は 0.85M, 1.5M sucroseを含んだbufferを用いた分画遠心法により行った。SPもNFT も細胞核とほぼ同じ分画に見出された。共存している細胞核や結合組織は subtilisin および collagenase により分解したがSPやNFT はあまり分解を受けなかった。酵素消化により分解を受けたものはショ糖密度不連続勾配遠心法により除いた．

4．精製されたSPとNFT の微細構造は電子顕微鏡により観察し，その特徴を明らかにするとともに，8 M 尿素に可溶化される成分についてSDS-ゲル電気泳動法を行った。

Key word：　Senile Plaque,　Neurofibrillary Tangle,　Amyloid Protein

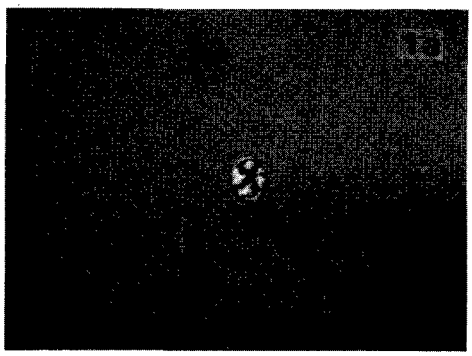
Alzheimer 病および老人痴呆症患者の剖検脳には，病理的特徴として老人斑(SP)，原線維変化(NFT)およびアミロイド沈着血管が見出されている(6,10)。これらの変性組織は，アミロイド物質をよく染色するCongo red により染色され，偏光下で光学活性を示すことからアミロイド物質が沈着して形成されたものと予測されている。ここ十数年間の体中の各種の臓器のAmyloidosis に関する研究の結果可溶性のM.W.10.000-50.000 のいくつかのグループのアミロイドプロテインの構造が明らかになっており(2,3)，SPやNFT の構成タンパク質に対する興味がおうきくなっている。そこで本報では，剖検脳よりSPやNFT の精製を試みたので，その結果について報告する。

［実　験　法］

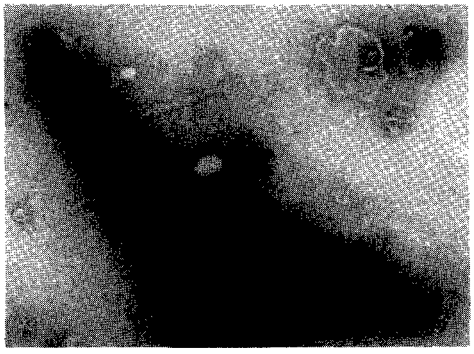
(1) 材料，本実験に用いた剖検脳はAlzheimer 病により死亡した男性患者のものを用いた。剖検脳は摘出後-70°C 保存したものを用いた。

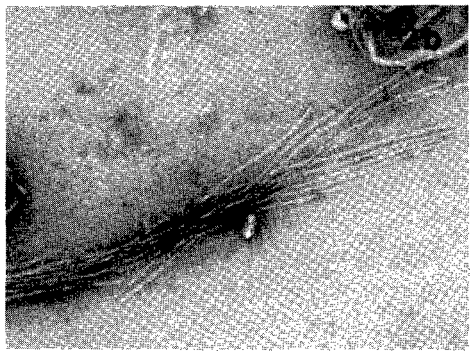
(2) 染色，剖検脳をホモジェナイズした溶液一滴をガラス棒でスライドグラス上に取り，これにやはり一滴の1% COngo red溶液を加え，よく混合してから偏光顕微鏡により観察した。

(3) 精製，剖検脳5 g をとり，これに10mM NaH_2PO_4-1mM EDTA-0.85M sucrose,pH 6.8のbuffer 25mlを加え，ポリトロンを用いホモジェナイズし，日立RPR 20-2のローターで，15,000 rpmで15 min遠心した。沈澱には細胞核，結合組織のほか，SP,NFTそれにアミロイド沈着血管が見出された。沈澱を10mM NaH_2PO_4-1mM EDTA-0.1M NaCl,pH 6.8のbufferにけんだくさせsubtilisin 1mgを加え37°Cで2 h 消化を行った。酵素消化物は日立RPS 25ローターのチューブ内に作った 1.0M および 1.5M sucroseの層上にのせ遠心した(1)。Subtilisin消化により細胞核はほとんど分解され，SP,NFTおよびアミロイド血管は 1.0M-1.5M sucrose中間層と沈澱画分に見出された。この画分にはまだ結合組織がかなり残っていたので，この画分を集めて$CaCl_2$ を2 mMになるように加えて2 h collagenase 消化を行った









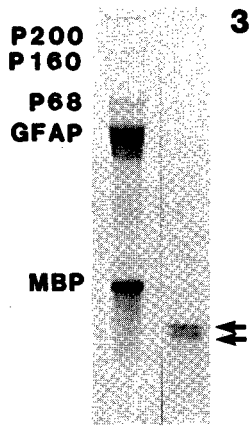
が結合組織は完全には分解されなかった(4)。消化後ショ糖密度不連続勾配遠心法により消化物を除いたがSP,NFTおよびアミロイド血管を含んだ画分の収量は約5 mgであった。

［結　果］

(1) 偏光顕微鏡による観察．図１は精製された分画をCongo red で染色し，偏向下で観察したSP(a) とNFT (b) の写真である．SPの形はほぼ球形であり，十文字形に黄色に輝く部分とオレンジ色に着色した部分が見られるという特徴により確認することが出来た。NFTも青白色に輝く部分とオレンジ色に着色する部分からなっていたが，その形態は紡錘形の線維束からなっているように観察された。黄色あるいは青白色に輝く部分とオレンジ色に着色する部分は偏光板を回転するとその位置は相互に逆転した。この分画には，このほかに，アミロイド血管や酵素分解を受けなかった結合組織が見出された。

(2) 電顕による観察．次ぎに，SPやNFT を含んだ分画をnegative staining 法により，微細線維構造の観察を試みた。Gridはcarbon coated collodion filmを用い，stainingは1%酢酸ウラニルにより行った。図１で観察されたようなおうきな形のSPやNFT は,grid filmに吸着されにくく，またたとえ吸着されても染色が強すぎて微細構造を観察しにくかった。しかし，もっと小さな構造をしたものは，よく染色され微細構造を観察することが出来たので図２に示した(a:SP,b:NFT)。NFT は脳のsliced sectionの観察からもいわれていたように，二本の線維がねじれたような構造(Paired Helical Filaments)が観察された(6,12)。SPと思われるfilaments はneurofilamentsよりも細く7-8 nmであり，NFT よりも密であり，直線性に乏しいように思われた(7,9)。

(3) SDS-gel electrophoresis,SPとNFT を含んだ画分を8 M 尿素により処理し，可溶化される部分についてSDS-gel electrophoresis を行った。ゲルは10-20%のgradient gelを用い(8),markerとしてはNeurofilaments (P 200, P 160, P 68),Glial Fibrillary Acidic Protein (GFAP),およびMyelin Basic Protein (MBP)を用いた(11)。その結果M.W. 4,000-5,000のところに２つのbandが観察された（図３矢印）。これはGlenner が脳のアミロイド血管より単離した



amyloid protein に相当すると思われた(3,5)。

［考　察］

SPやNFT 等の病変組織は通常それ自体が難溶性であるばかりでなく，それらの近傍組織とも強く結合している。従ってこれらの組織を単離しようとするとき，機械的あるいは化学的方法により，ある程度激しい条件でこれらの組織を他の組織から切り離す操作が必要である。しかし，難溶性だからといって，尿素，SDS,2-mercaptoethanol 等を含んだ溶液でboilするというような激しい条件を使えば，ある程度の可溶性成分の損失はまぬがれない。そこで，あまり破壊や損失を受けず，しかも効果的に単離する条件を見つけ出すことが，研究の目的の成否にかかわってくる。また本実験で得たSPとNFT 分画を尿素で処理して可溶性成分を抽出しても，残渣のなかには依然，ほとんど変化を受けないSPやNFT が観察されているので，不溶性coreをいかに可溶化するかということが，SPやNFT を構成するタンパク質の本質を明らかにする上で不可欠のことであろう。本実験で得られた分画はSP, NFT およびアミロイド血管等が混合しており，それらの分離には成功していない。従ってGlenner 見つけたの成分が血管のみに由来するものか，SPとNFT にも共通に含まれているのか，まだわからない。

［謝　辞］

本実験に用いた剖検脳は当研究所神経病理研究室小坂憲司先生の御好意によりいただくことが出来ました。先生の御好意と御協力に感謝します。

［文　献］

1. Allsop,D.,Landon,M.and Kidd,M. (1983) Brain Research 259,348-352.
2. 荒木淑郎，(1984)　蛋白質，核酸，酵素　29,1770-1782.
3. Glenner,G.G. (1980) N.Engl.J.Med. 302,1283-1343,
4. Glenner,G.G.and Wong,C.W. (1984) Biochem.Biophys.Res.Commun.120,885-890.
5. Glenner,G.G.and Wong,C.W. (1984) Biochem.Biophys.Res.Commun.112,1131-1135.
6. Kidd,M. (1963) Nature 197,192-193.
7. Kidd,M. (1964) Brain 87,307-320
8. Laemmli,U.K. (1970) Nature 227,680-685.
9. Merz,P.A.,Wisniewski,H.M.,Somerville,R.A.,Bobin,S.A.,Master,C.L.and Iqual,K. (1983) Acta.Neuropath.60,113-114
10. Terry,R,D.,Gonatos,N.K.and Weiss,H. (1964) Amer.J.Pathol.44,269-297.
11. Tokutake,S. (1984) Anal.Biochem.140,203-207
12. Wisniewski,H.M.,Narang,H.K.and Terry,R.D. (1976) J.Neurol.Sci.27,173-181.

117. 発達期および成熟期マウス脳におけるピペコリン酸濃度とその取り込みについて

金　長寿・E. Giacobini*

（国立肥前療養所，南イリノイ大・医・薬理*）

〔要　約〕

発達期および成熟期マウス脳におけるピペコリン酸（ＰＡ）濃度とその脳内への取り込みについて、HPLC-ECを用いて検討した。

（１）新生マウス脳では、間脳、きゅう球、前終脳に高濃度に分布する反面、中脳、菱脳で低かった。この分布は成熟マウスの分布と異なっていた。

（２）発達期においては、脳および血液において、周産期に高濃度のＰＡが認められた。それは生後１日以後急速に減少し、生後２週間で成熟レベルに達した。脳／血液比率は周産期に高く発達にともない減少した。

（３）２５０㎎／㎏ＰＡ腹腔あるいは皮下投与による脳内取り込み実験で、成熟マウスでは５分で最大レベルに達し、それは２－５時間持続後徐々に減少した。Kineticsから、２つの取り込み機序が示唆された。新生マウスでは投与５分でＰＡ濃度急増し、その後２４時間にわたり漸増した。成熟マウスに比べ新生マウスでは常に高い濃度が得られた。

（４）発達期におけるＰＡ取り込みは新生期に大で、以後年令依存的に４週まで減少した。

（５）妊娠マウス（20日）へのＰＡ（250㎎／㎏）投与では、胎児脳ＰＡは投与後10分急増し、以後24時間にわたり高レベルであった。これはほぼ新生児と同様の傾向であった。

以上の結果，ＰＡの発達にともなう変化が明らかになるとともに，実験的高ＰＡ血症の作成が可能であることが示唆された。

Key word :　Pipecolic acid, HPLC-EC, Development

脳に存在するイミノ酸であるピペコリン酸（ＰＡ）は、リジンより脳内で生成され、食餌からも供給される（１）。ヒトにおけるＰＡ代謝関連障害として、高ＰＡ血症（２）、Zellweger症候群（３）が知られ、重度精神薄弱、ＣＮＳ degenerationがおこる。更に最近、Ｎeonatal ＡdrenoleukodystrophyもＰＡ代謝異常を伴うことが示唆された（４）。それら脳障害は、胎児期および周産期における高濃度ＰＡの脳内貯溜に原因すると考えられている（１）。今回は、発達期脳へのＰＡのneurotoxicityについて検討する目的で、新生児脳内ＰＡ分布や、発達にともなうＰＡの変化を検討するとともに、ＰＡ負荷による脳内取り込み動態について検討した。

［方法］

Ｃ５７－ＢＬ１０成熟雄性および雌性マウスを用いた。幼若マウスは雌雄マウスを交配させて得た。脳は５倍容の５％ＴＣＡでホモジナイズ後、17，000ｘｇ、２０分間遠心し上清を得た。血液は心臓より採取後、５倍容の５％ＴＣＡにて遠心後血清を得た。サンプルは－８０℃下でＰＡ測定時まで保存した。新生マウスの脳は氷上できゅう球、終脳（前および後部）、間脳、中脳、菱脳の各部位に分けた。ＰＡ取り込み実験では、250mg/kg D,L-ＰＡをpH 7.0のリン酸緩衝液に溶解し、成熟マウス（生後３ケ月、30 g）には 腹腔内、新生マウス（生後１日、1.5g)には皮下投与した。成熟マウス脳は、脳内残留血液を除くために原則として生食でかん流を行った。

ＰＡは既に報告した方法（５）を一部修正したHPLC-EC法を用い、ＰＡのＩsomerであるニペコチン酸を内部標準として定量した。

［結果および考察］

表１に新生マウス脳でのＰＡ分布を示す。間脳、きゅう球および前終脳で高濃度に分布する反面、中脳および菱脳では低かった。この分布状態は、D,L-［^{3}Ｈ］ＰＡ（28 μg/kg)腹腔投与24時間の取り込みの分布（６）と同様であったことから、ＰＡの部位別相違は、脳部位

の取り込み率の相違、あるいは、合成と代謝の相違を反映するとかんがえられる。また、新生マウスでの分布は成熟マウスのそれとは異なっていた。因に、成熟マウスでは橋・延髄や小脳で高く、大脳皮質やきゅう球で低かった（５）。このことは、脳部位別に発達が相違していることを示唆する。

胎児期から成熟期までの脳と血液での発達にともなう変化を図１（上）にしめす。脳では高濃度のＰＡが出生前後にみられた。胎生17日から20日にかけて一旦増加し、出生1日以後急激に減少し、生後15日で成熟レベルに達した。血液においても同様の傾向がみられたが、脳のレベルに比べると、出生前後で３分の１程度であった。出生後、脳血液比率は漸減した（図１、下）。妊娠マウスでは、脳および血液レベル共に成熟雄性マウスと同じ濃度であることから、周産期にみられる高濃度のＰＡは、母マウスのそれを反映するものと言えない。

成熟雄性マウスで、種々量のＰＡ腹腔内投与による脳内取り込みをみた（図２、図３）。血清ではほぼ直線的にＰＡ濃度が増加する反面、脳では２つの取り込み機序の存在が示唆された。この結果はNishioら（６）、Charlesら（８）の結果と一致する。また、この結果は生理的条件下では、高親和性の取り込み機序が働き、また、ＰＡ大量負荷の如き非生理的条件下では両方の取り込み機序が働くことを示唆する。

ＰＡ（250㎎／㎏）腹腔あるいは、皮下投与後の脳内取り込みの経時的変化を成熟および新生マウスでみた（図４）。新生児では最初の２時間急速に増加し、その後も24時間にわたり漸増するのに反し、成熟マウスでは５～10分で最大に達し、５時間の間その濃度が維持され、以後漸減した。同様に、成熟および新生児の血液ＰＡ濃度変化をみた（図５）。新生マウスではＰＡ高濃度が長時間維持される傾向がみられた。脳における両者の取り込みの相違は、主として、血液脳関門（ＢＢＢ）の機能を反映すると考えられる。そこで、さらに、ＰＡ（250㎎／㎏、腹腔投与10分で屠殺）取り込みの発達にともなう変化をみた（図６）。ＰＡ投与後10分の血液レベルは成熟および新生児で同様なので、各年令での取り込みはＢＢＢの機能を反映すると考えられる。出生１週間は取り込みに変化なく、以後漸減し４週間でほぼ成熟レベルに達した。この結果は極く少量のD,L－[^{3}Ｈ]ＰＡ（28μｇ／㎏）を投与した際の実験結果と一致する（６）。このＢＢＢの発達が内在性ＰＡ濃度のそれと逆相関している事から、ＢＢＢの成熟は、出生後の内在性ＰＡ濃度の減少を招く原因でないとおもわれる。

母マウスの血中より、胎児の血液や脳へのＰＡの移行をみるため、妊娠マウス（妊娠19日－21日）に、ＰＡ（250㎎／㎏）を皮下投与した（図７）。胎児脳では最初の30分間急増し、以後も24時間にわたり漸増した。この変化は、新生児のそれとほぼ同様であり、到達濃度も新生児と同水準であった。血液中ＰＡ濃度は30分で最大に達し、１時間以後漸減した。このパターンは基本的には、新生児や成熟マウスと同様であった。しかし、胎児では、最大水準に達するのに遅延傾向がみられ、さらに到達濃度は成熟や新生マウスに比べ有意に低かった。この現象は胎盤機能の反映と考えられる。

ヒト幼児にみられるＰＡ代謝障害の研究、および、ＰＡのneurotoxicityに関する検討の為には、高ＰＡ血症の動物モデルをつくる必要がある。この目的の為には、妊娠中から、出生直後にかけ、脳および血液中のＰＡを持続的に高く維持する必要がある。今回の結果（図４，図７）は出生前から出生直後にかけてＰＡ（１日１回，250㎎／㎏、腹腔あるいは皮下）を投与することにより、実験的高ＰＡ血症の作成が可能なことを示唆している。因に、出生後の長期投与によっては、ＢＢＢの発達のために、高い脳内濃度は得られなかった（未報告）。現在、この動物モデルを使って、ＰＡの神経発達に対する効果について検討中である。

［文献］

1)Giacobini,E.(1983) In Handbook of Neurochemistry,Vol.3,(Lajtha, A.,ed.) pp.583-605, Plenum Press.

2)Gatfield,P.D.,Taller,E.,Hinton,G.G.,Wallace,A.C.,Abdelnour,G.M. and Haust,M.D. (1968) Can.Med.Assoc.J. 99, 1215-1233.

3)Danks,D.M.,Tippett,P.,Adams,C. and Campbell,P.(1975) J. Pediatr.86,382-387.

4)Kelly,R.I. and Moser,H.W.(1984) Amer.J.Med.Genetics 19,791-795.

5)Kim,J.S. and Giacobini,E.(1984) Neurochem.Res. 9,1559-1569.
6)Nishio,H.,Giacobini,E.,Ortiz,J. and Gutierrez,M.d.C.(1983) Dev.Brain Res.6, 107-112.
7)Nishio,H. and Giacobini,E.(1981) Neurochem.Res. 6,835-845.
8)Charles,A.K.,Chang,Y-F. and Myslinski,N.R.(1983) Neurochem.Res.8,1087-1096.

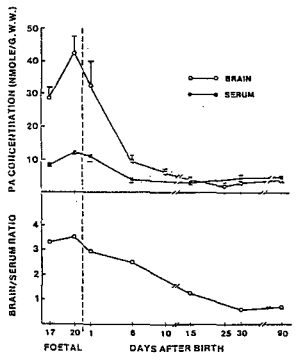


Fig. 1. Developmental changes of PA in brain and serum (upper) and brain/serum ratio(lower) in the mouse.

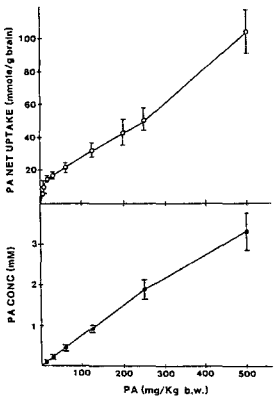


Fig. 2. Net uptake at 10 min of PA in adult mouse brain (top) and PA level in serum(bottom) following i.p. injection of various doses of D.L.-PA.

TABLE I

Regional distribution of pipecolic acid in newborn mouse brain

Brain region	PA conc [a]	Ratio [b]
Olfactory bulb	28.6 ± 4.1 (4)	2.3
Anterior telencephalon	27.8 ± 4.2 (6)	2.2
Posterior telencephalon	22.0 ± 2.8 (7)	1.8
Diencephalon	29.3 ± 3.8 (6)	2.3
Mesencephalon	15.4 ± 1.4 (5)	1.2
Rhombencephalon	12.5 ± 1.2 (5)	1.0

[a] Mean ± S.E.M. (nmol/g w.w.) with the number of experiments in parenthesis.

[b] Values expressed as ratio to rhombencephalon.

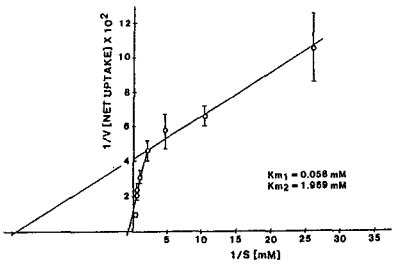


Fig. 3. Lineweaver-Burk plot of PA uptake into brain.

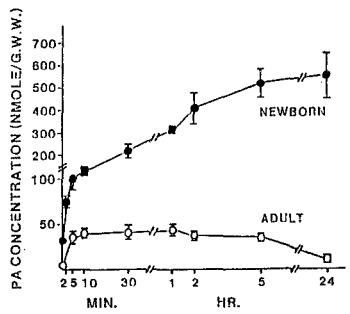


Fig. 4. Changes of PA level in brain of newborn and adult mouse following i.p.(adult) and s.c.(newborn) administration of D,L-PA(250mg/kg).

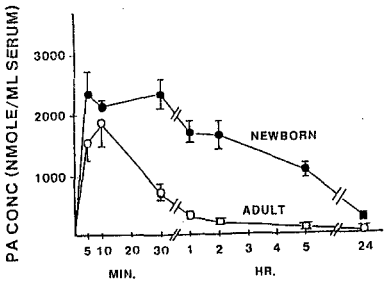


Fig. 5. Changes of PA level in serum of newborn and adult mouse following i.p.(adult) and s.c.(newborn) administration of D,L-PA(250mg/kg).

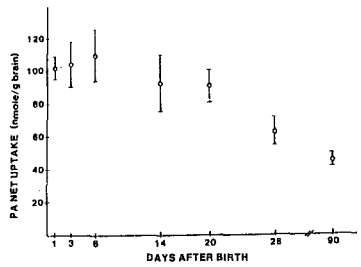


Fig. 6. Developmental change in net uptake at 10 min of PA following injection of D,L-PA(250 mg/kg,s.c.).

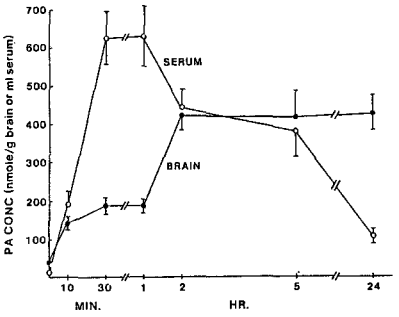


Fig.7. Changes in PA level in fetal brain and serum following administration of D,L-PA(250 mg/kg) to pregnant mice at 19-21 days of gestation.

118. 多発性硬化症脳における免疫グロブリンGについて

細川　武・浜口勝彦・E.L. Hogan*・J.J. Marchalonis*
（埼玉医大・神経内科，Med. Univ. of South Carolina*）

〔要　約〕

われわれは、多発性硬化症（以下ＭＳ）患者脳おけるIgGの量的変化および等電点電気泳動（以下ＩＥＦ）におけるIgGの泳動パターンにつき検討した。
対象：ＭＳ患者4例の剖検脳6検体，対照者の剖検脳3検体を用いた。
方法：1)IgGの抽出は、中性緩衝液(pH 7.4)ついで酸性緩衝液(pH 2.4) を用いた。2)IgGの定量はELISA 法にて測定した。3)ＩＥＦは、アンフォライン（pH 3.5-10 ）を含むポリアクリルアミドゲルを用いて行った。4)IgGは、泳動後ニトロセルロース膜に転写し、第1抗体と第2抗体を反応させ、ペルオキシダーゼ染色により染色した。
結果および結論：1)中性および酸性緩衝液によって抽出されたIgGは、ＭＳ患者脳において有意に増加していた。2)ＩＥＦの泳動パターン：ＭＳ脳から酸抽出したIgGでは、泳動パターンの得られた5検体のうち3検体にアルカリ側に限局するバンドを認め、うち1例に酸抽出したIgGに特異的なバンドを認めた。　また同一患者の脱髄巣と非脱髄巣から酸抽出したIgGを比較した結果では、脱髄巣からのIgGのバンドはアルカリ側に限局し、非脱髄巣からのIgGのバンドはアルカリ側から酸側にわたってみられた。以上からパターンの違いは、ＭＳの病巣における免疫状態の相違に起因することが示唆された。

Key word： Multiple sclerosis brain, Immunoglobulin G, Isoelectric focusing

多発性硬化症は、原因不明の脱髄疾患であり、85-95 %の患者髄液中に、oligoclonal bands が出現することが、知られている。　また多発性硬化症患者脳において、中性緩衝液によって抽出された免疫グロブリンGは量的に増加しており、oligoclonal bands を認めることが報告されている。しかし中性緩衝液によって抽出されたIgGは、脳組織から解離しやすいとされている。他方、脳組織にかたく結合しているIgGは、酸性の条件で抽出され、多発性硬化症の病態を検討する上でより重要である。

今回われわれは、多発性硬化症患者脳から中性および酸性緩衝液によりIgGを抽出し、その量的変化を検討し、さらに等電点電気泳動によりIgGの質的な相違の有無につき検討をおこなった。

実　験　方　法

対象〕多発性硬化症患者4例の6検体（内訳　白質　1，脱髄巣　2，非脱髄巣　3）および　対照者3例3検体を用いた。

方法〕1）中性緩衝液（pH 7.4）によるIgGの抽出：検体をリン酸緩衝生食水（ pH 7.4 ）を用いてホモジナイズした後、43,000 xg にて30分間遠心し、この操作を8回おこなった。1回目と2回目の上清を蒸溜水で透析し、ついで濃縮した。

2）酸性緩衝液（pH 2.42)によるIgGの抽出：遠心した際に得られた沈渣をグリシン・塩酸緩衝液(pH 2.42) と混合した。その後遠心してえられた抽出液である上清を1Mトリスで中和し、蒸留水で透析しついで濃縮した。

3）免疫グロブリンGの定量：IgGの定量は、ＥＬＩＺＡ法を用いて測定した。第1抗体としてヤギ抗ヒトIgGを、第2抗体としてペルオキシダーゼ標識ウサギ抗ヤギIgG

を用い、基質溶液として0.03% ABTSおよび過酸化水素水を含むクエン酸緩衝液を用い、414nm のマルチスキャンで測定した。

4）等電点電気泳動：アンフォライン（pH 3.5 - 10)を含むポリアクリルアミドゲルを用い、5 w で2.5 時間泳動した。

5）Blotting： blotting medium に浸したニトロセルロース膜をゲルに圧迫することにより蛋白を転写した。ついで第1抗体としてヤギ抗ヒトIgGを、第2抗体としてペルオキシダーゼ標識ウサギ抗ヤギIgGを反応させ、ナフタール・メタノール溶液および過酸化水素水を含むリン酸緩衝生食水を用いてIgGを染色した。

結　果　と　考　案

1）中性抽出液および酸性抽出液中のIgGの量：MS患者脳と対照脳との比較では、MS患者脳のIgGが中性抽出液および酸性抽出液中で有意に増加していた（$p < 0.001$）（表1）。

2）等電点電気泳動の泳動パターン：

中性抽出液中のIgGの泳動パターンは、MSにおいても対照においてもアルカリ側から酸側にわたる分布を示した。

酸抽出液では対照のうち、IgGの泳動パターンの得られた2例においては、アルカリ側から酸側にわたるバンドを認めた。

MS脳から酸抽出したIgGでは、泳動パターンの得られた5検体のうち3検体にアルカリ側に限局するバンドを認め、等電点はそれぞれpH 7.6 - 8.7, 7.1 - 8.4, 7.2 - 8.8であった。うち1例に酸抽出したIgGに特異的なバンドを認めた。　また同一患者の脱髄巣と非脱髄巣からの酸抽出したIgGを比較した結果では、脱髄巣からのIgGのバンドはアルカリ側に限局し（図　1）、非脱髄巣からのIgGのバンドはアルカリ側から酸側にわたってみられ、パターンが異なっていた。

以上から酸抽出液の泳動パターンは、

A）酸抽出液に特異的なバンドをゆうし、バンドがアルカリ側に限局する

B）酸抽出液に特異的なバンドはないが、バンドがアルカリ側に限局する

C）中性抽出液の泳動パターンに類似し、アルカリ側から酸側にわたるバンドを示す

の3型に分けられ、パターンの違いは　MSの病巣における免疫状態の相違に起因することが示唆された。

今回のわれわれの結果について、従来の報告と比較検討すると、多発性硬化症患者脳において中性および酸抽出されたIgGが増加していることは、Mehta ら[3,4]，Glynn ら[1]，Mattson ら[2]の報告と同様の結果であった。多発性硬化症患者脳において組織に結合する抗体が増加していること、また等電点電気泳動において、多発性硬化症患者脳の5 検体中3検体にアルカリ側に限局したバンドがみられた事は、特定の抗原に持続して曝されているか、共通のイディオタイプの存在の可能性が推定され、MSの病因、病態を知るうえで重要であり、今後の検討が必要である。

文　献

1)Glynn P., et al. (1982) Clin. exp. Immunol. 48, 102-110. 2)Mattson D.H., et al. (1982) J. Neuroimmunol. 2, 261-276. 3)Mehta P.D., et al.(1981) J. Neurol. Sci.

,49, 91-98.. 4)Mehta P.D., et al.(1982) Neurology 32, 372-376.

表 1．脳組織におけるIgG

	中性緩衝液による抽出（μg／1g脳）	酸性緩衝液による抽出（μg／1g脳）
多発性硬化症	120.38 ± 46.61 (M ± SEM)	5.44 ± 2.00 (M ± SEM)
対照	54.25 ± 14.17 (M ± SEM)	0.79 ± 0.79 (M ± SEM)
	P < 0.001	P < 0.001

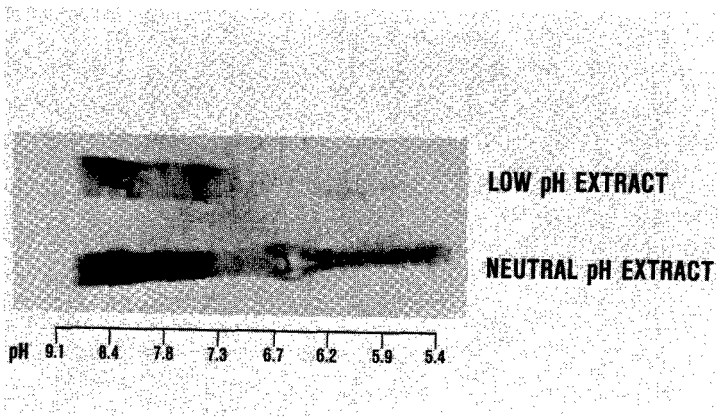


図1． 多発性硬化症症例 4．脱髄巣から酸抽出したIgGのバンドは、アルカリ側に限局している。

119. プロスタグランディン D_2 の神経腫細胞に対する細胞分化作用

上野隆司・林　祐一・三輪直人・杉野弘明
三輪俊明・早石　修・工藤佳久*・天野武彦*
（新技術開発事業団・早石生物情報伝達プロジェクト，
三菱化成・生命研・脳神経科学*）

〔要　約〕

脳内の主要なプロスタグランディン(PG)の一つであるPGD2の神経系細胞の増殖、分化に果す役割を明らかにするために、外因性PGD2の神経系由来腫瘍細胞(N1E-115, NG108-15)に対する作用を、形態的、生化学的、電気生理学的に調べた。培地に添加したPGD2 (1-10 μM)はその濃度に応じて、これら神経芽腫細胞に対して、神経突起の伸長、細胞体の肥大など特徴的な分化形態を誘導した。PGD2存在下で培養した神経細胞腫細胞のアセチルコリンエステラーゼ(AChE)、およびPGD2合成酵素は、PGD2の用量に依存してその比活性が増大した。一方、PGD2脱水素酵素は、PGD2処理によって誘導されることはなかった。またこれらPGD2処理細胞は、電気刺激に対する応答性が高まっていることもわかった。神経芽腫細胞を分化させることの知られているPGE1は、cAMPを介してその作用を発現すると考えられている(3)。しかし、用いた神経芽腫細胞に対して、PGD2は、PGE1にみられるような顕著な細胞内cAMP上昇をもたらさなかった。

これらの知見は、PGD2が神経系細胞の分化に深く関与しており、その分化誘導の作用機序はcAMPを介するPGE1とは異なっている可能性を示唆する。

Key word： prostaglandin, cultured cell, cell differentiation

＜緒言＞　PGD2は哺乳類の神経組織において活発に生合成され、体温(4)、痛み(2)睡眠(5)等の生理機能に深く関与している。一方、我々はPGD2合成酵素が、ラット脳において胎生12日－生後 7日にかけて大きく誘導されることを見いだした(6)。この時期は脳神経細胞が神経細胞としての種々の機能を獲得する時期に一致しており、内因性のPGD2が神経系の発育に深く関与する可能性が考えられた。そこで我々は、培養神経芽腫細胞(N1E-115, NG108-15)を用いPGD2をはじめ種々のPGの細胞レベルでの作用を検討した。また、グリア腫細胞(C6BU-1)に対するPGの作用もあわせて報告する。

＜実験方法＞　神経芽腫細胞(N1E-115, NG108-15)、グリア腫細胞(C6BU-1)は、5%準胎児牛血清含有ダルベッコ変法イーグル培地を用い、37°C、10% CO_2 存在下で培養した。細胞密度が2-5 x 10^3 cells/cm^2 となるようシャーレに分注し、24時間インキュベーション後各種PGを含む培地に交換した。以後 2日目毎にPGを含む培地で培地交換を行ない、細胞の形態、酵素活性、及び電気生理学的性質を調べた。なお、cAMPの定量にはPGを含まない培地で培養した細胞を用いた。

＜結果及び考察＞　神経芽腫細胞N1E-115、NG108-15はPGD2により神経突起の伸長、細胞体の肥大を生じ、神経細胞に特徴的な分化形態を示した（図１）。このような形態変化は培養 3日目より出現し、培養 5日目で最も顕著であったが、それ以降は増殖した細胞がシャーレ表面を密におおってしまうため形態の観察は不可能であった。また、この形態変化はPGD2 (1-10 μM) において用量依存的であったが、15 μM 以上の濃度では増殖阻害が生じ細胞は球形化した。脳内で主要な他のPG (PGE1, E2, F2α)ではPGE1, E2により神経突起の伸長が生じたが、PGF2α では突起伸長はわずかであり

PGD2の神経突起伸長作用はPGE1，E2と同程度もしくはそれ以上であった。形態的分化に加えて神経細胞の機能的分化に及ぼすPGの影響を調べた。神経芽腫細胞N1E-115のAChE活性はPGD2により1-10 μMにおいて用量依存的に上昇した。しかし、15 μMではAChE活性は対照と同程度まで低下し、20 μMでは細胞死のため測定不可能であった。他のPG（PGE1，E2，F2α)ではPGF2αは30 μMまで活性に影響を及ぼさず、PGE1，E2は10 μMではAChE活性の上昇を引き起こさなかった（図２）。次に、PGD2(1-10 μM）存在下で培養した細胞のPGD2合成酵素及び脱水素酵素活性を測定したところ、添加したPGD2に用量依存的にPGD2合成酵素活性が上昇し、10 μMで対照の約1.5倍に達した。しかし、PGD2脱水素酵素活性については、PGD2による有意な活性の上昇はみられなかった。（表１）。さらに、PGD2により分化させた細胞について電気生理学的性質を検討したところ、PGD2処理細胞は未処理の細胞に比べて電気刺激による活動電位の立ち上がり速度が上昇していることがわかった。以上の結果は、PGD2により神経芽腫細胞が形態的、生化学的に分化し、また電気生理学的にも分化傾向が認められることを示している。

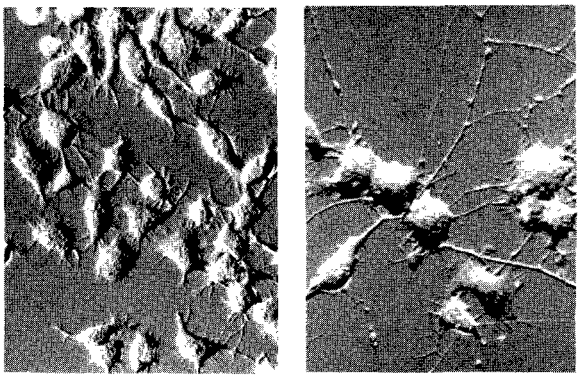


図１．PGD2（10 μM)によるNG108-15細胞の形態変化（ノマルスキー顕微鏡にて撮影，PGD2処理期間は 4日）

PGD2の神経芽腫細胞に対する分化誘導の作用機構を解明するため、PGD2をはじめ種々のPGによる細胞内cAMPの変化を測定した。PGE1，E2により神経芽腫細胞の細胞内cAMP量は上昇したが、PGD2，F2α の細胞内cAMPに及ぼす効果はきわめてわずかであり、各種PGによるcAMP上昇能は、PGE1>PGE2>>PGF2α=PGD2

表１．NG108-15細胞のPGD2合成及び脱水素酵素活性に及ぼす外因性PGD2の影響（PGD2処理期間は 4日）

CONCENTRATION OF PGD2 (μM)	PGD2 SYNTHETASE (nmol/min/mg protein)	PGD2 DEHYDROGENASE (pmol/min/mg protein)
0	0.29 (1.0)	7.4 (1.0)
5	0.40 (1.4)	7.8 (1.1)
10	0.44 (1.5)	5.2 (0.70)

( ) : RELATIVE VALUE

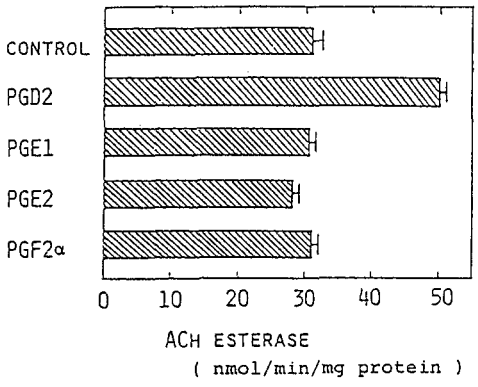


図２．各種PG（10 μM)によるN1E-115細胞におけるアセチルコリンエステラーゼ活性の誘導 （PG処理期間は 4日）

の順であった（図３）。以上のことから、cAMPを介して細胞分化を誘導することが提唱されているPGE1，E2(3)と異なり、PGD2の分化誘導作用はcAMPを介さない別の機構で作用している可能性が示唆された。

一方、各種PGのグリア腫細胞C6BU-1の形態に及ぼす影響を検討した結果、PGD2に特異的な形態変化が観察された。15 μM以上のPGD2添加により、細胞は24時間後に多極性の偏平な形態へと変化することが見いだされ（図４）、その形態変化はホスホジエステラーゼ阻害剤であるテオフィリン（1 mM）の共存下で顕著な影響は受けなかった。PGE1，E2，F2α（10-20 μM）は、それぞれ単独では程度の差こそあれ、双極性の細長い形態へ変化させ、テオフィリンは、この形態変化を増強した。

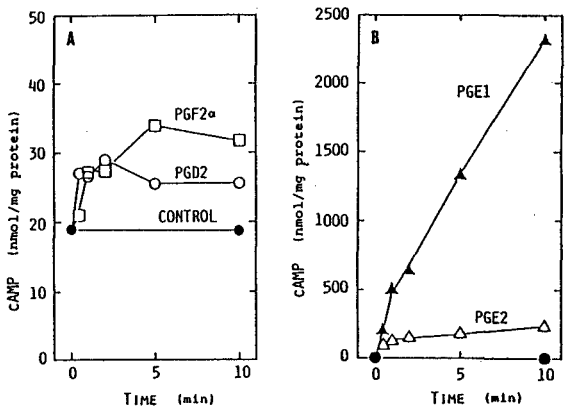


図３．各種PG（3 μM）によるNG108-15細胞における細胞内cAMPの産生
（縦軸のスケールの違いに注意）

我々は、グリア腫細胞C6BU-1も神経芽腫細胞と同様PGD2合成酵素及び脱水素酵素活性を有していることを明らかにしてきたが(1)、このグリア腫細胞をPGD2存在下で培養すると、神経芽腫細胞では上昇のみられなかったPGD2脱水素酵素活性もPGD2合成酵素活性同様上昇することがわかり、生成されるPGD2を分解代謝する方向への代謝の変化がみられた。

PGD2により、PGD2合成酵素及び脱水素酵素活性を有する神経芽腫細胞ならびにグリア腫細胞は形態的、機能的に変化した。このことは、内因性のPGD2が神経系の細胞分化において重要な役割を果たしている可能性を示唆している。

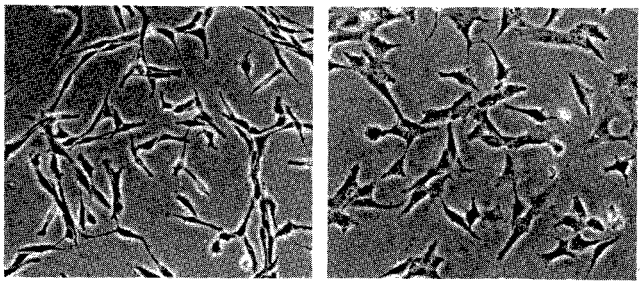


図４．PGD2（20 μM）によるC6BU-1細胞の形態変化
（位相差顕微鏡にて撮影，PGD2処理期間は 2日）

＜文献＞

1. Miwa,N.,Miwa,T.,Sugino,H.,Hayashi,Y.,Ueno,R.,Hayaishi,O. and Amano,T.(1985) Neurosci.Res. Suppl.1,S32
2. Ohkubo,T.,Shibata,M.,Takahashi,H. and Inoki,R.(1983) Japan J.Pharmacol. 33,264
3. Prasad,K.N.(1972) Nature New Biol. 236,49
4. Ueno,R.,Narumiya,S.,Ogorochi,T.,Nakayama,T.,Ishikawa,Y. and Hayaishi,O.(1982) Proc.Natl.Acad.Sci.USA 79,6093
5. Ueno,R.,Ishikawa,Y.Nakayama,T. and Hayaishi,O.(1982) Biochem.Biophys.Res.Commun. 109,576
6. Ueno,R.,Osama,H.,Urade,Y. and Hayaishi,O.(1985) J.Neurochem. 45,483

120. 正常マウスおよび網膜変性症マウスの網膜内におけるグルタミン酸脱炭酸酵素 (EC 4.1.1.15, GAD) と γ-アミノ酪酸 (GABA) の分布

村島善也・加藤尚彦*　　(東京都精神研, 東京大・医・脳研*)

〔要　約〕

正常および網膜変性 (rd) ーマウスの網膜各層の微小凍乾燥結切片 (4-54 ng) を試料とし, その中のGABAおよびGADレベルの微量測定を行なった。

(1) 9週齢マウス (C57BL) の正常網膜中では、GABA濃度は各層とも数 mM 以上有り, 内か粒層と内網状層にわたって, なだらかなピーク (35－ 48 mmol/kg 乾燥重量/時) を示した。GAD活性は内網状層内側に鋭いピーク (212 mmol 生成 GABA /kg 乾燥重量 /時) を持ち, 内か粒層を除く他の層 (脈絡膜色素上皮層, かんおよび錐状体層, 外か粒層, 外網状層, 視神経細胞および繊維層) にはほとんど見出されなかった。

(2) 6週齢の rdーマウス (C3H)の網膜では, 光受容細胞が変性脱落しており, 内か粒層, 内網状層, 視神経細胞および繊維層の3層が残っていた。この3層内の GABA および GAD分布は, 正常網膜とほとんど変わりなく, GABA は44, GADは 244 [単位は (1) と同じ] のピーク値を示した。

(3) 出生後 rdーマウスの網膜全層の平均 GABA濃度は徐々に増加し, 出生後 (4.0) から20週齢 (23.7) に達した。これと平行して GADは 7.8 から 170 に急激に増加した [単位は (1) と同じ]。

Key word : GAD, Retina, *rd*-Mouse

GABAは網膜における伝達物質として知られているが (4,6), GABA系の網膜各層内での定量的な分布は調べられていない。そこで既に確立した超微量定量法 (13) を用いて, マウス網膜の各層の微量試料内の GAD活性とGABA濃度を測定した。一方網膜の光受容細胞 (かんおよび錐状体細胞) が遺伝的に脱落する網膜変性 (retinal degeneration, rd) マウスの網膜についても同様の測定を行ない光刺激の欠落が GABA 系に及ぼす影響を調べた。

実験方法

[正常および rdーマウスの網膜試料]　正常マウス(C57BL/6J, オス, 6週3日齢, 24g)と, rdーマウスの一種(C3H/HE NCRJ, オス, 6週3日齢, 24g) を 100ワットの電球下 50cm の位置で3時間以上明順応させた。また C3Hマウス網膜が発育と共に変性する過程を追跡するため, 出生直後, 生後10日, 14日, 4週, 20週齢マウスを同様に処置した。眼球を 2-3mmの視神経束をつけたまま摘出し, 円柱状 (10X20mm)の O.C.T.コンパウンド(Miles Lab., Naperville, IL, USA) 中に包埋し, 液体窒素に投入して瞬間凍結した。クリオスタット(-23℃) 中で固形化した O.C.T.コンパウンドといっしょに, 眼球を20μmの厚さに切り, そのまま -35℃, 10mmHgの真空下で一夜凍結乾燥した(8)。凍結乾燥切片をそのまま顕微鏡下において観察し (図1), 網膜を構成する層構造別に切片を切り出した。また全層を平等に含む切片と, 視神経束の横断面からその中心部の切片を切り出して用いた。切片試料は高感度水晶系バランス (感度, ±0.11ng) を用いて秤量した後, そのまま少量の反応液に加えた。

[GABA 濃度および GAD 活性測定法(13)]　試料を塩酸溶液中で加熱して, 試料中の酵素と NADPHを変性破壊した後, 過剰量の NADP と GABAase [アミノ酪酸トランスアミナーゼ(EC 2.6.1.19) とコハク酸セミアルデヒド脱水素酵素(EC 1.2.1.16) の混合標品] を加えて, 試料中の GABA を NADPHに転換する。この NADPHを, 酵素反応を利用する増幅反応 [NADP サイクリング (3,8)] を用いて, 10,000-15,000 倍に増幅して定量した。GADの活性は, グルタミン酸より試料中の酵素によって生成される GABA を, 上記の方法に従って 5,000倍に増幅し

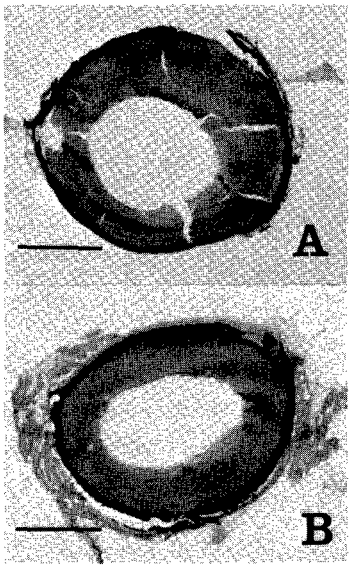
て測定した。したがって GAD活性測定時には，GAD により生成される GABA と，試料中に内在する GABA の総和が測定値として得られる。そこで別に測定した内在性 GABA の平均濃度を，GAD 平均活性測定値より差し引いて，GAD 活性値とした（図3）。詳しくは文献13を参照。

結果および考察

［正常およびrd－マウスの網膜試料］　網膜の凍結乾燥切片を，無染色のまま透過光で照明して顕微鏡下で観察すると，層構造が明瞭に認められる（図1）。正常な網膜には，最外層の黒色の脈絡膜の下から内側に向かって6層が見られるが（図1A），C3H 網膜ではかんおよび錐状体細胞が消失しており，内側の3層しか認められない（図1B）。正常網膜では内か粒層が内網状層に比して薄いので，内か粒層はそのまま，内網状層は内外2層に分割して試料とした。これに反しC3H 網膜では内か粒層は厚く，内網状層と同様に内外に分割した。これらの層試料，全層を含む試料，視神経束中心部の切片試料とも 4－45 ng 乾燥重量の大きさであった。

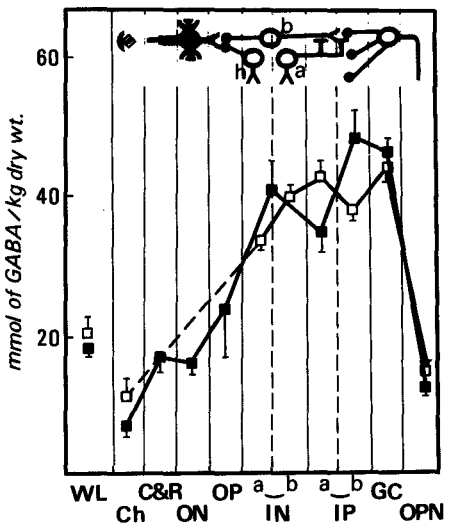
［正常マウス網膜内の GABA および GADの分布］　若年成熟ラットの正常網膜内では，GABA 濃度は内か粒層および内網状層全体にわたるなだらかなピークを示し，全層にわたって数 mM 以上の濃度レベルが検出された（図2）。これらの結果は従来のサル(1)，ウサギ(7)，ラット(10)，カエル(5)についての報告と，同程度のオーダーの値であった。しかし本報告と同様詳細な分析をサル網膜について行なった結果(1)では，光受容細胞を含む外網状層より外側の各層には，ほとんど GABA は見出されていない。GABA に比較すると，GAD活性は正常網膜の内網状層内側に鋭いピークを示した（図3）。従来 GADの高感度測定法がなく，本報告のような詳細な定量的分析結果は報告されていないが，GADの抗体を用いる免疫組織化学的な染色法による最近の所見では，マウス(16)，ラット(17)，ウサギ(2,18)，キンギョ(9,11,18) などの脊椎動物の網膜では，アマクリン細胞群の一部の細胞体とその軸索がシナプスを形成する内網状層に，GAD様免疫反応が見出されている。GAD抗体を用いる染色法によっては酵素の活性を証明できず，また定性的な結果しか得られないが，上述の所見は本報告の結果を裏づけている。既に報告したように，GABA 作動性ニューロンであるブルキニェ細胞の単一細胞体の分析により，その GABA 濃度と GAD活性は，図2，3と同じ単

図1．網膜の凍結乾燥切片



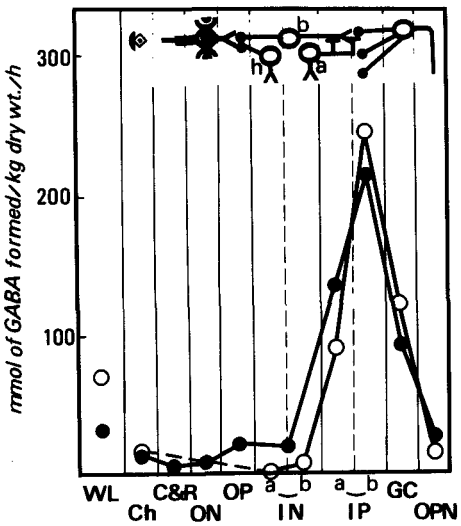
Aは正常マウス（C57BL，9 週齢），Bはrd－マウス（C3H，6 週齢）の眼球の20μm 切片。バーは 500μm を表わす。眼球の後極に近い切片で，各層は斜めに切れて厚く見える。

図2．正常および変性網膜内の GABA 濃度分布



左側に全層を一様に含む試料（WL）の GABA 濃度を，上部に各層内に含まれるニューロンを示した。Ch，脈絡膜と色素上皮層；C & R，かん及び錐状体層；ON，外か粒層；OP，外網状層；IN，内か粒層；IP，内網状層；GC，視神経細胞とその繊維層；OPN，視神経束；b，双極細胞；h，水平細胞；a，アマクリン細胞；■は正常マウス，□はrd－マウスの7 -12 試料の平均値を，上の直線は SEMを表わす。

図３．正常及び変性網膜内の GAD 活性分布

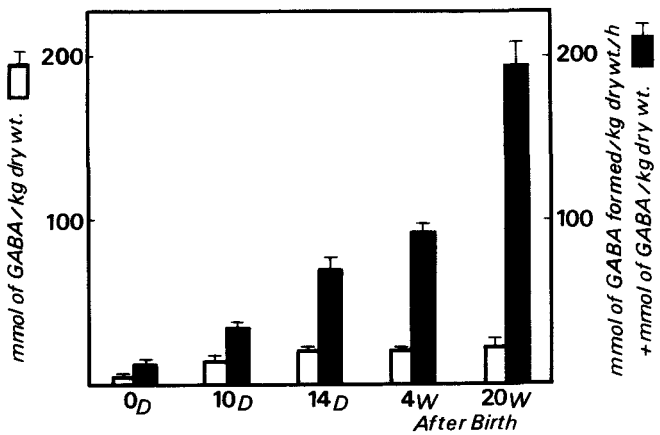


表現形式と略記号は図２と同じ。●は正常マウス，○は rd－マウスの 8-12 試料の平均活性値を示す。この値は，GAD 測定の平均値（生成 GABA ＋ 内在性 GABA量）から，GABA測定の平均値（内在性 GABA 量）を引いて計算した（測定法参照）。

位で表わすと，19および250 となり(14)，内網状層内のシナプスには両者とも細胞体と同様に高い濃度で含まれていることがわかった（図２，３）。

［rd－マウス網膜内の GABA および GADの分布と発育に伴うその変化］　C3Hマウスは出生後，網膜の構成細胞の分化と光受容細胞の変性脱落が同時に進行し，生後10日目には不充分ながらかんおよび錐状体層を含む全層が区別出来る（文献12；染色標本の写真供覧）。そして３週以後は内側のか粒および網状層が残り，マウスは失明状態となる。このように光受容細胞が欠如して３週以上経過した状態でも，正常な網膜と同程度のレベルの GABA と GADが見出され，しかも正常網膜と同様の分布を示した（図２，３）。出生後の発育に伴って，網膜の分化と変性に平行して起きる変化を調べると，GABA 濃度は徐々に増加するのに対し，GAD活性は著しく増加した（図４）。前述した免疫組織化学の所見を考察すると，これらの結果は，光刺激による一次ニューロン（光受容細胞）からの入力が失われても，その刺激を双極細胞を介して受けるアマクリン細胞 (4)が，活発に伝達物質を合成する能力を保持していると考えられ興味深い。

図４．rd－マウスの発育に伴う網膜全層内 GABA と GADの平均レベルの変化



横軸の下に出生後の日週齢（D，日齢；W，週齢を示す）。全層を平等に含む試料（WL）を分析した。左縦軸は GABA 濃度測定値，右縦軸は GAD測定値を示す。

［文　献］

1) Berger,S.J.,McDaniel,M.L., Carter,J,G. & Lowry,O.H.(1977) J. Neurochem.,28,159-163. 2) Brandon,C.,Lam,D.M.K. & Wu,J.-Y.(1979)Proc.Nat.Acad.Sci.USA,76,3557-3561 . 3) Chi,M.-Y.,Lowry,C. V. & Lowry,O.H.(1978)Anal.Biochem.,89,119-129. 4) Ehinger,B.(1982)Retina,2,305-321. 5) Graham,T.L.Jr.(1972)Brain Res.,36, 476-479. 6) Graham,L.T.Jr.(1974)The Eye (eds. Dovson,H. & Graham,L.T.Jr.),vol.6, pp.238-342, Academic Press,New York. 7) Kuriyama,K.,Sisken,B.,Harber,B. & Roberts,E.(1968)Brain Res.,9, 165-168. 8) Lowry,O.H. & Passonneau,J.V.(1972) A flexible system of enzymatic analysis, Academic Press,New York and London. 9) Lam,D.M.K.,Su,Y.Y.T.,Swain, L.,Marc,R.E.,Brandon,C. & Wu,J. -Y.(1979)Nature(London),278, 565-567. 10) Macaione,S.(1972) J.Neurochem.,19,1397-1400. 11) Marc, R.E.,Stell,W.K.,Bok,D. & Lam,D.M.K.(1978)J.Comp.Neurol., 182,221-246. 12) Matuk,Y.(1984) Can.J.Biochem.Cell Biol.,62,535-546. 13)Murashima,Y.L. & Kato,T.(1984)Biomed.Res.,5,527-532. 14) Murashima,Y.L. & Kato,T.(1985) in press. 15) Pourcho,R.G.(1980) Brain Res.,198,333-346. 16) Schnitzer,J. & Rusoff,A.C.(1984) J.Neurosci.,12,2948-2955. 17) VAughn,J.E.,Famiglietti,E.V.,Barber,R.P.,Saito,K.,Roberts,E. & Ribak,C.E.(1981) J.Comp.Neurol.,197,113-117. 18) Wu,J.-Y.,Brandon,C.,Su,Y.Y.T. & Lam,D.M.K.(1983) Mol.Cell.Biochem.,39,229-238.

121. 節前および節後神経切断後のラット上頸部神経節内神経成長因子（NGF）含量の高感度酵素免疫測定法による定量

高濱和也・岩田光良・三輪正人・安藤正人
永田　豊・堀　真一郎*・加藤兼房**

〔要　約〕(藤田学園保衛大・医・生理，東京都神経研・神経生化*，愛知県コロニー研・生化**)

① 雄マウス顎下腺より神経成長因子（nerve growth factor, NGF）を抽出し，2.5Sタンパク分画として精製し，それをアジュバントと共に家兎に免疫して抗血清を作製した。この抗血清よりIgGを精製し，これを用いて高感度酵素免疫測定（enzyme immunoassay，EIA）系を作製した。このEIA系は，0.3～3pg／tube 以上のNGF量の検出が可能で，かつまた従来の方法よりも短時間で測定を行うことができた。

② このNGF-EIA測定系を用いて，ラットの各組織中のNGF含量を測定した結果，上頸部交感神経節（superior cervical sympathetic ganglia, SCG）中に最も高濃度に見出されたが，他の組織には極くわづかしか見出されなかった。

③ SCG内のNGF含量は，生下時から3週間ぐらいまでは低濃度であったが，生後4週頃から急激に上昇して，成熟ラットの値に達した。

④ 成熟ラットのSCGの節後線維の切断手術（axotomy）をおこなうと，術後数時間から急速にNGF含量は低下し，約1日後には極めて低い値に達した。一方，節前神経を切断する（denervation）と，SCG内のNGF濃度は一過性に急速に上昇し約6時間で最大値（約2倍）に達したが，24時間以降は，非手術SCGのレベルに留まった。このような実験成績は，NGFが逆行性に交感神経の軸索を輸送されてSCG内に蓄積している可能性を強く示唆している。

Key word：nerve growth factor (NGF), superior cervical sympathetic ganglia (SCG), denervation & axotomy

神経成長因子（nerve growth factor, NGF）は，交感神経系細胞の生存と分化に必須な分子量130Kのポリペプチドとして，そのアミノ酸構成などよく解明されている。[8] NGFは，雄マウスの顎下腺に大量に存在することはよく知られているが，その他の組織については，ラットでは上頸部交感神経節（superior cervical sympathetic ganglion）以外，ほとんど確実な在存が認められていない。[3] 現在まで種々のNGFの微量定量法が試みられたが，特異性や感度の面から充分とはいえない。そこで今回我々は，マウスβ-NGFに対する精製抗体を用いたサンドイッチ法によるEIA系を開発し，ラットの体内各組織内含量を調べた。また，特にNGFが多量に見出されるラットSCGについて，その生後発育に伴う変動，ならびに，節前および節後神経切断術による影響を調べて，NGFの生理機能について考察した。

〈材料と方法〉

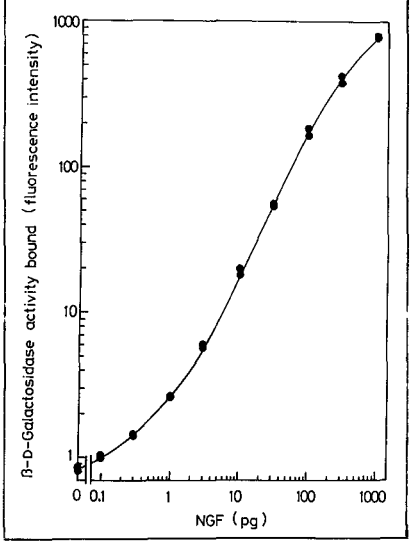
1. NGFの精製および抗血清の作製：NGFは，成熟雄マウスの顎下腺よりCozzari[2]らの方法により，2.5S蛋白として精製した。精製NGFをFreund's adjuvantと混合してウサギのfoot padに注射し，5週後に脱血して抗血清を採取した。このNGF抗血清に50%硫安を加えて沈殿して得られるタンパク分画を1晩透析後，β-NGFで活性化したCNBrセファロース・アフィニティ・カラムに2回通して精製を行ない，抗NGF・IgG分画を得た。この抗体は，オクタロニー法でNGFと沈降線を認め，NGF特異性を確認した。

2. 酵素免疫測定系（enzyme immunoassay system）の作製：抗NGF・IgGの$F(ab')_2$フラグメントをポリスチレン球に結合させ，さらに還元してFab'としてから，マレイミド結合試薬をもちいてβ-ガラクトシダーゼと結合させた。各検体または標準NGFを含む反応液0.3mlに，抗体結合固相

ビーズをそれぞれ1個を入れて，30℃で5時間 incubate 後，固相を洗ってβ-ガラクトシダーゼ標識抗体を含む液中で一晩4℃で incubate した。翌日，固相を洗ってから30℃で20分間基質（4-methyl umbelliferyl-β-D-galactoside）と反応させて，生成する4-methyl umbelliferon の量を測定してNGFの量を測定した。[6)7)]

3. 節前および節後神経切断術：Wistar系ラット（体重180～210 g）をペントバルビタール麻酔下（40 mg／kg. ip），無菌的に一側の上頸部交感神経節の節前神経を切断(denervation)，反対側の筋後神経も切断（axotomy）した後，皮膚縫合し，麻酔から回復させて飼育した。[1)]一定期間生存させた後，ウレタン麻酔（1.5 g／kg. ip）下に，SCGを摘出して，通常1個のSCGを用いてNGFの測定をおこなった。

Fig. 1: Standard curve for the enzyme immunoassay for mouse NGF



〈結果と考察〉

今回我々が開発したβ-NGF（2.5 S）のEIAは，0.3 pg／tube 以上のNGFを定量しうる高感度な測定系である。また，測定に要する時間が，比較的短時間（1.5日）に短縮できたので，今後微量のNGF量を測定する上で有用であると思われる。（図1）。

上記の測定系を用いて，ラットの各組織内のNGF含量を測定した。その結果は表1に示す如くで，NGFは雌の上頸部交感神経節（SCG）に31.34±6.7（pg／mgw.w.）と，特に高濃度検出されたが，雄でもほぼ同様で性差は認められなかった。しかし，NGFは交感神経の支配臓器である心房，輪精管，唾液腺中には微量しか検出されなかった。また大脳および小脳中のNGFは検出限界以下であったが，迷走神経節内にわずかながらNGFが見出された。このような分布の相違は，Thoenen[9)]らの成績と多少異っており，さらに実験例数を増やして詳細に調べる必要があろう。

ラットSCG中のNGF濃度の発育にともなう変動を示したのが図2で，生後3週間までは低い値であるが，それ以後急激に増量し，成熟組織のレベルに達するのが認められた。

成熟ラットの節前および節後神経切断術後のSCG内のNGF含量の変動を図3に示した。節後神経切断手術（axotomy）をおこなうと，術後3時間以後急速にSCG内のNGF含量は減少し，1日（24時間）後には非手術（intact）SCG内の含量のほぼ1／3になり，1週間後まで徐々にさらに低下していくのがみられた。Hendry[4)]らはラットの前眼房中に ^{125}I-NGFを注入したところ，6-20時間後に同側のSCG内に^{125}I放射能の著明な上昇を認めた。この際，SCGの節後神経を切断したり，あるい

Table I: DISTRIBUTION OF NERVE GROWTH FACTOR IN VARIOUS TISSUES THE RAT (ng/g-wet weight tissue)

Tissues	Female	Male
S C G	31.34 ± 6.70 (10)	44.90 ± 14.40 (3)
N G	2.76 ± 1.62 (4)	- - - - - -
Cerebrum	< 0.01	- - - - - -
Cerebellum	< 0.01	- - - - - -
Atrium	0.32 ± 0.24 (3)	- - - - - -
Ventricle	0.22 ± 0.08 (4)	- - - - - -
Submand. gland	0.17 ± 0.05 (6)	0.15 ± 0.03 (4)
Vas diferens	- - - - - -	0.35 ± 0.15 (4)

SCG:superior cervical sympathetic ganglia, NG:nodose (vagus) ganglia, Submand. gland:submandibular salivary gland.

は軸索輸送を障害するコルヒチンを前眼房中に注射すると，このSCG内の放射能の取り込みは認められなかった。さらに，NGFのメッセンジャーRNA（mRNA）の分布を調べたところ，SCG組織内にはほとんど検出できないにも拘らず，交感神経支配をうけている虹彩や精管には，かなりの量のmRNAが見出された[5]。今回のわれわれの実験結果は，Hendryらのdataを補強するものであり，やはりNGFは虹彩で作られ，交感神経軸索を逆行性に輸送されてSCG内に蓄積することを強く示唆している。

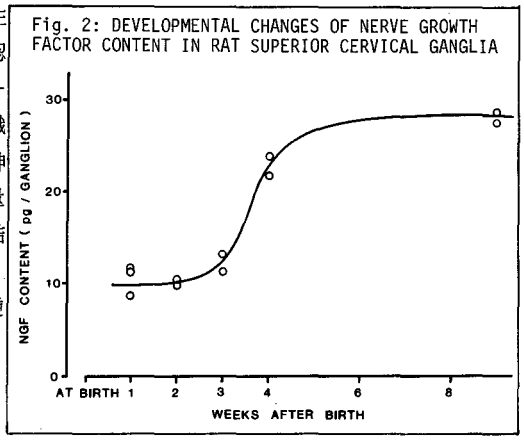


Fig. 2: DEVELOPMENTAL CHANGES OF NERVE GROWTH FACTOR CONTENT IN RAT SUPERIOR CERVICAL GANGLIA

ところが，節前神経線維の切断手術(denervation)後数時間でSCG内NGFは急激に増加し，6時間後には2倍以上に達した。しかし，この増加は一過性で12時間後には非手術（intact）レベルまで戻って以後1週間まで同じ値に保たれた。NGFの逆行性の軸索内輸送は，間に組織的連続性をもたないシナプスをへだてた節前線維へまで連続しておこなわれているとは考えにくい。したがって，節前線維切断手術による術後数時間以内のSCG内のNGFの一過性増大の解釈は難かしい。今後さらに別な方向からの実験によって，この興味ある現象の原因を追求していきたい。

〔参考文献〕

1) Ando, M., Nanba, T., Okuya, M., and Nagata, Y.（1983）Brain Res. 267：313－321　2) Cozzari, C., Angeletti, P. V., Jazar, T., Orth, H., and Gross, F.（1978）Biochem. Pharmacol. 23：1321－1327　3) 畠中　寛（1985）医学のあゆみ, 133：1010－1014　4) Hendry, I. A., Stökel, K., Thoenen, H., and Iversen, L. L.（1974）Brain Res. 68：103－121　5) Heumann, R., Korsching, S., Scott, J., and Thoenen, H.（1985）J. Neurochem. 44（Suppl.）S－1390　6) Kato, K., Fukui, H., Hamguchi, Y., Ishikawa, E.（1976）J. Immunol. 116：1554：1560　7) Kato, K., Nakajima, T., Ishiguro, Y., and Matsutani, T.（1982）Biomed. Res. 3：24－28　8) Thoenen, H. and Barde, Y.－A.（1980）Physiol. Rev. 60：1284－1335　9) Thoenen. H. and Korsching, S.（1983）Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 60：3513－3516

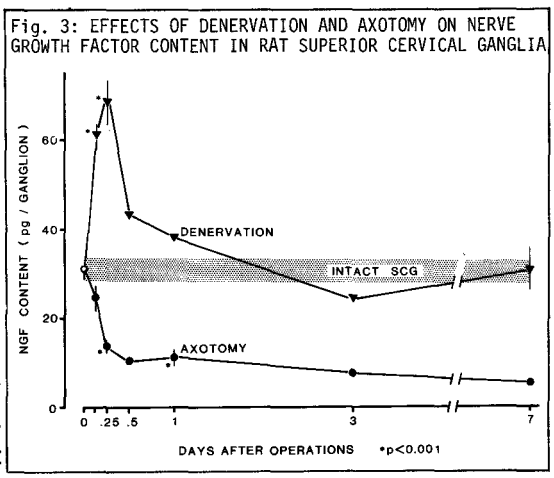


Fig. 3: EFFECTS OF DENERVATION AND AXOTOMY ON NERVE GROWTH FACTOR CONTENT IN RAT SUPERIOR CERVICAL GANGLIA

122. PC12h 細胞における Na^+, K^+-ATPase に対する神経成長因子の影響

井上順雄・松井英男・畠中　寛*
（杏林大・医・生化，三菱化成・生命研*）

〔要　約〕

培養神経細胞ＰＣ１２ｈを神経成長因子（ＮＧＦ）存在下で長期間培養し，Na^+,K^+-ATPaseに対する効果を検討した．ＮＧＦ非存在下に培養した細胞の不溶性分画は，0.37±0.02（μmol/min・mg protein）(n=15)のNa^+,K^+-ATPase活性を示した．このNa^+,K^+-ATPaseはStrophanthidinによる阻害実験からジギタリス低感受性（IC_{50}～1mM）のα鎖からなる酵素（α型）であった．ＰＣ１２ｈ細胞に50ng/mlＮＧＦを添加培養し，細胞をニューロン様に分化させると，酵素活性が添加後３日目頃から徐々に増加した．そして，５日から１０日間ＮＧＦを添加培養した細胞の活性は 0.55±0.03（μmol/min・mg protein）(n=16)であり，ＮＧＦ非存在下で培養した細胞より有意に増加していた．しかし，ＮＧＦ存在下に培養した細胞のNa^+,K^+-ATPaseも，ジギタリス低感受性のα型であり，axolemmaに存在するジギタリス高感受性（IC_{50}～1μM）のα(+)鎖からなる酵素（α(+)型）ではなかった．以上より，ＰＣ１２ｈ細胞において，ＮＧＦ添加培養によって，α型Na^+,K^+-ATPaseは増加するが，α(+)型Na^+,K^+-ATPaseは誘導されないことが明らかになった．

Key word : Na^+,K^+-ATPase ; a rat pheochromocytoma cell line ; nerve growth factor.

神経系において，Na^+,K^+-ATPase（Ｎａポンプ）は重要な役割を果たしている．ニューロンでは膜電位の維持のために，グリア細胞ではニューロンから細胞間隙に出たK^+の排除のために機能している．近年，脳や心臓に複数の分子種の存在が報告されたが(7,9)，特に脳では，グリア細胞には腎臓等と同種のα鎖とβ鎖を構成ペプチドとするα型Na^+,K^+-ATPaseが存在するのに対し，ニューロンにはα(+)鎖とβ鎖から成るα(+)型Na^+,K^+-ATPaseが存在する事が明らかとなった(9)．このα(+)型酵素はジギタリス感受性が高く(9)，ピリチアミンによって特異的に阻害を受ける事(7)等から，α型酵素と区別され，又，機能的相違としては，脂肪細胞でインスリン刺激に応答して活性化するのはα(+)型酵素である事(6)が報告されている．

一方，ラットのクロム親和性細胞腫からクローン化されたＰＣ１２細胞は，神経成長因子（ＮＧＦ）を長期間添加し培養すると，ニューロン様に分化する事が知られている(2)．形態上の変化，種々の神経伝達物質合成酵素の誘導の他に，特に最近，エンケファリン受容体(4)，ムスカリン受容体(5)，Ｎａチャンネル(8)等の種々の膜タンパク質もＮＧＦによって誘導される事が報告されている．

今回，ＰＣ１２ｈ細胞を用い，そのNa^+,K^+-ATPase活性を測定し，その分子種を，ジギタリス系強心ステロイドStrophanthidinに対する感受性により同定した．更にＮＧＦにより細胞を分化させたとき，Na^+,K^+-ATPaseの活性，分子種にどの様な変化がみられるか検討した．

［実験方法］

ＰＣ１２ｈ細胞は，１％準胎児牛血清（三菱化成中標津血清センター）及び５％熱非

働化馬血清(Gibco)を含むＤＦ培地で培養した(4)．ＮＧＦは雄マウス顎下腺から精製した2.5S ＮＧＦを培地に５０ng/ml加えた．ポリリジン(Sigma)コートしたディッシュ上に生育したＰＣ１２ｈ細胞を集め，細胞を0.32M Sucrose，1mM EDTAを含む 5mM Imidazole-HCl緩衝液(pH7.4)で洗い，ホモジナイズした．これを，100,000 x gで４０分間遠心し沈渣を得，この不溶性分画を実験に用いた．比較試料として，ラットグリオーマ由来のＣ６細胞からも同様に不溶性分画を得た．更にラットの大脳，腎臓，上頸神経節からもホモジナイズ後，1,000 x g遠心上清の100,000 x g遠心沈渣として粗膜分画を得た．axolemma分離はDe Vries等の方法(1)によった．

ATPase活性は，試料を100mM NaCl，10mM KCl，4mM $MgCl_2$，1mM EDTA，50mM Imidazole-HCl緩衝液(pH7.4)中で，preincubation後，ＡＴＰ(最終濃度 2mM)を加え１０分間反応させ測定した．0.5% SDSを反応液の半分量加えて反応を止めた．遊離したリン酸はオートアナライザーで定量した(3)．Na^+, K^+-ATPase活性は，ATPase活性のうち10mM strophanthidinで特異的に阻害される活性として得た．

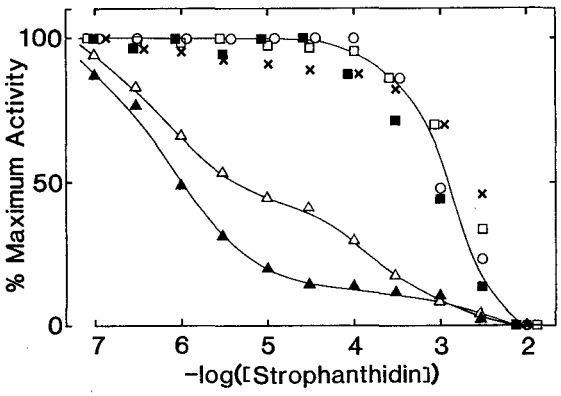


図１．各種細胞由来のNa^+,K^+-ATPase活性のStrophanthidin感受性．
○ ＰＣ１２ｈ細胞(ＮＧＦ非存在下に培養)，□ 腎臓，△ 大脳，× 上頸神経節，▲ axolemma，■ Ｃ６細胞．

[実験結果と考察]

ＮＧＦ非存在下に培養したＰＣ１２ｈ細胞の不溶性分画のNa^+,K^+-ATPase活性は，全ATPase活性の約75%であり，0.37±0.02(SEM)(μmol/min・mg protein)(n=15)であった．この値はラットの大脳，腎臓，上頸神経節の粗膜分画およびaxolemmaの活性値がそれぞれ，1.6，1.1，1.5，2.4(μmol/min・mg protein)であるのに比較して低いが，Ｃ６細胞の不溶性分画(0.094(μmol/min・mg protein))の約４倍高い値であった．

図１に示される様に，ラットの２種類の Na^+, K^+-ATPaseは，Strophanthidin の阻害定数の違いにより容易に区別される(9)．即ち，腎臓がStrophanthidin に低感受性のα型酵素(IC_{50}～1mM)を持つのに対し，axolemmaは高感受性のα(+)型酵素(IC_{50}～1μM)を持つ．ＰＣ１２ｈ細胞は明らかに腎臓，及びＣ６細胞と同じα型酵素を持った．一方，２種類の酵素を含む大脳は二相性の阻害曲

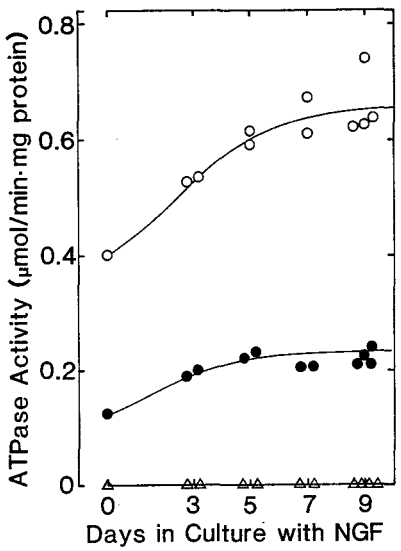


図２．ＮＧＦ(50ng/ml)存在下に培養したＰＣ１２ｈ細胞のATPase活性．
○ Na^+,K^+-ATPase活性(10mM Strophanthidin依存性活性)，△ α(+)型 Na^+,K^+-ATPase活性(10μM Strophanthidin依存性活性)，● Mg^{2+}-ATPase活性(10mM Strophanthidin非依存性活性)．

線を示したが，上頸神経節はほとんどが低感受性の阻害を受けた．

図２は50 ng/mlのＮＧＦを添加してＰＣ１２ｈ細胞を培養した時の活性の経日変化を示す．添加開始約２日後から起こる細胞の分化とともに，活性が増加した．ＮＧＦ添加培養５日～１０日後の細胞の活性は１０～６０％増加したが，平均すると 0.55±0.03 (μmol/min・mg protein)(n=16)となり，この増加は有意(p＜0.01)であった．ＮＧＦ添加培養１０日後の細胞についてStrophanthidinの効果をみたのが図３である．しかし，その阻害曲線はＮＧＦ非添加培養のものと全く一致し，ＮＧＦによって増加した酵素はα型酵素である事が明らかとなった．更に，図２も10μM Strophanthidin によって阻害されるATPase(α(+)型 Na^+,K^+-ATPase)活性が，ＮＧＦ添加培養で全く出現しない事を示している．このα型酵素活性の増加は，増加率がエンケファリン受容体の誘導等の特異的な誘導より低いこと等から，おそらく形態変化に伴う細胞膜の増大によって起ったと考えられた．

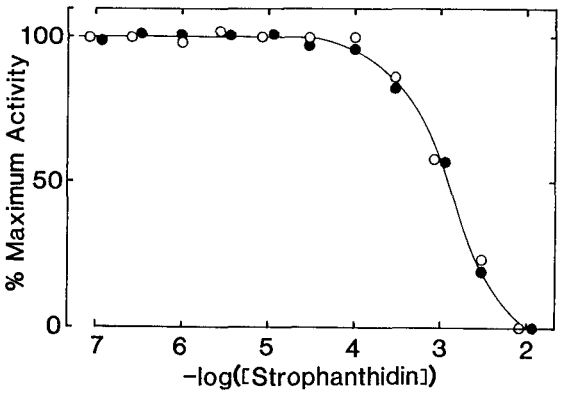


図３．ＰＣ１２ｈ細胞のNa^+,K^+-ATPase活性のStrophanthidin感受性．○ ＮＧＦ非存在下に培養した細胞，● ＮＧＦ(50ng/ml)存在下に１０日間培養した細胞．

この細胞において，α(+)型酵素が誘導されない原因の一つとしては，この細胞がＮＧＦにより交感神経細胞様に分化するからではないかと考えられる．即ち，図１の様に交感神経細胞を含む上頸神経節には大脳と異なりα(+)型酵素が非常にわずか(＜10%)か，全く存在しないこと，更に培養交感神経細胞がα型酵素を持つという報告(9)から，交感神経細胞がα(+)型酵素を持たない可能性が考えられるからである．しかし，他の可能性としては，この細胞もα(+)型酵素を発現する能力を持つが，α(+)型酵素の誘導にはＣａチャンネルの例(10)のように，細胞をより長期間培養し十分に分化させる必要があるのかもしれない．

［文献］

1. De Vries, G.H., Matthieu, J.-M., Beny, M., Chicheportiche, R., Lazdunski, M., and Dolive, M. (1978) Brain Res. 147, 339-352
2. Greene, L.A. (1984) Trends Neurosci. 7, 91-94
3. Hegyvary, C., Kang, K., and Bandi, Z. (1979) Anal. Biochem. 94, 397-401
4. Inoue, N., and Hatanaka, H. (1982) J. Biol. Chem. 257, 9238-9241
5. Jumblatt, J.E., and Tischler, A.S. (1982) Nature 297, 152-154
6. Lytton, J., Lin, J.C., and Guidotti, G. (1985) J. Biol. Chem. 260, 1177-1184
7. Matsuda, T., Iwata, H., and Cooper, J.R. (1984) J. Biol. Chem. 259, 3858-3863
8. Rudy, B., Kirschenbaum, B., and Greene, L.A. (1982) J. Neurosci.2, 1405-1411
9. Sweadner, K.J. (1979) J. Biol. Chem. 254, 6060-6067
10. Takahashi, M., Tsukui, H., and Hatanaka, H. (1985) Brain Res. (in press)

123. ヒトおよびラット培養脳腫瘍細胞における pp60^{src} および上皮成長因子受容体（EGF-R）の発現の検討

本田千穂・田渕和雄・入江恵子・福岡高宏
三野章呉・吉岡純二・植田清隆・大本堯史
（香川医大・脳神経外科）

〔要　約〕

上皮成長因子（epidermal growth factor, EGF）は、細胞表面に存在するその特異的受容体（EGF—R）と結合することにより、グリア細胞を含む種々の細胞の増殖を促進することが知られている。ところで、がん遺伝子のひとつである src 遺伝子産物 pp60^{src} と、EGF—R のアミノ酸配列が類似していることが最近指摘され、細胞のがん化のメカニズムを検討する上で注目されつつある。今回我々は、pp60^{src} ならびに EGF—R に対するモノクローナル抗体を用いて、培養グリオーマ細胞における両者の発現の有無および程度を検討した。即ち、4 種のヒト培養グリオーマ細胞株（KY、KH、118MG、KC）と、3 種のラット培養グリオーマ細胞株（C6、RT1O、9L）について、間接蛍光抗体法により、flow cytometry を用いて検索を行った。その結果、9L 細胞株では、pp60^{src}、EGF—R のいずれかが存在しているという明らかな証拠を得ることはできなかったが、他の細胞株では、程度の差はあれ両者のうちどちらか、あるいは両者の発現が認められた。このように、培養グリオーマ細胞で pp60^{src} あるいは EGF—R の発現が認められたことにより、グリオーマのなかには、その発生あるいは増殖に、src がん遺伝子群が関与しているものがある可能性が示唆されたものと考えられる。

Key word : glioma cells, pp60^{src}, epidermal growth factor receptor

［はじめに］

上皮成長因子（epidermal growth factor, EGF）は、グリア細胞を含む種々の細胞に作用し、G_0+G_1期の細胞をS期へ移行させ、細胞増殖を促すことが知られている[1]。この EGF の作用の発現には、EGF が細胞表面の特異的受容体（epidermal growth factor receptor, EGF—R）と結合することが必須であり、その結果、tyrosine 残基のリン酸化が誘導されることも知られている[2]。一方、Rous Sarcoma Virus（RSV）由来のがん遺伝子 src がコードしている蛋白 pp60^{src} も、tyrosine 残基をリン酸化する protein kinase であることなどから、これらと growth factor との関連が注目されていた。1984 年になり、src 関連がん遺伝子の一つである erbB によってコードされる蛋白が、EGF—R の一部に相当することが指摘された[3, 8]。しかも、erbB 蛋白のアミノ酸配列は、部分的に pp60^{src} のそれと相同性があり[9]、最近では、pp60^{src} と EGF—R の tyrosin kinase 活性を担う部分のアミノ酸配列が良く類似していることが明らかとなった。このように、細胞成長因子あるいはその受容体と、細胞のがん化との係わりが次第に解明されつつあるが、今回我々は、培養グリオーマ細胞について、EGF—R および pp60^{src} の発現の有無あるいは程度を、各々に対するモノクローナル抗体を用いて、間接蛍光抗体染色を用い、flow cytometer で解析した。

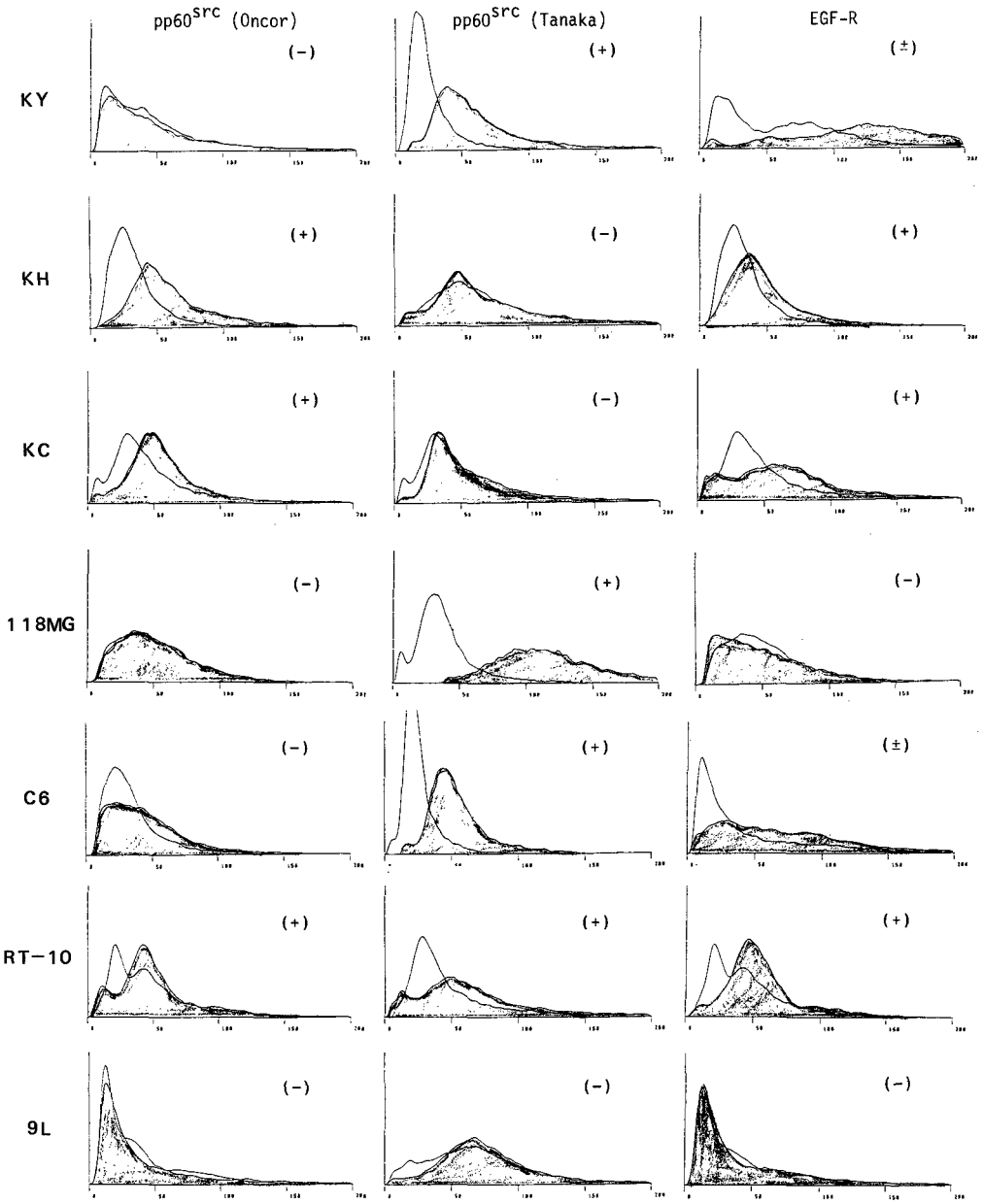
［材料および方法］

4 種のヒト培養グリオーマ細胞（KY、KH、KC、118MG）と 3 種のラット培養グリオーマ細胞（C6、RT1O、9L）を用いた。細胞はいずれも、10％牛胎児血清および抗生物質を含む、Eagle's minimum essential medium を培養液とし、37 ℃、5％炭酸ガス中で継代培養を行った。モノクローナル抗体は、Oncor 社製抗 pp60^{src} 抗体（Lot. No. A40106）および抗 EGF—R 抗体

（Lot. No. 40105）と、田中らが作製した抗 $pp60^{src}$ 抗体（H2B4—A2A2）[6]を用いた。2次抗体は、FITC でラベルしたヤギ抗マウス IgG（Fab'）（E·Y Laboratories 社製）を用い、flow cytometer は、Ortho の cytofluorograf System 50H を使用した。プラスチックシャーレで増殖させた細胞を、0.05％trypsin＋0.02％EDTA で遊離させ、単一浮遊細胞化させ、99.6％メタノールで30分以上固定した。この細胞をモノクローナル抗体と4℃、overnight で反応させ、PBS で15分、2回洗浄後、2次抗体と30分間反応させた。これを PBS で15分、2回洗浄後、PBS 中に浮遊させ、試料とした。Flow cytometry による解析は、横軸に蛍光強度、縦軸に細胞数をとり、コントロール抗体を反応させた場合と比較して、抗 $pp60^{src}$ 抗体あるいは抗 EGF—R 抗体処置細胞に強い蛍光が観察された場合に、$pp60^{src}$ あるいは EGF—R の発現があるものと判定した。

[結果および考察]

Flow cytometry による結果を、横軸を蛍光強度、縦軸を細胞数とした histogram に表し、各細胞、抗体について、それぞれコントロールカーブ（図中白色で示す）とともに図示した。ラット 9L 細胞では、$pp60^{src}$ および EGF—R のいずれについてもコントロールとの差が見られず、それらの発現を示す結果は得られなかったが、その他の細胞株については、$pp60^{src}$ あるいは EGF—R のどちらか、あるいは両者の発現を示唆する結果が示された。しかし、それらの発現程度には差がみられ、ヒト 118MG 細胞に対する抗 $pp60^{src}$ 抗体（Tanaka）のように、明らかに強い反応を示すものと、ヒト KY 細胞やラット C6 細胞に対する抗 EGF—R 抗体のように、それらの反応の判定に困難を感ずるものとがあった。このような判定保留例を陰性と仮定すると、検索した7種の細胞株は、(1)2種の抗 $pp60^{src}$ 抗体、抗 EGF—R 抗体いずれも陽性のもの（RT10）、(2)抗 $pp60^{src}$ 抗体（Oncor）と抗 EGF—R 抗体とが陽性で、抗 $pp60^{src}$ 抗体（Tanaka）は陰性のもの（KH、KC）、(3)抗 $pp60^{src}$ 抗体（Tanaka）のみ陽性のもの（KY、118MG、C6）、(4)いずれも陰性のもの（9L）の4群に分類される。$pp60^{src}$ の検索には、2種の異った抗体を用いたが、RT10 細胞ではいずれも陽性、9L 細胞ではいずれも陰性の他は、2種の抗体の反応態度は一致しなかった。このことは、今回用いた2種の抗 $pp60^{src}$ 抗体は、それぞれ異なる抗原決定部位を認識していることによるものと思われる。また、RT10 細胞以外では、一方の抗体についてのみ陽性反応が得られたことは、これらの細胞においては $pp60^{src}$ の一部分のみが発現されている可能性も考えられる。また、抗 $pp60^{src}$ 抗体（Oncor）と抗 EGF—R 抗体とは、各細胞でいずれも陽性もしくはいずれも陰性で、反応に関連性がみられることより、両抗体は、異った抗原の類似部位を認識している可能性も否定できない。抗 $pp60^{src}$ 抗体には、EGF—R と反応するものがあることが報告されており[4]、今回抗 $pp60^{src}$ 抗体（Oncor）でみられた陽性反応は、EGF—R との反応によって得られたもので、真の $pp60^{src}$ の発現を示していないかもしれない。しかし、少くとも RT—10 細胞は、いずれの抗 $pp60^{src}$ 抗体でも陽性反応が得られており、この細胞においては明らかに $pp60^{src}$ が発現しているものと思われる。さて、これまでグリオーマ細胞について EGF—R 発現の報告はあるが[5, 6]、$pp60^{src}$ についての報告は未だみられていない。培養グリオーマ細胞で、$pp60^{src}$ あるいは EGF—R の発現が認められたことにより、グリオーマのなかには、その発生あるいは増殖に src がん遺伝子の関与しているものがある可能性が示唆されたものと考える。



[文献]
1. Capenter, G. et al (1976) J. Cell Physiol. 88: 227-237
2. Cohen, S. et al (1980) J. Biol. Chem. 225: 4834-4842
3. Downword, J. et al (1984) Nature 307: 521-527
4. Lax, I. et al (1984) Proc. Natl. Acad. Sci. 81: 5911-5915
5. Lifermann, T.A. et al (1984) Cancer Res. 44: 753-760
6. Lifermann, T.A. et al (1985) Nature 313: 144-147
7. Tanaka, T. et al (1984) Virology 133: 202-210
8. Ullrich, A. et al (1984) Nature 309: 418-425
9. Yamamoto, T. et al (1983) Cell 35: 71-78

124. ヒト脳のアシアロ GM1：Glioma 組織における減少とヌードマウス皮下移植 Glioma における増量

岩森正男・石原映子・永井克孝・中村　治*・高倉公明**
（東京大・医・生化，国立がんセンター・脳外科*，
東京大・医・脳外科**）

〔要　約〕

ヒト脳白質，灰白質，Glioma，転移性脳腫瘍，悪性髄膜腫組織，ヌードマウス皮下移植 Glioma の中性糖脂質，特にアシアロ GM1 の含量を比較した。TLC 単独ではアシアロ GM1 の存在は確認できないが，抗アシアロ GM1抗体による免疫染色で検出でき，発色強度を二波長 TLC スキャーナーで比色定量したところ，5ng以上のアシアロGM1が定量できることが判った。また，その構造は高速中性粒子衝撃イオン化質量分析法で推定した。正常ヒト脳白質ならびに灰白質には，1 g 湿重量当り約 35nmol のアシアロ GM1 が存在し，その含量は脂質結合性リン量の 0.1～0.2％にすぎなかった。一方，ヒト Glioma 組織ではアシアロ GM1が極端に減少しており，特に臨床的に悪性度の強い患者組織には全く検出できなかった。しかし，増殖度が大きく，臨床的にも悪性の Glioma 組織をヌードマウス皮下で増殖させた組織では，高濃度のアシアロ GM1が検出でき，湿重量当りの濃度では正常組織よりも高濃度であるものがあった。脂質結合性リンに対するモル比は，ヌードマウス移植 Glioma で全例，正常組織よりも高い値を示した。正常組織におけるアシアロ GM1 の存在は，その代謝と免疫的性質を考察するうえで非常に興味があり，癌化に伴うそれらの変化が今後の課題となろう。

Key word：Asialo GM1, Glioma, TLC Immunostaining,

ガングリオシドの脳内濃度は他の非神経系組織とは比較にならないほど高く，シナプトソームに特に高濃度に含有されていることから，神経伝達機構との密接な関係が予想されている。また，培養神経芽細胞の突起形成や増殖促進効果に特定のガングリオシド分子が関与し，その作用は細胞膜を介した蛋白質のリン酸化とも連動していることから，神経細胞の生理機能にも何らかの関係があることが予想されている(1)。哺乳動物脳のガングリオシド組成は種間多様性が少なく，主要ガングリオシド組成は相互に類似しており，いずれもアシアロ GM1 が主要基本糖鎖構造になっている(2)。アシアロ GM1 については，マウスナチュラルキラー細胞のマーカー抗原(3)であり，神経系にも含有されることから神経系細胞とリンパ球の共通抗原になっていることが指摘された。マウス脳内ではミエリンに高濃度に含まれることが，免疫蛍光法と，薄層クロマトプレート上での免疫的検索法で示されている(4)。正常な脳組織にアシアロ GM1 が存在することの意義については多くの議論があるが(5)，ヒトの病態異常に伴って血中に抗体が検出される例があり，しかも，免疫性神経疾患，たとえば全身性エリテマトーデス(6)，多発性硬化症(7)，Neuro-Behçet (8)，などに検出されることから，疾患の病態とも何らかの関係があることが予想されている。ウサギを用いた実験でも，シアル酸を結合したガングリオシドは液性免疫応答をほとんど示さないのに対し，アシアロ GM1の免疫原性の強さが示され，ヒト生体内におけるアシアロ GM1 の産生経路と免疫的性質に関心が集まりつつある。糖脂質の代謝と機能を解析する場合，病態異常が最も良い材料になることから，ヒト脳腫瘍組織とヌードマウス移植腫瘍組織を用い，アシアロ GM1 の量的変化に注目して分析を進めた。

〔実験方法〕

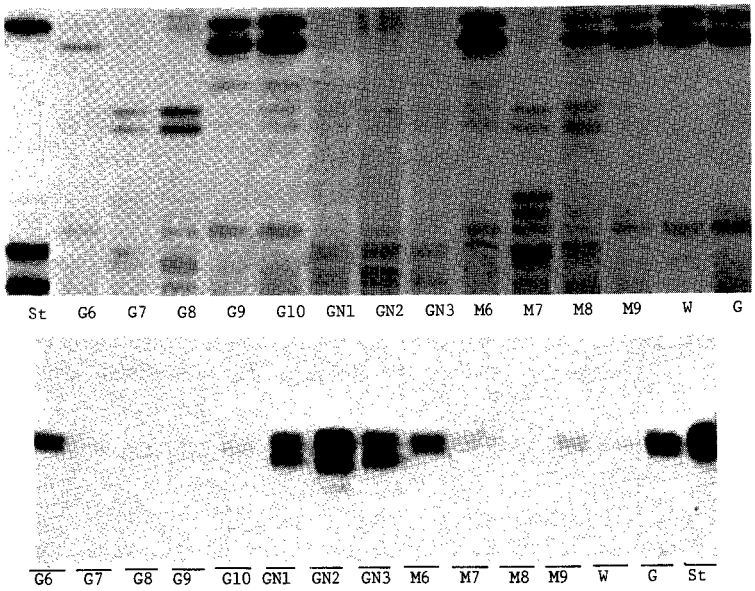
脂質分析：分析に用いたヒト悪性脳腫瘍はglioma10例，転移性脳腫瘍（肺，腎，腸）9例，悪性髄膜腫1例であり，いずれも開頭手術時直視下に摘出し，直ちに－70℃に保存した。また，ヌードマウス皮下で維持しているglioma3例も分析に用いた。組織の湿重量は100～300mgであった。脂質分析は常法(9)に従い，凍結乾燥後，クロロホルム-メタノール混合溶媒で抽出し，抽出液を用いて，ガスクロマトグラフィーによるコレステロールの定量，比色法による脂質結合性リンの定量を行い，DEAE-Sephadexカラムで酸性と中性脂質画分に分画した。中性脂質画分はアセチル化後，Florisilカラムで分離し，中性糖脂質画分を得た。

TLCプレート上でのアシアロGM1の検出と定量：ウサギで作製した抗アシアロGM1抗体を用いてTLCプレート上で展開した糖脂質に対する抗体の結合反応を調べた。酵素抗体法で測定した抗血清の抗体価は1:320,000，他の関連糖脂質，フォルスマン抗原，グロボシド，パラグロボシド，アシアロGM2とは交叉反応を示さなかった。Polygramプラスチックプレートに1-100ngのアシアロGM1を展開し，ブロッキングバッファー（1%ポリビニルピロリドン，1%卵白アルブミンPBS）で処理した後，抗アシアロGM1抗血清（1:200）を作用させる。0.1%Tween20PBSでよく洗浄，ブロッキングバッファーで処理し，パーオキシダーゼ標識抗ウサギIgG抗血清（1:1000）を作用させ，再び0.1%Tween20PBSで洗浄した。プレート上のパーオキシダーゼ活性は，4-クロル-1-ナフトール／H_2O_2を基質として染色した。定量に際しては，二波長TLCスキャナーを用い，測定波長420nm，対照波長710nmで測定した。

〔結果と考察〕

ヒト脳腫瘍組織の糖脂質：図1に示すように正常ヒト脳の中性糖脂質はセレブロシドが主要成分であるのに対し，glioma，転移性脳腫瘍のなかには，CDHやCTH，あるいは，グロボシドやアシアロGM1領域の成分が高濃度に含まれる頻度が高い。また，いずれの脳腫瘍組織も湿重量当りの中性糖脂質含量が，正常組織の含量よりも低く，質的量的な糖脂質の変化が脳腫瘍組織で起っていることが判る。糖脂質ばかりでなく，コレステロール，脂質結合性リン，ガングリオシドにも定性定量的変化が観察される。糖脂質組成については，悪性度と密接な関係があ

図1ヒト脳腫瘍組織の中性糖脂質（上図）とアシアロGM1（下図）



る特徴が見られた。

ヒト脳腫瘍組織のアシアロGM1：TLC免疫染色法により，TLCプレート上に展開したアシアロGM1の染色を行うと，5ng以上の抗原が定量的に検出できた。プレート上の抗原量を1ngから100ngまで変化させ検量線を作成し，各種腫瘍組織のアシアロGM1の検出定量を行った（図1）。染色パターンを図1に，定量値を表1に示す。図1で明らかなように，抗アシアロGM1抗体と反応する中性糖脂質は，標準アシアロGM1と移動度の等しい位置にあり，他の移動度の位置には染色できる中性糖脂質は全く観察されなかった。また，ヌードマウス移植Gliomaの場合，二本のバンドが観察でき，極性の大きい下のバンドはヒドロキシ脂肪酸・もしくはフィトスフィンゴシンを含む成分であることが予想された。正常脳から単離したアシアロGM1の高速中性粒子衝撃イオン化質量分析法による分析では，量が少ないためフラグメントイオンの検出は困難であったが，分子イオンが検出できた。表1に示すように正常ヒト脳には湿重量当り35nmol

表1. ヒト脳，Glioma，ヌードマウス移植Glioma組織のアシアロGM1

	正常ヒト脳		ヒトGlioma							ヌードマウス移植Glioma		
	白質	灰白質	G1	G2	G3	G4	G5	G7	G8	G9	GN1	GN2	GN3
アシアロGM1（nmol／g湿重量）	36.2	35.5	0.52	0.31	1.58	0.46	0.74	n.d.	n.d.	n.d.	24.71	55.79	23.72
アシアロGM1／リン脂質（＝1000）	1.2	2.0	0.1	0.0	0.1	0.1	0.1	nd	nd	nd	2.39	5.06	2.91

のアシアロGM1が含まれ，その含量は，白質，灰白質ともほぼ同じ値であった。脂質結合性リンに対するモル比で比較すると，1−2：1000程度の濃度であった。Glioma組織のアシアロGM1は，正常組織と比較すると極端に少なく，特に臨床的に悪性度の大きい患者組織では全く検出できなかった。しかし；ヌードマウス移植Gliomaでは高濃度にアシアロGM1が含まれ，脂質結合性リンに対するモル比で比較すると正常組織よりも高い値を示した。ヌードマウス移植Gliomaは，増殖度の大きい悪性Gliomaを移植したものであるが，この結果はヌードマウス皮下移植によってアシアロGM1の代謝系が変化していることを示す。皮下で増殖している細胞は明らかにヒト由来の細胞であるが，糖鎖構造の変化が生じていることから，ヌードマウス移植ヒト癌細胞を用いた実験を行う場合，注意が必要であろう。また，正常脳におけるアシアロGM1の存在とGliomaにおける変化は，アシアロGM1の代謝と免疫的性質を調べるうえで興味深い。

〔参考文献〕

1 S. Tsuji, M. Arita and Y. Nagai：J. Biochem. 94, 303(1983)
2 Y. Nagai and M. Iwamori：Mol. Cell. Biochem. 29, 81(1980)
3 M. Kasai, M. Iwamori, Y. Nagai, K. Okumura and T. Tada：Eur. J. Immunol. 10,175(1980)
4 S. Kusunoki, S. Tsuji and Y. Nagai：Brain Res.
5 岩森正男：神経精神薬理 4, 807(1982)
6 T. Hirano, H. Hashimoto, et. al：J. Clin. Invest. 66, 1437(1980)
7 T. Endo, D. Scott et. al：Glycoconjugates 7, 244(1983)
8 G. Inaba and J. Aoyama：Proc. Int. Conf. Behçet's disease 145(1982)
9 M. Iwamori, K. Sawada et al：J. Biochem. 91, 1875(1982)

125. アストロサイトーマ GA-1 の autocrine 型増殖調節

伊藤仁一・加藤泰治・田中　亮・加藤兼房*
（名古屋市大・医・第一生化，愛知県コロニー研・生化*）

〔要　約〕

ラットアストロサイトーマ細胞（GA−1）の培養液（無血清培地，N２培地）は、グリア細胞成長因子（glia maturation factor, GMF）と同様、ラット正常グリア芽細胞の DNA 合成を dose dependent に促進した。この GA−1 培養液に存在する growth - promoting factor (GPF) は分子量10.3K - 7.1K、等電点 4.55 の酸性タンパク質で、熱および酸・アルカリに不安定性を示した。ラットグリア芽細胞をＧＰＦで刺激すると細胞内の glia fibrillary acidic protein (GFAP), s−100 protein 含量は、それぞれ２倍、９倍に上昇し，α- enolase 含量は、1.4 倍上昇した。このようにＧＰＦは、GMF 同様グリア芽細胞の DNA合成促進能に加えて、グリア細胞のマーカータンパク質の含量を上昇させ、グリア芽細胞の生化学的分化も誘導した。また GPFは低血清条件（0.5％以下のＮＢＳ含有Ｆ - 10培地）でグリア芽細胞の形態分化も誘導した。GA - 1培養液には transforming growth factor (TGF)活性も認められ，腫瘍性グリア細胞は autocrine system を介して自ら産生した growth factor により細胞増殖を促進していることが示唆された。また腫瘍性グリア細胞が growth factor (GPF, GMF) により分化誘導されないことはＧＦ刺激後の情報伝達系が正常グリア芽細胞とは異っていることを意味している。

Key word： Astrocytoma GA-1, Growth promoting factor (GPF), Glia maturation factor (GMF)

グリア細胞成長因子（GMF)はラット正常グリア芽細胞の増殖および分化を促進する因子で、等電点4.75　分子量23.000の酸性タンパク質である。私たちは、最近GMF に類似した特性をもつ growth - promoting factor (GPF) を腫瘍性グリア細胞の培養液中に見い出し，自律増殖能の強い腫瘍性グリア細胞ほどGPF産生能が強く、ＧＭＦに対する反応性が低いことを示した。今回の報告では、GPF産生能の最も強いアストロサイトーマ（GA-1）細胞を無血清培地（N2 培地）で培養し、その培養液中に存在する growth factor (GPF) および transforming growth factor (TGF) について，その物理化学的特性と生化学的特性を検討した。

〔実験方法〕

１．細胞培養：ラットアストロサイトーマ（GA-1）細胞は10％ newborn bovine serum (NBS) を含むF - 10 培地にて 37 ℃、5％CO_2 下で維持し、0.1％トリプシン液による Sub-culture 後は、無血清培地（Ｎ２培地）で培養した(1)。ラットグリア芽細胞の培養は Kato らの方法に従った(2)。

２．GPFの物理化学的特性：GA - 1 培養液の 85％硫安沈殿物を透析後、Bio - Gel P - 30 カラムにて分子量を測定した。また、等電点は平板等電点分画法により測定した。

３．Mitogenic activity の測定：GPF 活性は、GPF の刺激を受けたラットグリア芽細胞のＤＮＡ合成（3H - チミジン取り込み）増加率を測定した。

４．GFA protein, S - 100、γ - enolase 定量：サンドイッチタイプのＥＩＡ系 (Sandwich - type enzyme immunoassay 法）により測定した(2)。

5．ＴＧＦ活性：マウス３Ｔ３細胞をGA-1細胞培養液を含む0.3%寒天培地で培養し、直径60μm以上のコロニーを測定し、ＴＧＦ活性とした。

〔結果および考察〕

Ｎ２培地でのＧＡ－１細胞培養液でのGA-1細胞培養液はGMF同様、ラット正常グリア芽細胞のDNA合成をdose dependentに促進した（Fig. 1）。このことはGA-1細胞がGPFを産生し細胞外に分泌していることを示す。しかしながら、GPFの過剰投与はGMFと同様、DNA合成の抑制効果を示した。GA-1培養液の85%硫安塩析沈殿画分を透析後Bio-Gel P-30カラムにかけた（Fig 2）。GPF活性は分子量31.5K～18.0K、および10.3K～7.1Kの２つの画分に分かれ、７０%以上の活性が低分子領域にあらわれた。低分子画分をAmicon YM-05 membraneで濃縮後、平板等電点分画法にかけた。GPFの等電点は4.67～4.55でGMF（pI 4.75）とよく類似した等電点を示した。またGPFは60°C 30 minの加温により失活した。一方様々なpHで4°C10時間GPFを処理すると、pH３以下あるいはpH９以上ではGMF同様　熱および酸・アルカリに不安定性を示した。グリア芽細胞を一週間GPFで刺激し、GPFの生化学的分化誘導作用をＧＭＦのそれと比較した（Table 1）。GFA protein 含量はGPFにより２倍、GMFにより2.6倍上昇し、S-100含量はGPF、ＧＭＦ共に９倍上昇した。またα-enolase含量はGPFにより1.4倍、GMFにより1.8倍上昇した。このようにグリア細胞のマーカータンパク質であるGFAP、S-100そしてα-enolase含量は、GPF刺激によりGMF刺激の場合とほぼ同程度上昇した。GMFの生物活性の特徴であるグリア芽細胞の形態分化誘導作用は、無血清あるいは低血清（0.5%以下）条件下でのみGPF刺激により認め

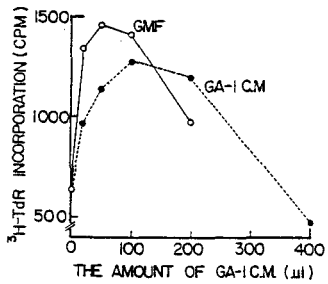


Fig. 1 Dose-response curve of GA-1 C.M. for mitogenic stimulation of glioblasts

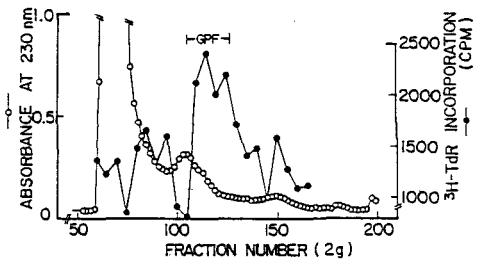


Fig. 2 Bio-Gel P-30 Column chromatography of GA-1 C.M.

られた。加えてGA-1細胞培養液にはTGF活性がみられることより、GA-1細胞はgrowth factorを細胞外に分泌しオートクリン形式で自らの増殖を維持していることが示唆された。またGA-1細胞はGMFに物理化学的特性（分子量のみ異なる）および生物活性の類似したgrowth factor (GPF)を産生しており、GA-1細胞自身は、正常グリア芽細胞と異なり増殖面でのみ反応していることが判った。

Table 1 The effects of GA-1 C.M. on differentiation of glioblasts

	GFA[1] (units/mg protein)	S-100 (ng/mg protein)	α-enolase (p mol/mg protein)
Control	19.3 ± 2.8	21.4 ± 9.2	9.75 ± 1.17
GA-1 C.M.[2]	39.3 ± 8.4	196.0 ± 92.3	13.5 ± 1.2
GMF	49.7 ± 9.2	181.1 ± 71.6	17.4 ± 4.3

1) GFA was measured by the sandwich-type enzyme immunoassay system in the presence of 0.5% SDS. One unit was defined as the amount of 1 mg of protein in the partially purified GFA fraction after hydroxyl apatite and Sephadex G-150 Column Chromatographies.
2) The 20-fold concentrated sample was used for this experiment.

〔文献〕

(1) Kato, T. etal. (1981) Brain Res., 212, 393-402
(2) Kato, T. etal. (1984) Brain Res., 301, 83-93,

126. グリア芽細胞増殖抑制因子（GGIF）の生物活性：グリア細胞成長因子（GMF）活性に対する抑制作用

原　普二夫・田中恭子*・伊藤仁一**・加藤泰治**・田中　亮**
（名古屋市大・医・第二外科，粟津神経生物研*，名古屋市大・医・第一生化**）

〔要　約〕

マウス神経芽腫細胞（Neuro 2a, NS-20Y, NIE-115, NAs-1）よりグリア芽細胞の増殖を制御する因子（グリア芽細胞増殖抑制因子，GGIF）の産生能をスクリーニングした。4種の神経芽腫細胞のうちマウス腹水型神経芽腫細胞NAs-1の培養液に強いGGIF活性が存在した。この因子はDEAE-Sephacelカラムに吸着する酸性タンパク質でGGIF$_1$（M.W. 33K～40.5K）およびGGIF$_2$（M.W. 31K～34K）の2成分に分かれた。GGIFはラットグリア芽細胞のDNA合成および細胞分裂をdose-dependentに抑制し、グリア細胞成長因子（GMF）によって刺激されたグリア芽細胞に対しても、そのDNA合成および細胞分裂を抑制した。GGIFは、G0期にあるグリア芽細胞のGMF刺激によるS期への誘導を特異的に抑制した。しかし、GMFの持つグリア芽細胞分化促進能に対しては阻害効果を示さなかった。即ち、グリア芽細胞のGMF刺激によって誘導されるアストロサイト様細胞への形態分化がGGIFによって阻害されなかった。さらにGMF刺激によるグリア芽細胞内S-100含量の上昇に対してもGGIFは影響を与えなかった。これらの結果より、GGIFはGMFによるグリア芽細胞の増殖に対してのみ阻害効果を示し細胞分化に影響を与えないことが示唆された。

Key word：Mouse neuroblastoma NAs-1, Glioblast growth inhibitory factor (GGIF), Glia maturation factor (GMF)

坂崎らは、ラット正常グリア芽細胞の培養液中にマウス神経芽腫細胞Neuro 2aの増殖を抑制する神経芽腫細胞増殖抑制因子(NGIF)を見い出した(1)。さらに堀内らはグリア芽細胞とマウス腹水型神経芽腫細胞NAs-1とのCocultureを行ないNAs-1のDNA合成抑制と同時にグリア芽細胞のDNA合成をも抑制されることを示唆した(2)。この事実はグリア芽細胞によるNGIFの培養液中への産生と共に、NAs-1もグリア芽細胞のDNA合成を抑制する因子を培養液中に産生していることを示唆した。そこで私たちは、4種のマウス神経芽腫細胞を用いてグリア芽細胞の増殖を抑制する因子の産生をスクリーニングすると同時に、その物理化学的特性と生物活性，特にグリア芽細胞に及ぼすGMFの作用に対するGGIFの効果を検討した。

〔方法〕

1．細胞培養：4種のマウス神経芽腫細胞を使用し、Neuro 2a，NS-20YおよびN1E-115は10% fetal bovine serum (FBS)を含むDMEM培地で、またNAs-1は10% FBS含有F-10培地にて37°C、5%CO$_2$下で維持した。ラットグリア芽細胞の培養はKatoらの方法に従った(3)。

2．GGIFおよびGMFの部分精製：NAs-1の培養液の85%硫安塩析沈殿画分を透析後，DEAE-Sephacelカラム、Bio-Gel p-200カラムでGGIFを部分精製した。GGIF活性は、ラットグリア芽細胞の^{3}H-チミジン取り込み（DNA合成）の抑制を指標とした。GMFの精製は(3)の方法に従った。GMF活性は，GMFの刺激を受けたラットグリア芽細胞の^{3}H-チミジン取り込み増加率を測定した。

3．S-100 protein 定量：サンドイッチタイプの enzyme immunoassay 法により定量した(4)。

〔実験結果および考察〕

4種のマウス神経芽腫細胞(NS-20Y, N1E-115, Neuro 2a, NAs-1)の培養液を用いて、ラット正常グリア芽細胞のDNA合成抑制効果を検討した。Fig. 1で示したように、マウス腹水型神経芽腫細胞(NAs-1)の培養液中に強いGGIF活性が認められた。NAs-1の培養液を85%硫安で塩析し、沈殿画分を透析後、DEAE-Sephacel カラムクロマトグラフィーを行なった。GGIF活性はDEAE-Sephacel に吸着し、$GGIF_1$ と$GGIF_2$の2成分に分かれて溶出された。GGIFはグリア芽細胞のDNA合成を抑制すると同時に、細胞分裂も抑制した(Fig. 2)。GMFによって刺激されたグリア芽細胞のDNA合成に対してもGGIFは抑制効果を示した(Fig. 3)。そこでグリア芽細胞をGMFで刺激した後、経時的にNAs-1培養液を添加した。GMF刺激後8時間までは、GGIFはGMFのDNA合成促進作用に対し抑制効果を示したが、10時間以後では抑制効果を示さなかった。グリア芽細胞はGMF刺激後8時間でS期に誘導されることから、GGIFはGMFによってS期に誘導される直前のグリア芽細胞を特異的に抑制することが示唆された。同様の実験をGMF刺激によるグリア芽細胞の細胞分裂に対するGGIFの抑制効果に対しても行なった。Fig. 4から明らかなように、GMF刺激後8時間以後のグリア芽細胞に対してGGIFは細胞分裂抑制作用を示さなかった。このことはGMFによって誘導されたグリア芽細胞の細胞分裂に対するGGIFの抑制起点はG1後期からS期直前であることを示している。一方、GGIFはGMFのもつグリア芽細胞の分化誘導促進作用に対しては抑制効果を示さなかった。即ち、GMFによって誘導されるグ

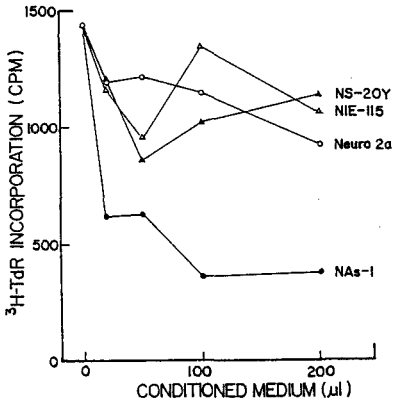


Fig. 1 GGIF activity in the conditioned medium of mouse neuroblastomas

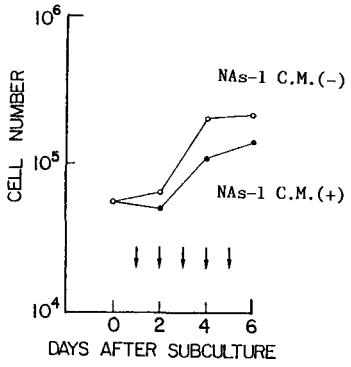
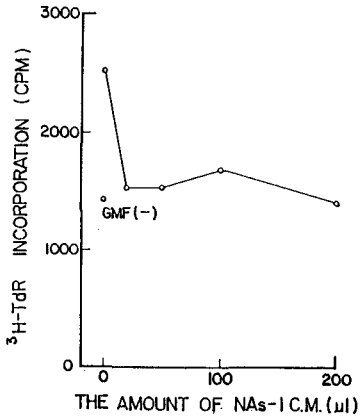


Fig. 2 The effects of NAs-1 C.M. on cell growth of rat glioblasts

リア芽細胞のアストロサイト様形態への分化がGGIFの存在の有無にかかわらず誘導された。さらにグリア芽細胞のマーカータンパク質であるS-100含量もGGIFの存在の有無にかかわらずGMF刺激により上昇した。これらの結果より、GGIFはGMFによって誘導されたグリア芽細胞の増殖に対してのみ阻害効果を示し、細胞分化には影響を与えない因子であることが示唆された。



Flg. 3 The inhibitory activity of NAs-1 C.M. on DNA synthesis of glioblasts stimulated with GMF

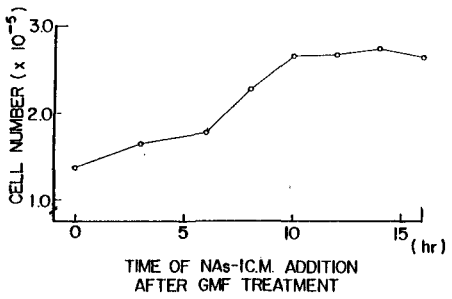


Fig. 4 The inhibitory activity of NAs-1 C.M. on cell division of glioblasts stimulated with GMF

〔文献〕

(1) Sakazaki, Y. etal. (1983) Brain Res. 262, 125-135
(2) Horiuchi, I. etal. (1985) Neurochem. Int. 7, 497-504
(3) Kato, T. etal. (1981) Brain Res. 212, 393-402
(4) Kato, T. etal. (1984) Brain Res. 301, 83-93

127. 培養オリゴデンドロサイトの細胞骨格

熊谷博道・佐藤七枝・今澤正興・田平　武*・宮本侃治
(国立武蔵療・神経センター・代謝研，疾病6部*)

〔要　約〕

ニワトリ胚脳より単離、培養したオリゴデンドロサイトの細胞骨格成分を解析し、各成分がオリゴデンドロサイトの突起形成に果たす役割について検討した。SDS ポリアクリルアミドゲル電気泳動により、オリゴデンドロサイトの細胞骨格は主としてチューブリンとアクチンより成り、10 nm フィラメントの構成タンパク質はわずかに存在することが認められた。間接ケイ光抗体法により、オリゴデンドロサイトの突起内に多数の微小管が存在し、細胞表面や突起先端部にアクチンが分布することが示唆された。オリゴデンドロサイトの微小管はコルヒチンや Ca^{2+} イオン処理で消失したが、低温に対しては比較的安定であった。一方アクチン重合を抑制することが知られているサイトカラシンB（CB）は、濃度〉1 μM でオリゴデンドロサイトの突起形成を促進することを観察した。添加後数時間以内で曲線状のよく伸展した突起が出現し、24時間後にCBを除去することにより可逆的にこの促進効果が消失した。以上の結果からオリゴデンドロサイトの突起内には微小管が多数存在し突起を支持すること、またアクチンフィラメントの存在形態が突起形成に重要な役割を果たしていることを示唆した。

Key word： oligodendrocytes, cytoskeleton, myelin formation

オリゴデンドロサイトは中枢神経系におけるミエリン形成・維持に関与するとされ、ミエリンはオリゴデンドロサイトの細胞膜が著しく伸展し、ニューロンを取り囲むことにより形成されると考えられる。一方、オリゴデンドロサイト内に多数の微小管が存在すること[2]、ミエリン画分に微小管構成タンパクであるチューブリンが含まれていること[1]などから、微小管がオリゴデンドロサイト突起形成、ミエリン形成に重要な役割を果たすことが推測される。前回はニワトリ脳オリゴデンドロサイトの単離法、培養系を報告したが、今回は培養オリゴデンドロサイトの微小管などの細胞骨格系について、突起形成との関連性を検討し報告する。

〔材料および方法〕

(1) 材料：白色レグホン有精卵を 38.5℃、湿度90％の条件でふ卵し、14－17日胚の大脳（小脳、脳幹部を除去）を用いた。

(2) オリゴデンドロサイトの単離および培養：既報のパーコール法[3]を若干改変し、単離した細胞をポリ－L－リジンでコーティングしたプラスチックシャーレまたはガラスカバーグラスに播種した。培地としては10％ウマ血清、100 μg/ml ストレプトマイシン、100 units/ml ペニシリンを含む Eagle's MEM を用いた。

(3) オリゴデンドロサイトの細胞骨格の単離[5]：培養オリゴデンドロサイトを PSB で2回洗浄後、0.2％ Triton X-100 含有の微小管安定化 buffer を用い、室温5分間処理し、可溶性画分を Fr. 1 とした。細胞骨格は非溶出画分として得られるが、更に2mM $CaCl_2$ 含有の上記 buffer 中で4℃、20分処理し、溶出画分（Fr. 2）と残渣（Fr. 3）とに分画した。微小管タンパクは Fr. 2 に回収される。

(4)間接ケイ光抗体法[6]：カバースリップ上で培養した細胞を1％グルタールアルデヒドを用い室温20分間固定の後、0.5％ Triton X−100で5分間処理した。0.5 mg/ml $NaBH_4$、PBSで洗浄した後、各抗血清（抗チューブリン，×50希釈；抗アクチン，×100希釈）と室温1時間反応させた。第2抗体としてはFITC結合のヒツジ抗ウサギIgGを用い、ケイ光顕微鏡により観察した。

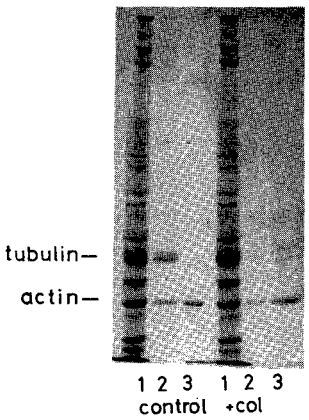
(5)電子顕微鏡観察：グルタールアルデヒド-ホルムアルデヒドにより固定、通常の方法により染色した。

〔結果および考察〕

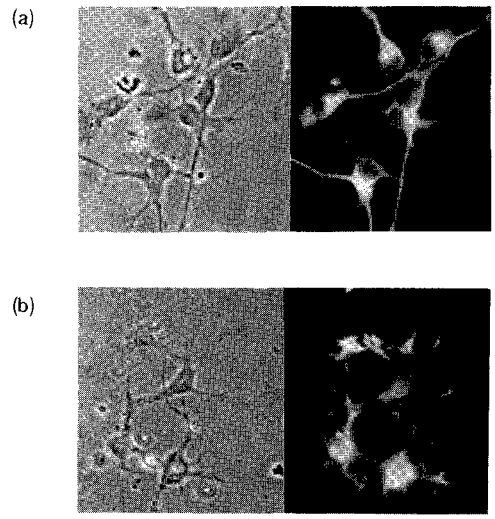
(1)培養オリゴデンドロサイトの細胞骨格：17日目の胚脳より、パーコール法を用いて単離したオリゴデンドロサイトを培養し、その細胞骨格成分をSDSポリアクリルアミドゲル電気泳動により解析した（Fig. 1）。単離した骨格成分は主としてチューブリン、アクチンから構成され、その他10 nmフィラメントとして知られるビメンチン、グリアフィラメント蛋白が微量に存在した。あらかじめコルヒチン処理を行い細胞骨格を単離すると、Fr. 2のチューブリンのバンドが消失した（Fig. 1、＋col）。

微小管やマイクロフィラメントの分布を抗チューブリン、抗アクチン血清を用いた間接ケイ光抗体法を用いて検討した。抗チューブリン血清によりオリゴデンドロサイトの細胞質、特に突起が強く染色された（Fig 2 a）。一方、抗アクチン血清では細胞質のほか突起先端部が比較的強く染色された（Fig. 2b）。

(2)培養オリゴデンドロサイトに対する微小管重合阻害因子の効果：in vitroにおいて微小管を脱重合させることが知られているコルヒチン、Ca^{2+}イオン、低温の各処理を



(Fig. 1) Cytoskeletal proteins of the cultured oligodendrocytes.
The cultured oligodendrocytes were treated with or without 50 μM colchicine (+col or control) for 2 hr before the extraction. Cytoskeletal proteins containing Ca^{2+}-labile microtubule proteins were prepared as described in "Methods". Each fraction was analyzed by 10 % polyacrylamide gel electrophoresis in the presence of SDS and stained with Coomassie Brilliant Blue.

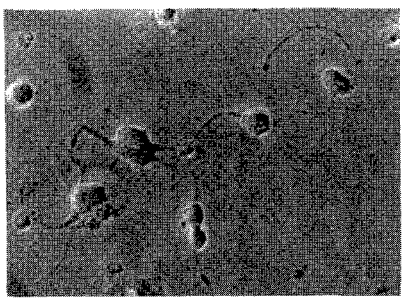


(Fig. 2) Localization of tubulin and action in the cultured oligodendrocytes.
The cultured cells(culture 4 day) were fixed, permeabilized and immunostained with either rabbit anti-tublin (a) or anti-actin (b) serum.

オリゴデンドロサイト微小管に作用させ、ケイ光抗体法により解析した。前二者の処理により微小管は脱重合され、一方低温処理によりこの細胞の微小管は安定であることが認められた。またコルヒチン処理により突起形成は完全に阻害された。

(3)培養オリゴデンドロサイトに対するサイトカラシンBの効果：サイトカラシンB（CB）はアクチンフィラメントの脱重合および細胞内成分との相互作用の抑制により培養細胞の形態に顕著な変化を与えることが報告されている[4,7]。単離したオリゴデンドロサイトをディッシュに播種し、接着後 CB を添加したところ、添加後1-2時間で突起の伸展が観察され始め、添加24時間後には著しい突起の伸展が認められた。形成された突起は対照と比べ非常に長く、曲線状の形態を示した。この効果はサイトカラシンDでも同様であった。またこの効果は可逆的で、24時間処理後 CB を除去すれば対照とほぼ同様の形態を示した。CB の濃度が 0.1 μM では効果が認められず、1 μM 以上で顕著な効果が現われた。一方 CB による突起形成に伴うタンパク質合成を〔^{35}S〕メチオニンを用いて解析したが、新たなタンパク質合成、およびアクチン、チューブリンの合成量について著しい変化は観察されなかった。間接ケイ光抗体法により CB 処理で生じた長い突起中には微小管が多数存在することが示唆され、現在電顕観察により突起内の微小管とアクチンフィラメントの関連性について検討中である。

今回の結果からオリゴデンドロサイトの突起維持には微小管が必須であること、突起形成の促進には、アクチンフィラメントの脱重合または他の構造物（例えば微小管や膜構造）との相互作用の抑制が必要であることが示唆された。今後電顕観察、生化学的解析によりオリゴデンドロサイト突起形成のメカニズムを追究する予定である。



(Fig. 3) Phase contrast microscopy of cytochalasin-treated oligodendrocytes.
Cells were treated with 10 μM CB for 1 day.

〔謝辞〕
抗アクチン血清、抗チューブリン血清を供与して下さった臨床医学総合研究所の飯田和子、矢原一郎両博士、愛知ガンセンター佐藤周子博士に心より感謝します。

〔文献〕

(1) de Nechaud, B., Wolff, A. Jeantet, C. & Bourre, J. M.(1983) J. Neurochem. 41, 1538-1544.
(2) Gonatas, N. K., Hirayama, M., Steieber, A. & Silberberg, D.H.(1982) J. Neurocyt, 11, 997-1008.
(3) 熊谷博道、佐藤七枝、今澤正興、宮本侃治 (1984) 神経化学 23, 345-347.
(4) Schliwa, M. (1982) J. Cell Biol. 92, 79-91.
(5) Solomon, F., Magendantz, M. & Saltzman, A. (1979) Cell 18, 431-438.
(6) Wang, K., Feramisco, J. R. & Ash, J. F. (1982) Methods Enzymol. 85, 514-562.
(7) Yahara, I., Harada, F., Sekita, S., Yoshihira, K. & Natori, S. (1982) J. Cell Biol. 92, 69-78.

128. ラット脳を用いた培養オリゴデンドログリアの形態的特徴とミエリン形成能力

武藤紀子・阿相皓晃・平野修助　（東邦大・医・第二生理）

〔要　約〕

胎生期のラット大脳より初代培養を行ない、ミエリン形成細胞であるオリゴデンドログリアの、培養日数に伴う形態変化について検討した。この培養系におけるCNPase活性は、培養10日目すぎより認められ、30日目ごろより著しい増加を示した。これらの各時期にみられるオリゴデンドログリアには、大きく分けて3つのtypeが存在していた。これらは、出現時期、直径、突起の数、抗-CNPase血清,抗-MBP血清を用いたPAP法での染色性、分裂能力等が異なり、培養日数を追ってある時期重複して認められるため、オリゴデンドログリアの成熟段階を示していると思われた。培養30日目すぎに見られるオリゴデンドログリアは、非常に大型で、くもの巣状に広げた突起の先端までCNPase,MBPが存在していた。特に、突起同士の接合部は染色性が強く、生後のラット脳の初代培養系から分離した成熟オリゴデンドログリアと、形態的にほぼ等しいものであった。これらの細胞は、CNPase活性が著しい上昇を示す時期（培養30日すぎ）に、数多くみられるため、ミエリン形成能力を備えた細胞であると考えられた。これらのことから、オリゴデンドログリアの成熟に伴い、ミエリン形成の引金となるなんらかの因子が、発達したオリゴデンドログリア中に形成されるものと思われる。

Key words：　Oligodendroglia, 2',3'-cyclic nucleotide 3'-phosphohydrolase(CNPase), Myelination

〔はじめに〕

中枢神経系におけるミエリン形成は、オリゴデンドログリアと成熟した軸索との間で行なわれるといわれている。しかしながら、オリゴデンドログリアの軸索の認識、ミエリン形成の引金など、まだ不明な点が多い。われわれは、これらの点を細胞レベルでとらえるため、各々の細胞がその独自の性質を反映できうる、dissociated cell culture において研究を進めてきた。今回、胎生期のラット大脳の初代培養系を用いて、オリゴデンドログリアの培養日数、CNPase活性に対応した形態変化、及び、その時の神経細胞の状態について研究を進め、いくらかの知見を得たので報告する。

〔実験方法〕

1.初代培養：胎生18日目ラット（Wistar系）大脳を取り出し、軟膜及び血管類を取り除いた後、ステンレス スクリーンメッシュ（pore size 140 μm）を通し、細胞を単離、培養液で3回洗浄（800rpm, 10min）後、poly-L-lysine をコートした 75cm^2 glass dish にまいた。培養液は、15% 新生仔牛血清, 600mg/dl glucoseを含む、Eagle's MEM（ニッスイ）を用いた。

2.オリゴデンドログリアの分離培養：McCarthyら(4)の方法に従い、生後1日目のラット大脳を初代培養し、培養10日目に上層のオリゴデンドログリアを、振り落とすことにより分離し、上述と同じ条件で、glass coverslip 上に培養した。

3.免疫組織化学：培養細胞を、4% パラホルムアルデヒドで30分固定後、Sternbergerら(7)の方法に従い、抗-CNPase血清、抗-MBP血清、抗-NF血清をもちいてPAP染色を行った。

4. CNPase活性の測定 : 培養細胞をPBSで3回洗浄後、ラバーポリスマンでかきとり、ヒストコロンでホモゲナイズしたものを試料とした。測定はSprinkle(6)の方法に従い、[8-^{3}H]2'3'C-AMPを基質として生成される、[8-^{3}H]2'AMPの放射活性で調べた。

5. 蛋白質の定量 : Lowryら(3)の方法に従った。

[実験結果及び考察]

胎生18日目のラット大脳からの、初代培養系におけるCNPase活性は、培養10日目位より認められ、30日目すぎに著しい上昇を示した (Fig.1 : 値はmean±S.E. で示す)。これらの培養期間中に見られるオリゴデンドログリアを、抗-CNPase血清, 抗-MBP血清を用いたPAP法で観察した結果、3つのtypeが認められた。これらは Table 1 に示した様に、培養日数に伴い、細胞体の成長、突起数の増加が認められ、CNPase,MBPの染色性も強くなっており、逆に分裂能力は低下していった。すなわちtype 1,2,3 は、オリゴデンドログリアの成熟過程を示していると思われた。

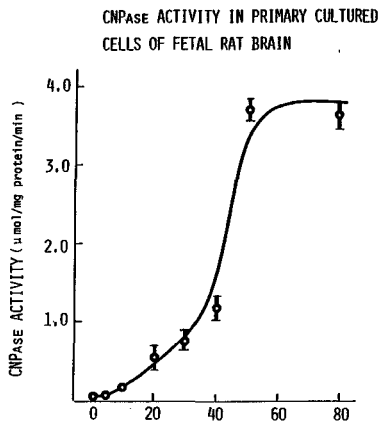


Fig.1

Fig.2 (type 1)は、抗-CNPase血清を用いたPAP法で染めた、培養10日目のオリゴデンドログリアであるが、直径約3μmの小さな細胞体(►)は全く染まっておらず、突起数も0~2本とごく少ないものであった。 Fig.3-a (type 2)は、培養20日目のオリゴデンドログリアであるが、type 1 に比べて細胞質が豊富であり、突起も2~8本と増加していた。また、成長した細胞体(約7μm)と突起部分にCNPaseの存在が認められた(MBPも同様)。このtypeのオリゴデンドログリアは、培養20日すぎまで分裂像が認められた(Fig.3-b)。 Fig.4 (type 3)は、培養35日目のオリゴデンドログリアであるが、細胞体は10μm以上と非常に大型で、突起もくもの巣状に複雑にのばし、特に、突起同士の接合部はCNPase(MBPも同様)が強く存在していた。このtypeの細胞には、分裂像は見られず成熟型のオリゴデンドログリアであると思われた。また、このtypeの細胞は、生後のラット大脳の初代培養から分離した、単離オリゴデンドログリアと形態的に似ており、特に混合培養ではオリゴデンドログリア同士が突起を結びあってしまうため、広げた突起の観察が不十分であったのに対し、単離オリゴデンドログリアにおいては、くもの巣状の突起の走行がはっきりと観察できた(Fig.5a,b)。

一方神経細胞は、培養後10日目頃まで分裂像が認められ(1)、その後細胞体は増大し突起も太くなっていった(Bodian染色により)。特に培養20日目過ぎになると、神経細胞間のみに無数に広がる線維網が確認され、これらの線維網により、多数の神経細胞がしっかりと結合され分化した神経細胞の集落形成が示された。

McMorrisら(5) は、オリゴデンドログリアの分離培養細胞に、非常に高値のCNPase活性を見出しており、われわれも、同様の結果を得ている。しかし、オリゴデンドログリアのみが示す

それらの活性値には限りがあり、ミエリン形成時においてさらに高い活性上昇が認められると思われる。すなわち、培養30日すぎの上昇カーブがそれにあたり、形態的にも type 3 のオリゴデンドログリア、分化した神経細胞群、ミエリン形成像が認められた(2)。それらはまたCNP-aseの上昇カーブに従い、オリゴデンドログリアの形態的変化に一致してミエリン形成能力との関連がうかがわれた。特に type 3 のオリゴデンドログリアは1つの細胞が数多くのミエリンを形成するという現象を納得させうる形態であると思われた。

今後、ミエリンを構成する脂質や糖蛋白が、これらのオリゴデンドログリアの形態変化に伴い、どの様に変化していくのかを追究すると共に、種々のステージのニューロン、オリゴデンドログリアの co-culture 等により細胞間の相互作用を検討していく。

Table 1.

	出現時期	直径	突起の数	PAP法での染色性 CNP	MBP	分裂能力
type 1	0~20日	約 3um	0~2 本	−	−	++
type 2	10~30日	約 7um	2~8 本	+	+	+
type 3	20日以後	10um以上	くもの巣状	++	++	−

[Reference]

(1) Asou,H.et al.(1985) Brain Res.,332,355-357.
(2) Hirano,S.et al.(1985) Cell Structure & Function, (Inpress)
(3) Lowry,O.H.et al.(1951) J.Biol.Chem.,193,256-275.
(4) McCarthy,K.D.et al.(1980) J.Cell Biol.,85,890-902.
(5) McMorris,F.A.(1984) Brain Res.,292,123-131.
(6) Sprinkle,T.J.et al.(1978) Analyt.Biochem.,88,449-456.
(7) Sternberger,L.A.(1979) Immunocytochemistry,(2nd ed.)104-169.

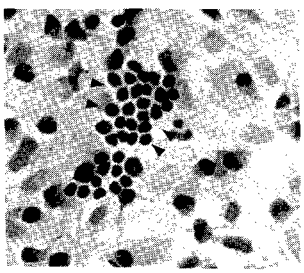


Fig.2.(type 1) Immunoperoxidase staining for CNPase in 10 day-old primary cultures (x600).

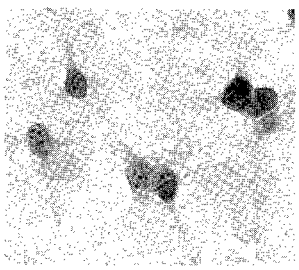


Fig.3-a.(type 2) Immunoperoxidase staining for CNPase in 20 day-old primary cultures; a: x600, b: mitotic stage (▶) x600.

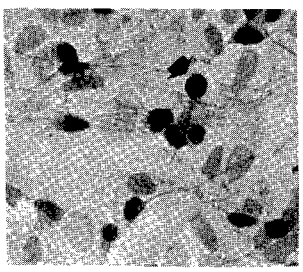


Fig.3-b.(type 2)

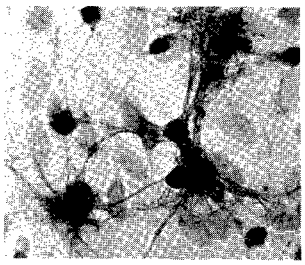


Fig.4.(type 3) Immunoperoxidase staining for CNPase in 35 day-old primary cultures (x600).

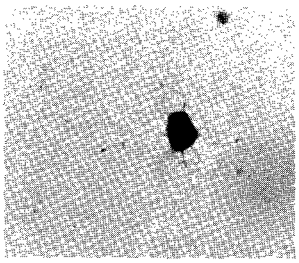


Fig.5-a.(type 3) Immunoperoxidase staining for CNPase of 5 day-old oligodendrocytes, separated from 10 day-old primary cultures of newborn rat brain; a: x600, b: scanning electron microscopy, x1,000.

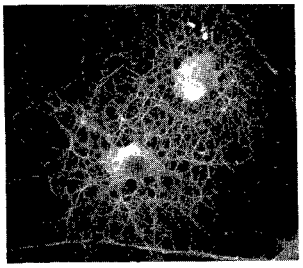


Fig.5-b.(type 3)

129. ウシ脳からの Substance P 結合部位の可溶化

田中祥裕・仲田義啓・森島義行・瀬川富朗
（広島大・医・総合薬学・薬効解析）

〔要　約〕

中枢神経組織内Substance P(以下、ＳＰ)結合部位の膜画分からの可溶化を試みた。牛脳幹部を、CHAPS:3-[(3-cholamidopropyl)-dimethylammonio]-1-propanesulfonate を用いて可溶化し、膜画分及び可溶化膜画分での[^{3}H]ＳＰ結合実験を行い比較検討した。その結果、牛脳幹部の膜画分への[^{3}H]ＳＰ結合に対する類似ペプチドのIC_{50}値は、非放射性ＳＰ 2.19nM, Physalaemin (以下、Phy) 58.9nM, Eledoisin (以下、Ele) > 10μM であった。一方、NaCl(0.1M)存在下10mM CHAPS で可溶化した画分では、ＳＰ 13.5nM, Phy 178nM, Ele >10μM であった。可溶化膜画分を5mM EDTA, 1mM Dithiothreitol(以下 DTT)存在下[^{125}I]Bolton-Hunter 試薬でラベルしたＳＰ([^{125}I]BHSP)と incubate した後、SDS-Polyacrylamide gel 電気泳動(以下 SDS-PAGE)を行なうと数本の放射活性を有するバンドが得られた。MW 約50K～60K の位置のバンドに最も強い放射活性が認められた。更に、膜及び可溶化膜画分とも、高濃度[^{125}I]BHSP でラベルすると、MW 約90K 付近に新たな放射活性を有するバンドが確認された。可溶化膜画分を[^{125}I]BHSP と incubate した後、高速ゲルクロマトグラフィー(GPC)で分析したところ、Void Volume 付近に放射活性のピークが認められた。このピークは予め組織を1μM のＳＰで incubate 後、可溶化し分析すると、約20% 減少した。以上の結果、牛脳幹部には Leeら[6] の分類によるＳＰ-Ｐ型の結合部位が存在し、CHAPS で可溶化されSDS-PAGE より分子量約９万以下の３～４個に分離された。またGPC により界面活性剤－結合部位複合体の分子量は10万以上であると推定された。

Key word： Substance P binding sites, solubilization, central nervous system .

1982年、Leeら[6] は平滑筋標本におけるSubstance P(ＳＰ)とEledoisin(Ele)の感受性の違いからＳＰ受容体のサブタイプを分類した。1983年、Kimuraら[4], 及び Kangawaら[3] によって哺乳動物の中枢神経系にＳＰに構造類似のタヒキニン類が発見されたが、このことは哺乳類の中枢神経組織に受容体のサブタイプ、つまり結合部位が異なる分子構造を有するサブタイプが存在する可能性を提唱した。我々は、この様なサブタイプの分子的性質を明らかにするため、まずＳＰ結合部位の可溶化を試みた。

［実験方法］

Segawaら[5] の方法に従って牛脳幹部よりＰ$_2$画分を得、－80℃で保存し実験に用いた。

膜画分への[^{3}H]ＳＰ結合

Ｐ$_2$画分を、100μM GDP 及び 10mM NaCl を含む 50mM Tris-HCl buffer(pH 7.4)に懸濁し、室温で１時間放置後20,000×g,10min で遠心した。沈渣を２度洗浄後、10mM $MgCl_2$, 0.02% BSA, 40μg/ml Bacitracin, 4 μg/ml Leupeptin, 2 μg/ml Chymostatin, 10mM Captopril を含む50mM Tris-HCl buffer(pH 7.4)に蛋白濃度が約2.5mg/ml になるように懸濁し、膜標本液とした。結合実験は、50μl のdisplacer に400μl の膜懸濁液を加え 24℃で１時間incubate することによって行った。

CHAPS による膜画分の可溶化

Ｐ$_2$画分を10mM CHAPS、0.1M NaCl を含む50mM Tris-HCl buffer(pH 6.5)で懸濁し、氷中に30分間放置した後、100,000×g 1hr 遠心し、得られた上清を可溶化膜標本とした。可溶化膜標本においても、膜標本の場合と同様に、[^{3}H]ＳＰ結合実験を行った。B/F 分離は、Brunsら[2] の方法に従い 0.3% polyethyleneimine で前処置した GF/B glass filter を用いて行った。

SDS-Polyacrylamide gel 電気泳動

12.5% Polyacrylamide gel 中で泳動させた後、0.1% Coomassie Brilliant Blue R-250 で染色した。

高速ゲル ろ過法 (GPC)

TSK G-3000 SW を用い、カラム及びbuffer を氷冷しつつ行った。

[結果]

SP結合部位が牛脳幹部P_2画分に存在し、非放射性SP, Phy, Ele で置換された。[^{3}H]SP特異的結合を抑制するpotency 順位は、SP > Phy >> Ele で、このSP結合部位が、いわゆるSP-P型であることが示唆された(Fig.1)。SP結合部位は、10mM CHAPS 可溶化膜画分にも存在し、膜画分と同様にSP > Phy >> Ele の順で結合量が抑制された(Fig.2)。従って、SP結合部位が膜画分よりCHAPS で可溶化されることが示唆された。

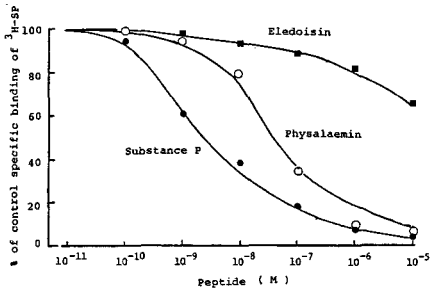


Fig. 1. Displacement of ^{3}H-SP binding to bovine brain membranes by SP, Physalaemin and eledoisin.

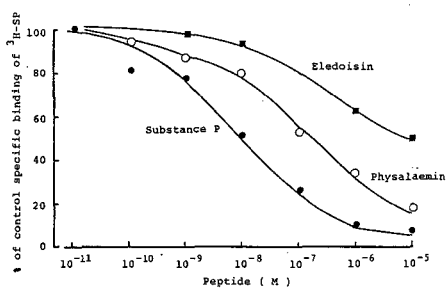


Fig. 2. Displacement of ^{3}H-SP binding to CHAPS solubilized bovine brain fraction by SP, Physalaemin and eledoisin.

この可溶化膜画分の結合部位の分子量を推定するため、[^{125}I]Bolton-Hunter 試薬でSPをラベルし([^{125}I] BHSP)、SDS-PAGE を行った。CHAPS で可溶化した画分は、主に、分子量100K 以下の蛋白質に分離され、autoradiogram により、分子量約55K の位置に強い放射活性がみられた(Fig.3)。その他に、約47K, 40K の位置にも放射活性がみられた。更に、高濃度の[^{125}I]BHSP を用いると、分子量が約95K の蛋白質もラベルされた。膜画分でも同様の結果が得られた。組織を予め10μM のSPとincubate した後、[^{125}I]BHSP とincubate(可溶化膜画分 0℃ 30min、膜画分 室温 1 hr)したところ、前処置しない対照群に比べて、ラベルされた蛋白質すべてにおいて放射活性の低下が認められた。以上の結果より、CHAPS で可溶化された画分に、SPと特異的に結合する3～4個の蛋白質(MW 約20K から、95K まで)が存在することが明らかになった。

[^{125}I]BHSPと粗シナプス膜画分を室温下1時間incubate することによって[^{125}I]BHSP を結合させた後、遠心して得られた沈渣を10mM CHAPS で可溶化し直ちにGPC による分析を行った。結果はFig.4 に示す様に放射活性がVoid Volume 付近とfree の[^{125}I]BHSP と思われる低分子付近に溶出された。このVoid Volume 付近の放射活性は、界面活性剤-結合部位蛋白質の複合体と考えられ、この複合体の分子量はTSK G-3000 SW の排除限界である100K 以上であると推定された。そこで、この複合体に結合した[^{125}I]BHSP が、タヒキニン類で置換されるか否かについて検討した。1μM SP, 1μM Phy、10μM Ele 存在下で[^{125}I]BHSP と粗シナプス膜画分をincubate した後、以下同様の操作を行ったところ、高濃度タヒキニンを用いたにもかかわらず抑制率は1μM SP, 1μM Phy では約20%, 10μMEle では28% 程度であった。以上のことから、このCHAPS-SP結合部位の複合体はみかけの分子量が100K 以上で、一部タヒキニンで[^{125}I]BHSP が置換されうる蛋白質を含んでいると考えられた。

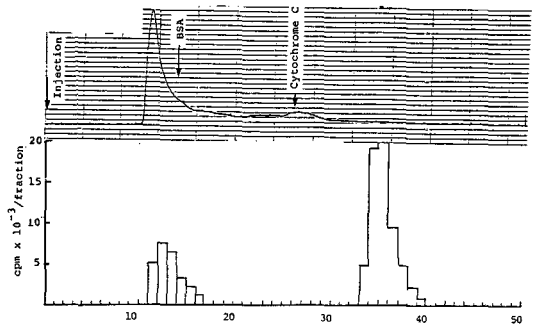


Fig. 4. GPC profile of CHAPS solubilized proteins labelled with ^{125}I-BHSP.

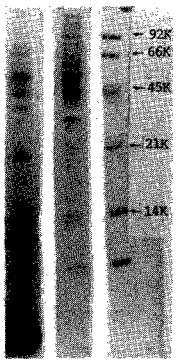


Fig. 3. SDS-polyacrylamide gel electrophoretic pattern of CHAPS solubilized fraction (B) and labeled with ^{125}I-BHSP, autoradiogram (A).

［考察］

現在まで、ＳＰ結合部位の可溶化は丸山ら[7]によってラット脳からGlycodeoxycholic-acid(GDC)を用いて行われたのみである。我々も予備実験でGDC を用いたがCHAPS, GDC の間に著しい優位性はみられなかった。

膜画分における[^{3}H]ＳＰ特異的結合を抑制するタヒキニン類のpotency 順位が、可溶化された画分でのそれと同様であることから、ＳＰ結合部位がCHAPS により可溶化されたと考えた。しかしながら、可溶化膜画分におけるＳＰ結合部位の薬理学的特異性について、更に検討が必要と思われる。

SDS-PAGE の結果より、分子量100K 以下の複数のＳＰ結合部位の存在が示唆された。また一方、GPC では100K 以上が示された。しかし、この、可溶化膜画分をGPC(TSK G-3000 SW)で分析した際、認められたvoid volume 付近の放射活性は、高濃度タヒキニン類で膜画分の場合と比べて完全には抑制されず、しかも膜画分でみられたＳＰ－Ｐ選択性がみられなかった。これらの成績の矛盾点に関しては、GPC で示された分子量は結合部位の蛋白質だけでなく、その周りに附属している脂質や他の蛋白質をも含めた複合体のそれを反映しているのかもしれないこと、GPC 分析には約30分～40分の時間を要し、その間に解離要素が影響するかも知れないこと、などがその原因と考えられる。SDS-PAGE では結合部位はSDS で変性を受けた蛋白質であり、GPC ではCHAPS との複合体であることから、真の結合部位の分子量や数は、今までのところ断言できないが、結合部位が複数存在する可能性が示唆された。

ＳＰ結合部位は受容体以外に、貯蔵部位、分解酵素などの様に数多く存在する。例えばLeeら[5]の報告している膜結合性ＳＰ分解酵素の分子量は約50K～60K であり、Akopyanら[1]が報告しているhypothalanic neutral endopeptidase は約40K の分子量である。今回の結合実験では数種のpeptidase inhibitor, EDTA, DTT を入れＳＰ分解酵素活性を抑制するように努めたが、これらの処置がＳＰとＳＰ受容体以外の高親和性蛋白(物質)との結合を抑制しているという証拠はない。そこで、ＳＰ受容体を同定する上で、ＳＰ結合部位と受容体を区別する更なる実験が必要と考える。

［文献］

1.Akopyan,T.N.(1979)J.Neurochem.32 629 2.Bruns,R.F.(1983)Anal.Biochem.132 74 3.Kangawa,K.(1983)Biochem.Biophys.Res.Comm.114 533 4.Kimura,S.(1983)Proc.Jap. Acad.Ser.B59 101 5.Lee,C.M.(1981)Eur.J.Biochem.114 315 6.Lee,C.M.(1982)Naunyn-Schmieberg's Arch.Pharmacol.318 281 7.丸山六郎 第58回 日本薬理学会総会要旨集 p166 8.Segawa,T.(1968)J.Pharm.Pharmacol.20 320

130. ラット辺縁脳の TRH レセプターへの 5-HT と向精神薬の結合

舩津邦比古・手嶋茂紀・稲永和豊　　(久留米大・医・精神)

〔要　約〕

ラット limbic forebrain の thyrotropin-releasing hormone (TRH) レセプターに対する 5-hydroxytryptamine (5-HT)、d-lysergic acid diethylamide (d-LSD) および向精神薬の親和性について検討した。5-HT と d-LSD は 100 nM 以上の濃度で ^{3}H-TRH 結合を約 20% 置換した。このことから TRH レセプターの中にはこれらの薬物に対し高い親和性を有するサブグループ (TRH-5-HT sites) があると考えられた。Limbic forebrain の TRH レセプターは高親和性、低親和性レセプターの 2 種類が存在するが TRH-5-HT sites は高親和性レセプターに含まれることがわかった。向精神薬は 5-HT や d-LSD と異なり ^{3}H-TRH 結合を dose-dependent に置換した。その IC_{50} は 10−200 μM の間にあった。以上のことから TRH レセプターは 5-HT_1 レセプターや向精神薬結合部位と隣接して存在し、相互に影響しあっている可能性が示唆された。

Key word : TRH receptor, 5-HT, neuroleptics

昨年の本学会で我々は、in vitro に与えた TRH がラットの辺縁脳と海馬の 5-HT_1 レセプターを増加させることを報告した (1)。この作用は 10−100 nM の TRH によって出現し (3)、しかもあらかじめ TRH と共にインキュベートしておいた膜標本を用いて ^{3}H-5-HT 結合実験を行なっても認められ、また他の脳部位では認められないことから生理的な作用であろうと考えられた。またこのことは、TRH とその誘導体 DN-1417 の抗けいれん作用は、中枢の 5-HT ニューロンを介して発揮されるという報告 (7) を支持するもののように思われる。 今回我々は、昨年の報告に続き、TRH レセプターに対する 5-HT の親和性についてラットの limbic forebrain (辺縁脳) を用いて検討してみた。その結果、TRH 受容体の中には、5-HT に対し高い親和性を有するサブグループ (TRH-5-HT sites) が存在し、しかもこれらのレセプターはやはり我々が昨年の本学会で報告した高親和性 TRH レセプターの一部であることがわかった。また TRH 受容体は向精神薬に対しても比較的高い親和性を有することがわかったので、これらのことについて報告する。

＜実験方法＞

ラット脳部位の分離、レセプター標本の作製、^{3}H-TRH 結合実験は昨年の本学会で述べたごとく行なった (1)。TRH (酒石酸塩) と DN-1417 は武田薬品から提供してもらった。

＜実験結果＞

図 1 に示すように ^{3}H-TRH 特異的結合は 100 nM 以上の濃度の 5-HT によって約 20% 置換された。いっぽう ^{3}H-TRH 結合は 1 μM 以上の濃度の (+)-butaclamol によって dose-dependent に置換され、100 μM では約 65% が置換された。d-LSD は 5-HT と同様に約 20% の ^{3}H-TRH 結合を置換した。Phenothiazine 系および butyrophenone 系向精神薬は (+)-butaclamol と同様の置換曲線を描いた。しかし (−)-sulpiride は 100 μM でも ^{3}H-TRH 結合の置換は 10% 以下に留まり、TRH レセプターに対して

親和性を有しないことを示した。以上のように5-HTとd-LSDの置換曲線は(-)-sulprideを除く向精神薬の置換曲線とは明らかに異なった種類の曲線を描いている。このことはTRHレセプターの中には5-HTやd-LSDに対し、高い親和性を有するサブグループ（TRH-5-HT sites）が存在することを示唆している。そこで特異的^{3}H-TRH結合を10％置換するのに必要な5-HTとd-LSDの濃度がTRH-5-HT sitesに対するこれらの薬物のIC_{50}にほぼ相当すると考え、それらの値を求めてみたが、いずれもnM領域であった（表1）。いっぽう向精神薬のIC_{50}はμM領域であった。Dopamineは1－100μMで^{3}H-TRH結合を30％置換したが、この点は別の演題で報告する。

次に5-HTの^{3}H-TRH置換曲線を200nM DN-1417存在下と非存在下で比較してみた。図2に示すごとく200nM DN-1417存在下では特異的結合は約20％減少するが、それに5-HTを加えて

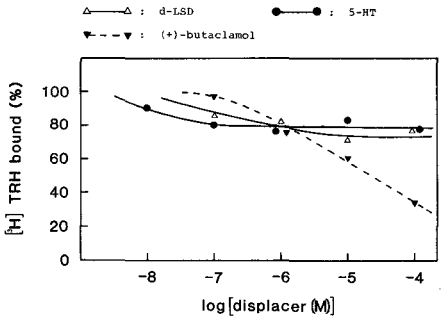


図1. ^{3}H-TRH特異的結合に対する置換曲線
^{3}H-TRH：5nM　全結合：1400 dpm
特異的結合：800 dpm

表1. ^{3}H-TRH結合に対するIC_{50}
^{3}H-TRH：5nM

ligand	IC_{50}（μM）
5-HT	0.01＊
d-LSD	0.07＊
(+)-butaclamol	30
spiperone	53
chlorpromazine	84
(-)-butaclamol	116
(-)-sulpiride	＞1000

＊：TRH-5-HT sitesに対するIC_{50}

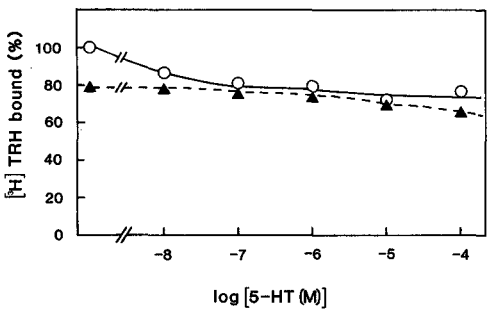


図2. ^{3}H-TRH特異的結合の5-HTによる置換曲線
○—○：対照群　▲--▲：DN-1417 200nM加群
^{3}H-TRH：5nM

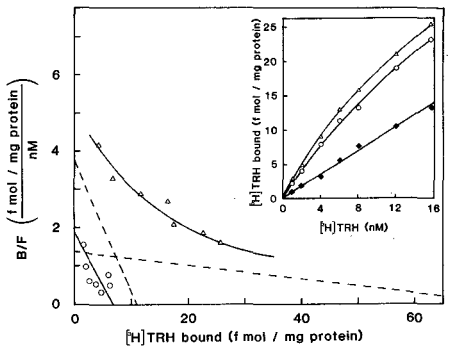


図3. ^{3}H-TRH結合飽和実験とScatchard解析
△--△：全結合および全TRHレセプター（S解析）
○—○：1μM 5-HT存在下の結合およびTRH-5-HT sites（S解析）
◆—◆：非特異的結合（TRH 10μM）

もそれ以上の特異的結合の減少はおこらなかった。既に報告したとうり、limbic forebrainの高親和性TRHレセプターへの^{3}H-TRH結合はこの濃度のDN-1417にて置換されるが低親和性TRHレセプターへの結合は影響を受けない（2）。それゆえ図2の結果は5-HTの結合が高親和性TRHレセプターに対してのみおこることを示している。

次に^{3}H-TRH飽和実験を行ない、全TRHレセプターとTRH-5-HT sitesのKdとBmaxを求めた（図3）。特異的^{3}H-TRH結合のScatchard plotは曲線となった（最小二乗法による）ので、既報(1)のごとく二種類のレセプターがあると考え、それぞれのKdとBmaxを求めた。その結果高親和生

TRHレセプターではKd＝2.9±0.3 nM、Bmax＝10.3±0.4 fmol/mg proteinとなり、低親和性TRHレセプターではKd＝51.3±14.3 nM、Bmax＝71.3±21.2 fmol/mg proteinが得られた。いっぽうTRH-5-HT sites（全^{3}H-TRH結合と1 μM 5-HT存在下での^{3}H-TRH結合の差）のScatchard plotは直線に回帰し、単一の結合部位の存在が示唆された。そのKd＝3.7±0.4 nM、Bmax＝6.0±0.2 fmol/mg proteinであり、高親和性TRHレセプターに類似した値が得られた。このことはTRH-5-HT sitesは高親和性TRHレセプターの中に含まれることを示している。

＜考察＞

TRH-5-HT sitesは何らかの形で5-HT_1レセプターと関係していると考えられる。この部位に対して5-HT、d-LSD（5-HT_1、5-HT_2レセプターのリガンド）、spiperone（5-HT_2レセプターのリガンド）の順に高い親和性を有することや、TRHがこの脳部位の5-HT_1レセプターを増加させることがそれを示唆している。TRH-5-HT sitesがDN-1417も高親和性を有するlimbic forebrainの高親和性TRHレセプターに属するということは前述した永井ら(7)の報告をさらに支持するものと考えられる。我々の前回(1)と今回の報告を総合するとTRHレセプターと5-HT_1レセプターの一部は膜上にて隣接して存在し、相互に影響しあっていることが示唆される。しかしながらTRH-5-HT sitesが6 fmol/mg proteinであるのに対し100 nM TRHによって生じた高親和性5-HT_1レセプターの増加が30 fmol/mg proteinであった事実は両レセプター間の相互作用メカニズムが複雑であろうことを想像させる。

TRHレセプターが向精神薬に対し親和性を有することに関する問題は、はたして向精神薬はこれらのレセプターを介して薬理作用を発揮するのか、あるいはTRHレセプターは向精神薬が高い親和性を有するD_2タイプのdopamineレセプターと何らかの形で関係しているのかということである。今回の結果では(−)-butaclamolのIC_{50}は(+)-体の4倍で、立体特異性は明らかでない。(−)-sulpirideはTRHレセプターに親和性を有さず、この点は上述のような推測に対し否定的である。しかしこれは実験条件によるみせかけのものかもしれない。(−)-SulpirideのD_2レセプターへの結合にはNa^+イオンが不可欠だが(8)、今回の実験ではNa^+が添加されていないからである。行動薬理学的にはTRHの中枢作用は向精神薬によって増強され(6)、また臨床上もTRHはうつ病や精神分裂病に対し治療効果を有するか、あるいは向精神薬の治療効果を補強することが知られている（4,5）。以上のような事柄はTRHレセプターに対する向精神薬の結合が薬理学的作用を伴なったものであろうことを示唆している。

〔文　献〕

1) 船津邦比古，手嶋茂紀，稲永和豊（1984）神経化学 23, 33-38.
2) Funatsu, K., Teshima, S. and Inanaga, K. (1985) J. Neurochem. 45, 390-397.
3) Funatsu, K., Teshima, S. and Inanaga, K. (1985) Peptides, in press.
4) Garbutt, J. C. and Loosen, P. T. (1984) Psychoneuroendocrinology 9, 311-314.
5) Inanaga, K., Nakano, T., Nagata, T., Tanaka, M. and Ogawa, N. (1978) Arch. Gen. Psychiatry 35, 1011-1014.
6) Mora, S., Loizzo, A. and Long, V. G. (1976) Pharmacol. Biochem. Behav. 4, 279-282.
7) 永井康雄，成実重彦，佐治美昭，名川雄児（1983）神経化学 22, 303-305.
8) Theodorou, A. E., Jenner, P. and Marsden, C. D. (1983) Life Sci. 32, 1243-1254.

131. ラット辺縁脳と線条体における TRH レセプターと dopamine autoreceptor の相互作用

舩津邦比古・手嶋茂紀・稲永和豊　　(久留米大・医・精神)

〔要　約〕

ラット limbic forebrain と線条体の thyrotropin releasing hormone (TRH)レセプターと D_3-dopamine (DA)レセプターの相互作用について検討した。両部位にて DA と apomorphine は ^{3}H-TRH結合を30%置換し、TRHレセプターの中にDAに親和性の高いサブグループがあることを示した。^{3}H-apomorphine 結合を100 nM TRHは著明に抑制した。Scatchard解析の結果はKdは変化せず、Bmax が対照群の60%に減少していた。TRHのこの作用はレセプター標本をあらかじめTRHと共にインキュベートし、その後遠心にてTRHを除去した後に^{3}H-apomorphine結合実験を行なっても認められた。用いたTRHの濃度がTRHレセプターのKdに近く十分低いので、この作用は生理的なものと考えられる。

^{3}H-Apomorphine で標識される D_3 レセプターの50%以上は dopamine 神経終末の DA-autoreceptor と考えられるので、今回の結果はTRHレセプターとDA-autoreceptor が隣接して存在し、相互に影響を与え合っていることを示唆している。また、今回の結果はTRHをDA系の stimulant と考える充来の知見とよく一致する。すなわちTRHはシナプス前部にてDA-autoreceptor を抑制することによってDAの放出を促し、L-dopa 投与によって出現する動物の行動を増強させるものと解釈出来る。

Key word：　TRH receptor,　dopamine autoreceptor,　limbic forebrain

TRHはDA性神経伝達を促進すると考えられている。Plotnikoff ら(3)はラットにL-dopa を投与したときに出現する行動が、TRHをあらかじめ投与することにより増強されることを認めた。TRHがラット脳側坐核のDAニュロン終末に働き、DAの放出を増加させることも認められている(4)。神経終末からのDA放出の調節は同部にあるDA autoreceptor によっても行なわれる。それゆえTRHによるDA放出の増加はTRHがDA autoreceptorの機能を抑制することによってもたらされるのではないかとも考えられる。そこで我々は^{3}H-TRHと^{3}H-apomorphine を用いた結合実験を行ない、ラット limbic forebrain と線条体におけるTRHレセプターと dopamine (D_3)レセプターの関係について検討してみた。

＜実験方法＞

(1) 脳部位の分離と^{3}H-TRH結合実験に用いるレセプター標本の作製、および^{3}H-TRH結合実験は昨年の本学会で述べたごとく行なった(1)。

(2) ^{3}H-apomorphine 結合実験に用いるレセプター標本の作製。

線条体、limbic forebrain いずれも5,6匹分をまとめて20 vol. w/vの氷冷50 mM Tris/HCl緩衝液(pH 7.4)の中でホモジナイズし、37℃、10分間インキュベートし、30000×G 10分間遠心した。このペレットを新たなTris緩衝液にて懸濁し、実験に用いるまで−60℃で保存した。

(3) ^{3}H-apomorphine 結合実験

Leysen and Gommeren の方法(2)に従い、^{3}H-apomorphine (26 Ci/mmol, NEN)とレセプター標本(蛋白量0.25 mg)を50 mM Tris/HCl緩衝液中に混じ、0.01%アスコルビン酸、2 mM EDTA, 12.5 μM nialamide存在下で25℃ 45分インキュベートした。その後試料をWhatman GF/B 濾紙上に吸引濾過し、濾紙を洗浄後濾紙上の放射活性を測定した。

(4) DA, TRH（酒石酸塩）、(−)−sulpirideはTris緩衝液にて溶解、希釈した。(+)−Butaclamolはエタノールにて溶解後、Tris緩衝液で希釈した。100μMを含むサンプルのエタノール濃度は2%であった。Spiperoneは注射液（エーザイ）をTris緩衝液で希釈して用いた。30μMを含むサンプルの希釈倍率は250倍であり、pHに変動は認められなかった。(−)−apomorphineは酒石酸に溶解した後、希釈して用いた。100μMを含むサンプル中の酒石酸濃度は0.001Nであるが、pHは不変であった。

＜結　果＞

線条体における^{3}H−TRH置換実験では（図1）、1−100μMのDAは特異的^{3}H−TRH結合を約25%置換した。ApomorphineもDAと同様に1−100μMの濃度で^{3}H−TRH結合を20−25%置換した。これらの薬物の置換曲線は次に述べる向精神薬の置換曲線とは明らかに異なるものであり、TRHレセプターの中にDAやapomorphineに比較的高い親和性を示すサブグループ（TRH−DA sites）があることが推測された。TRH−DA sitesに対するDAとapomorphineのIC_{50}はそれぞれ36nM、120nMであった。(+)−Butaclamolは1μM以上の濃度でdose-dependentに^{3}H−TRH結合を置換し、そのIC_{50}は34μMであった。検討した他の向精神薬、spiperone, haloperidol, (−)−butaclamolのIC_{50}は10−200μMの間であったが、(−)−sulpirideは^{3}H−TRH結合をほとんど置換しなかった。これらの結果はlimbic forebrainにおいてもほぼ同様であった。

次に線条体における^{3}H−TRH飽和実験を10μM DA存在下と非存在下で行ない、比較してみた（図2）。対照郡ではKd＝13.7±4.2 nM、Bmax＝42±6 fmol／mg proteinであったが、DA添加群ではKd＝13.3±3.9 nM、Bmax＝34±4 fmol／mg proteinであり、Bmaxの有意な減少（$P<0.05$, paired t-test）が認められた。

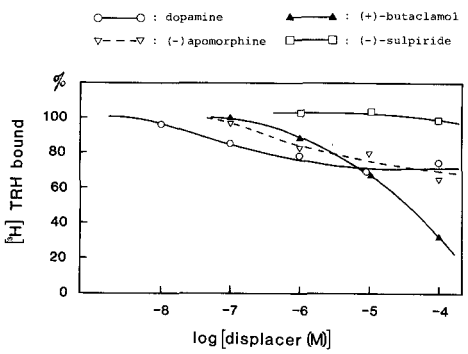


図1. ^{3}H-TRH特異的結合の置換曲線、線条体。
^{3}H-TRH：5nM　全結合：1300 dpm
特異的結合：600 dpm

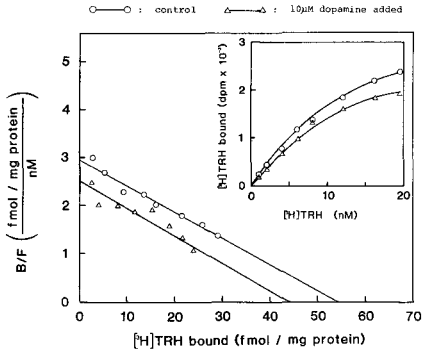


図2. ^{3}H-TRH結合飽和曲線とScatchard plot，線条体。
○—○：対照群　△—△：10μM DA添加群
挿入図：特異的結合

次に^{3}H−apomorphineによる実験を行なった。線条体でのDAによる^{3}H−apomorphine置換曲線（図3）は二相性となり、1μMにてプラトーが認められた。このとき全^{3}H−apomorphine結合の30%が置換された。DA−antagonistのspiperoneと(+)−butaclamolは1μM以上の濃度で同様に全結合の30%を置換した。　それゆえこの部分が特異的結合を表わすと考え、次に10μM spiperoneを非特異的給合の測定に用いて飽和実験を行なった。その際半数の試料に100 nM TRHを加え、D_3レセプターに及ぼすTRHの影響を検討してみた。

図4に示すように^{3}H−apomorphine特異的結合は飽和曲線を描いたが、TRHはそれを著明に抑制した。

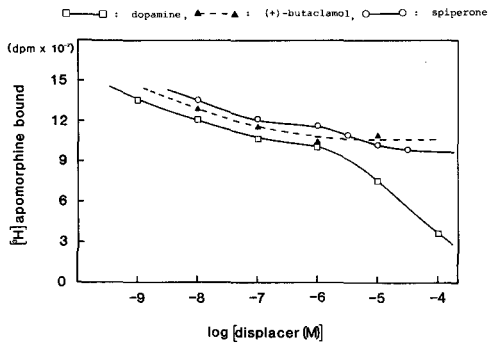


図3. ^{3}H-apomorphine 全結合に対する置換曲線、線条体。
^{3}H-apomorphine : 0.8nM

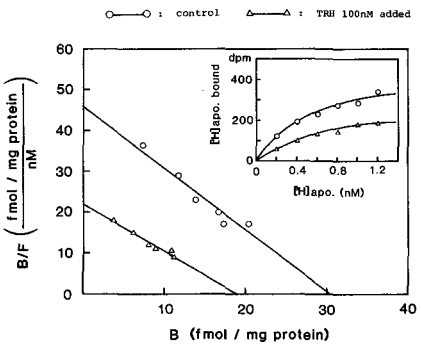


図4. ^{3}H-apomorphine 結合飽和曲線と Scatchard plot。線条体。 ○—○：対照群
△—△：100nM TRH添加群 挿入図：特異的結合

Scatchard plot による解析では対照群では Kd = 0.7 ± 0.1 nM, Bmax = 31 ± 2 fmol/mg protein であったが、TRH添加群では Kd = 0.8 ± 0.1 nM, Bmax = 19 ± 2 fmol/mg protein であり、Bmax が対照群の 61 %へ有意に ($p < 0.01$, paired t-test) 減少しているのがわかった。この TRH の作用は limbic forebrain においても同様に認められた。またレセプター標本を 100 nM TRH と共に Krebs-Ringer 液中にて 37℃ 15分間インキュベートし、その後遠心して TRH を除去した後 Tris 緩衝液に再懸濁して ^{3}H- apomorphine 結合実験を行なってみると、 TRH存在下の場合ほどではないがやはり Bmax が減少することが認められた。

＜考　察＞

TRH による D_3 レセプターの抑制は Bmax の減少であり、あらかじめレセプター標本を TRH と共にインキュベートした後 TRH を除去して ^{3}H- apomorphine 結合実験を行なっても認められるので非競合的な抑制であると言える。用いた TRH 濃度が TRH レセプターの Kd に近いのでこれは生理的作用であろう。D_3 レセプターの 50 % 以上がシナプス前 autoreceptor と考えられているので TRH レセプターと DA autoreceptor の密接な相互作用が示唆される。我々の得た結果とこれまでの知見を総合すると TRH は DA 神経終末の autoreceptor を抑制することによって DA の放出を促し、L-dopa による行動の発現を増強すると考えることが出来る。^{3}H-Apomorphine特異的結合の全結合に対する割合が低かったのは、膜の構成成分が喪失されない方がレセプター間の相互作用がよく観察されるのではないかと考え、レセプター標本を EDTA 加 Tris 緩衝液でくり返し洗浄しなかったことによると考えられる (2)。

〔文　献〕

1) 船津邦比古, 手嶋茂紀, 稲永和豊 (1984) 神経化学 23, 33-38.
2) Leysen, J. E. and Gommeren, W. (1981) J. Neurochem. 36, 201-219.
3) Plotnikoff, N. P., Prange, A. J., Jr., Breese, G. R., Anderson, M. S. and Wilson, I. C. (1972) Science 173, 417-418.
4) Sharp, T., Bennett, G. W. and Marsden, C. A. (1982) J. Neurochem. 39, 1763-1766.

132. 老令ラットにおける TRH 神経機構の変化と Dihydroergotoxine の効果

野村正彦・小川紀雄*・広瀬由起子*
（藤田学園保衛大・医・生理，岡山大・脳研・機能生化*）

〔要　約〕

老化に伴う中枢神経系の変化は神経伝達物質レベルの低下と記銘力低下等の機能的な変化とが同時に認められる。今回、脳内ペプチドであるＴＲＨおよびその受容体が老化によりどのように変化するかを調べ、更に老令患者の脳機能改善剤として広く使用されている Ergot Alkaloid の Dihydroergotoxine（ＤＨＥＴ）を連続投与して、治療的な効果を調べるとともに、ＴＲＨ濃度およびその受容体への影響を平行して検討した。老化ラット（２４ヶ月令）の脳内ＴＲＨ濃度は若い２ヶ月令ラットと較べて視床下部において有意に減少を示したが、他の脳の部位では変化は認められなかった。老令ラットにＤＨＥＴ投与してもＴＲＨ濃度は変化しなかった。一方、ＴＲＨの受容体は老化ラットの大脳皮質において著減しＤＨＥＴ投与で有意に改善した。つぎに、オペラント型明度弁別学習課題を使って学習行動を観察した。老化ラットの反応数は若いラットに較べて低く、正反応率も低かった。ＤＨＥＴ投与ラットでは反応数には著明な変化はなかったが、正反応率の上昇を認めた。以上の結果は、高次の神経機能をつかさどる大脳皮質のＴＲＨ受容体レベルの回復が、高次の神経活動を必要とする弁別学習課題の学習成績に関与しているものと考えられる。

Key word： Aged-rat, TRH receptor binding, Discrimination learning.

いわゆる老人ぼけによる日常生活の障害は、高令化している社会環境にあって特に重大な問題である[2]。この老化現象の重要な研究課題である“ぼけ”の本態に関係する生化学的変化と薬物治療の機能的研究の為に、実験モデル動物として老令ラットを使って以下の実験を行なった。加令に伴なう生理学的変化の一つの指標として、意識障害改善作用のあるＴＲＨおよびその受容体の変動と、学習行動変化とを平行してモデル動物で調べた。また老人の脳機能改善剤として使われている Dihydroergotoxine（ＤＨＥＴ）[1]を投与したラットについて、脳内ＴＲＨ量およびＴＲＨ受容体の変化と、これらのラットが実際に行なった弁別学習課題による学習行動の変化も調べ両者の関係について、神経化学的考察を行なった。

方法　１。実験動物：Ｆｉｓｈｅｒ３４４系（Charles River Co.）雄ラットの２ヶ月令時を若令ラットとし、また２４ヶ月令時を老令ラットとして実験に使用した。

２。脳内ＴＲＨ－like Immunoreactivity の定量：断頭後脳を摘出して、Glowinski and Iversen の方法[3]に準じて脳を６部位に分けた。１０倍量の酸エタノール（0.1ＮＨＣｌ：ethanol ＝１：１）にてホモゲナイズし、１２,０００ｇ×２０ｍｉｎ遠心分離後上清を窒素ガス下に乾燥後使用した。測定にはＲＩＡ用リン酸緩衝液（0.14Ｍリン酸緩衝液，２５ｍＭＥＤＴＡ，0.5％ Bovine Serum Albumin，ｐＨ７．４）を用いて、２抗体法で行なった[7]。

３。脳内ＴＲＨ受容体結合の定量：ＴＲＨ受容体結合は１２ｎＭの〔^{3}Ｈ〕－ＴＲＨ存在下における各々の脳部位組織粗膜分画に、１００ｕＭＴＲＨの存在下および無添加条件下から、常法に従って特異的結合を求めた[8]。

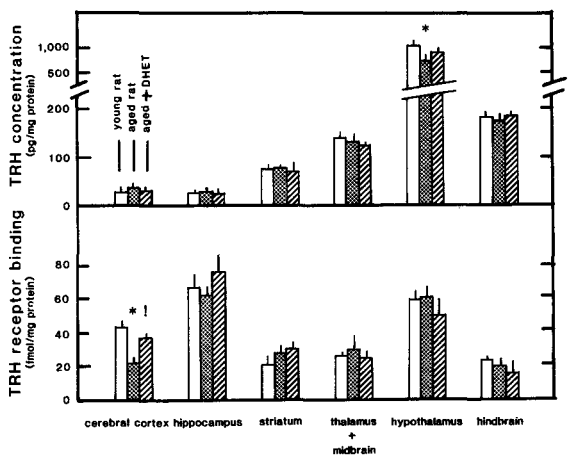
４。ＤＨＥＴ投与群ラット：ＤＨＥＴは１ｍｇ／ｋｇを連日１４日間老令ラット腹腔内に投与し、１５日目に断頭して脳内ＴＲＨ含有量およびＴＲＨ受容体の変化を測定した。

５。オペラント型明度弁別学習試験：若令および老令ラットと老令ラットにＤＨＥＴ（１mg/kg）を３０日間連続投与した３群の弁別学習行動の変化を観察した。スキナー箱前面中央にある光呈示窓に１０００対１の明度差の光を投射し（Ｓ＋、およびＳ－）、この間にラットがレバー押しをすれば餌ペレットを餌箱に提示した（Ｒ＋および、Ｒ－）、Multiple VI-15 Seconds Extinction（Ｍｕｌｔ．ＶＩ－１５　Ｓｅｃ．Ｅｘｔｉｎｃ．）課題を使用した。[5,6]各々の明度の光刺激は２０秒間で Gellerman 系列により各々２０回ずつ５秒間の black out をはさんで呈示した。[10]学習成績はそれぞれの反応数Ｒ＋、Ｒ－、と正反応率（Ｒ＋／Ｒ＋　＋Ｒ－）×１００の変化で比較した。有意差検定はＡＮＯＶＡ（１および２ｗａｙｓ）で行なった。

結果　１。脳内ＴＲＨ濃度を３群のラットの脳部位別に図－１に示した。大脳皮質、海馬ではその濃度が低く、線条体、視床と中脳、これに次いで橋＋延髄の順に濃度が増加し、視床下部では１ｎｇ／ｍｇ protein と最も高かった。しかし、３群間の変化は視床下部で老令ラットのみが有意に低下を示したが、他の部位では有意差はなかった。ＤＨＥＴの注射をしても、ＴＲＨ濃度には変化がなかった。一方、ＴＲＨ受容体の変化は大脳皮質において老令ラットは若令ラットの２分の１に減少し、またＤＨＥＴ投与群では明らかな有意差をもって回復した。

２。　２ヶ月令の若いＦｉｓｈｅｒラットの明度弁別学習成績を図－２Ａに示した。正の反応数は学習課程の進行に従って増加を示したのに対して、負の反応数は進行に従って減少を示した。そして、正反応率は明らかに増加を示し、第２７試行日には８５％以上の成績であったこれに対して、老令ラットは正の反応数が非常に低く、また負の反応数は若いラットに比較して減少の程度が悪かった（図－２Ｂ）。従って、正反応率はいずれも悪く全３０日間の学習課程を通じて８０％以下であった。老令ラットにＤＨＥＴを投与した群では、学習成績はほゞ老令ラットに近いパターンを示したが、負の反応数の減少が著明であったため、正反応率は第２８試行日以降より８５％以上を示した（図－２Ｃ）。

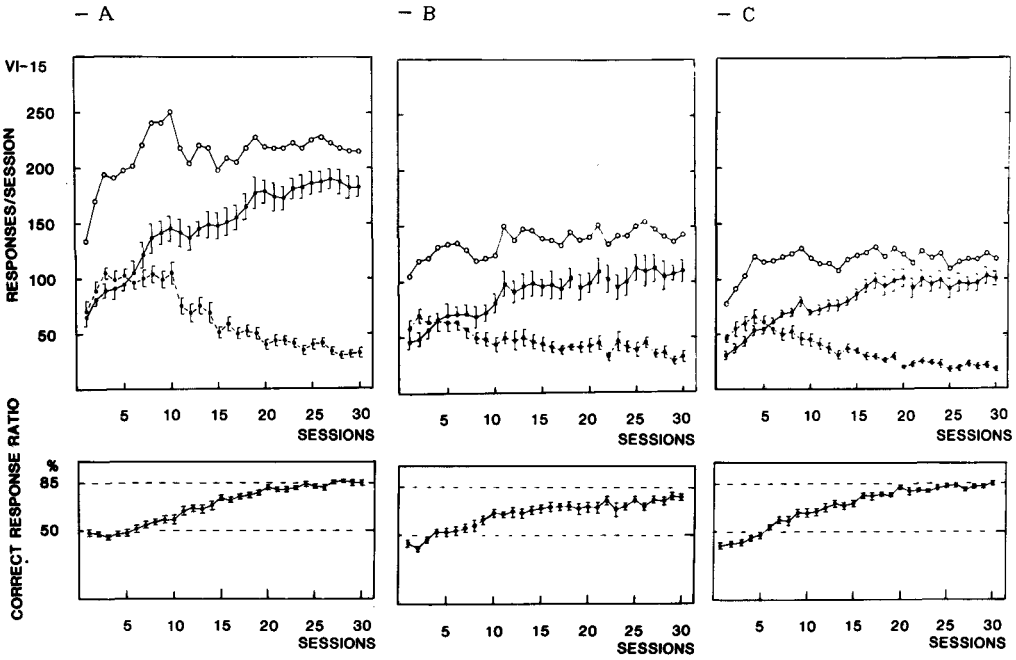
図　1



* p＜0.05 vs young, ! p＜0.05 vs aged control

考察　加令による神経系の変化は脳内神経伝達物質であるアミノ酸、モノアミン、ペプチド等の変化に起因している事が考えられている。[2,4,9]意識改善作用のある脳内ペプチドであるＴＲＨの変化をＤＨＥＴを連日投与したラットにおいて比較定量したが、脳内ＴＲＨ濃度は老令ラットの視床下部でのみ低下しており、ＤＨＥＴ投与にもかかわらず回復し

図 2



なかった。受容体レベルの変化は老化ラットの大脳皮質で著明に低下し、ＤＨＥＴ投与により回復した。これは高次の神経機能をつかさどる大脳皮質で、老化現象が著明であったことを示唆するものである。また、高次の神経活動を要求される弁別学習課題をラットに課して、老化ラットの学習成績が著明に低下していたが、これにＤＨＥＴを投与すると学習成績が明らかに改善を示した。以上の成績は、大脳皮質のＴＲＨ受容体レベルの回復が、高次の神経活動を必要とする弁別学習課題の改善に関与している変化だと考えられる。

文 献

1. Agnoli,A.,Crepaldi,G.,Spano,P.F.,and Trabucchi,M. (1983) Aging brain and ergot alkaloids Raven press. New York.
2. Bartus,R.T.,Dean,R.L.,Beer,B.,and Lippa,A.S. (1982) Science.217;408-417.
3. Glowinski,J.,and Iversen,L.L. (1966) J. Neurochem.13;655-669.
4. Lippa,A.S.,Critchett,D.J.,Ehlert,F.,Yamamura,H.I.,Enna,S.J.,and Bartus,R.T. (1981) Neurobiology of Aging.3-8.
5. Nomura,M. (1984) Research Communi.in Psychol.Psychiat.and Behav.9;373-384.
6. Nomura,M.,and Ohtsuji,M. (1982) Hypertensive Mechanisms (Rascher,W.,Clough,D.,and Ganten,D. eds) PP.658-661.
7. Ogawa,N.,Kabuto,H.,Hirose,Y.,Nukita,I.,and Mori,A. (1985) Regul.Peptides.10;85-90.
8. Ogawa,N.,Mizuno,S.,Nukita,I.,Tsukamoto,S.,and Mori,A. (1983) Brain Research. 263;348-350.
9. Powell,D.A.,Buchanan,S.L.,and Hernadez,L.L. (1984) Physiol.and Behav.32;609-616.
10. Tsukada,Y.,Nomura,M.,Nagai,K.,Kohsaka,S.,Kawahata,H.,Ito,M.,and Matsutani,T. (1977) Behavioral Neurochemistry.PP.63-84.Spectrum Pubications.

133. 脳内神経ペプチドとその受容体に及ぼす拘束ストレスの影響

高山晴彦・貫名　至・広瀬由起子*・小川紀雄*
（岡山大・医・第三内科，脳研*）

〔要　約〕

SD系雄ラットに金網拘束ストレスを負荷して，脳内神経ペプチド：substance P(SP), methionine−enkephalin(Met−Enk), thyrotropin releasing hormone(TRH), dynorphin(Dyn), cholecystokinin−octapeptide(CCK−8), somatostatin(SRIF) 濃度と受容体結合に及ぼす影響を検討した。拘束前，拘束後0.5, 1, 3時間に断頭し，大脳皮質，中隔野，線条体，扁桃核十梨状皮質，視床下部，視床十中脳，海馬，橋十延髄，脊髄の9部位を摘出してSP, Met−Enk, TRH, Dyn, CCK−8, SRIF濃度をRIAで，SP, Met−Enk, TRH受容体結合をRRAで測定した。SP濃度は中隔野，線条体，海馬で，受容体結合は中隔野，扁桃核十梨状皮質で減少した。Met−Enk濃度と受容体結合は中隔野，線条体，扁桃核十梨状皮質，視床下部では変化しなかった。TRH濃度は大脳皮質，中隔野，扁桃核十梨状皮質，橋十延髄で減少し，脊髄で増加したが，受容体結合は変化しなかった。Dyn濃度は脊髄で，CCK−8濃度は中隔野，橋十延髄で増加した。SRIF濃度は全部位で変化しなかった。以上の結果ストレス状況下ではモノアミン系，オピオイド系ペプチドばかりでなく各種の脳内神経ペプチド機構も変化しており，その反応は脳の部位及び拘束時間により差が認められた。

Key word：　Immobilization stress, Neuropeptides, Neuropeptide−receptors

各種ストレス状況下においては，脳内のさまざまな神経伝達物質が相互に複雑に影響しあいながら変化する。古典的神経伝達物質であるモノアミン系のノルアドレナリンやオピオイド系ペプチドのストレス状況下での動態の報告はなされている（2, 9）が，他の神経ペプチドについては未だ報告されていない。今回我々はストレスの脳内substance P(SP), methionine−enkephalin(Met−Enk), thyrotropin releasing hormone (TRH), dynorphin (Dyn), cholecystokinin−octapeptide(CCK−8), somatostatin(SRIF)濃度に及ぼす影響と，SP, Met−Enk, TRH受容体結合に及ぼす影響について検討した。

〔方法〕田中の金網拘束ストレス(9)に従って体重200～250gのSprague−Dawley系雄ラットを3㎜×3㎜のwire meshの金網(24㎝×24㎝)で包みこんで身動きができないようにして，室温で0.5時間，1時間，3時間拘束した後断頭した。コントロールとして拘束をしなかったラットを断頭した。ラットは各群6匹ずつ合計24匹使用した。断頭後速やかに脳を摘出し，Glowinski・Iversenの方法(1)に準じて氷上で大脳皮質，中隔野，線条体，扁桃核十梨状皮質，視床下部，視床十中脳，海馬，橋十延髄の8部位に分け，また脊髄も摘出し合計9部位とし，radioimmunoassay(RIA)用のサンプルは酸・エタノール抽出（4, 6）後，−20°Cにて保存し，radioreceptor assay(RRA)用のサンプルはそのまま−70°Cにて保存した。SP, Met−Enk, TRH, Dyn, CCK−8, SRIF濃度はすでに報告したRIA（3, 4, 5）で，SP, Met−Enk, TRH受容体結合（特異的結合）はすでに報告したRRA（5, 7, 8）で測定した。なお，統計学的解析にはすべてone−way ANOVAを適応した。

〔結果〕SP濃度は中隔野(0.5, 1, 3時間)，線条体(1時間)，海馬(1時間)で減少し，受容体結合は中隔野（1, 3時間）と扁桃核十梨状皮質（0.5, 1, 3時間）で減少した(Fig. 1).

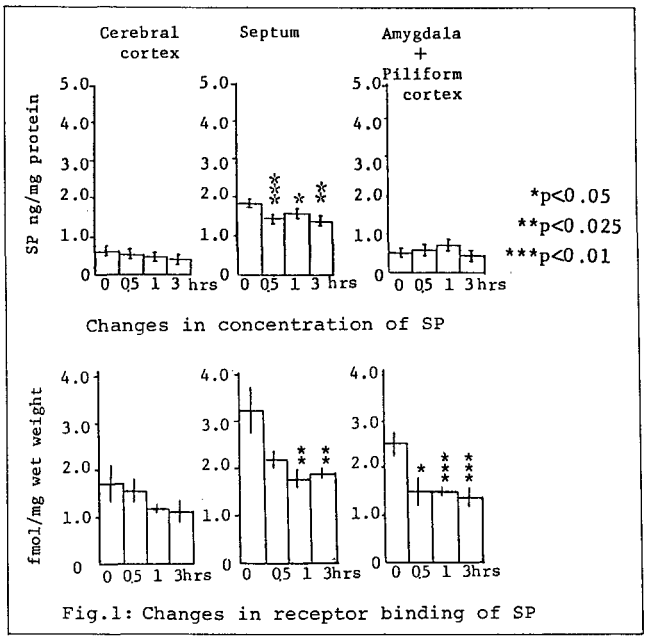


Fig.1: Changes in receptor binding of SP

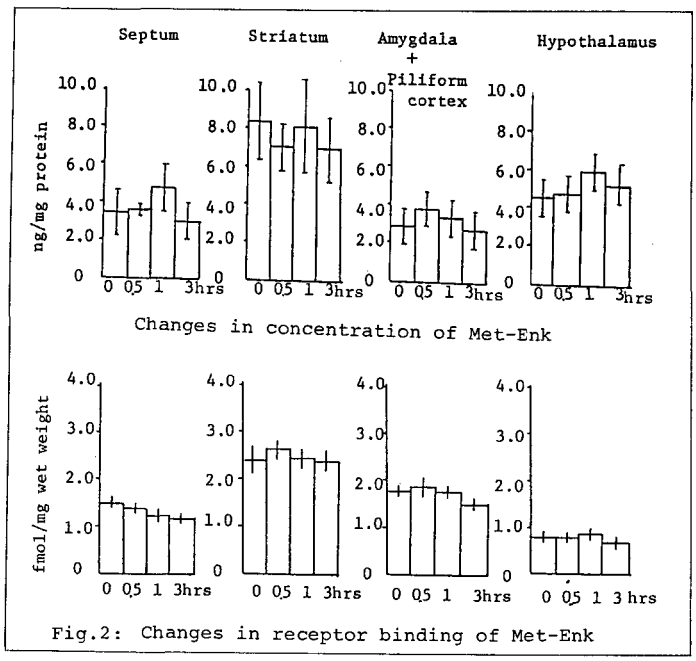


Fig.2: Changes in receptor binding of Met-Enk

Met-Enk濃度は全脳部位で，受容体結合は検討した中隔野，線条体，扁桃核十梨状皮質，視床下部では有意な変化を認めなかった(Fig. 2)。TRH 濃度は大脳皮質（３時間），中隔野(0.5時間)，扁桃核十梨状皮質（３時間），橋十延髄(３時間)で減少し，脊髄(0.5時間)では増加したが，受容体結合は変化しなかった。Dyn濃度は脊髄(0.5時間)で増加し，CCK-8濃度も中隔野（３時間），橋十延髄(0.5，３時間)で増加した。SRIF濃度は全脳部位で有意な変化を認めなかった。(Fig.3~Fig.6)

〔考察〕脳内で作用すると考えられる神経伝達物質としてはアミノ酸，モノアミン，ペプチドなど多数ある。田中らは拘束ストレス状況下では視床下部，扁桃核，視床，海馬，大脳皮質，橋十延髄のノルアドレナリン代謝が亢進し，基底核では拘束の初期に一過性の代謝回転の抑制がみられると報告(9)している。本実験では多数の脳内神経ペプチド系について検討した。その結果，脳の部位により，また，拘束時間により反応に差がみられた。濃度と受容体結合の両方を検討したSPでは特に中隔野で拘束ストレスにより濃度と受容体結合ともに減少した。拘束ストレスを負荷する

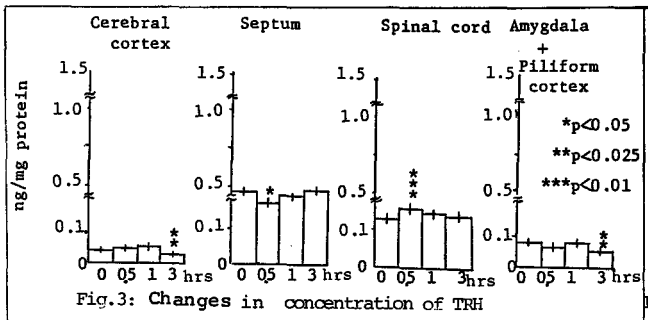


Fig.3: Changes in concentration of TRH

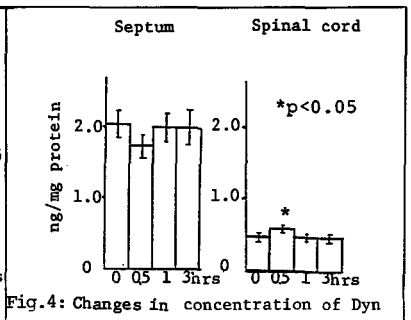


Fig.4: Changes in concentration of Dyn

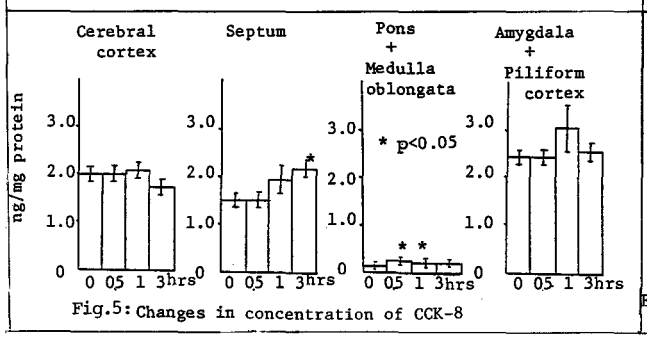


Fig.5: Changes in concentration of CCK-8

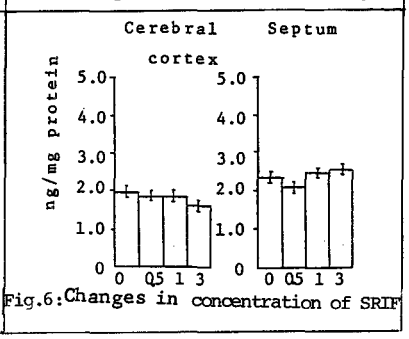


Fig.6: Changes in concentration of SRIF

と中隔野では，比較的早い時期より急速にSPのreleaseがおこり，それに伴いSP受容体がdown regulationされたものと考えられる。また，情動と密接に関連があると考えられる視床，視床下部，扁桃核十梨状皮質は今回の3時間の拘束ストレスではSP濃度の変化がみられなかったが，SP受容体結合は扁桃核十梨状皮質で減少し，濃度と受容体結合に差異がみられた。拘束ストレス下でのMet-Enk濃度については池田らがモルモットの前頭葉皮質，線条体でわずかに増加すると報告(2)しているが，我々の今回の実験では変化がみられなかった。これは実験動物の種族の差によるものかもしれないが，受容体結合についても有意な変化がみられなかったことからMet-Enkは拘束ストレスにおいてはあまり大きな役割をはたしていないものと思われる。

以上のようにストレス状況下ではモノアミン系やオピオイド系ペプチドばかりでなく他の神経ペプチド系も変化しており，今後はストレス状況下での神経ペプチド濃度の変化だけでなく受容体の変化も検討する必要性があると思われる。

〔文献〕 1) Glowinski, J., and Iversen, L. L. (1966) J. Neurochem. 13, 655-669 2) Ikeda, Y., Ijima, M., Suzuki, T., Kimura, E., Nakao, K., Imura, H., and Nakazawa, T. (1984) Bull. Jap. Neurochem. Soc. 23, 427-429 3) Pongdhana, K., Ogawa, N., Hirose, Y., Ohara, S., Kosaka, F., and Tachibana, S. (1985) Neurochem. Res. (in press) 4) Ogawa, N. (1985) Acta Med. Okayama, (in press) 5) Ogawa, N., Hirose, Y., and Nomura, M. (1985) in Neurotransmitters in Disease, (Yoshida, H., ed), Excerpta Medica, Amsterdam, (in press) 6) Ogawa, N., Kabuto, H., Hirose, Y., Nukina, I., and Mori, A. (1985) Regulatory peptides 10, 85-90 7) Ogawa, N., Mizuno, S., Mori, A., and Kuroda, H. (1984) Peptides 5, 53-56 8) Ogawa, N., Yamawaki, Y., Kuroda, H., Ofuji, T., Itoga, E., and Kito, S. (1981) Brain Res. 205, 169-174 9) Tanaka, M., Kohno, Y., Nakagawa, R., Ida, Y., Takeda, S., and Nagasaki, S. (1982) Pharmacol. Biochem. Behav. 16, 315-319

134. ラット副腎のグルタミン酸受容体について

米田幸雄・中牟田弘道・荻田喜代一・小井田雅夫
(摂南大・薬・薬理)

〔要　約〕

ラットの各種神経組織における^{3}H-グルタミン酸結合について検討を加えた。

ラット中枢神経系では網膜に最も結合活性が高く、以下視床下部、線条体、海馬、小脳、延髄・橋、中脳および大脳皮質の順であった。中枢神経系以外にも下垂体と副腎に本結合能が見出された。特に、下垂体の結合能は用いた神経組織中最大であった。各部位の結合に対するClイオン、CaイオンおよびNa^+イオンの影響について検索を進めたところ、網膜以外の中枢内部位ではすべてこれら三種のイオンにより結合が増強されたが、網膜、下垂体および副腎では特にNa^+イオンによる結合阻害が顕著であった。グルタミン酸受容体の各サブタイプのアゴニストのうちキスカル酸が、大脳皮質および副腎の結合を強く阻害したのに対して、N-メチル-D-アスパラギン酸は大脳皮質への結合には著変を与えずに副腎の結合を著しく増強した。しかしながら、カイニン酸は両組織の結合に対して有意な変化を誘発しなかった。副腎を皮質と髄質に分割して結合を測定すると、髄質の方が皮質に比べて五倍以上結合能が高いことが判明した。

以上の結果より、ラット副腎髄質には脳とは異なった性質を持つグルタミン酸受容体が存在する可能性が示唆される。

Key word :
Adrenal medulla, Glutamate receptor, N-Methyl-D-aspartic acid

L-グルタミン酸(GLU)が無脊椎動物の神経系ばかりでなく、哺乳動物の中枢神経系においても興奮性の神経情報伝達物質としての機能を示唆されていることは周知の事実(4,8)である。近年、レセプターアッセイの開発と発展に伴い、GLUのシナプス受容体に関する生化学的研究も数多く行われている(2,5,7)。筆者らも、ラット脳シナプス膜における本受容体の生化学的解析により、^{3}H-GLU結合がClイオン、CaイオンおよびNa^+イオンにより著しく影響されることを見出した(6,9-11)。したがって本研究では、ラット脳内特定部位における本結合の分布について検討を加えるとともに、各部位への結合に対する前述の三種のイオンの作用強度の相違についても検索を進めた。さらに、GLUが興奮性伝達物質としての機能を持つことが示唆(1)されているラット網膜についても同様の検討を行った。また、これらの中枢性神経組織ばかりでなく末梢性の神経組織として、下垂体と副腎を用いて同様な解析を行った。<実験方法>^{3}H-GLUをリガンドとするレセプターアッセイは前報(6,9,10)に準じて行った。ラット脳はGlowinski and Iversen(3)の方法に従い、大脳皮質(CC)、線条体(ST)、視

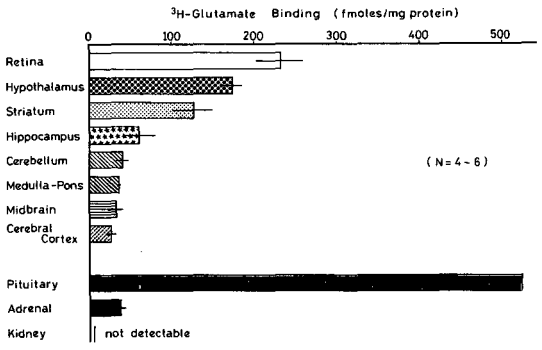


Fig.1. Regional distribution of ^{3}H-glutamate binding in rat various neuronal tissues.

床下部(HT)、中脳(MB)、海馬(HPC)、小脳(CB)、橋・延髄(MP)の7部位に分画した。これらの脳内部位および下垂体(PT)、副腎(AD)、網膜(RT)、腎臓(KD)をそれぞれ、脱イオン蒸留水でホモゲナイズしたのち、ホモジネートを50,000×gで30分間遠心分離した。得られた沈査は50mMトリス酢酸緩衝液(pH7.4)で3回洗浄操作(50,000×g, 30分)を繰り返したのち、0.32Mシヨ糖水溶液に懸濁して-80°Cで凍結保存した。懸濁液は用時室温融解後、前報(6,9,10)の如く結合実験に供した。RT、PTおよびADについては通常8匹の動物から得られた組織を1例とした。<u>＜実験結果＞</u>ラット各神経組織における^{3}H-GLU結合能の分布を検討したところ、PTに最も活性が高く、以下RT、HT、ST、HPC、CBの順に結合能が低くなり、CCが最も活性が低いことが明らかとなった(Fig.1)。また、KDには^{3}H-GLU結合能は検出出来なかった。これに対して、Cl依存性結合は基礎結合能の分布とは逆に、CCに活性が高くRTに最も活性が低かった。PT、ADおよびKDにはCl依存性結合は見出せなかった(Fig.2)。Ca刺激性結合については、中枢性部位には活性が認められたが、ADではCaイオンにより逆に結合能の低下が誘発された。さらに、Na依存性結合は脳内部位では常に活性が検出されたが、RT、PT、およびADについてはNaイオンによる結合能低下現象が観察された(Figs.2,3)。このADの^{3}H-GLU結合がGLU受容体への結合を反映するか否かを解析するために、GLU受容体のアゴニストであるキスカル酸(QA)、N-メチル-D-アスパラギン酸(NMDA)およびカイニン酸(KA)の作用について検索を進めた。ADへの^{3}H-GLU結合はCCの場合と同様に、QAにより有意に阻害されたが、NMDAはCCの結合には影響せずにADの結合を著明に増強した(Fig.4)。また、KAはCCおよびAD いずれの結合に対しても著変を与えなかった。ADを皮質部と髄質部に分割してさらに詳細な検討を加えたところ、髄質部の^{3}H-GLU基礎結合能は皮質部に比べて5倍以上も活性が高いことが判明した(Table1)。<u>＜考察＞</u>RTでは光受容細胞ばかりでなく双極細胞においても、GLUが神経伝達物質としての可能性を示唆されているので、中枢性神経組織の中でRTに最も^{3}H-GLU結合能が高かったのは当然の結果と言えるかもしれない。これらの細胞とシナプス連絡のある水平細胞や無軸索細胞における^{3}H-GLU結合部位の存在の証明が今後の検討課題であろう。また、中枢性および末梢性の各神経組織において、Cl依存

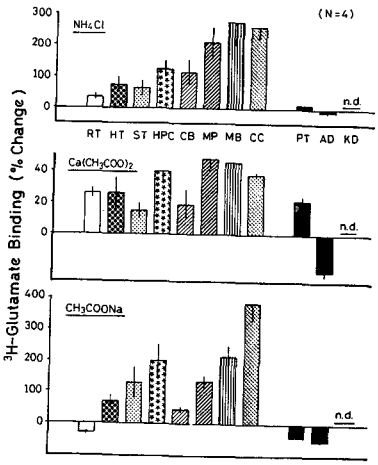


Fig.2. Effect of ammonium chloride, calcium acetate and sodium acetate on ^{3}H-glutamate binding in rat various tissues.

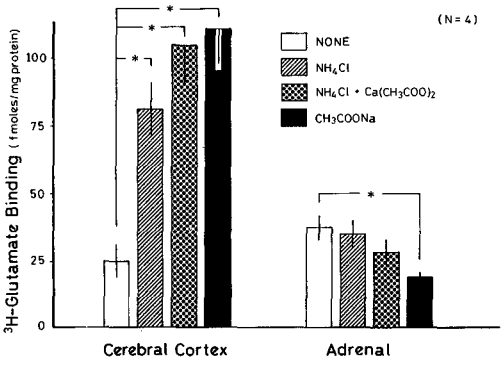


Fig.3. Comparison of ^{3}H-glutamate binding in rat cerebral cortex and adrenal gland.

性結合とCa刺激性結合が常に平行関係にあることは、Ca刺激性結合のCl依存性を裏付けるものである。Na依存性結合は前報(6)の如く、取り込み部位への^{3}H-GLU結合を反映している可能性が高いが、RTにおいてはNa依存性GLU取り込みの存在にもかかわらず、Naイオンは^{3}H-GLU結合を阻害するので、Na依存性結合をすべて取り込み部位への結合と結論するには時期尚早の様に思われる。本研究結果で特筆すべきことは、ADにおける^{3}H-GLU結合の局在の証明である。AD の^{3}H-GLU結合能は殆んどすべてが髄質部に局在し、しかもQAで著明に阻害されることからQA型の受容体であると考えられる。このことは副腎髄質部にGLU作動性シナプスが存在することを示唆する極めて興味深い結果だと言えよう。さらに、中枢性GLU受容体のアゴニストであるNMDAにより、ADの^{3}H-GLU結合が著しく増強されることは、両者の受容体あるいはその調節機構に大きな相違が存在することを示唆するものである。このことは各イオンの影響の差異からも推察され、ADのGLU受容体の機能追究とともにその相違の分子機構は早急に解決されなければならない課題であろう。

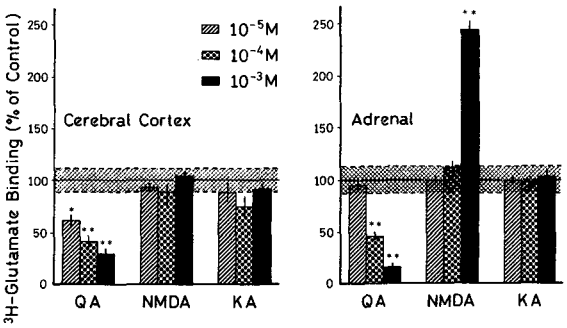


Fig.4. Effect of quisqualic acid (QA), N-methyl-D-aspartic acid (NMDA) and kainic acid (KA) on ^{3}H-glutamate binding in rat cerebral cortex and adrenal gland.

	^{3}H-Glutamate Binding (fmoles/mg protein)
Cortical part	28.4± 3.1
Medullary part	155.0± 14.7

N=4

Tablel. Localization of ^{3}H-glutamate binding in rat adrenal gland.

〔謝辞〕本研究の一部は文部省科学研究費(60770185)の援助のもとに行った。

〔文献〕1. Dowling,J.E., and Ripps, H. (1973) Nature (Lond.) 242, 101-103 2.Fagg,G.E., Foster,A.C., Mena,E.E., and Cotman,C.W. (1982) J.Neurosci. 2, 958-965 3. Glowinoki,J., and Iversen,L.L. (1966) J.Neurochem. 13, 655-669 4. Hayashi,T. (1954) Keio J.Med. 3, 183-192 5.Malouf,A.T., Schnaar,R.J., and Coyle,J.T. (1984) J.Biol.Chem. 259, 12756-12762 6. 荻田喜代一，中牟田弘道，小井田雅夫，米田幸雄(1985) 神経化学 24, 印刷中 7. Roberts,P.J. (1974) Nature (Lond.) 252, 399-401 8. Watkins,J.C., and Evans,R.H. (1981) Annu. Rev.Pharmacol. 21, 165-204 9. 米田幸雄，荻田喜代一，中牟田弘道，福田美衛，小井田雅夫 (1985) 神経化学 24, 印刷中 10. 米田幸雄，荻田喜代一，中牟田弘道，小井田雅夫 (1985) 神経化学 24, 印刷中 11. Yoneda,Y., Ogita,K.,Nakamuta,H., and Koida,M. (1985) Excitatory Amino Acids (Roberts,P.J., Storm-Mathisen,J., and Bradford,H.F., eds), in press, Macmillan Press, London

135. 神経細胞における受容体活性化による Ca^{2+} mobilization への GTP 調節蛋白の関与

大杉　武・今泉太郎・水島　淳・内田修次・吉田　博
（大阪大・医・第一薬理）

〔要　約〕

受容体活性化を介するCa^{2+} mobilization の機構を調べるために、NG108-15細胞を用いて、ブラジキニン（BK）受容体活性化によるCa^{2+} mobilization に対するGTP binding protein の関与について検討した。Ca^{2+}感受性蛍光プローブ quin 2を用いて細胞内Ca^{2+}濃度を測定した。BKによって細胞内Ca^{2+}濃度は上昇するが、Niを ADPリボシル化するislet-activating protein(IAP) で処理した細胞を用いても対照群と差がなかった。BKはcAMP生成を増加せず、またPGE_1によって増加するcAMP生成を抑制しなかった。BK受容体に、Ni,Ns 以外のGTP binding proteinがcoupleしているかどうか調べるために [^{3}H]BK の膜分画への結合実験をした。GppNHp存在下に[^{3}H]BKの結合は抑制された。　Quin 2 を取り込ませた細胞にGTPγS をmicro-injection すると、quin 2の蛍光強度は増加した。従って、BK受容体活性化を介するCa^{2+} mobilization には、Ns,Ni と異なるGTP binding protein が介在することが示唆された。

Key word NG108-15 cells,　Ca^{2+} mobilization,　GTP binding protein

ニューロブラストーマ×グリオーマ　ハイブリッド　NG108-15 細胞においてBKがCa^{2+} mobilization を生じ、ホスファチジルイノシトール4,5-ビスホスフェイト（TPI)の分解で生じるイノシトール３リン酸（IP3)とジアシルグリセライド(DG)がCa^{2+} mobilization に関与することを報告した。また、BKがTPI の分解を高めることが報告されている。従って、受容体を介するCa^{2+} mobilization には、BKのBK受容体への結合－－－TPI の分解－－－ IP3,DG の産生－－－ Ca^{2+} mobilization という経路が考えられるが、ligandと受容体が結合した後にどのような機構によってTPI が分解されるかは明らかでない。　最近、neutrophils において、TPI の分解にGTP binding protein が関与することが報告されている。　ここでは、NG108-15細胞を用いて、BKによって生じるCa^{2+}mobilizationにGTP binding protein が関与しているかどうか検討を行なった。

方　　法

細胞培養：

NG108-15細胞を10% FCS とHAT を含むDME mediumで培養した。

細胞内Ca^{2+}濃度の測定　：

Ca^{2+}感受性蛍光プローブquin 2を用いて測定した。細胞を30μM quin 2AM を含むバッファーで60分間、37℃でプレインキュベートした後、残っているquin 2AMを洗浄して取り除き、細胞を再びバッファーに懸濁した。この細胞を蛍光セルに入れて常時攪拌し蛍光光度計にて測定した（exitation wave-

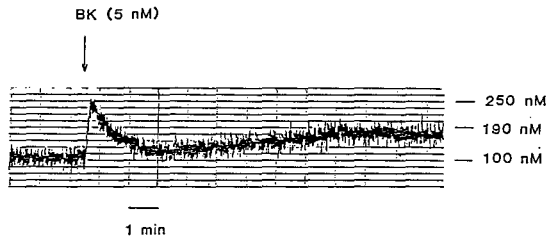


図１　BKによる細胞内Ca^{2+}濃度の上昇

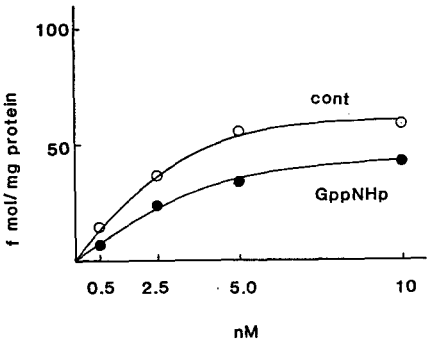


図２ [^{3}H]BK 飽和曲線

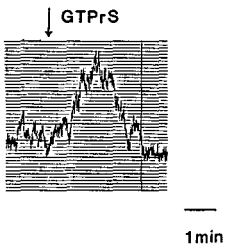


図３　GTPrS injection によるquin 2　蛍光変化

length: 339 nm, emission wavelength: 492 nm ）。細胞内Ca^{2+}濃度は Tsien らの方法に従って求めた。

[^{3}H]BK- 結合実験　：

細胞を50mM Tris バッファー中でホモジナイズし、100 xgで遠心分離した supernatant を10,000 xg で遠心分離して得たpelletを膜分画として用いた。膜分画を50mM Tris バッファーにsuspend し、[^{3}H]BK と25°C,30 分間インキュベートした後、15,000 xg で遠心分離し、膜分画中の放射活性を測定した。非特異的結合の測定には10μM非標識BKを加えた。　GTP のanalogであるGppNHpの効果を調べる場合は、膜分画をGppNHpと25°C 15 分間プレインキュベートした後に結合実験を行った。

細胞内注入法　：

薬物の細胞内での作用を調べるために、単一細胞内のquin 2の蛍光を顕微鏡下に測定しながら、ガラスピペット（2 M KCl を入れた場合、50 M オーム）を用いて薬物を細胞内へ電気泳動的に注入した。Quin 2の蛍光変化はphoto-multiplier(Nikon PI)を用いて測定した。

cAMP content　の測定　：

細胞をHepes バッファーにsuspend し、1 mM IBMX とligandを加えて37℃、15分間インキュベートし、0.1N HClで反応を止めた。細胞内のcAMP量はラジオイムノアッセイ法によって測定した。

結　　果

図１に示すように、quin 2を含む細胞をBKで刺激すると二相性の細胞内Ca^{2+}濃度の上昇が見られた。この上昇にはIP3,DGが関与する可能性を報告しているが、最近、mast cellsやneutrophils において、アデニレートシクラーゼ系の抑制性GTP binding protein(Ni) をADP リボシル化するIAP で処理すると、Ca^{2+} mobilization と TPI分解が減じるという報告がある。BKによるCa^{2+}mobilizationがIAP 処理によって影響を受けるかどうか調べるために、細胞を500ng/ml IAPと18時間培養したが、BKによる細胞内Ca^{2+}濃度上昇に対し、IAP 処理群と対照群に差はなかった。

次に、BKがcAMP生成を促進あるいは抑制するかどうか検討した。BKはcAMP生成を促進せず、また、PGE_1のcAMP生成促進効果を抑制しなかった。従って、NG108-15細胞において、Niあるいはアデニレートシクラーゼ系の促進性GTP binding protein (Ns)はBK受容体に介在していない可能性を示唆する。次に、GTP binding proteinがBK受容体にcoupleしていないのかどうか調べるために、細胞膜分画への[^{3}H]BK結合実験を行ない、guanine nucleotides が[^{3}H]BK 結合に影響するかどうか検討した。図２に示すように、[^{3}H]BKの膜分画への結合は100 μMのGppNHpによって減少した。従って、BK受容体にGTP binding protein はcoupleしていると思われる。BK受容体活性化によるCa^{2+}mobilizationにGTP binding protein が関与している可能性を調べるために、quin 2を取り込ませた単一細胞にGTP analogのGTPγS をmicro-injection した。図３に示すように、GTPγS の細胞内注入によりquin 2の蛍光強度は増加するが、GDP では作用がなかった。

以上のことから、BK受容体活性化によって生じるCa^{2+} mobilization には、Ns,Ni と異なるGTP binding protein が介在することが示唆された。そして、TPIの分解によって産生されるIP3,DGが、Ca^{2+} mobilization を生じることからBK のBK受容体への結合－－－GTP のGTP binding protein への結合－－－TPI の分解－－－IP3,DGの産生－－－Ca^{2+} mobilization の経路が考えられる。

文　　献

1) Yano,K.,Higashida,H.,Inoue,R.,and Nozawa,Y.(1984) J.Biol.Chem. 259, 10201-10207
2) Nakamura,T.,and Ui,M. (1985) J.Biol.Chem. 260,3584-3593
3) Tsien,R.Y.,Pozzan,T., and Rink,T.J. (1982) J.Cell Biol. 94,325-334
4) Cockcroft,S.,and Gomperts,B.D. (1985) Nature 314, 534-536

136. Conotoxin GⅢ による Na channel に対する [^{3}H] Lys-tetrodotoxin の阻害

柳川右千夫・阿部輝雄・佐武　明　（新潟大・脳研・神経化学）

〔要　約〕

アンボイナ貝(Conus geographus)の毒素よりconotoxin GⅢを精製し、電気鰓電気器官膜分画（電気器官）とラット脳P_2分画（ラット脳）に対する[^{3}H]Lysine-tetrodotoxin（[^{3}H]Lys-TTX）の特異的結合の本毒素による阻害と非標識tetrodotoxin（TTX）による阻害とを比較検討し、conotoxin GⅢの神経毒としての性質を明かにした。

（1）電気器官において[^{3}H]Lys-TTX（4 nM）の特異的結合に対する50%阻害濃度はTTXで7.2 nM、conotoxin GⅢで、13.2 nMであった。（2）ラット脳において、上記特異的結合の50%阻害濃度はTTXでは、3.5 nM、conotoxin GⅢで7.9 μMと1000倍以上の差を示した。（3）電気器官においてTTXによる上記特異的結合能の阻害はバッファーによる洗浄のみで消失したが、conotoxin GⅢによる阻害効果は洗浄の後、更に20時間インキュベートしても消失しなかった。（4）以上よりconotoxin GⅢがNaチャンネルに作用する神経毒であり、可逆性の点では異なるが、複素環化合物であるTTXと同じ作用機構をもつペプチド神経毒あることが示唆される。

Key word : Conotoxin GⅢ, [^{3}H]Lys-TTX binding , Na channel

神経にとって電気的興奮性は特徴的かつ重要な性質であり、Naチャンネルがその主役を担っている。Naチャンネルは電気鰓電気器官（1）、ラット脳シナプス膜（2）等より精製された蛋白質であり、前者では遺伝子工学的手法を用いて、一次構造が明らかにされた（5）。今後、分子内における機能的ドメインを解明することが重要であるが、それにはNaチャンネルに特異的に作用する神経毒が有用である。

Conotoxin GⅢはアンボイナ貝の毒素より精製され(7, 8)、Sato等のgeographutoxin Ⅰと同一と考えられており（6）、22個のアミノ酸よりなるペプチドである。その作用はマウスの横隔膜筋の等尺性収縮、同座骨神経の活動電位の発生を抑制することにより、Naチャンネルに作用すると推測されている。Naチャンネルに特異的に作用するTTXを放射性標識し、電気鰓電気器官およびラット脳P_2分画に含まれるNaチャンネルとの特異的結合を調べ、それに対するconotoxin GⅢとTTXとによる阻害効果を比較検討した。

［実験方法］

（1）電気鰓電気器官膜分画（電気器官）とラット脳P_2分画（ラット脳）の調製：前者はAgnew等（1)の方法を改良し、後者はGray等（4)の方法を用いた。

（2）Conotoxin GⅢの精製：全ての操作を0-4°Cで行なった。ドライアイスに入れて沖縄より空輸したアンボイナ貝(Conus geographus)の毒せんを取り出して10倍容の0.1 N塩酸中でポリトロンでホモジェナイズし、10^5 g、1時間遠心して上清を得、凍結乾燥した。この塩酸抽出物を適当量の1%酢酸で2回抽出して、10^5 g、1時間遠心後の上清をセファデックスG－25のカラムにかけ254 nmの吸収

を測定して５つの分画を得た。この中の一つの分画を凍結乾燥後、逆相系HPLCによってconotoxin GⅢを得た。（Fig. 1. 参照）

（３）　[^{3}H]Lys-TTXの特異的結合実験：　Chicheportiche等 (3)の方法に従い、[^{3}H]Lys-TTX (20 Ci/mmol)を合成した。電気器官では、20 mM Tris-HCl、pH 7.4、40 mM choline chloride中にてラット脳においては、20 mM Tris-HCl、pH 7.4、140 mMcholine chloride中にて種々の濃度の [^{3}H]Lys-TTXと20分間 4°Cでインキュベート後に 28,000 g、10分間遠心し、沈さに結合した放射活性を測定し全結合とした。全結合より4 μM TTX存在下での値を差し引いたものを特異的結合とした。神経毒による阻害実験では [^{3}H]Lys-TTXの濃度を4 nMと一定にし、種々の濃度の神経毒と混合した後、インキュベートし、以下同様に行なった。

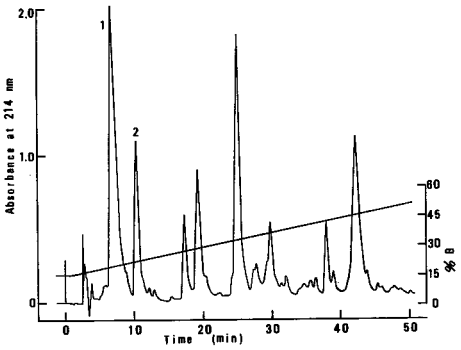


Fig. 1. Reversed phase HPLC of Fraction II. Lyophilized Fraction II was dissolved in 300 ul of solution A (0.1% trifluoroacetic acid) and injected into a column (1.9 x 15 cm) of μBONDAPAK C18 (Waters) and toxins were eluted with a linear gradient of solution B (60% acetonitrile in 0.1% trifluoroacetic acid). Flow rate was 10 ml/min.

［結果と考察］

（１）　conotoxin GⅢの精製：逆相HPLCにより精製されたFig. 1.のFraction 1はconotoxin GⅢであり、Fraction 2はgeographutoxin IIであることがアミノ酸分析より決定された（6)。

（２）　[^{3}H]Lys-TTXの電気器官とラット脳とに対する特異的結合をScatchard plotにてFig. 2.に示した。両者とも単一の結合部位が示され、Kdは前者で19.5 nM、後者では18.7 nMであり、Bmaxは前者では15.8 pmol/mg蛋白、後者においては2.57 pmol/mg蛋白を示した。

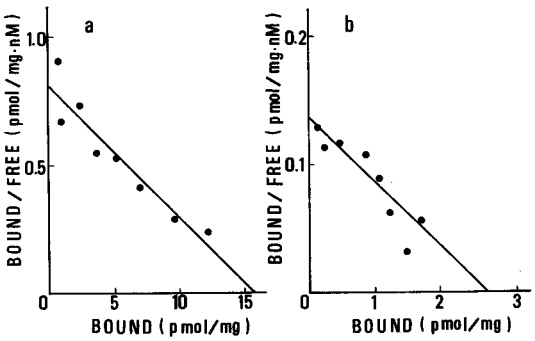


Fig. 2. Specific bindings of [^{3}H]Lys-TTX to eel elecoroplaque membranes (a) and rat brain P_2 fraction (b) are presented as Scatchard plot.

（３）　Fig. 3.に電気器官とラット脳とに対する[^{3}H]Lys-TTX (4 nM)の特異的結合がconotoxin GⅢとTTXによって濃度依存性に抑制されることを示した。この結合の50%阻害(IC_{50})は電気器官において、TTXが7.2 nM、conotoxin GⅢが13.2 nMであり、ラット脳において、TTXが3.5 nM、conotoxin GⅢが7.9 μMであった。この様に、Naチャンネルに特異的に結合し、Naイオン透過性を抑制するTTXとconotoxin GⅢが競合することは、conotoxin GⅢが、Naチャンネルに結合することを証明し、またTTX類似の作用をもつ神経毒に分類されることを示している。と

ころでconotoxin GⅢ と TTXとによる [^{3}H]Lys-TTXの結合のIC_{50}が、電気器官では互いに近い値を示し、ラット脳では約1000倍の差を示したことは、Naチャンネル分子の構造が両種属間で相違していることを示唆する。

（4） 電気器官においては、[^{3}H]Lys-TTXの特異的結合の TTXによる阻害はバッファーによる洗浄のみで消失したが、conotoxin GⅢによる阻害効果は洗浄で消失せず、20時間インキュベートしても依然として同程度の阻害効果を示した。これは TTXは可逆的に結合するが、conotoxin GⅢが不可逆的に結合するためと考えられる。

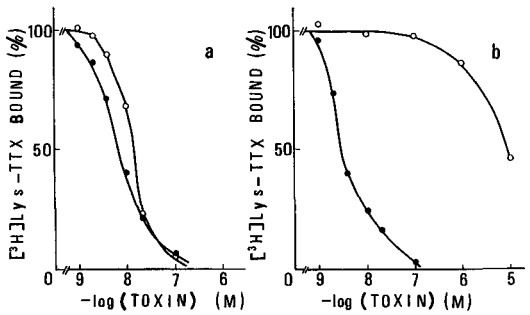


Fig. 3. Inhibition of[^{3}H]Lys-TTX binding (4 nM) by conotoxin GⅢ(o) and unlabeled TTX (●).
a, eel electroplaque membranes b, rat brain P_2 fraction.

以上のことは、放射性標識conotoxin GⅢによる結合実験と、詳細な電気生理学的実験によって更に確実にされると考えられる。

[文献]

1. Agnew, W.S. et al. (1978) Proc. Natl. Acad. Sci. 75, 2606-2610
2. Catterall, W.A. (1984) Science 223, 653-661
3. Chicheportiche, R. et al. (1980) Eur. J. Biochem. 104, 617-625
4. Gray, E.G. et al. (1962) J. Anat. 96, 79-88
5. Noda, M. et al. (1984) Nature 312, 121-127
6. Sato, S. et al. (1983) FEBS Lett. 155, 277-280
7. Spence I. et al. (1977) Life Sci. 21, 1759-1770
8. Stone, B.L. et al. (1982) Arch. Biochem. Biophys. 216, 765-767

137. スピンラベル法によるラット脳神経終末形質膜（SPM）及びシナプス小胞（SV）膜の流動性測定

都築紀宏　（名古屋市大・医・生化）

〔要　約〕

(1) 神経伝達物質の放出過程が開口放出に基づくか否かを検討する目的で、SPM, SV 膜の流動性を測定した。(2) SV 膜内に導入したスピンラベル、5-及び16-doxylstearic acids（5NS,16NS）の電子スピン共鳴吸収（ESR）は、SV 膜も他の生体膜同様表層部程硬く中心部程柔らかいリン脂質2重構造を有する事を示した。(3) 各膜標品中の5NS の order parameters（S）は SPM>SV>肝ミトコンドリアの順に減少し SPM の方が SV より硬い膜であった。同傾向は膜脂質転移温度からも得られた。(4) 2 mM $CaCl_2$, 56 mM KCl 存在下で SPM と SV を incubate した場合、膜融合が起るか否かを調べた。しかし、30°,10 min 後単離した SPM の S-値、SDS-PAGE（電気泳動）上のタン白組成に関して有意差は見られ無かった。(5) ^{14}C-コレステロール標識した SV を用いて(4)と同様の実験を試みたが、SV の SPM への取り込みは見られ無かった。(6) これらから判断して、開口放出時に SV が SPM へ完全に取り込まれるとするなら、SPM の流動性は神経活動に応じて変動する。又、融合後 SPM の脂質組成を変えずに元の SV 脂質分子のみを回収する事は、不可能な様に思われる。

Key word : Spin labelling, exocytosis, fluidity of synaptosomal plasma membrane.

神経伝達物質の放出機構に就て現在提唱されている仮説の一つに開口放出説がある。これは神経終末に含まれるシナプス小胞（SV）が神経終末形質膜（SPM）と融合後開口し、その内容物（伝達物質）を放出すると言う説である。そして神経刺激後 SV 数が減少するのは SV が SPM 中へ取り込まれてしまう為と仮定している(1)。この説は素量放出説を説明し易い反面(2) 微小終板電位より更に小さい電位変化の存在が認められ、素量と言う概念を再考する必要がある等と反論も有る(3,4)。私は現在までに(a) 神経終末 cytosol 中で合成された dopamine (DA) は、DA 結合性酸性糖タン白と結合して cytosol pool を形成する事、(b) この結合によって DA は MAO (monoamine oxidase) から保護される事、(C) Ca^{2+} にはこのタン白から DA を遊離する作用がある事などを示し、cytosol pool の、放出機構への関与を述べた(5-7)。今度の研究は伝達物質の開口放出が可能か否かを検討する目的で、ラット脳 SPM、SV、及び肝ミトコンドリア膜の流動性を測定したので報告します。

主な材料と方法

SPM の調製。ラット脳 P_2-分画を得、0.8-1.2 M sucrose gradient 法で神経終末を精製。低張処理後 0.6-1.0 M ショ糖密度遠心法で SPM を得た(9)。

SV の調製。P_2-分画を低張処理後膜分画を 3.1 万g 遠沈除去、その上清を 10.5 万g で遠心し ppt を SV とした。肝ミトコンドリアは常法調製した。スピンラベルの導入。クロロフォルムに溶かした 5NS, 16NS (250 ug/ml) を試験管に取り、N_2 ガス下で溶媒を除く。膜標品 (20-40 mg prot./ml) を加え、20° 10 min vortex 混合し、未導入スピンを遠心除去した。ESR 測定。偏平セルを用い 0° から 41° まで 2° おきに測った。

Order parameter (S) はGaffney (8) の式、$S=(T_{\parallel}-T_{\perp}+C)/(T_{\parallel}+2T_{\perp}+2C)\times 1.723$, $C=1.4\,\text{gauss}-0.053\,(T_{\parallel}-T_{\perp})$ より得た（図1参照）。^{14}C-コレステロール標識SV。^{14}C-Chol. (5uCi, 0.5 mℓ toluene) を試験管に取り、N_2 ガス下で溶媒除去後SVを6 mℓ (25.2 mg prot.) 加え、20°, 10 min vortex 混合。Free ^{14}C-chol は遠沈除去した。SVの^{3}H-DA 負荷。SV (8.4 mg prot) と1.5 uM DA (+0.23 uM ^{3}H-DA) を0.32 M sucrose -45 mM Tris-maleate, pH 7.4 (2 mℓ) 中で、29°, 5 min incubate した。取り込まれなかったDAは遠心除去した。SDS-PAGE。7%ゲル, pH 8.0 で2-3 h 泳動した。試料 (1 mg prot/mℓ) は1% SDS, 2% β-メルカプトエタノール中で100° 5 min 処理した。試薬。5NS、16NS はAldrich社より、「4-^{14}C」cholesterol (58.4 mCi/mmol) 及び「ring-2,5,6-^{3}H」dopamine-HCl (13.5 Ci/mmol) はAmersham 社より購入した。

結　果

5NS, 16NS のESRスペクトル。脂肪酸スピンラベルを生体膜に導入すると、炭素鎖を膜面に垂直に配列する。SV膜内の5NS (A), 16NS (B) は各々、異方性及びほぼ等方性回転運動を反映するスペクトルを示す（図1)。5NSの遊離基は膜の表層部に、16NSでは膜の中心部に位地するので、これらの結果はSV膜も他の生体膜同様、表層部程硬く中心部程柔らかいリン脂質2重層構造をしている事を示している。図1に於て $T_{\parallel}=27.93$ gauss, $T_{\perp}=9.0$ G, $S=0.685$ (23°)。

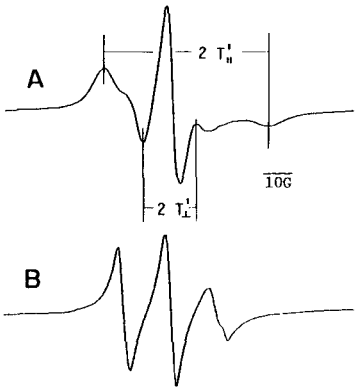


図1：5NS及び16NSのESRスペクトル。(A) 5NS, (B) 16NS at 28°

Order parameter (S) の温度依存性。図2にはSPM, SV, 肝ミトコンドリア (Mt) 膜に導入した5NSのS-値の温度依存曲線が示してある。S-値（最大は1.0で結晶の時）は大きい程“硬い”ことを表わすので、0°-40°の範囲で膜はSPM>SV>Mtの順に柔らかく成る事を示している。矢印で示した、直線が折れ曲っている点は膜脂質の相転移温度を示しているので、この温度からも膜は上記の順に流動性が大きいと言える。即ち各々の生体膜は個有の“柔らかさ”を保持している事、SVよりSPMの方が硬い膜である事を示している。

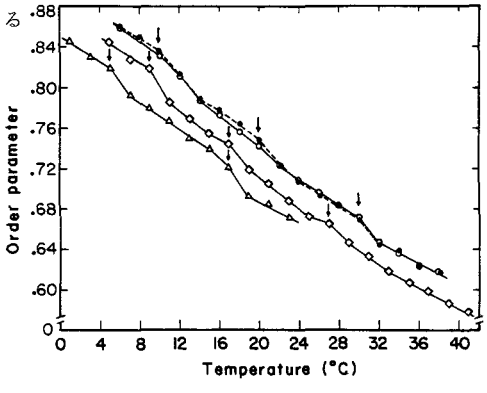


図2：S-値の温度依存性。△, ミトコンドリア, □, SV、○, SPM、●, treated SPM

Ca^{2+} 存在下でのSPMとSVのincubation。SPMとSV (各々11.0, 1.9 mg prot/mℓ) を、2 mM Ca^{2+}、56 mM KCl 存在下でincubte した時、膜融合が検出されるか否かを調べた (0.32 M シュ糖-80 mM Tris-maleate、pH 7.4、30°)。10分後単離したSPM中の5NSのS-値は対照と比べて有意差は見られなかった（図2黒丸)。このESR測定に用いたSPMのタン白組成をSDS-PAGEで分析したがincubate前後に於て有意差は見出せなかった（図3)。S-値に対するCa^{2+}の作用も認められなかった。次に^{14}C-コレステロールで標識した

SVを用いて、上記と同様の実験を試みた。図4に示した様にSPMの（沈殿）分画に回収される^{14}C-コレステロールは全体の数%で、対照（ロ）と比較して有意差は検出できなかった。SV回収量が多いのはaggregated SVとSPMが充分に遠心分画されなかった為と思われる。この様に、異なった3種の方法を用いたが、SVのSPMへの取り込みは見出せなかった。

^{3}H・DAの遊離。次に上述のincubation条件下で、伝達物質がCa^{2+}依存的に遊離されるか、を調べた。図5の様に、予じめ負荷された^{3}H・DAはCa^{2+}依存的にSVより遊離された。しかし、この遊離は上の結果から判断すると、開口放出に依るのではなく、我々が既に報告した(7) Ca^{2+}の別の作用、即ちタン白に結合しているDAを遊離する作用に依って、系の平衡がDA遊離の方向へ傾むいた結果SVから遊離されたとも考えられる。

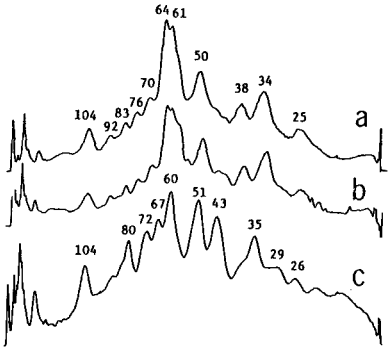


図3：タン白組成（SDS-PAGE）a，SPM、b，treated SPM、c，SV。数字は分子量（kD）。

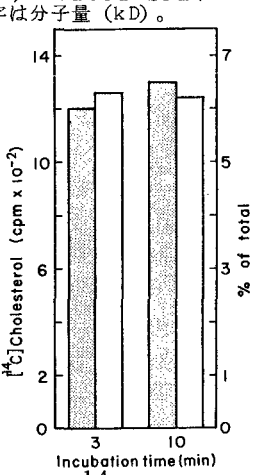


図4：^{14}C-SVのSPMへの取込。■，Ca^{2+}，KCl（+）、ロ，対照。

考　察

開口放出説ではSVのrecyclingを仮定している。SVの瞬時的融合による放出では、神経刺激後に見られると言うSV数の減少は説明できないので、SPMへのSVの完全な取り込みをも仮定している。伝達物質の放出に伴なって、この膜融合が繰り返されるならばSPMの脂質組成は変化するであろうしSV脂質分子もlateral diffusionするであろう。SPMの脂質組成の変化は、膜の流動性や膜電位の変化をもたらし、神経伝達を左右すると思われる。又、この様に拡散したSVの脂質分子のみを再び集めて、SVを再生する事が可能であろうか？この様に考えると、現在開口放出が必ずしも可能な機構とは言い切れない。今回のSPM標品中には多くのinside-outやunsealed vesiclesが見られたが、SVとの融合が検出されなかったのは、この所為かも知れない。

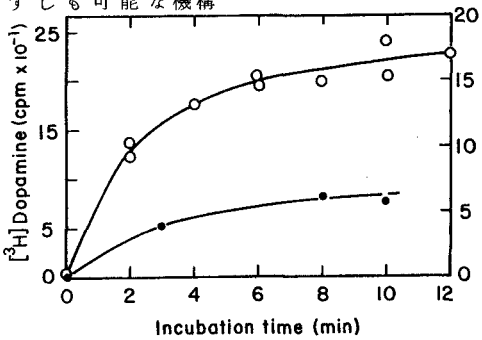


図5：^{3}H-dopamineの遊離。SV，0.4 mg prot，SPM，1.2 mg 2 mM Ca，56 mM KCl，●，対照

1) Heuser, J.E. & Reese, T.S. (1973) J. Cell Biol. 57, 315-344

2) Blackman, J.G., Ginsborg, B.L., & Ray, C. (1963) J. Physiol. 167, 402-415

3) Kriebel, M.E. & Gross, C.E. (1974) J. Gen. Physiol. 64, 85-103

4) Bevan, S. (1976) J. Physiol. 258, 145-155

5) Tsudzuki, T. (1981) J. Biochem. 90, 1341-1349

6) Tsudzuki, T. (1984) Bul. Japn. Neurochem. Soc. 23, 264-266

7) Tsudzuki, T. (1983) J. Biochem. 93, 599-606

8) Gaffney, B.J. (1975) Proc. Nat. Acad. Sci. USA 72, 664-668

9) Ohashi, T., Uchida, S., Nagai, K., & Yoshida, H. (1970) J. Biochem. 67, 635-641

138. 線条体黒質路に含まれるオピオイドペプチド

市川宏伸*,**・西川　徹*,***・三ツ汐　洋*・高嶋瑞夫*
融　道男****・松尾壽之*****
（国立武蔵療・神経センター*，都立梅ケ丘病院**，東京医歯大・医・神経精神***，信州大・医・精神****，宮崎医大・第二生化*****）

〔要　約〕

プロエンケファリンBを前駆体とすると考えられているα－ネオエンドルフィン，ダイノルフィンA(1-8)(PH-8P)と線条体－黒質路の関連について検討した。

Wistar系雄性ラットの線条体－黒質路を選択的に破壊した際の上記2物質を黒質で測定し，既知のγ－アミノ酪酸，サブスタンスPの変化との異同を調べた。

4物質ともに，偽手術群と比較して約30％の有意の低下を示した。また，これらの物質相互の相関を調べた所すべて有意の正の相関があった。既知のγ－アミノ酪酸，サブスタンスPが有意に低下していることから，線条体－黒質路は破壊されており，α－ネオエンドルフィン，ダイノルフィンA(1-8)(PH-8P)もこの経路に含まれていることが支持された。

手綱核を破壊して同様に黒質の4物質を測定した際には，偽手術群と比較して有意の差異はなく，線条体－黒質路の変化が特異的なものであることが示唆された。手綱核から黒質へ投射する線維群に，上記4物質の直接の投射はないと考えられた。

Key word : striato-nigral pathway, α-neoendorphin, dynorphin A (1-8) (PH-8P)

［はじめに］　線条体－黒質路(S-N路)は線条体に分布するドーパミンニューロンを調節する上で重要なことが認められており，これまでにγ－アミノ酪酸(GABA)，サブスタンスP(SP)などが含まれていることが明らかにされている。また組織化学的研究，S-N路をナイフカットした生化学的研究などから，ダイノルフィン(Dyn)も含まれていることが最近示唆されている(1)。一方，α－ネオエンドルフィン（α-NE)ダイノルフィンA(1-8)(PH-8P)はDynと同じくプロエンケファリンBを前駆体とすると考えられているオピオイドペプチドである(2)。今回，我々は電気凝固法を用いて，S-N路と手綱核（Hab)を選択的に破壊し，この際の黒質における，GABA,SP,α-NE,PH-8P量の変化について検討した。

［方法］　実験にはWistar系雄性ラットを用いた。電気凝固によって，S-N路，Habを破壊後30日にラットを断頭した。脳を取り出し，冷凍後，脳切片(300μm）から黒質を取り出し，測定を行なった。脚間核は脳切片よりパンチアウトし測定した。

単極性ステンレス電極の挿入部位と通電条件は以下の通りである。S-N：A＋3.8，V＋2.5，L±3.0，2mA，10sec. Hab：A＋4.0，V＋5.0，L±0.6，3.5mA，15sec．GABAは既報(3)により蛍光測定し，SP，α-NE，PH-8Pは特異的抗体を用いたRIA法により，既報通り測定をした(3)。脚間核のコリンアセチル基転移酵素(CAT)は，

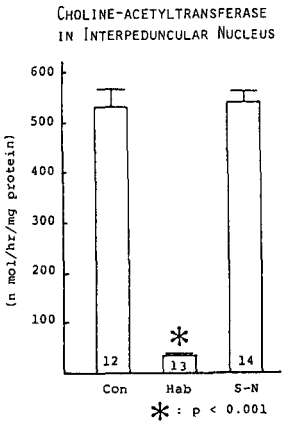


図　1

Fonnumの方法で測定した(4)。蛋白は Lowry法で測定した。

［結果］ GABAは偽手術群（Con 群，12例）で72.8±1.6 （n mol/mg protein±SE），Hab 破壊群（Hab 群，13例）で74.8±1.9 ，S-N 路破壊群（S-N 群，14例）で51.7±2.0 となり，S-N 群で有意の低下（Mann-Whitney U 検定:p＜0.001 ）がみられた（図２参照）。

SPはCon 群（12例）で4.51±0.22 (p mol/mg protein ±SE），Hab 群（13例）で4.70±0.15，S-N 群（14例）で3.08±0.18であり，S-N 群で有意の低下（ p＜0.001 ）がみられた（図３参照）。

α－NEは Con群（12例）で12.3±2.7 (p mol/mg protein ±SE)，Hab 群（13例）で13.8±1.2 ,S-N群（14例）で9.0 ±1.8 であり，同じくS-N 群で有意の低下(p＜0.02) がみられた（図４参照）。

PH-8P は Con群（12例）で1.55±0.12(p mol/mg protein ±SE),Hab 群（13例）で1.43±0.08，S-N 群（14例）で1.13±0.08であり，S-N 群で有意の低下（ p＜0.02 ）がみられた（図５参照）。

Con群を100 とした時，Hab 群の値は，GABA,SP,α-NE,PH-8Pでそれぞれ，103,104,112,93 であった。一方，S-N 群の値はそれぞれ71,68,73,73 であり，すべて30％前後の有意の低下を示した。

また Con群12対，S-N 群14対についてGABA,SP,α-NE,PH-8P 間のそれぞれの相関を調べると，全ての組み合わせで有意の正の相関(Pearson) が示された（図６，７，表１参照）。 脚間核における CAT活性を調べると，Con 群（11例）530 ±33(n mol/hr/mg prot.±SE)，Hab群（12例）34.9±1.9，S-N群（13例）534 ±22であり， Hab群で有意の低下（ p＜0.001)がみられ，Habは十分に破壊されていると考えられた（図１参照）。［考察］ S-N 群おいて，GABA,SP,α-NE,PH-8P は Con 群に対して，すべて30％前後の低下を示した。S-N 路に含まれていることが知られている，GABA,SP について，Con 群,S-N群26対の相関を調べ

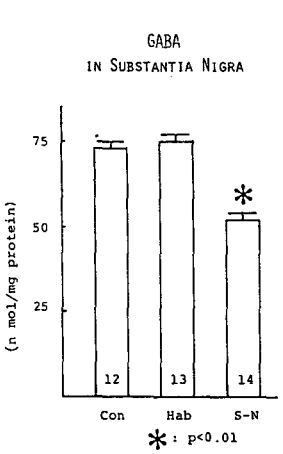


図 2

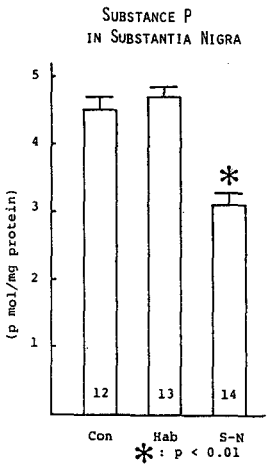


図 3

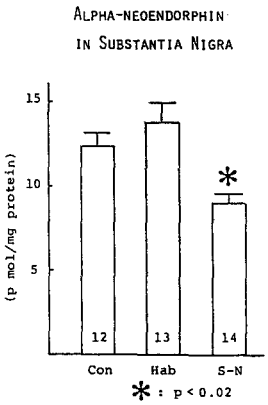


図 4

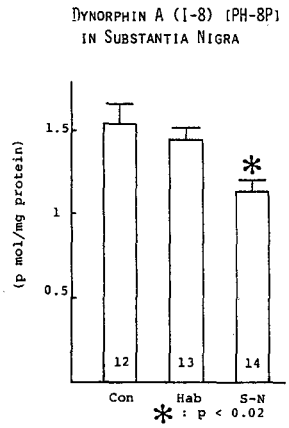


図 5

ると，極めて強い正の相関を示し，既知の知見を支持すると共に，今回の実験で，S-N 路が破壊されていることが確認された。

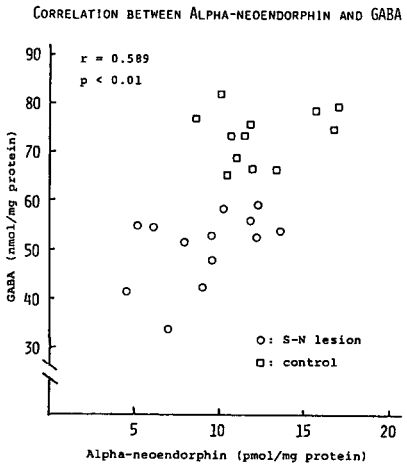


図　6

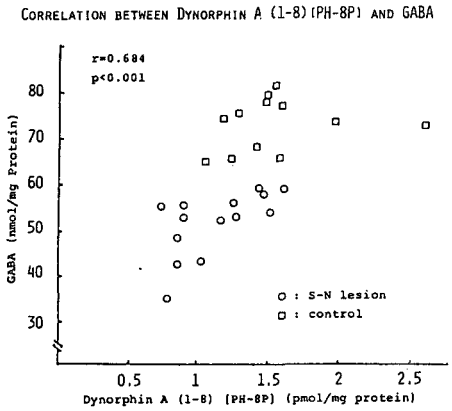


図　7

次に，同様にGABA，α-NE について相関を調べると，強い正の相関を示し，α-NE も S-N路に含まれていることが示唆された。α-NE とSPも正の相関を示し，この事実を支持した。またS-N 路をナイフカットした際に黒質でα-NE が低下したとの報告とも矛盾しない(1)。

GABA,PH-8Pについて相関を調べると，強い正の相関を示し，PH-8P もS-N 路に含まれていることが示唆された。PH-8P とSPも正の相関を示し，この事実を支持した。PH-8P とα-NE の相関をしらべると強い正の相関を示し，共通の前駆体を持つ可能性を考えると，興味深い。

CORRELATION AMONG GABA,SP,α-NE AND PH-8P IN SUBSTANTIA NIGRA AFTER LESION OF STRIATONIGRAL PATHWAY

	γ-aminobutyric acid (GABA)		
Substance P (SP)	r = 0.866 p < 0.0001		
α-neoendorphin (α-NE)	r = 0.589 p < 0.01	r = 0.443 p < 0.05	
Dynorphin A (1-8) [PH-8P]	r = 0.684 p < 0.001	r = 0.589 p < 0.002	r = 0.586 p < 0.002

表　1

Hab 群においてはS-N 群で認めた変化はなく，S-N 群における変化は特異的なものであると考えられた。また，Hab から黒質へ投射する神経線維群においては，GABA,SP,α-NE,PH-8P などの直接の投射はないと考えられた。

今後，α-NE,PH-8P が S-N路に含まれていることの生理学的意義について検討を続けていきたい。

［文献］

(1) M. Palkovits, et al., Neuropeptides 4 : 193-199, 1984.
(2) H. Kakidani, et al., Nature 298 : 245-249, 1982.
(3) 融　道男　ほか、精神経誌 86 : 827-840, 1984.
(4) F. Fonnum, Biochem. J. 115 : 465-467, 1969.

139. 線条体への kainic acid 投与に伴う海馬での (Met^5)-enkephalin 合成系の変化
－ Preproenkephalin A に対する cDNA による検討－

金松知幸・ J.S. Hong*
(東邦大・医・第二生理, NIEHS, NIH*)

〔要　約〕

線条体への kainic acid (KA) 投与に伴う、脳内 (Met^5)-enkephalin (ME)合成系の変化についてラット脳部位別に ME 濃度、ME 前駆体 (preproenkephalin A) 濃度、preproenkephalin A に対する mRNA (mRNA^{enk}) 量を経時的に測定することにより検討した。

KA 投与後 3~6時間内にラットは頻発性痙攣をしめすが、この時期に海馬では ME 濃度は減少(0.65倍)し、その後増加し始め 72時間まで増加 (3倍)し続けた。Preproenkephalin A 濃度は24時間後まで増加 (3.2倍)し、その後徐々に減少したが、72時間後でも 3倍の値を示していた。mRNA^{enk} 量は 6時間後までに急速に増加 (4倍)し、その後直線的に減少してゆき 72時間後には正常量を示した。また内嗅領野皮質－海馬の歯状回へ神経線維を投射しているenkephalinergicな神経の細胞体が存在する部位－でも海馬とほぼ同様の変化が認められたが、線条体、視床下部では変化が認められなかった。

以上のことより、線条体への KA 投与により内嗅領野皮質－海馬に存在するenkephalinergicな神経の ME 合成系が著しく増加することが判明した。また痙攣時に mRNA^{enk} 量が著しく増加していることから、痙攣と ME 合成系との間に関連性があることが強く示唆された。

Key word : Kainic acid、 mRNA coding for preproenkephalin A、 Hippocampus

グルタミン酸の analogue である KA を脳内投与することにより、海馬での ME 濃度が上昇することが知られている[2,3]。しかし、ME 濃度上昇が ME 合成系の促進によるものか、ME 放出の抑制によるものかは明らかでない。一方、KA 投与に伴い、ラットが痙攣を示すことが知られており[7,8]、また electoconvulsive shock (ECS), amygdala kindling などにより海馬の ME 濃度が上昇することから[4,5]、ME と痙攣との相関性が指摘されている。そこで今回我々はラット脳より得られた preproenkephalin A に対する cDNA を用い、mRNA$^{(enk)}$ 量を測定することにより、ME 合成系を中心に検討した。

< 実験方法 >

実験動物 : Fischer-344系、雄の 12~14週令のラットを用いた。ケタミン麻酔下にラットを脳固定器に固定し、A,7.4; L,2.8; V,0. の部位に 1μgの KA を 1μlの生食でマイクロポンプを用いて 1分間で投与した。Control 群として 1μlの生食のみを投与した。各実験群に 10匹のラットを使用した。投与後 3,6,12,24,48,72時間にラットを断頭、瀉血し、すみやかに脳を Glowinski & Iverson の方法に従い部位別にした後、組織をドライアイス上で凍結させた。

Preproenkephalin A, ME の濃度測定 : 組織に 10倍量の 0.1 N HClを加へ、ソニケータで homogenate した。ME 測定のため、homogenate の一部を 15分間 boil し、25,000gで 30分間遠沈し、上清を凍結乾燥した後、buffer A (50mM Tris, 5mM $CaCl_2$, pH 8.4) でサスペンドし、再び 25,000gで 30分間遠沈し、その上清を radioimmunoassay (RIA) のサンプルとした。Preproenkephalin A の測定は Cupo,A.et al.[1] および Liston,D.et al.[6] の方法に従った。

すなわち homogenate の一部に等量の 10% TCA を加えて、氷冷下に 15分間放置後、10,000gで 2分間遠沈した。沈澱をエタノールで 3回洗浄した後、室温で乾燥させ、buffer A でサスペンドした。その溶液に trypsin(Sigma, Type XIII)を加え 37℃、4時間 incubateした後、15分間 boil し、氷冷した。次に carboxypeptidase B (Sigma, TypeI-DFP) を加え 37℃で2時間 incubate した後、再び15分間 boil した後、氷冷し、25,000g で 30分間遠沈し、上清を RIA のサンプルとした。即ち preproenkephalin A 量を cryptic ME 量として求めた。RIA は Immuno Nuclear Corporation 社製の ME assay kit を使用して行った。

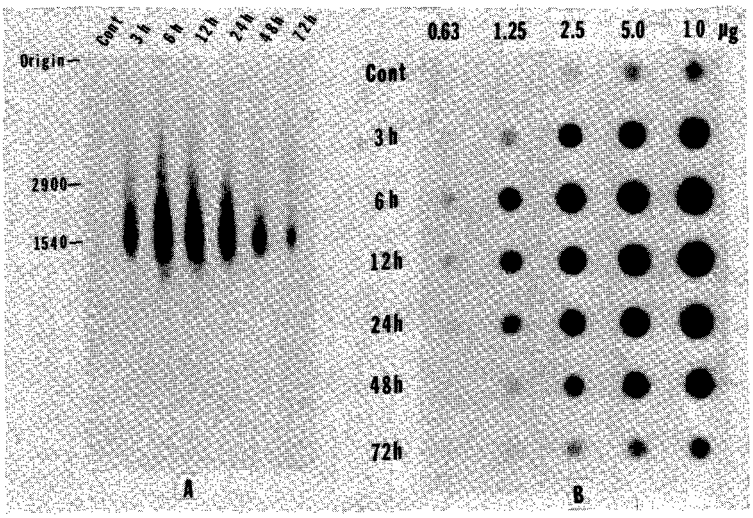


Fig.1 Changes of mRNA cording for proproenkephalin A abundance in the rat hippocampus after a single striatal injection of kainic acid. A: Northern blot analysis; 20µg of total RNA was denatured and electrophresed in 1.3% agarose gel. RNA was transfered to a GeneScreen membrane by capillary blot. B: Dot blot analysis; 20µg of RNA was denatured and serially diluted, and filtered under slight vacuum through a GeneScreen membrane held by a Hybri-Dot manifold.

mRNA^{enk} の測定：ラット脳より Sabolらの方法[9]に従い、RNAを抽出した。Northern blot analysis；RNA を agarose 電気泳動で分離した後 capillary blot によりGene-Screen 膜に transferした。Dot blot analysis；RNA を Hybri-Dot manifold を使用し、直接 Gene-Screen 膜上にアプライした。これらの膜を nick translation された、cDNA(ラット脳より得られた preproenkephalin A に対する cDNA. Dr.Sabol 氏より贈与された。) とともに 42℃で 16時間 incubate しハイブリダイゼーションを行ないその後、膜を洗浄し、乾燥し、オートラジオグラフィーを行った。

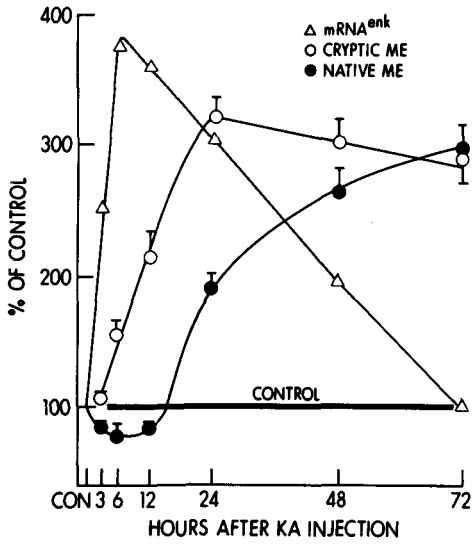


Fig.2 Levels of cryptic and native (Met^5)-enkephalin and mRNA coding for preproenkephalin A in the rat hippocampus after a single striatal injection of kainic acid.

Table 1 Levels of native and cryptic (Met^5)-enkephalin and mRNA coding for preproenkephalin A in rat striatum, hypothalamus and entorhinal cortex after a single striatal injection of kainic acid

Brain Region	Time Course	Native ME-LI (p mole/g wet wt.)	Cryptic ME-LI (p mole/g wet wt.)	Preproenkephalin mRNA (% of control)
Striatum	Control	2003 ± 191	655 ± 50	100
	3	1899 ± 296	N.D.	95.1 ± 5.1
	6	1986 ± 314	657 ± 52	90.9 ± 4.3
	12	1847 ± 314	834 ± 85	127.8 ± 5.9
	24	1951 ± 105	885 ± 77*	105.6 ± 6.6
	48	2770 ± 209	N.D.	96.2 ± 5.1
	72	2735 ± 436	855 ± 94	N.D.
Hypothalamus	Control	1141 ± 82	1056 ± 57	100
	3	1207 ± 70	N.D.	115.0 ± 3.6
	6	1145 ± 129	1073 ± 162	140.0 ± 4.6
	12	920 ± 92	934 ± 73	150.2 ± 6.8
	24	1115 ± 150	1131 ± 87	124.5 ± 2.2
	48	1096 ± 139	N.D.	109.0 ± 2.7
	72	1160 ± 150	1333 ± 101	N.D.
Entorhinal Cortex	Control	298 ± 38	329 ± 61	100
	3	383 ± 42	547 ± 85	136.0 ± 4.0
	6	371 ± 73	490 ± 77	253.4 ± 11.0
	12	274 ± 24	418 ± 28	288.2 ± 5.0
	24	397 ± 37	561 ± 106*	256.4 ± 20.8
	48	476 ± 49*	505 ± 75	159.4 ± 10.5
	72	587 ± 68**	831 ± 103**	N.D.

n = 6 for the measurement of native and cryptic ME-LI
Three tissue samples were pooled for the measurement of preproenkephalin mRNA. The experiment was replicated once. ND: Not determined. *P < 0.05, **P < 0.001

< 実験結果 及び 考察 >

海馬より抽出された RNAの northern blot analysisの結果(Fig.1 A)より、KA投与後 preproenkephalin A に対する cDNA とハイブリダイズする同一分子量の mRNA 量が著しく増加しているのが認められた。また 同一 sampleを用いたdot blotより得られたオートラジオグラム(Fig. 1 B)をデンシトメーターで測定し、control値を 100%として、各実験群のパーセントを算出し Fig.2に示した。$mRNA^{enk}$量は KA投与後 3時間で 1.5倍に達し、6時間後でピーク(3.8倍)を示し、以後直線性に減少した。また preproenkephalin A 濃度は 6時間後より増加し始め、24時間目でピーク(3.3倍)を示し、その後やや減少したものの 72時間目でも control群の 3倍の値を示した(Fig.2)。ME濃度は KA投与直後に減少し、15時間より増加に転じ、以後 72時間目まで増加し続けた。線条体や視床下部では KA投与に伴うME合成系の変化は認められなかった(Table 1)。しかし、海馬の歯状回に enkephalinergicな線維を投射している神経の細胞体が存在すると言われている内嗅領野皮質でも海馬とほぼ同様に ME合成系の活性化が認められた(Table 1)。KAを投与されたラットは麻酔から覚醒し始めると同時に wet dog shakes、頻発性痙攣などを生じ 3~5時間目頃にいたり激しい発作をしめすが、その時期に ME濃度が著しく減少すると同時に $mRNA^{enk}$の合成が始まって要ることから、KA投与に伴ない生じる痙攣発作等がトリガーとなり神経細胞からの ME放出が促進され、同時に ME合成系が活発化されるものと思われる。

References; 1)Cupo,A.et al(1984) Neuropeptides 4, 375-387. 2)Hong,J.S.et al(1980) Nature 285, 231-232. 3)Hong,J.S.et al(1980) in Neural Peptides and Neuronal Communication (Costa,E.et al ed.) pp.385-397. Raven,Press,N.Y. 4)Hong,J.S.et al(1985) submit. 5)Kanamatsu,T.et al(1985) Nuroscience in press 6)Liston, D.et al(1984) Science 225, 735-736. 7)Lothman,E.W.et al(1981) Brain Research 218,299-318. 8)Nadler,J.V. (1981) Life Sciences 29, 2031-2042. 9)Sabol,S.L.et al(1983) J.Biol.Chem. 258, 2697-2704.

140. 実験的脳卒中ネコの脳における ^{3}H-EKC binding および Dopamine, GABA-uptake に与える Dynorphin (1-13) の効果

黒田広生・ Y. Hosobuchi*
(岡山大・医・第三内科, UCSF・脳外科*)

〔要　約〕

Stroke および dynorphin (1-13)処置stroked catを使って、EKC bindingおよびdopamine(DA)、GABA uptakeについて比較検討した。stroked catは中大脳動脈結紮にて作製した。EKC bindingでは結紮側大脳皮質のKd値がcontrolに比べ著しい増加を示したが、dynorphin (1-13)処置したものでは虚血による変化は全く認められなかった。DA uptakeでは、非結紮側大脳皮質のKm値、Vmax値が各々有意に減少および増加を示した。dynorphin (1-13)処置で再びこれらの変化は正常化された。さらに結紮側大脳皮質Km値が有意に増加し、非結紮側大脳皮質下領域のKm値はcontrolに比べ有意に減少した。GABA uptakeに関しては全く有意の変化は認められなかった。虚血による上記の変化とdynorphin (1-13)の効果はオピオイドペプチドがレセプターを介して虚血性変化に対し有意の効果を及ぼすとの考えを裏づけるものであった。また、脳内オピオイド系がDAと関連があるという考えから、DA uptakeの変化もオピオイド投与による結果であると考えられた。

Key word : opioid, dopamine uptake, stroke

我々はすでにオピオイドペプチドであるdynorphin (1-13)がstroked catの延命に著しい効果がある事を報告した(1)。一方、dopamine (DA)やGABA uptakeがstrokeと深くかかわりをもっている事も知られている(3)。そこで今回我々は、control、strokeおよびdynorphin (1-13)処置stroked catを使って、EKC(ethylketocyclazocine) bindingおよびDA、GABA uptakeについて比較検討した。

[実験方法]

Stroked Catモデル　O'Brienらの方法(2)に従い、経眼窩的中大脳動脈(MCA)結紮にて作製した。雄猫(3-5kg)を麻酔固定後眼球を摘出(binding study…右、uptake study…左)、lenticulostriate arteryの近位側を凝固切断した。実験猫は各々6時間(uptake study)、および8時間(binding study)後に脳を摘出した。dynorphin (1-13)投与実験では脳摘出1時間前にdynorphin (1-13)(2mg/kg)を腹腔内に投与した。

脳組織分画作製　各々の実験猫の脳(小脳および脳幹は除く)を左右に分け、さらに各々をcortex、subcortexに分けた。各々の部位の脳はまず0°C 0.32M Sucrose-25mM HEPES(pH 7.7)につけ、テフロングラスホモゲナイサーでホモゲナイズし、さらに1,000G,4°Cで10分間遠沈した。Binding studyではその上清を20,000G、4°C、20分間の遠沈を2回繰り返した。得られたペレット(P2)をHEPES-Sucroseでホモゲナイズし−20°Cにて保存した。Uptake studyではその上清を27,000G、4°Cで30分間遠沈してペレット(粗シナプトゾーム分画)をKrebs-Ringer phosphate buffer (KRB)(pH 7.4)にて最終濃度150 mg w.w.tissue/mlとなるようにした。Uptake studyではfreshなこの分画をただちに実験に供した。

Binding Study　飽和実験では0.05から20nMの^{3}H-EKCを15から20pointとって飽和曲線を作製した。試験管にさらにHEPES buffer (25 mM,pH 7.7)、1mg brain membrane

を入れ、shaking water bathにて37°C、30分間インキュベートした後60分間氷水中に入れ、フィルター法(Whatman GF/B)にてB・F分離を行った。Specific bindingはtotal bindingからnon-specific binding (1μM EKC存在下)を引いたものとした。

Uptake Study of Dopamine and GABA　粗シナプトゾーム分画とKRBを含む試験管をまず37°C、10分間インキュベートし、次に放射性リガンドを加えてuptakeをスタートさせた。Dopamine (DA) uptakeでは、各々の試験管に20μl (100μg)シナプトゾーム、880μl KRBと50-600nMのDAを加えた。GABA uptakeでは40μl(200μg)シナプトゾーム、760μl KRB、100μlの10mMβ-alanineと4-64μM GABAを混和した。37°C、10分間のインキュベートの後0.65μm DA Millipore filterにてfiltrationした。Specific uptakeはtotal uptake(37°Cにてインキュベート)からnon-specific uptake(0°Cにてインキュベート)を引いたものとした。

KRBには以下のものが含まれた：118 mM NaCl, 4.7 mM KCl, 32.0 mM sodium phosphate (pH 7.4), 1.8 mM $CaCl_2$, 1.2 mM $MgSO_4$, 5.6 mM glucose, 1.3 mM EDTA, 1.7 mM ascorbic acid, 0.05 mM pargyline.

Table 1 ^{3}H-EKC Binding in Control Cat Brain

	RC	LC	RS	LS
$Bmax_1$ (fmol/mg prot.)	47.7	49.0	42.1	45.0
Kd_1 (nM)	0.30	0.30	1.00	1.01
$Bmax_2$ (fmol/mg prot.)	200	213	205	220
Kd_2 (nM)	13.2	12.0	10.9	9.3

RC=right cortex, N=8; LC=left cortex, N=8; RS=right subcortex, N=4; LS=left subcortex, N=4; Each value represents mean.

Table 2 ^{3}H-EKC Binding in Stroke Cat Brain

	RC	LC	RS	LS
$Bmax_1$ (fmol/mg prot.)	58.5	45.8	49.6	47.7
Kd_1 (nM)	0.58*	0.30	1.00	1.01
$Bmax_2$ (fmol/mg prot.)	313	227	317	250
Kd_2 (nM)	17.7	12.8	10.3	10.6

Right-MCA was ligated. N=12 (cortex); N=6 (subcortex); *p<0.01 (2 tail test) Each values represents mean.

Table 3 ^{3}H-EKC Binding in Stroke Cat Brain Treated with Dynorphin-(1-13)

	RC	LC	RS	LS
$Bmax_1$ (fmol/mg prot.)	48.0	50.2	45.7	53.2
Kd_1 (nM)	0.31	0.31	0.90	0.93
$Bmax_2$ (fmol/mg prot.)	236	236	296	326
Kd_2 (nM)	12.0	12.5	11.6	11.4

Dynorphin-(1-13) (2mg/kg) was injected intraperitoneally one hour before sacrifice. N=6 (cortex); N=4 (subcortex); Each value represents mean.

Table 4 Dopamine and GABA Uptake in Control Cat Brain

DA Uptake	RC	LC	RS	LS
Km (nM)	254	237	317	329
Vmax (pmol/mg prot./10 min)	21.4	21.5	38.1	34.6
GABA Uptake				
Km (μM)	13.2	12.9	12.0	11.5
Vmax (pmol/mg prot./10 min)	1091	993	1967	2100

N=9; Each value represents mean.

Table 5 Dopamine and GABA Uptake in Stroke Cat Brain

DA Uptake	RC	LC	RS	LS
Km (nM)	181**	286	337	293
Vmax (pmol/mg prot./10 min)	26.1*	21.0	33.4	33.3
GABA Uptake				
Km (μM)	11.5	11.4	9.9	9.3
Vmax (pmol/mg prot./10 min)	1059	1043	2344	1932

Left-MCA was ligated. Each value represents mean of 8 cats. (*p<0.05, **p<0.001)

Table 6 Dopamine and GABA Uptake in Dynorphin-(1-13) Treated Stroke Cat Brain

DA Uptake	RC	LC	RS	LS
Km (nM)	246	333*	227	309
Vmax (pmol/mg prot./10 min)	21.9	19.6	37.3	32.3
GABA Uptake				
Km (μM)	11.4	14.2	10.6	11.5
Vmax (pmol/mg prot./10 min)	1260	1106	2334	2215

Left-MCA was ligated. Dynorphin-(1-13) (2mg/kg) was injected intraperitoneally one hour before sacrifice. N=8, *p<0.02

[結果]

^{3}H-EKC Binding　^{3}H-EKC bindingのScatchard plotはcurvilinearでありhighとlowの2つの結合部位を認めた。Control群においてはdissociation constant(Kd)にもmaximum binding capacity (Bmax)にも左右差は全く見られなかった(Table 1)。Stroked cat群ではhigh affinity Kdが非結紮側に比べ結紮側cortexにおいて著しく($p<0.01$)増加していた(Table 2)。他の部位、パラメータには有意差は認められなかっ

た。次に6匹のstroked catについてdynorphin (1-13)(2mg/kg)の腹腔内投与による効果を調べたが、Table 3に示すごとくstroked cat群に認められた有意なKd値の変化は全くなかった。

Dopamine and GABA Uptake　Control群において、DA uptakeはcortex、subcortexとも600 nMのDAにて飽和され、GABA uptakeでは同様に64μM GABAで飽和された。さらに両uptake studyにおいて、有意な左右差はKm、Vmax値とも全く認められなかった（Table 4）。Stroked cat群については、8匹すべてMCA結紮4時間後に典型的なhemiphlegiaを呈した。DA uptakeでは、結紮側に比べ非結紮側cortexのKm値は有意（$p<0.001$）に減少し、Vmax値は有意（$p<0.05$）な増加を示した（Table 5）。結紮側cortexはcontrolに比べても全く有意な変化はなかった。subcortexにおいても全く有意な変化はなかった。GABA uptakeでも全く有意な変化は認められなかった。dynorphin (1-13)処置stroked cat群で、DA uptakeにおいて非結紮側cortexのKm値、Vmax値とも同部位のcontrol群に比べ全く有意差はなかった（Table 6）。一方、結紮側cortexのKm値が非結紮側およびcontrolに比べ有意な増加を示した。さらに非結紮側subcortexのKm値が低下傾向を示した。GABA uptakeについては全く有意な変化はなかった（Table 6）。

［考察］

今回我々は虚血の脳オピオイドレセプターに与える影響について検討した。虚血がどのsubtypeのレセプターに最も影響するか十分解明されていないことから、μ、δ、κ、σの少なくとも4つのsubtypeに結合するEKCをリガンドとして用いた。オピオイド結合に関する唯一の虚血による影響は結紮側cortexのhigh affinity Kd値が2倍ほど増加した点で、さらにdynorphin (1-13)の投与によりこの変化を完全に抑えることができた（table2, 3）。dynorphin (1-13)がstroked catに著しい延命効果を示したこと、および虚血によるEKC結合の変化を抑えたことは、このペプチドがstrokeに対し重要な役割を持っていることを示唆している。虚血による変化が結紮側cortexのhigh affinity Kd値に起こった事は、この変化が代償性のものでなく、虚血による直接的な変化である事を示している。

我々はstrokeに関連した変化をDA uptakeにも認めることができた。この場合にはEKC結合と異なり非結紮側cortexにおいてであり、著しいKm値の減少とVmax値の増加であったこれらの変化は代償性変化と考えられ虚血により機能低下となった皮質側を補うためのものと考えられた。この変化に対してもdynorphin (1-13)は効果を及ぼした結果、結紮側cortexのKm値を結果的に高めることとなった。一方、GABA uptakeでは全く有意の変化を認めなかったことは、DA uptakeが虚血に最も鋭敏に反応するとしたWeinburgerらの考え（3）に一致するものであった。オピオイドと虚血の関係同様、DA uptakeと虚血の関係についてもその関連性について現在の時点で十分に説明することは難しいが、その選択性からみて単にエネルギー利用の減少のみでは説明できないように思われた。以上、中大脳動脈結紮によるstroked catにおいて、オピオイドレセプターおよびDA uptakeに有意の変化が生じ、これをdynorphin (1-13)が抑えることが明らかとなった。これらの結果は実験的、臨床的strokeに対するオピオイドの有意な効果に基礎的根拠を提供するものと考えられた。

[References]　1. Baskin,D. S., Hosobuchi, Y., Loh, H. H., and Lee, N. M. (1984) Nature 312,551-552
2. O'Brien, M. D., and Waltz, A. G. (1973) Stroke 4, 201-206
3. Weinberger, J., and Cohen, G. (1982) J. Neurochem. 38, 963-968

141. ラット性行動調節における Opioid Peptide Leumorphin (Dynorphin B-29) の生理的役割について

須田光明・中尾一和・坂本　誠・森井成人
菅原　照・井村裕夫　（京都大・医・第二内科）

〔要　約〕

Leumorphin は哺乳類の脳・下垂体に存在し、合成 Leumorphin の中枢投与は卵巣摘出 - Estrogen 処置ラットの性行動 (lordosis) を促進する。性行動調節における Leumorphin の生理的役割を明らかにするため、性周期中のラット脳・下垂体における Leumorphin 様免疫活性 (ir LM) を測定した。性周期中 ir LM の有意な ($P < 0.05$) 変動が視床下部と下垂体前葉に限り認められた。両組織における ir LM は発情前期で最も高値を呈し、発情期・発情後期よりも有意に ($P < 0.01$) 高値を呈した。視床下部の ir LM が発情前期の午後高値であることは、性周期中発情前期の午後 lordosis が亢進する現象と一致していた。更に、同時に測定した Dynorphin様免疫活性 (ir Dyn) も ir LM と全く同様の変動パターンを示し、Leumorphin と Dynorphinが共通前駆体に由来するとの報告に合致していた。海馬・下垂体中後葉における ir LM と ir Dynは性周期中有意な変動を示さなかった。Leumorphin の radioimmunoassay は Rimorphin [Leumorphin (1-13)] を tracer としているため、Rimorphin をモル比でブタ Leumorphin の1.78倍認識する。発情前期と発情期に得た視床下部抽出物を高速ゲル濾過で分析すると、Leumorphin の溶出位置に一致する ir LM のピークは total ir Leumorphinの変動と同様な変化を示した。これらの結果は外因性 Leumorphin の性行動促進効果と ventromedial hypothalamusにおける ir LM の局在と合わせ考えると Leumorphin(κ agonist) 含有 neuron 系はβ- Endorphin(μ and/or δ agonist) 含有系と逆に、性周期中 lordosis に促進的な役割を担うと考えられた。

Key word： Opioid Peptide, Leumorphin, Sexual Behavior

〔目　的〕

哺乳類の中枢神経系には３つの Opioid Neuronal System が存在する (β- Endorphin 系, Enkephalin系, Dynorphin 系) (13)。Leumorphin は Dynorphin系で産生される Preproenkephalin B (Prodynorphin)に由来する opioid peptide で (2)，既に私達は Leumorphin が哺乳類の脳・下垂体に存在し、in vitro・in vivo でモルヒネ様生物活性を有し、κ type opioid receptor に結合することを報告した (5, 9 - 12)。最近、佐久間らは合成ブタ Leumorphin の中枢投与は雌ラットに lordosis を惹起することを見い出した。私達は性行動調節における Leumorphin の生理的役割を明らかにするため性周期中のラット脳・下垂体における Leumorphin 様免疫活性 (ir LM) を測定した。

〔方　法〕

ＳＤラットの性周期を２周期の間、鏡検した後、第３周期目の発情間期・発情前期・発情期・発情後期に視床下部・海馬・下垂体前葉・下垂体中後葉を摘出した。これらの組織は１０倍容の 0.1M HCl/MeOH (50:50, vol/vol) の中で抽出し、抽出液中の ir LM と ir Dynorphin (ir Dyn)を radioimmunoassay (RIA) で測定した。RIA ・高速ゲル濾過 (HP-GPC) は既に報告した方法に従った (9, 6)。

〔結　果〕

Total ir Leumorphin

視床下部・海馬・下垂体前葉・下垂体中後葉のうち下垂体中後葉で最も高濃度の ir LM が検出された（図１）。これらの組織のうち一元配置の分散分析を行なって性周期中有意な ($P < 0.05$) 変動を示した組織は視床下部と下垂体前葉に限られていた。図２は両組織の性周期各期における ir LM の平均値±S.E.M.と個体数を示している（黒い棒グラフ）。各期の値を Duncan's multiple range test で比較すると、視床下部の ir LM は発情前期(131.6±9.0 pmol/g) で最も高値で、発情期 (82.5±17.7 pmol/g)・発情後期 (70.2±18.1 pmol/g)に比べて有意に ($P < 0.01$) 高値を呈した。発情前期 vs.発情間期 (101.0 ±19.7 pmol/g)、発情期 vs.発情後期、発情期 vs.発情間期、発情後期 vs.発情間期では有意差はなかった。下垂体前葉の ir LM の変動も視床下部の場合と同様の変動パターンであった（図２下段）。

視床下部抽出物の高速ゲル濾過パターン

Leumorphin - RIA は Rimorphin [Leumorphin (1-13)]を tracer としているため Rimorphinをモル比で Leumorphin の

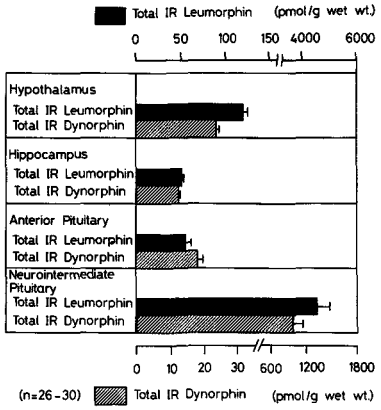


図1 ラット脳・下垂体の Leu - morphin 様免疫活性と Dynorphin 様免疫活性

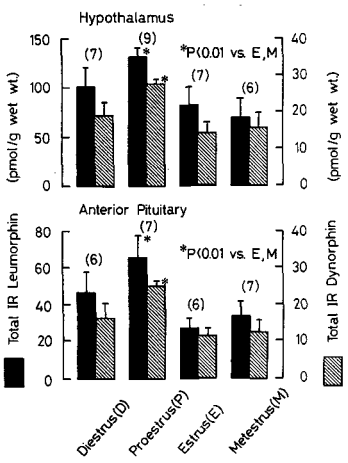


図2 ラット視床下部・下垂体前葉における Leumorphin 様免疫活性と Dynorphin様免疫活性の性周期にともなう変動

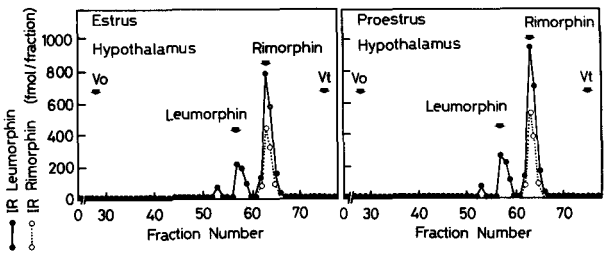


図3 視床下部抽出物の高速ゲル濾過パターン

1.78倍認識する。発情前期と発情期に得た視床下部抽出物を高速ゲル濾過で分析すると３つの ir LM のピークが認められ、各々 void volume側から順番に 6,000 dalton の calibrationの位置、合成ブタ Leumorphin の溶出位置、 Rimorphinの溶出位置に一致していた（図３）。図３では発情期（左）と発情前期（右）を比較するため、n＝７の視床下部抽出物から各々５０μl ずつを取り pool した物を高速ゲル濾過にて分析した形で表現してある。 Leumorphin の溶出部位のピークは total ir LM の場合と同様に発情前期 (30.2 pmol/g)は発情期 (24.2 pmol/g)より高値であった。

Ir Dynorphin レベル

脳・下垂体において ir Dyn は ir LM と平行して分布し（図１）、total ir LM と同様に視床下部と下垂体前葉に限り性周期中有意な (P <0.05) 変動を認めた（図２）。両組織共に発情前期は発情期・発情後期より有意に (P <0.01) 高値を呈した（図２）。また、視床下部・下垂体前葉における ir LM と ir Dyn の性周期中の変動には有意な (P < 0.001) 正の

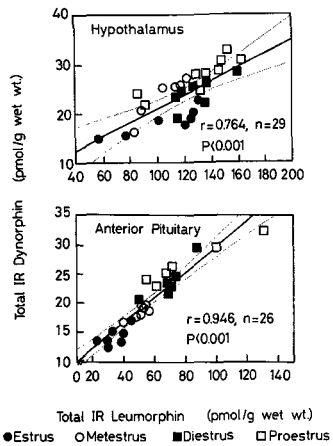


図4 性周期に認められる Leumorphin様免疫活性の変動とDynorphin 様免疫活性の変動との関係

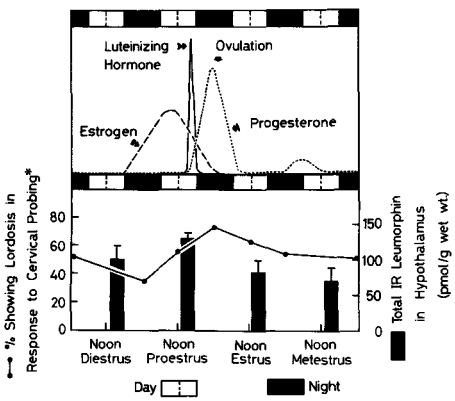


図5 雌ラットの性周期中に繰り返される一連の変化の模式図

相関が認められた（図4）。視床下部における相関係数（r = 0.764)と下垂体前葉における相関係数（r = 0.946)には有意な（P <0.01）差が認められた。

〔考　察〕

雌ラット視床下部の ir LM は性周期中に変動し、発情前期で最も高値を呈することが明らかになった。Ir Dyn も同様な変動パターンを呈し、ir LM と正の相関を示したことは Leumorphin と Dynorphinが共通前駆体に由来するとの報告(2) に合致していた。視床下部（特に、 ventromedial hypothalamus）(VMH) は lordosis を制御する神経回路の重要な構成単位と考えられている (7)。図5は上段にラット性周期中に繰り返される一連の血清ホルモン・レベルの変動と排卵の時期を、下段に子宮頸部の probingに対する lordosis 応答率の変化（折線グラフ）(3) と視床下部おける ir LM の変動（棒グラフ）を示している。 lordosis 応答率は血清 Estrogen ピークに遅れて発情前期の午後2時頃より上昇し始め深夜前後に最高となる。視床下部の ir LM は lordosis 応答率の変化と平行して変動し、共に発情前期に最も高値を呈している。以上の結果は、pmol dose の合成ブタ Leumorphin の脳室内投与が卵巣摘出 - Estrogen 処置ラットに lordosis を惹起すること、VMHに ir LMが組織化学的に局在することと合わせ考えると視床下部の Leumorphin 含有 neuron 系は性周期中 lordosis に促進的な役割を担うと考えられる。

β- Endorphin は Leumorphin とは逆に、中枢投与で lordosis を抑制する (8)。視床下部の ir β- Endorphin は性周期中 ir LM と類似の変動を示し、VMHにも局在する (1)。雄の性行動に対しても同様で、 Leumorphin の中枢投与は麻酔下ラットに射精を惹起するのに対して（東条ら）、β- Endorphin は意識下雄ラットの性行動を抑制する (4)。 Leumorphin と β- Endorphin の性行動に及ぼす効果は specific opioid antagonist である naloxone によっていずれも拮抗されるので、opioid receptor を介していると解される。 Leumorphin はκ type opioid receptor に結合するのに対し (11)、β- Endorphin はμ and/or δ receptor に結合する。従って、雌および雄ラットの性行動調節に、異なる中枢性 opioid receptor type が相反する効果を仲介している可能性が示唆される。

〔結　論〕

性周期中のラットにおいて、視床下部の Opioid Neuronal System のうちβ- Endorphin 含有系は lordosis に対して抑制的な役割を担っているのに対し、 Leumorphin 含有系は lordosis に促進的な役割を担っていると考えられる。

〔文　献〕

1. Barden, N., Merand, Y., Rouleau, D., Garon, M. and Dupont, A., Changes in the beta-endorphin content of discrete hypothalamic nuclei during the estrous cycle of the rat, Brain Research, 204 (1980) 441-445.
2. Horikawa, S., Takai, T., Toyosato, M., Takahashi, H, Noda, M., Kakidani, H., Kubo, T., Hirose, T., Inayama, S, Hayashida, H., Miyata, T. and Numa, S., Isolation and structural organization of the human preproenkephalin B gene, Nature (Lond.), 306 (1983) 611-614.
3. Komisaruk, B.R. and Diakow, C., Lordosis reflex intensity in rats in relation to the estrous cycle, ovariectomy, estrogen administration and mating behavior, Endocrinology, 93 (1973) 548-557.
4. Meyerson, B. and Terenius, L., β-Endorphin and male sexual behavior, Europ. J. Phrmacol., 42 (1977) 191-192.
5. Nakao, K., Suda, M., Sakamoto, M., Yoshimasa, T., Morii ,N., Ikeda, Y., Yanaihara, C., Yanaihara, N., Numa, S. and Imura, H., Leumorphin is a novel endogenous opioid peptide derived from prepro-enkephalin B, Biochem. biophys. Res. Commun., 117 (1983) 695-701.
6. Nakao, K., Yoshimasa, T., Oki, S., Tanaka, I., Nakai, Y, Wakimasu, M., Fujino, M. and Imura, H., Presence of dynorphin-like immunoreactivity in rat pituitary gland and hypothalamus, Regul. Peptieds 2 (1981) 201-208.
7. Pfaff, D.W., Estrogens and Brain Function, Springer- Verlag, New York, 1980, 281 pp.
8. Sirinathsinghji, D.J.S., Whittington, P.E., Audsley, A. and Fraser, H.M., β-Endorphin regulates lordosis in female rats by modulating LH-RH release, Nature (Lond.), 301 (1983) 62-64.
9. Suda, M., Nakao, K., Sakamoto, M.,.Yoshimasa, T., Morii , N., Yanaihara, N., Numa, S. and Imura, H., Leumorphin is a novel endogenous opioid peptide in man, Biochem. biophys. Res. Comm., 123 (1984) 148-155.
10. Suda, M., Nakao, K., Sakamoto, M., Yoshimasa, T., Morii , N., Yanaihara, N., Numa, S. and Imura, H., Leumorphin in human brain, Neuropeptides, 5 (1985) 461-464.
11. Suda, M., Nakao, K., Yoshimasa, T., Ikeda, Y., Sakamoto, M., Yanaihara, N., Numa, S. and Imura, H., A novel opioid peptide, leumorphin, acts as an agonist at the κ opiate receptor, Life Sci., 32 (1983) 2769-2775.
12. Suda, M., Nakao, K., Yoshimasa, T., Ikeda, Y., Sakamoto , M., Yanaihara, C., Yanaihara, N. Numa, S. and Imura, H., Comparison of the action of putative endogenous κ- agonist, leumorphin and rimorphin in vitro, Life Sci., 33 (1983) 275-278.
13. Watson, S.J., Khachaturian, H., Akil, H., Coy, D.H and Goldstein, A., Comparison of the ditribution of dynorphin systems and enkephalin systems in brain, Science, 218 (1982) 1134-1136.

142. Kyotorphin (Tyr-Arg) の神経終末への取り込みと放出機構について

植田弘師・高木博司　　(京都大・薬・薬理)

〔要　約〕

ウシ脳組織より見出したオピオイド鎮痛活性ジペプチド、kyotorphin (Tyr-Arg) の神経終末への取込み能及び脱分極刺激による放出作用について調べた。神経終末への kyotorphin の取込み実験には、ラット全脳の粗シナプトゾーム (P_2) 画分を用い、合成 kyotorphin を分解酵素阻害剤 bestatin 10^{-4}M 存在下でインキュベートする方法により行った。Kyotorphin の定量には、kyotorphin に対する特異的な抗体を用いたラジオイムノアッセイによった。Kyotorphin は37℃、インキュベート時間0-6 分間の範囲内で時間依存性に直線的に取りこまれた。また、この取込みは、用量依存性であり、k_m 値は $1.31 \pm 0.12 \times 10^{-4}$M、V max は5.9 ± 0.5 pmol/mg protein/min であった。さらにこの kyotorphin 取込みは温度、Na^+イオン，エネルギー依存性であった。次に P_2画分に kyotorphin を 10^{-4}M で取込ませ、洗浄を繰り返した後、高カリウム液に懸濁したところ、正常メジウムに比べ有意に kyotorphin 放出が増大していた。さらにこの脱分極による kyotorphin 放出は外液 Ca^{2+}イオン非存在下では認められなかった。

Key word :　Kyotorphin, Uptake, Release.

Kyotorphin (Tyr-Arg) はウシ脳組織よりオピオイド性鎮痛作用を有する物質として抽出、同定されたニューロペプチドである[4]。薬理学的には、kyotorphin は脳内エンケファリンの放出を促進して鎮痛効果を生ずるという結果を得ている[2~4]。一方　生理学的には以下の様な知見が得られている。1) Kyotorphin は脳内で不均一な分布を示し[5]細胞分画法によると、シナプトゾーム画分に高濃度認められる[6] 2) Kyotorphin は脳内で急速に膜結合性アミノペプチダーゼにより分解され、bestatin により特異的に阻害される。[7] 3) Bestatin 存在下で脳組織をインキュベートすると、kyotorphin は蓄積し、シナプトゾーム分画で特に顕著であることから、kyotorphin 生合成は、神経終末で行われうる[8]。そこで、kyotorphin の神経系における生理作用をさらに研究するため、その神経終末への取込みと脱分極刺激による放出機構について調べた。また、kyotorphin に対する抗体を作成し、ラジオイムノアッセイ法を確立したので合せて報告する。

実験方法

1、Kyotorphin の定量法

1-1 Kyotorphin 抗体の作成：Kyotorphin 15 mg とウシ血清アルブミン 60 mg とを Steinbusch et al. (1978)[3]の報告に従い、ホルムアルデヒド法により結合させ、抗原としウサギから抗血清を得た。抗体価は21 週で最高に達し、25 週で採血した。希釈倍率は600 倍であった。

1-2 Kyotorphin のラジオイムノアッセイ (RIA)：試料 100μl、^{125}I-kyotorphin 100μl、抗体 100μl (すべて、0.15 M NaCl, 0.01 % merthiorate を含む 0.06 M ホウ酸緩衝液 pH 8.0 に溶解) を混合し、4°C 一夜インキュベートし、500μl の30% ポリエチレングリコール 6000 と 100μl の 1% γ-グロブリンにより B/F 分離を行った。RIA での kyotorphin の検出限界は 20 fmol, IC 50 値は 200 fmol であった。各種

類似ジペプチドの交叉反応性は表 1 に示した。

1-3 脳組織及びメジウムからの kyotorphin の抽出： 脳組織を0.4 % トリフルオロ酢酸（TFA）中あるいは 0.1 N HCl で煮沸し、ホモジナイズ後，遠心分離し、上清を SepPak C-18 （あらかじめ 0.4 % TFA 5 ml で洗浄後，50 % CH_3CN で溶出させ、エバポレートし、高速液体クロマトグラフィー（HPLC: Cosmosil $5C_{18}$,4 % CH_3CN/0.1 % TFA, 流速 1 ml/min, 保持時間 6.0 分）にて分離後 RIA したところ、0.4 % TFA 或いは 0.1 N HCl 抽出液の kyotorphin 様免疫活性の 90 % 以上が回収されたので、各実験では簡便に 0.1 N HCl 抽出物そのままを RIA した。 一方、放出実験の場合、メジウムに TFA を加え、0.4 % の TFA 濃度にした後、SepPak で分離し、RIA した。

2、Kyotorphin の神経終末への取込み及び放出実験

2-1 神経終末標本の作成： ラット全脳を 0.32 M Sucrose 10 倍量でホモジナイズし、1,000 x g 10 分間の遠心ペレット（P_1）を除き、12,000 x g 20 分間の遠心ペレット（P_2）を 使用した。この粗シナプトゾーム画分は Krebs-HEPES メジウム（KH メジウム；145 mM NaCl, 5 mM KCl, 1 mM Na_2HPO_3, 5 mM glucose, 1 mM $CaCl_2$, 10 mM HEPES, pH 7.4）で洗浄し、同メジウムで再懸濁 （3 mg protein/ml）した。

2-2 取込み実験：上記粗シナプトゾーム標品を 400 µl とり、bestatin 10^{-4} M と各濃度の合成 kyotorphin を加え 1 ml とし、37°C で10 分間プレインキュベートした後、37°C 或いは 0°C で取込み実験を行った。反応は 0°C KH メジウム 3 ml を加え、すばやく遠心（20.000 x g, 10 分） することにより洗浄を行った。

2-3 放出実験： 取込み実験で述べたのと同じ方法で kyotorphin、高カリウム（NaCl と置換）メジウム，高カリウム-Ca^{2+}free メジウムでそれぞれ洗浄後、同液 1 ml（10^{-4} M bestatin を含む）で懸濁し、15 分間インキュベートした。反応停止は、0°C normal KH メジウム 3 ml を加え、すばやくガラス繊維ろ紙（Whatman GF/C)で 吸引ろ過した。

表 1

Cross reactivities of kyotorphin antibody with kyotorphin analogs

Compounds	Cross reactivity (%)
Tyr-Arg	100
Tyr-Lys	2.08
Tyr-D-Arg	0.43
D-Tyr-Arg	0.33
Arg-Tyr	0.001
Tyr-Tyr	0.001
Cyclo-kyotorphin	0.001
Tyr	0.001
Arg	0.001

図 - 1

Kinetics of kyotorphin uptake into P_2 fraction

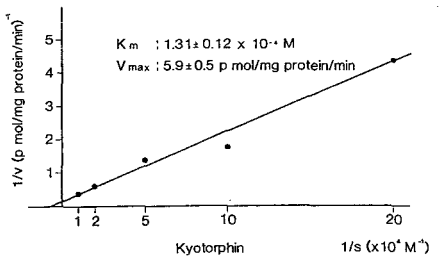


図 - 2

Effects of various metabolic inhibitors on kyotorphin uptake

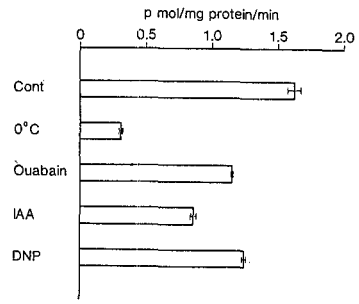
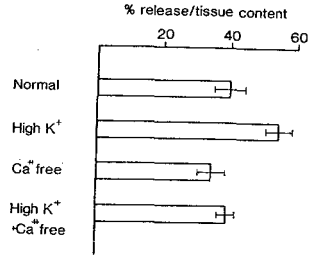


図 - 3

Release of kyotorphin from P_2 fraction



実験成績と考察

Kyotorphin 10^{-4}M による取込み能は37°C にて、0-6 分間の範囲内で直線的であった。そこで，37°C 4 分間という条件でその kinetics を求めた。図-1 に示した様に、K_m値は、1.31 ± 0.12 x 10^{-4}M , V_{max} 5.9 ± 0.5 pmol/mg protein/min であった。この取込み能は、0°C インキュベート、ouabain、或いは代謝阻害薬の dinitrophenol、iodoacetamide の各 1 mM と37°C インキュベートすることにより有意に阻害された（図-2）ことから、この取込み機構は、多くのモノアミン系及びアミノ酸系の神経伝達物質で認められた取込み機構と一致する。また一般にペプチド系の伝達物質は神経終末に取込まれないと考えられていること[1]から，　ジペプチド、kyotorphin の取込み機構は注目に値する。

あらかじめシナプトゾーム標品に kyotorphin を取込ませた後、脱分極刺激をすると有意に放出量が増加した。また、この放出促進作用は、外液　Ca^{2+}イオンの非存在下において認められなかった（図－３）。このことから、kyotorphin はエキソサイトーシス様の機構により放出されることが示唆された。

以上の知見と、これまでの知見とから、kyotorphin 神経伝達物質同定の条件における神経終末での生合成、貯蔵、放出、不活性化などを満たすことになり、残された受容体反応などが今後の研究課題となる。

最後に本実験に協力していただいた、福山大学薬学部、塩見浩人教授，京都大学薬学部、吉原良浩、福島伸之、松本純枝　各氏に謝意を表します。

1) Hökfelt T., Johansson O., Ljungdahl A., Lundberg J.M. and Schultzberg M., (1980) Nature, 284 515-521

2) Shiomi H., Kuraishi Y., Ueda H., Harada Y., Amano H. and Takagi H. (1981), Brain Res., 221 161-169

3) Steinbusch H.W.M., Vehhofstad A.A. and Joosten H.W.J. (1978) Neurosci., 3 811-819

4) Takagi H., Shiomi H., Ueda H. and Amano H. (1979) Nature, 282 410-412

5) Ueda H., Shiomi H. and Takagi H. (1980) Brain Res., 198 460-464

6) Ueda H., Tatsumi K., Shiomi H. and Takagi H. (1982) Brain Res., 231 222-224

7) Ueda H., Ge M., Hazato T., Katayama T. and Takagi H. (1985) Life Sci. 36 1865-1871

8) Ueda H., Yoshihara Y., Nakamura A., Shiomi H., Satoh M. and Takagi H. (1985) Neuropeptides, 5 525-528

143. ラット脳内神経ペプチドに及ぼす Ketamine の影響

小野　剛・小川紀雄・広瀬由起子・梶田三郎*
（岡山大・医・脳研，神経精神*）

〔要　約〕

Ketamineを腹腔内投与（100mg/kg）すると、ラット脳内の神経ペプチドの濃度が様々に変化し、各神経ペプチドによってその変化が現れる脳部位に差異がみられることを見出した。Ketamine注射によってdynorphinは前頭葉では増加するが、逆に中隔では減少した。somatostatin（SRIF），cholecystokinin-octapeptide（CCK-8），substance-P（SP）は脳のいろいろな部位でいずれも減少し、その減少部位は各神経ペプチドによって異なっていた。ところが、thyrotropin releasing hormone（TRH）のみは、脳のどの部位でも対照群と比較して有意差はみられなかった。

Ketamineの麻酔作用機序に関して、様々な古典的神経伝達物質が関与していることがわかっているが、従来から知られているモノアミン、コリン、GABA系のみならず、神経ペプチド系もかかわっている可能性があり、今後はketamineの作用機序を考える上で、神経ペプチドとともにその受容体結合もあわせて研究していく必要があろう。

Key word： Ketamine, Neuropeptides, Brain regions

［はじめに］

Dynorphn（1-17），somatostatin（SRIF），cholecystokinin-octapeptide（CCK-8），substance-P（SP），thyrotropin releasing hormone（TRH）のような神経ペプチドは、脳内各部位によって異なった濃度で存在し（2，7，14），中枢神経系において神経伝達物質あるいは神経修飾物質として作用していると考えられる（6，8，13，20）．しかし、麻酔薬の脳内神経ペプチドに及ぼす影響についてはまだほとんど明らかでない。

Ketamineは静注可能な全身麻酔薬として、広く臨床で使われているが、barbiturateや他の麻酔薬とは多くの点で異なり、特異的な副作用として精神興奮性、幻覚を生じる（4，15）．ketamineはモノアミン系、コリン系、GABA系ニューロン機構に関与して（9，11，14）、その効果を発現することが示唆されているが、神経ペプチド系に対する作用は明らかにされていない。

上述の神経ペプチドもketamineの神経薬理学的作用に関与している可能性が考えられるので、今回私達はketamineのラット脳内神経ペプチドに対する影響を検討した。

［方法］

6匹のSprague-Dawley系雄ラット（180-220g）にketamine（100mg/kg）を腹腔内注射し、30分後に断頭屠殺した。脳をすみやかに取り出し、Glowinski and Iversenの方法（5）で7部位に分割した。他の6匹のラットには生理的食塩水0.2ml腹腔内投与し、これを対照群として用いた。

各脳部位は、塩酸エタノールにより神経ペプチドを抽出し(20)、各神経ペプチドをradioimmunoassay(RIA)によって濃度測定した。詳細は以前報告した方法によった(16,17).従ってすべての測定値は各々のpeptide-immunoactivity(LI)と称すべきであるが、以下では簡単のためにLIを省略する。

[結果]

結果を表1に示す。Ketamineの注射は前頭葉におけるdynorphin濃度を有意($p<0.01$)に上昇させ、一方、中隔では著明($p<0.01$)に減少させることがわかった。しかしながら、他の5部位では有意差はみられなかった。前頭葉の抽出物のSephadex G-25を用いたゲル濾過パターンは対照群とketamine注射群との間に差異はみられなかった。SRIFは、前頭葉、被殻、視床および中脳、後脳の4部位で有意($p<0.01$)に減少するが、他の3部位には変化がなかった。CCK-8も、被殻、海馬(それぞれ$p<0.01$),後脳($p<0.05$)では対照群と比べて低下していたが、残りの部位は変わりなかった。SP濃度は7部位のうち前頭葉のみ減少($p<0.01$)がみられた。TRHは対照群と比較してどの部位にも有意差はなかった。

[考按]

Ketamineはdynorphinの濃度を前頭葉では増加させ、中隔では逆に減少させる。TRHを除いて神経ペプチドはいずれもketamine注射によって減少するが、各神経ペプチドの減少する脳部位はそれぞれ異なっていた。

Walkerら(23)が、dynorphin(1-17)を脳室内に投与すると痙攣や、脳波上皮質でspike dischargeが、海馬ではその抑制がみられると報告したが、ketamineによって誘発されるspike discharge(3,10)の原因の一部は、ketamineによるdynorphin作動性ニューロン系の活性の増大にあるのだろう。また、中隔は大脳辺縁系の1つである海馬と線維連絡があることが知られているので、ketanmineの中隔におけるdynorphin作動性ニューロン系の抑制は2次的に海馬に興奮性をもたらしている可能性が考えられる。

Table 1 Effects of Pretreated Ketamine on Dynorphin,SRIF,CCK-8,SP and TRH in Discrete Regions of Rat Brain

Region		Dynorphin	SRIF	CCK-8	SP	TRH
Frontal cortex	(C)	4.4±0.2	1248.3± 17.2	4294.4± 72.1	44.5± 3.0	29.6± 1.0
	(K)	5.2±0.1*	966.7± 58.6**	4000.2±174.7	32.6± 2.2*	30.2± 2.1
Septum	(C)	21.9±1.9	3211.7±191.3	1786.2±217.1	108.0± 3.2	242.9± 4.5
	(K)	14.6±0.6*	2945.0±168.9	2247.5± 89.9	108.5± 2.8	281.0±18.1
Striatum	(C)	5.3±0.1	761.7± 45.9	2839.0±101.6	143.0± 6.5	40.2± 1.9
	(K)	5.4±0.2	531.7± 48.0**	2416.0± 74.7**	128.5±11.1	41.4± 1.6
Hypothalamus	(C)	7.6±0.3	2210.0± 66.7	523.4± 32.6	293.6±14.4	988.9± 8.4
	(K)	7.3±0.2	1903.3±124.7	566.5± 47.0	304.8±18.1	965.1±46.8
Thalamus+midbrain	(C)	3.1±0.1	1033.3± 27.5	1163.9± 66.9	299.8±23.4	127.5± 8.4
	(K)	3.4±0.2	745.0± 37.7**	1036.5± 47.6	257.3±14.4	104.8± 6.5
Hippocampus	(C)	4.9±0.4	1126.7±155.5	3080.0±113.4	12.0± 0.8	20.3± 1.6
	(K)	4.9±0.2	875.0± 72.0	2465.1± 63.5**	11.7± 1.0	17.4± 1.9
Hindbrain	(C)	3.7±0.1	1070.0± 38.7	71.2± 4.7	217.7±13.0	164.8± 3.5
	(K)	3.7±0.1	746.7± 17.6**	49.6± 5.3*	219.7±10.7	172.3± 8.4

(C) presents control group and (K) ketamine-treated group.
The data (except dynorphin) are shown as mean±S.E.M.(pg/mg protein) of 6 rats in each group. Dynorphin as mean±S.E.M.(ng/mg protein).
*$p<0.05$, **$p<0.01$ (one-way ANOVA)

TRHを除く他の神経ペプチドがketamine投与によって減少する理由は明らかではないが、中枢神経系の神経伝達物質あるいは神経修飾物質の役割を演じている(6,7,13,18)ことを考えるとketamineの麻酔作用発現にこれらの神経ペプチドが関与している可能性は十分考えられる。

CCK-8の皮下注射はマウスのピクロトキシン誘発痙攣に対して拮抗作用を示す(24)が、CCK-8のこの性質は脳内の恒常性の維持に重要で、海馬におけるCCK-8の減少はketamineの興奮性発現のメカニズムに寄与している可能性がある。SRIFは、行動や神経活動に対して抑制的にあるいは興奮的に作用する(1,21,22)という報告が様々あるが、本実験結果との関連については今後の詳しい検討が必要であろう。前頭葉へのSP作動性ニューロンは中脳の脚間核から投射されていることがわかっている(19)のでSPの前頭葉における減少は、ketamineの中脳レベルにおけるSP作動性ニューロンを抑制していると理解される。

従来、ketamineはモノアミン系、コリン系、GABA系ニューロン機構によって中枢神経系に影響を及ぼし(9,11,12),これによって神経薬理学的作用を発揮すると考えられていた。今回、私達の研究によってketamine投与により脳内各神経ペプチドの増減がみられ、ketamineの麻酔作用に何らかの役割を担っている可能性が示唆された。したがって、今後ketamineの作用機序を明らかにしていくためには、神経ペプチドをその受容体結合とともに測定していく必要があろう。

[文献]

1. Chihara,K.,Arimura,A.,Chihara,M.,and Schlly,A.V.(1978)Endocrinology,103,912-916
2. Cooper,P.,Fernstrom,M.H.,Rorstad,O.P.,Leeman,S.E.,and MartinJ.B.(1981)Brain Res., 218,219-232
3. Domino,E.F.Chodoff,P.,and Corssen,G.(1965)Clin.Pharmacol.Ther.,6,279-291
4. Dye,D.J.and Taberner,P.V.(1975)J.Neurochem.,24,997-1001
5. Glowinski,J.,and Iversen,L.L.(1966)J.Neurochem.13,665-669
6. Reichlin,S.(1982)in Brain Peptides(Krieger,D.T.,Brownstein,M.,and Martin,J.B.eds.) pp.712-752 John Wiley New York
7. Jackson,I.M.D.,and Reichlin,S.(1979)in Central nervous system effects of hypothalamic hormones and other peptides(Collu,R.,Barbeau,A.,DucharmeJ.R., Rochefort,J.G.eds.)pp.3-54 Raven Press New York
8. Jackson,I.M.D.(1982)N.Eng.J.Med.,306,145-155
9. Kari,H.P.,Davidson,P.P.,Kohl,H.H.and Kochhar,M.M.(1978)Res.Commun.Chem.Pathol. Pharmacol.,20,475-488
10. Kayama,Y.,and Iwama,K.(1972)Anesthesiology,36,316-328
11. Krishanan,H.,Baquer,N.Z.,and Singh,R.(1981)Neuropharmacology,20,567-574
12. Leeuwin,R.S.,van der Wal,J.K.,and Spanjer,W.(1984)Br.J.Pharmac.,82,339-347
13. Loonen,J.M.,and Soudijn,W.(1979)J.Physiol.(Paris)75,831-850
14. Loren,I.,Alumets,R.,Hakanson,R.,and Sundler,F.(1979)Histochemistry,59,249-257
15. Myslobodsky,M.,Ackerman,R.F.,Mansour,R.,and Golovchinsky,V.(1979)Brain Res., 172,191-195
16. Ogawa,N.,Thompson,T.,Friesen,H.G.,Martin,J.B.,and Brazeau,P.(1977)J.Biochem., 165,269-277
17. Ogawa,N.,Hirose,Y.,and Nomura,M.(in press)in Neurotransmitters in Disease (Yoshida,H.ed.)Excerpta Medica Amsterdam
18. Parnow,B.(1983)Pharmacol.Rev.,35,85-141
19. Paxinos,G.,Emson,P.,and Cuello,A.C.(1978)Neurosci.Lett.,7,127-131
20. Pogdhana,K.,Ogawa,N.,Hirose,Y.,Ohara,S.,Kosaka,f.,and Tachibana,S.Neurochem. (in press)
21. Segal,D.S.,and Mandell,A.J.(1974)in the thyroid axis drugs and behavior (Prange,A.J.ed.)pp.129-133 Raven Press New York
22. Tartara,A.,Maurelli,M.,and Savoldi,F.(1984)Regul.Peptides,9,77-86
23. Walker,J.M.,Moises,H.C.,Coy,D.H.,Young,E.A.,Watson,S.J.,and Akil.(1982)Life Sci., 31,1821-1824
24. Zelter,G.(1980)Eur.J.Pharmacol.,65,297-300

144. activity stress 負荷時のラット脳内 CRF 様免疫活性について

鈴木孝尚・池田淑夫・伊島正次・藤木嘉明
坂井田四郎・中尾一和*・中澤恒幸
(藤田学園保衛大・医・精神神経, 京都大・医・第二内科*)

〔要　約〕

rat CRF に対する高感度の radioimmunoassay を用いて、いわゆる activity stressを負荷したラットの視床下部、線条体、大脳皮質および小脳の CRF様免疫活性の変化を測定した。視床下部と線条体の CRF様免疫活性は activity stress を負荷した群(AS群)で control群(AC群)に比して有意に低下していたが、大脳皮質および小脳では両群間に有意な差は認められなかった。 CRF様免疫活性に変化のあった視床下部と線条体について、その組織抽出物をゲルろ過して、 CRF様免疫活性の溶出パターンを検討すると、視床下部では、AC群に認められた void volume に少し遅れたピークが、AS群では消失し authentic CRFと考えられるピークのみ認められた。線条体ではAC群、AS群、両者の CRF様免疫活性の溶出パターンには違いが認められなかった。これらから、我々が既に報告した、大分子型の CRF様免疫活性が authentic CRFと何らかの関わりを持つことを支持していると考えられる。また、線条体での CRF様免疫活性の変化は、視床下部以外に CRFが存在することと共に、 CRFが視床下部ホルモン以外の生理的機能を有している可能性を示唆していると思われる。

Key word : CRF 、activity stress paradigm 、extrahypothalamic action .

我々は CRFの精神神経機能との関連を検索する目的で、合成 rat CRFおよび合成 ovine CRF を用いて、高感度の radioimmunoassay を確立し、脳内の CRF様免疫活性の分布や、その存在様式について報告してきた(11,12) 。すなわち、諸家の報告の如く(3,4,5) CRF様免疫活性は視床下部のみならず脳内に広範に分布すること、更に大分子型の CRF様免疫活性が脳内に分布している可能性を指摘した。今回、この大分子型の CRF様免疫活性と authentic CRFとの関係を明らかにする一手段として、ラットに、いわゆる activity stressを加え、視床下部、線条体、大脳皮質および小脳における CRF様免疫活性の変化について検討した。

［ 実験方法 ］

対象　第５週令の Wistar 系雄性ラットを用い、実験開始前１週間を食餌および水が自由に摂取可能なホームケージで、12時間周期の明暗サイクルのもとで飼育した。

activity stress の負荷　坂井田らの方法(8) と同様の手続きで行なった。すなわち、ラットは飼育カゴと回転カゴからなる activity cageに入れられ、１日１時間のみの摂食を行った群(AS)群と摂食制限を行なわず自由に摂食飲水が可能な群(AC)群とに分けられた。両群は12時間周期(午前６時～午後６時　明期) の明暗サイクルのもとで飼育し、AS群では午前10時より１時間のみ餌が与えられた。体重および餌の摂取量の測定は午前11時に行なった。AS群、AC群のラットは、第８実験日午前11時に断頭および開腹され、組織抽出および胃潰瘍の同定に用いられた。

組織抽出法　断頭後得られたラットの脳は、直ちに氷上にて Glowinski法に準じて視床下部、線条体、大脳皮質 (前部) および小脳が取り出され、秤量後、10倍量の

合成 ovine CRF、^{125}I-[tyr]^{0}-rat CRF、blue dextran、^{125}I で calibrationした。

〔 結果と考察 〕

activity stress 負荷後の回転カゴの回転数、体重、食餌量の変化　第３～４実験日より、回転数は著名に増加し、第６～７実験日に、回転数がピークに達した後、第８実験日に急激に減少した。今回の CRF様免疫活性の測定には第７実験日に回転数がピークに達したラットを使用した。代表的なAS群のラットについて、これらの３指標を図２に示した。

胃潰瘍　今回の指標に従って断頭したAS群のラットには全例に出血を伴なう胃潰瘍が確認された。AC群のラットには、すべて胃潰瘍は認められなかった。

CRF 様免疫活性の変化　図３に示すようにラットの視床下部および線条体の CRF様免疫活性の含量はAS群でAC群に比して有意に低下していた。大脳皮質（前部）および小脳ではその含量に変化はなかった。

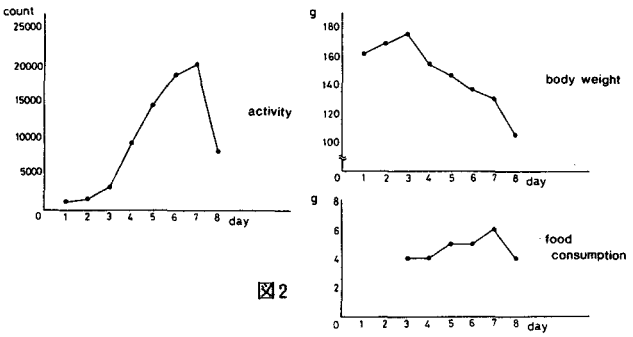


図2

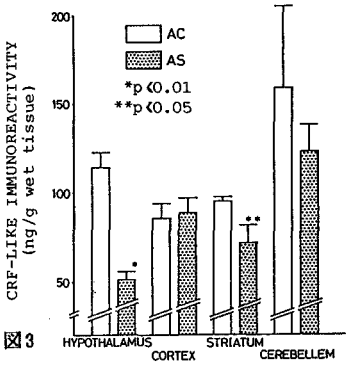


図3

0.1N塩酸－メタノール中で polytron homogenizer を用いて homogenize され、70℃ 10分間加温後14000Gで遠心分離を行ない、その上清を組織抽出物とした。

Radioimmunoassay　我々が既に報報告した(11)rat CRF-RIA 系に従って CRF様免疫活を測定した（図1）。すなわち、合成rat CRF を carbodiimide法にてウシthyroglobulin と結合し得られた抗血清（HC3-905）、[tyr]^{0}-rat CRFをクロラミンT法にて ^{125}Iで標識されたトレーサー、および標準 rat CRFあるいは0.1 N NaOHで中和された組織抽出物を標準緩衝液中で混和し、96時間インキュベートした後、Dextran coated charcoal 法にて B ,F分離を行ない、それぞれをγーカウンターにて測定した。

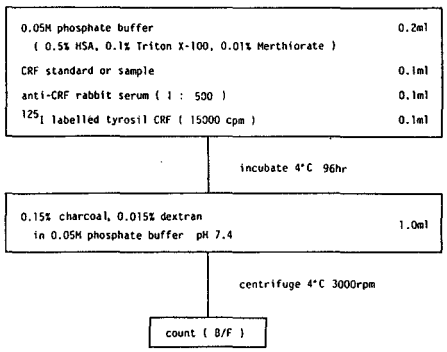


図1

ゲルろ過　組織抽出物1000μl を N_2 ガスにて 250μl に濃縮し、その 200μl を Sephadex G-50 カラム(0.7×50cm) に applyし 0.01% ヒト血清アルブミンを含む 0.1N酢酸で溶出した。得られた各 fraction は凍結乾燥後、RIA に用いた標準緩衝液にて溶解し CRF様免疫活性の測定に使用した。カラムは実験前に合成 rat CRFおよび

ゲルろ過における CRF様免疫活性の溶出パターン　視床下部ではAC群で void volume に少し遅れた位置と ^{125}I-[tyr]^{0}-rat CRFの溶出位置に一致したピークが認められたが(void volume peak, authentic CRF peak)、AS群では void volume peak は認められず authentic peak のみ検出できた。線条体ではAC群、AS群共、その溶出パターンに違いは認められなかった。(図4,5)

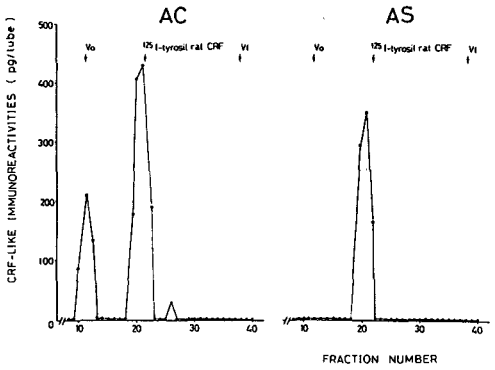


図4　HYPOTHALAMUS

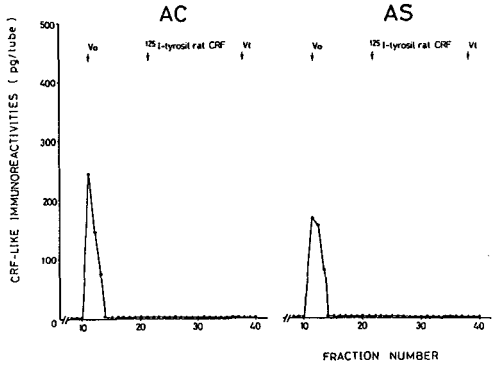


図5　STRIATUM

結語　CRF が ACTH を放出させることは in vivo、in vitroですでに知られている(6、7,12,13)。ストレス状況下で視床下部の CRFが関与することは予想されるが、一定の知見が得られていない。ストレスの種類や CRFの分泌形式、プロセシングの様式などによるものと思われるが、今回の実験に用いた慢性ストレスとしての activity stressでは CRF様免疫活性が視床下部で低下した。一方で、CRFが脳内に広範に分布しているという報告や CRFの脳室内注入がラットの性行動や摂食量を抑制したり、他の行動上の変化をもたらす(1,2,9) ことから、CRF が視床下部ホルモン以外の生理機能有する可能性が注目されている。今回の実験系ではストレス、摂食制限、運動などの要因が線条体の CRF様免疫活性の変化をもたらしたと考えられる。大分子型 CRF様免疫活性と authentic CRFとの関係および視床下部以外の CRFの生理的意義の解明が今後の研究課題である。

[文献] (1)Britton,DR.et al(1982)Life Sci.,31,363-367. (2) Brown,MR.et al(1982)Endocrinology,111,928-931. (3)Cote,J.et al(1983)Regul.Pept.,5,189-195. (4)Fischman,A.J. & Moldow,R.L.(1982)Peptides,1,149-153. (5)Hashimoto,K.et al(1983)Life Sci., 32,1001-1007. (6)Moldow,R.L.& Fischman,A.J.(1982) Peptides,3,37-39. (7) Paull,W.K.et al(1982)Peptides,3,183. (8)坂井田四郎他(1984)薬物・精神・行動,4191-194.(9)Sirinathsinghji,D.J.S.et al(1983) Nature,305,232-235. (10) 鈴木孝尚他, 薬物・精神・行動,(投稿中) (11)Suzuki,T. et al(1985)Psychoneuroendocrinology(in press) (12)Vale,W.et al(1983)Rec.Progr.Horm.Res., 39,245. (13)Vigh,S. et al(1982)Life Sci.,31,2441.

145. 覚醒剤精神病モデルにおける脳内 TRH 系の変化

梶田三郎・藤原　豊・佐藤光源・大月三郎・小川紀雄*
（岡山大・医・神経精神，脳研・機能生化*）

〔要　約〕

覚醒剤精神病の易再燃性における脳内 thyrotropin—releasing hormone（TRH）系の関与を知るため，Methamphetamine（MAP）反復投与ラットを用いて，脳部位別のTRH濃度とTRH受容体の変化を検討した。生食を2週間反復投与後1週間放置し生食を投与した（S—S）群，MAP 4mg／kg を腹腔内投与した（S—M）群と，MAP 4mg／kg／day を2週間腹腔内反復投与後1週間放置し生食を投与した（M—S）群，MAP 4mg／kg を再投与した（M—M）群の4群について，最終投与より1時間後の時点で断頭屠殺し，7脳部位で radioimmunoassay 法と radioreceptorassay 法によりTRH—like immunoreactivity（TRH—LI）と特異的TRH結合を測定した。TRH—LIはいづれの脳部位でも，MAP 1回投与，反復投与，再投与による有意な変化は認められなかった。特異的TRH結合はいづれの脳部位でもMAP 1回投与では変化が認められなかったが，MAP反復投与（M—S）群では，線条体においてのみ有意な減少がみられS—S群に比し約60％減少していた。再投与（M—M）群では，側坐核と線条体で有意な減少がみられた。特異的TRH結合は，いづれの脳部位でも反復投与（M—S）群と再投与（M—M）群間では有意な変化は認められなかった。

これらの結果より，MAP反復投与による逆耐性形成或いは覚醒剤精神病にみられる症状再燃には，線条体及び側坐核におけるTRH受容体の減少が重要であると考えられた。

Key word：Methamphetamine，TRH—like immunoreactivity，TRH receptor

覚醒剤精神病の多くは，断薬でしだいに軽快する。しかし長期間断薬していても，覚醒剤を再び使用すれば少量で容易にもとの精神病状態が再現する[7,8]。現実に，このような症状再燃をくりかえしている覚醒剤精神病者が多い。この再燃しやすさが，覚醒剤の長期乱用中に起った脳の変化に由来し，それが断薬後も持続するものと考えられるが，その変化の実体は明らかではない。これまでの多くの研究が一致して示しているのは，脳ドパミン系に過敏反応性が形成され，そこに作用点をもつ薬物あるいはストレスへの反応性が変化するということである。しかし，脳ドパミン系の変化を調べた神経化学的な成績では未だドパミン系の過敏反応を説明するに足る定説はない。一方，近年の神経内分泌学の長足の進歩により，各種の神経ペプチドが神経伝達物質或いは修飾物質として機能することが知られるようになった。Thyrotropin—releasing hormone（TRH）は，中枢神経系内において，ドパミンをはじめとする他のアミン及びアミノ酸と相互作用を示すことが推測されており，methamphetamine（MAP）の反復投与により生ずる逆耐性現象の病態生理に脳内TRHが関与している可能性が考えられ，今回，我々はMAP反復投与ラットを用いて，脳内TRH含量とTRH受容体がどのように変化するかを部位別に検討した。

［対象と方法］

8週齢のSD系雄ラット40匹を用い，室温24℃，12時間の明暗サイクルにて飼育した。MAPの投与方法は，生食或いはMAP 4mg／kg を1日1回一定時刻に14日間腹腔内に反復投与し，1週間放置後生食或いはMAP 4mg／kg を腹腔内に投与し4群にわけた。すなわち生食のみを投与した群をS—S群，生食反復投与後MAP 4mg／kg を1回投与した群をS—M群，MAP 4mg／kg を14日間腹腔内反復投与後1週間放置し生食を投与した群をM—S群，MAP 4mg／kg を14日間反復腹腔内投与し1週間放置後MAP 4mg／kg を再投与した群をM—M群とした。いずれの群も最終投与より1時間後，すなわち，MAP再投与群で行動上逆耐性現象が生じている時点で断頭屠殺し，脳部位別にTRH含量を，radioimmunoassay（RIA）[9,11]法で，特異的TRH結合を radioreceptorassay（RRA）[5,6]法で検討した。脳部位は Glowinski and Iversen の方法に準じて，前頭葉皮質，側坐核，線条体，視床下部，視床＋中脳，扁桃核＋梨状葉皮質，海馬の7脳部位とした。

1. TRH−RIA

RIA用の脳標本の処理はYoshimasaら[12]の方法に従った。組織の湿重量を測定後直ちに10倍容の酸エタノール(等量のエタノールと0.1N塩酸)を加え，4℃，12,000gで20分間遠心し，その上清の一部を40℃，N_2ガス下で乾燥させた後，−20℃で保存し，測定直前にRIA用リン酸緩衝液(0.14Mリン酸緩衝液，25mM EDTA，0.5%牛血清アルブミン，ph7.4)を加えて希釈した。TRH−RIAは通常の2抗体RIA法と同様の方法で行なった。すなわちプラスティク試験管に0.1mlのRIA用リン酸緩衝液，0.1mlの抗TRH家兎血清(10,000倍希釈)，0.1mlの標準TRH(36fg/mlから36ng/ml)或いは希釈標本0.1ml，0.1mlの^{125}I−TRH(15,000−18,000 c.p.m. : NEN)を加え4℃で48時間放置した。ついで0.1mlの5%抗家兎γ−グロブリン羊血清と0.1mlの1%正常家兎血清を加え，4℃で24時間放置した後，4℃ 3,000 rpmで30分間遠心し，上清を吸引排除して沈渣の放射活性をγ−カウンターで測定した。

2. TRH−RRA

切り出した脳標本の湿重量を測定した後，直ちに−70℃で保存し，測定直前に氷冷したトリス・塩酸緩衝液を加えホモゲナイズし，4℃，12,000gで20分間遠心し，その沈渣に同様の操作を加えて，最終沈渣に35倍容のトリス・塩酸緩衝液を加えてレセプター標本とした。このレセプター標本0.5mlに，最終濃度100μMの非標識TRHあるいはトリス・塩酸緩衝液，最終濃度12nMの[^{3}H]TRHを加え，最終容量を1mlとした。これら混合物を氷水中にて3時間放置し，Whatman GF/Cにて吸引ろ過し，フィルター上の放射能をβ−カウンターで測定した。特異的TRH結合は，100μM標準TRHの存在下，非存在下での結合の差として求めた。蛋白測定はLowryら[3]の方法に従って測定した。

[結　果]

TRH含量は，いずれの脳部位でもMAP急性1回投与，反復投与，再投与により有意な変化は認められなかった(Table 1)。特異的TRH結合は，いずれの脳部位でも，MAP急性1回投与による有意な変化はみられなかった。また，MAP反復投与(M−S)群と再投与(M−M)群間でも有意な変化は認められなかった。MAP反復投与後1週間休薬した時点(M−S群)では，コントロール(S−S)群に比べ線条体においてのみ有意な減少が認められ，約60%まで減少していた。その他の脳部位でMAP反復投与による変化はみられなかった。MAP再投与群ではコントロール群に比し，側坐核と線条体で有意な減少が認められ，その他の脳部位では有意な変化はみられなかった(Table 2)。

この特異的TRH結合の減少が親和性の変化によるものか，結合部位数の変化によるのか現在検討中である。

[考　察]

TRHは視床下部のみならず広く脳内に分布し，視床下部を介さない中枢作用を示すことが知られておりその作用機序として，脳内アミンやアミノ酸などの他の神経伝達物質を介して作用することが推測されている。特にそのドパミン性神経伝達への作用は最近注目されているところであり，線条体と側坐核で神経終末からドパミンを遊出させることが報告されている[2,4]。たとえば[^{3}H]−ドパミンをとりこませた脳の切片を灌流してその遊離を測定すると，TRHにより著しい増加がおこる[2]。今回の実験により覚醒剤の反復投与により逆耐性を形成すると，断薬1週間後に線条体の特異的TRH結合が減少し，再投与時には側坐核でも有意な減少がおこることが示された。さらにSpindelら[10]は，アンフェタミン(10mg/kg i.p.)投与2時間後より線条体のTRH含量が有意に減少し，この効果は，ハロペリドール投与等によりドパミン系を遮断することで阻止されると報告している。すなわち，線条体におけるアンフェタミンによるTRH含量の減少はドパミン系を介してTRHの遊離が促進された可能性を示唆している。今回の我々の結果ではMAP最終投与より1時間後の時点で解析しているためTRH含量に変化が認められなかった可能性が考えられ，Spindelらもアンフェタミン投与1時間後では線条体のTRH含量の減少が認められなかったと報告している。これらのことより，覚醒剤を長期にわたり乱用しているうちに，各回注射時のドパミン系における一過性の変化にとどまらず，線条体と側坐核におけるTRH受容体に持続性の変化を残すこととなり，それがドパミン系をはじめとする他の神経伝達物質の機能的変化をもたらし，逆耐性現象を形成する可能性のあることが示唆された。

Table 1 Regional TRH-LI (pg/mg tissue)

Region	S-S group	S-M group	M-S group	M-M group
Frontal cortex	0.9±0.3	0.7±0.2	0.7±0.2	0.6±0.1
N.accumbens	17.8±2.9	18.0±3.6	20.9±2.7	17.3±1.9
Striatum	10.6±1.5	11.2±0.6	8.9±1.3	8.1±1.0
Hypothalamus	101.1±4.2	94.1±2.0	89.4±8.2	78.9±2.2
Thalamus +Midbrain	7.2±0.9	7.2±0.8	5.2±1.0	6.3±1.7
Amygdala +Piriform cortex	3.0±0.4	3.2±0.6	3.0±0.3	3.0±0.4
Hippocampus	2.2±0.4	2.0±0.2	2.1±0.7	2.0±0.4

All values are expressed in pg/mg tissue and means ± S.E.M.(N=5).
S-S, S-M, M-S, M-M : see text

Table 2 Regional specific binding of TRH (f mol/mg protein)

Region	S-S group	S-M group	M-S group	M-M group
Frontal cortex	52.5±3.4	47.3±3.3	53.3± 2.0	50.3±3.1
N.accumbens	50.6±3.8	53.3±3.2	43.4± 2.9	39.9±2.2*
Striatum	18.1±1.4	14.4±1.8	11.0± 0.7**	10.5±0.3**
Hypothalamus	58.9±6.1	62.4±2.4	70.6± 2.3	71.9±8.1
Thalamus +Midbrain	47.6±2.1	41.5±4.3	42.1± 2.2	39.0±3.2
Amygdala +Piriform cortex	116.2±8.0	118.6±6.2	121.0±12.2	112.4±7.0
Hippocampus	63.0±7.0	47.4±6.5	52.9±3.0	46.5±3.2

* p 0.05, **p 0.01 compared to S-S (one-way ANOVA)
Samples of each receptor preparation were incubated with 12 nM[^{3}H]-TRH.
Values shown are the mean ± S.E.M. of 5 rats.

［参考文献］

1) Glowinski, J. and Iversen, L. L. (1966) J. J. Neurochem., 13, 655—669
2) Kerwin, R.W. and Pycock, C. J. (1979) Br. J. Pharmacol., 67, 323—325
3) Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L. and Randell, R. J. (1951) J. Biol. Chem., 193, 265—275
4) 成実重彦，永井康男，名川雄児（1979）日薬理誌，72，239—250
5) Ogawa, N., Yamawaki, Y., Kuroda, H., Ofuji, T., Iotaka, E. and Kito, S. (1981) Brain Res., 205, 169—174
6) Ogawa, N., Yamawaki, Y., Kuroda, H., Nukina, I., Ota, Z., Fujino, M. and Yanaihara, N. (1982) Peptides, 3, 669—677
7) 佐藤光源，中島豊爾，大月三郎（1982）精神医学，24，481—489
8) Sato, M., Chen, C. C., Akiyama, K. and Otsuki, S. (1983) Biol. Psychiatry, 18, 429—440
9) Sato, M., Kajita, S., Ogawa, N. and Okamoto, M. (1985) In J. A. Wada (Eds.), Kindling 3, Raven Press, New York (in press)
10) Spindel, R. J., Pettibone, D. J. and Wurtman, R. J. (1981) Brain Res., 216, 323—331
11) Utsumi, M., Tateiwa, M., Makimura, H., Yamada, A., Mori, H., Kusaka, T., Sakoda, M. and Baba, S. (1975) Endocrinol. Japan, 22, 509—516
12) Yoshimasa, T., Nakao, K., Otsuki. S., Li, S. and Imura, H. (1982) J. Clin. Invest., 69, 643—650

146. ラット脳内ニューロテンシン様免疫活性に及ぼすメトアンフェタミン及びハロペリドールの効果

和知　学・奥田正英・富樫俊二・不破野誠一・宮下　理
（新潟大・医・精神，脳研・神経化学）

〔要　約〕

脳内ニューロテンシン（ＮＴ）に対するメトアンフェタミン（ＭＡＰ）及びハロペリドール（ＨＡＬ）の影響をラットを用いて検討し次の結果を得た。１）ＭＡＰの１０㎎／kg１回投与ではいづれの脳部位でもニューロテンシン様免疫活性（ＮＴＬＩ）に変化がみられなかった。２）ＭＡＰ１０㎎／kgを１０日間投与した慢性投与群では辺縁系前脳部では４３％，中脳では３１％の増加がみられた。３）ハロペリドール（ＨＡＬ）２㎎／kg１回投与では尾状核ー淡蒼球（ＣＰ）で１８８％の増加を示した。ＨＡＬ２㎎／kg１０日間の投与時にはＣＰで４８％の増加がみられた。ＨＡＬ１回投与と１０日間投与のＮＴＬＩを比較すると１０日間投与のＮＴＬＩは１回投与にくらべてＣＰで減少を示し，中脳で増加を示した。４）ＭＡＰ１０日間投与＋ＨＡＬ１回投与ではＣＰで１６３％の増加を示し，また中脳でも４７％の増加を示していた。一方辺縁系前脳部では３５％の上昇がみられたが対照群との間に有意な差はみられなかった。５）ＭＡＰの急性及び慢性投与，ＨＡＬ＋ＭＡＰ投与後の行動の変化はstereotypyは慢性ＭＡＰ及びＭＡＰ＋ＨＡＬいづれでもcontrol 及びacute ＭＡＰに比し増加し，一方locomotionはそれらの群でacute ＭＡＰにくらべ減少していた。

Key word：Methamphtamine, Haloperidol,
Neurotensin-like immunoreactivity.

ニューロテンシン（ＮＴ）は１３個のアミノ酸からなる脳腸ペプチドの一種であり，最近Nemeroff らの研究（６）からneuroleptica様の作用を有するため，そのドパミン（ＤＡ）との関連が研究され，neuroleptica とＮＴの生理及び薬理作用に多くの類似性がみいだされている。さらに精神分裂病のあるsubtype の髄液中においてＮＴ含量の変化がみい出され注目されてきている（１０）。最近私達はその使用によりヒトに精神障害をひきおこすといわれているフェンサイクリジン（ＰＣＰ）をラットに投与し，前頭葉においてニューロテンシン様免疫活性（ＮＴＬＩ）が減少していることを報告した（９）。本研究ではＤＡのindirect agonist であるメトアンフェタミン（ＭＡＰ）及びＤＡのantagonistであるhaloperidol （ＨＡＬ）をラットに投与しラジオイムノアッセイ法（ＲＩＡ）によりラット脳内ＮＴＬＩを測定し検討したので報告する。

〈対象と方法〉

対象と薬物投与方法：対象は体重２００－２５０ｇのWistar系雄性ラットを用い下記の方法で薬物を投与した。①ＭＡＰ急性投与群；ＭＡＰ１０㎎／kgを腹腔内投与し１時間後に断頭した。②ＭＡＰ慢性投与群；ＭＡＰ１０㎎／kgを１０日間腹腔内投与し最終注射後１時間で断頭した。③ＨＡＬ急性投与群；ＨＡＬ２㎎／kgを腹腔内に投与し２４時間後に断頭した。④ＨＡＬ慢性投与群；ＨＡＬ２㎎／kgを１０日間腹腔内投与し最終注射後２４時間で断頭した。⑤ＭＡＰ慢性投与＋ＨＡＬ急性投与群；ＭＡＰ１０㎎／kgを１０日間腹腔内に投与し断頭の２４時間前にＨＡＬ２㎎／kgを投与した。ＭＡＰは断頭１時間前に最終注射を行った。⑥対照群には生理食塩水を１０日間

投与した。行動観察：①，②，⑤，⑥の各群は最終注射後1時間行動の観察を行った。行動評価についてはstereotypyは既報（7）に従い，locomotor activityはSturgeonらの方法（8）に準じて行った。脳各部位の切り出し：既報に従い（9）前頭葉（Fc），辺縁系前脳部（LF），尾状核淡蒼球（CP），視床下部（HT），中脳（MB）を切り出し，Carraway and Leemanの方法（1）に従いNTのRIAを行った。

〈結果と考察〉

①ラット脳内NTLIの分布はHTで最も高く次いでMB，LFの順に高く，CP，Fcでは低値を示した（表1）。この値は諸家の報告（2）（5）にほぼ一致していた。②HALの急性投与ではCPで188%の有意な増加を示していた。HAL慢性投与時にはCPで対照群にくらべ48%の有意な増加がみられた。一方HAL慢性投与群のNTLIはHAL急性投与群にくらべCPで有意な減少を示し，MBで有意な増加を示した（図2）。このように抗精神病薬であるHALによりひきおこされたNTLIの増加はnigro-striatal neuronに著明であり，抗精神病薬の作用とNTと

area :	Fc	CP	LF	HT	MB
control pg/mg wet weight (n=6)	3.17±0.02	4.81±0.38	14.6±0.8	89.0±2.8	34.8±3.6

Table.1 Neurotensin-like immunoreactivity(NTLI) in the 5 brain areas of control group. Fc denotes the frontal cortex;CP,caudate-putamen;LF,limbic forebrain;HT,hypothalamus;MB,midbrain

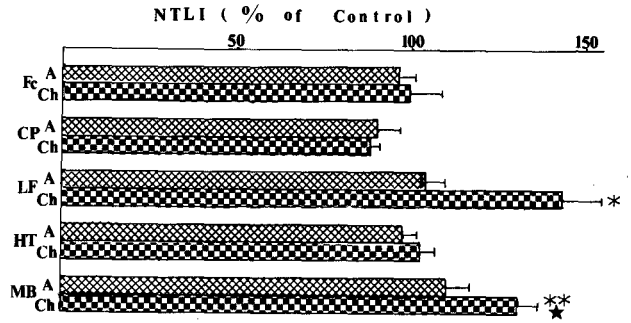


Figure.1 Effect of acute(A) and chronic(Ch) administration of methamphetamine on NTLI in discrete areas of rat brain. Values show Mean±SEM. ＊P<0.02,＊＊P<0.01(as compared with control) ★P<0.05(as compared with acute).

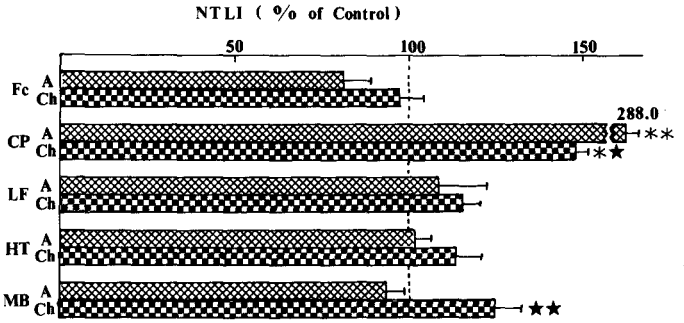


Figure.2 Effect of acute(A) and chronic(Ch) administration of haloperidol on NTLI in discrete areas of rat brain. Values show Mean±SEM. ＊P<0.01, ＊＊P<0.001(as compared with control) ★P<0.02,★★P<0.05(as compared with acute).

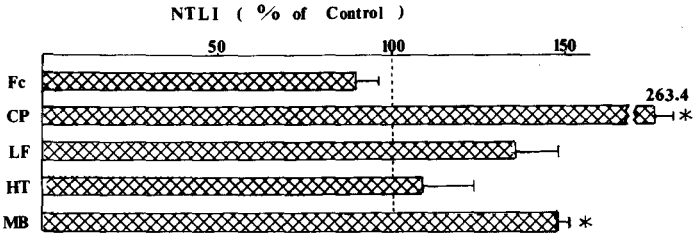


Figure.3 Effect of acute haloperidol and chronic methamphetamine administration on NTLI in discrete areas of rat brain. Values show Mean±SEM. ＊P<0.001 as compared with control.

は密接な機能連関を持つことが示唆される。ＨＡＬ急性投与時と慢性投与時におけるＮＴＬＩのＣＰでの差異については今迄報告がない。Govoniら（３）はn.accumbensではＨＡＬ急性投与で増加し，更に慢性投与の日数と共に増加傾向を示すと報告している。今後ＤＡ拮抗薬であるＨＡＬとＮＴとの関連についてＤＡニューロン系に部位特異性があるか，更に投与日数による経時的変化はどうなるかなど詳細な検討が必要であり，これらの点について現在検討中である。③ＭＡＰ急性投与ではいづれの脳部位でもＮＴＬＩは対照群と比較して有意な差はみられなかったが，慢性投与ではＬＦで４３％，ＭＢで３１％の有意な増加がみられた（図１）。さらにＭＡＰ慢性投与＋ＨＡＬ１回投与ではＭＡＰ慢性投与のみに比し，ＬＦで減少傾向をＭＢでは増加傾向を示していた（図３）。④行動面ではstereotypyは慢性ＭＡＰ及びＭＡＰ＋ＨＡＬいづれでもcontrol あるいはacute ＭＡＰに比し増加を示していた。逆にlocomotor activityは慢性ＭＡＰ，ＭＡＰ＋ＨＡＬのいづれの群でもacute ＭＡＰにくらべ減少していた。慢性ＭＡＰとＭＡＰ＋ＨＡＬの間ではstereotypy及びlocomotor activityとも差がみられなかった（図４）。ＭＡＰはＤＡ系ニューロンに対しindirect agonist として作用することが知られている。今回の実験で，ＮＴＬＩは，ＭＡＰ急性投与で変化がなく，慢性投与でＤＡ系ニューロンの起始核を含むＭＢと投射系終末のＬＦで有意な増加を示したことは，行動変化との関連で注目すべき知見と考える。Kalivasら（４）は，ＮＴを側坐核に注入するとamphetamineによりひきおこされる運動が抑制されると報告しており，今回のＭＡＰ慢性投与時のＮＴＬＩのＬＦの増加は，locomotor activityの減少に関与している可能性が考えられる。しかし慢性ＭＡＰとＭＡＰ＋ＨＡＬにおけるＮＴＬＩの差異を行動と結びつけることは難しく，現在追加実験を行い検討中である。今後ＤＡ系－ＮＴ系－行動との関連について更に研究をすすめていく必要がある。

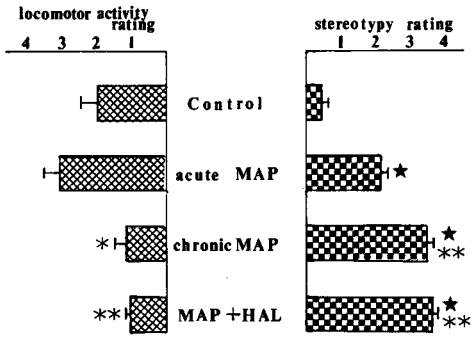


Figure.4. Effect of administration of MAP and/or HAL once or once a day for 10 days on locomotor activity and stereotypy. Values show Mean±SEM. ＊P＜0.01, ＊＊P＜0.001(as compared with acute MAP) ★P＜0.001 as compared with control.

なお本研究を御指導いただいた新潟大学脳研神経化学教授の佐武明氏に深謝する。

〈文献〉

1)Carraway,R.et al.(1976)J.biol.chem.251,7035-7044 2)Emson,P.C.et al.(1982) Ann.N.Y.Acad.Sci.400,198-215 3)Govoni,S.et al.(1980)J.Pharmacol.exp.Ther. 215,413-417 4)Kalivas,P.W.et al.(1982)Ann.N.Y.Acad.Sci.400,307-318 5)Kobayashi,R.et al.(1977)Brain Res.126,584-588 6)Nemeroff,C.B.(1980)Biol.Psychiat. 15,283-302 7)Okuda,M.et al.(1982) Adv.Neurosci.39,201-207 8)Sturgeon,R.D. et al.(1979) Europ.J.Pharmacol.59,169-179 9)Wachi,M.et al.(1985) Brain Res. 333,393-396 10)Widerlöv,E.et al.(1982)Amer.J.Psychiat.139,1122-1126

147. 血清浸透圧と血漿バゾプレッシン濃度におよぼす向精神薬長期投与の影響

平井基陽・岸本年史・大沢弘吉・井川玄朗
橋本泰道*・能登　直*・中嶋照夫*
（奈良医大・精神，京都府医大・精神*）

〔要　約〕

精神疾患患者にみられる水中毒の発生に向精神薬がどのように影響しているかを知る目的で、家兎にハロペリドールかクロールプロマジンを連日8週間投与し、絶食、水負荷などによって血清浸透圧を変化させたときの血漿バゾプレッシン濃度の動態を検討し以下の知見をえた。

1) 対照群、ハロペリドール投与群、クロールプロマジン投与群のいずれにおいても血清浸透圧と血漿バゾプレッシン濃度との間には正の相関関係が認められた。

2) 向精神薬投与群では対照群に比して血清浸透圧に対するバゾプレッシン分泌反応の感度が高くなる傾向を認めた。この感度の増加は投与期間が長くなるほど大きい傾向を示した。

3) 対照群、向精神薬投与群のいずれもで血清Na濃度と血漿バゾプレッシン濃度との間に正の相関関係が認められた。

以上のことより向精神薬の長期投与は体内水分調節系に影響を与えている可能性のあることが示唆された。

Key word :　Serum osmolality, Plasma arginine vasopressin, Psychotropic drugs

近年、血中バゾプレッシンの測定技術の進歩により、体液のホメオスターシスに関する機構が明らかにされつつある。Robertson (4) によれば健常人では血漿浸透圧 (Posm) と血漿バゾプレッシン (PAvp) との間には有意な相関関係があり、PAvp＝0.4 (Posm－280) で表わされる直線関係を示すといわれている。さらに躁うつ病患者では躁とうつの病相で上記の回帰直線の勾配すなわち浸透圧の上昇に対するバゾプレッシン分泌反応の感度が異なること、および投与されたリチウムはこの感度を増しカルバマゼピンは逆に感度を低下させることが報告されている (1)。

一方、精神分裂病などの精神疾患患者にみられる低ナトリウム血症および水中毒の発生に向精神薬の長期投与が関与しているとの推定もなされている (3) が、いまだ一定の結論はえられていない。

今回、われわれは向精神薬の長期投与が血清浸透圧－血漿バゾプレッシンの水分調節系におよぼす影響を知る目的で家兎に抗精神病薬を慢性投与し、経口水負荷および絶食により血清浸透圧を変化させたときの血漿バゾプレッシン濃度の変動を検討したので報告する。

〔実験方法〕

1)　向精神薬の投与：

日白系雄家兎（体重2,700－2,900g）、12羽をハロペリドール (HPD) 投与群とクロールプロマジン (CP) 投与群の2群に分け、それぞれ1日1回、連日、筋肉注射

(HPD：2mg／Kg，CP：10mg／Kg) を行なった。

2) 注射開始前を対照群とし、向精神薬の投与前および投与2，4，8週後のものについて、絶食（30時間）後、自由飲水時、胃管チューブを用いての水の経口負荷（30ml／Kg）90分後の3状態で耳静脈より採血した。

3) 採血後、ただちに血液の一部（約4ml）は氷冷したEDTA・2Naを加えたスピッツに移し、4℃、3000回転にて血漿を分離してバゾプレッシン測定に供した。残りの血液（約3ml）は同様に遠沈して血清を分離し、浸透圧およびNaの測定に供した。それぞれの標品は測定まで－20℃で保存した。

4) 血漿バゾプレッシン濃度の測定はHashimotoら（2）の方法を用い、ラジオイムノアッセイにて行なった。血清浸透圧Sosmは氷点降下法で血清Na濃度は炎光光度法にて測定した。

〔 実験結果 〕

1) 血清浸透圧と血漿バゾプレッシン濃度の関係

絶食、自由飲水、水負荷によって血清浸透圧を種々変化させたときの血漿バゾプレッシンの分泌動態を検討した結果を図1に示した。向精神薬投与前（図1－A）のものについてみるとSosmとPAVPは正の相関関係（$\gamma = 0.46$）を示し、その回帰直線は $y = 0.084\ (x - 248)$ で表わされる。8週間の向精神薬投与群についてもSosmとPAVPは相関関係を維持していた（図1－B,C）が対照群と比して回帰直線の勾配が増し、Sosmに対するバゾプレッシン分泌反応の感度が高くなる傾向を認めた。表1は向精神薬投与群でえられた相関係数と回帰直線の変化を経時的にみたものである。勾配についてみるとHPD群では投与2週後から徐々に増加する傾向にあった。一方CP群では投与4週後までは対照群と変わらないが8週後ではHPD群とほぼ同程度に増加を認めた。なお浸透圧閾値に関しては一定の傾向を認めなかった。

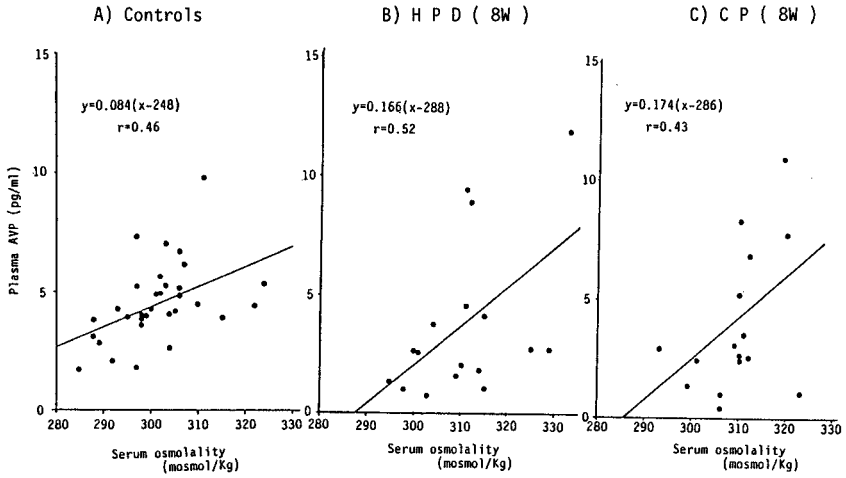


図1。 向精神薬投与8週後の血清浸透圧とPAVPの関係

2)　血清Na濃度とPavpの関係。

血清NaとPavpにも図2に示したように正の相関が認められ、回帰直線の勾配が向精神薬投与群で増加を示した。しかし経時的にみるとSosmとの場合とは異なり、4週後まではHPD, CPの両群とも対照群と変わらなかった。

表1。向精神薬のバゾプレッシン分泌動態におよぼす影響の経時変化

Duration	H P D	C P
2W	y=0.120(x-269) r=0.37	y=0.082(x-256) r=0.55
4W	y=0.124(x-251) r=0.38	y=0.083(x-243) r=0.30
8W	y=0.166(x-288) r=0.52	y=0.174(x-286) r=0.43

control:　y=0.084(x-248) , r=0.46

〔 考察 〕

今回の実験結果から向精神薬の慢性投与はSosmの変動に対するバゾプレッシン分泌反応の感度を高める可能性が示唆された。リチウムは躁うつ病患者ではバゾプレッシン分泌の始動ポインンである浸透圧閾値を変えることなく浸透圧の変動に対する感度を増加させるといわれている。

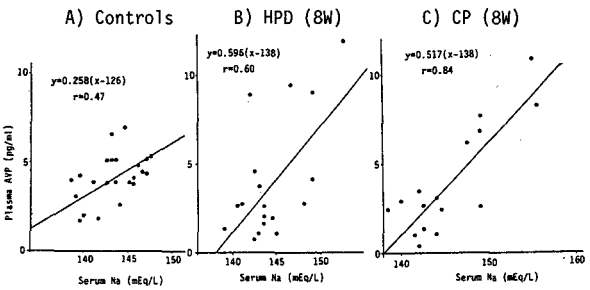


図2。向精神薬投与8週後のSerum Naと Pavpの関係

感度を増加させるという点では、HPD , CPの両方ともリチウムと同じ傾向を示すといえるかもしれない。しかし今回のわれわれの実験条件下では浸透圧閾値の変動に関して一定の結論をえるには到らなかった。

向精神薬の長期投与が精神疾患患者にみられる水中毒の発生に有利に働いているのか、不利に働いているのか、今後、浸透圧調節系を中心に追求して行きたいと考えている。

〔 文献 〕

(1)　Gold,P.W., J.C.Ballenger, G.L.Robertson, et al. (1984) In: Neurobiology of Mood Disorders (eds.R.M.Post and J.C.Ballenger) Williams & Wilkins, Baltimore, U.S.A. pp 323

(2)　H.Hashimoto, K.Fukui, T.Noto, T.Nakajima and N.Kato (1985) Endocrinol. Japan., 32, 89

(3)　堀　彰，永山素男，島園安雄 (1984)　精神薬療基金研究年報　15, 325

(4)　Robertson,G.L. (1974) Ann. Rev. Med., 25, 315

148. ラット心房性 Na 利尿ペプチド（28）結合部位：脳，副腎，腎

尾崎正若・丹羽正美・姫野明彦・太田　尚
猪狩伸比古・下村千枝子　（長崎大・医・第二薬理）

〔要　約〕

心房性Na利尿ペプチド(ＡＮＰ)受容体の分布を、(３－[^{125}I]tyrosyl^{28})Rat ＡＮＰ(２８)(rＡＮＰ)の結合部位として定量的In vitro autoradiographic techniqueを用いてRat脳および副腎、腎臓で検索した。

Rat脳ではSubfornical organが最も密度の高い結合部位で、以下、Choroid plexus, Area postrema, Lateral olfactory tract, Anterior commissure, Corpus callosum, Periventricular area of third ventricle, Dorsal motor nucleus of vagus, Hypoglossal nucleus, Inferior olive, Solitary tract nucleusであった。副腎ではZona glomerulosaに最も高密度に存在し、それ以外の副腎皮質にも散在的かつ密度の低い結合が観察された。腎臓皮質ではGlomerulusに限局し、髄質では縦に腎盂に向かう索状形に結合部位があり、さらに腎盂にも認められた。　これらの所見は、Angiotensin Ⅱ結合部位と比較することで、Brain-Heart peptideとしてのＡＮＰの体液－血圧調節における役割を考えるうえで示唆的であると思われた。

Key word：Rat atrial natriuretic peptide binding sites, Angiotensin Ⅱ receptor, In vitro autoradiography for receptors

[はじめに]

Rat atrial natriuretic peptide(２８)(rＡＮＰ)[3]は循環血液中に存在し、副腎皮質、腎臓をtarget organとするが、中枢神経にもAtriopeptin Ⅲ-like immunoreactive containing neuronの存在の報告[2-5]があり、その意味で代表的なBrain-peripheral peptidesの１つであるAngiotensinⅡ(ＡⅡ)との生理的競合関係が重視される。今回、我々は^{125}I-labelled rＡＮＰ(1-２８)の結合部位を^{125}I-labelled ligandによるin vitro autoradiographic method[1]を用いてRat脳、副腎、腎臓で観察し、同時に^{125}I-ＡⅡ binding sitesと比較した。

[方法]

Rat(雄性Wistar, 250～300g体重)断頭後、ただちに摘出した脳、副腎、腎臓をドライアイスで冷却したisopentane中で凍結し－20℃で8μmの凍結切片を作成した。gelatin coated slide glassに貼りつけた後、＋4℃で吸引下に１晩乾燥させた。0.5％ＢＳＡ、100mM NaCl、5mM $MgCl_2$、40μg/ml bacitracin、4μg/ml leupeptinおよび2μg/ml chymostatin含有50mM Tris-HCl buffer、pH7.4中で、室温(23℃) 15分間 pre-incubationした後、(３-[^{125}I]iodotyrosyl^{28})Rat atrial natriuretic peptide(２８)(Amersham Int., 1888Ci/mmol)(^{125}I-rＡＮＰ)600pM含有した上記buffer中で室温60分間incubationした。Nonspecific bindingは、1.0μM非放射性rＡＮＰ(２８)と競合させることで得た。Angiotensin Ⅱについては、同様に、120mM NaCl、5mM Na_2ＥＤＴＡ、

50μg/mlのbacitracin、0.2%ＢＳＡ含有50mM sodium phosphate buffer、pH7.4中で室温15分間preincubationした後、(3-[^{125}I]iodotyrosyl^{4})Angiotensin Ⅱ(5-L-isoleucine)(Amersham Int., 1888Ci/mmol)(^{125}I-AⅡ) 600pM含有buffer中で室温60分間incubationした。4℃,50mM Tris-HCl buffer, pH7.4中で各30秒間4回洗浄後、冷風下に乾燥させ、^{3}H Ultrofilm(ＬＫＢ)に感光させた。感光後、切片をtoluidine blueで染色した。

[結果と考察]

Rat脳では、Fig.1にあるように、前脳に嗅脳部ではLateral olfactory tract, Anterior commissureに結合部位が認められる。前視床下部のレベルで脳室周囲、特にSubfornical organ(ＳＦＯ)の高密度結合が注目された。^{125}I-AⅡ結合部位と、これらの部位は重複するが視床下部Paraventricular nucleus, Supraoptic nucleusでは、^{125}I-rＡＮＰの結合は認められなかった。(1.0μM非放射性rＡＮＰ置換によるnonspecific bindingsの像は、輪郭をはっきりさせるためにフィルムへの露出時間を長くしてある。以下同)。下部脳幹部尾側ＮＴＳ領域では、Area postrema, Dorsal motor nucleus of vagus, Hypoglossal nucleusに比較的強い結合が認められ、Solitary tract nucleusにも、それより弱く認められた。腹側部でInferior oliveにも存在する。これらの部位は、^{125}I-AⅡ結合部位と重複する(Fig.2)。副腎では、Fig.3に示すように、Zona glomerulosaに高密度に認められ、他の皮質にも弱く認められる。^{125}I-AⅡ結合部位との比較を示し

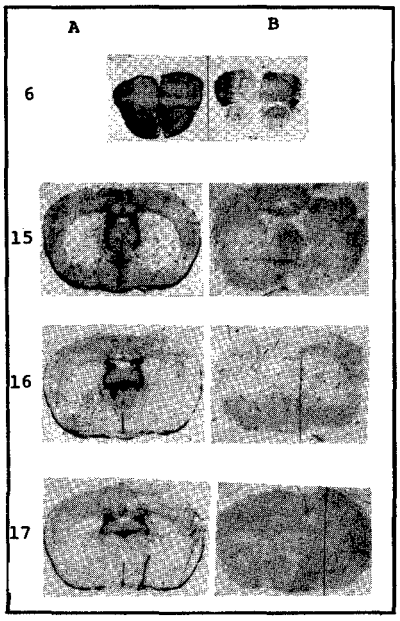


Fig. 1

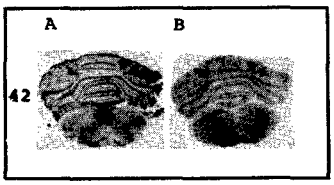


Fig. 2

Fig. 1 Direct print of an autoradiogram showing ^{125}I-rANP binding sites in rat brain at the level of "plate 6, 15, 16, 17" of the stereotaxic atlas of Paxions and Watson (1982). A: Total binding, B: Nonspecific binding in adjacent sections, incubated with ^{125}I-rANP and 1.0 uM unlabelled r-ANP.

Fig. 2 ^{125}I-rANP binding sites in rat lower brain stem at the level of "Plate 42". A: Total binding, B: Nonspecific binding.

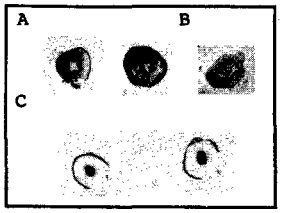


Fig. 3 ^{125}I-rANP binding (A, B) and ^{125}I-Angiotensin binding (C) sites in rat adrenal gland. A, C: Total binding, B: Nonspecific binding, incubated with ^{125}I-rANP and 1.0 uM unlabelled rANP.

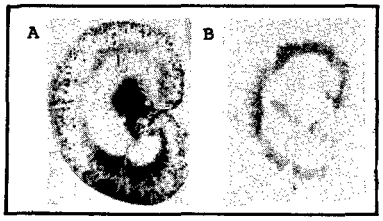


Fig. 4 ^{125}I-rANP binding sites in rat kidney.
A. Total binding, B: Nonspecific binding.

てあるが、AⅡの場合はZona glomerulosaと髄質のみに結合が認められる。腎臓皮質では特異的にglomerulusに強い結合があり、髄質にも集合管と思われる結合部位がある。解剖学的に腎盂と一致する場所にも結合があった(Fig.4)。副腎、腎臓における所見は、Murphy et al.[4]の^{125}I-atriopeptin Ⅲによる結合部位とよく一致する。^{125}I-rANP結合部位は、脳一末梢において体液一血圧調節系に深く関与するAⅡの受容体と重複する部位もあるが、いくつかの違いが観察された。特に、中枢神経内および副腎での差異は、広くANPの生理的役割を考察する上で重要な所見であろうと思われる。

References

1. Israel, A. et al. : Brain Res., 322, 341 (1984)

2. Jacobowitz, D. M. et al. : Neuroendocrinology, 40, 92 (1985)

3. Kangawa, K. et al. : Biochem. Biophy. Res. Commun., 121, 585 (1984)

4. Murphy, K. M. M. et al. : Eur. J. Pharmacol., 111, 291 (1985)

5. Saper, C. B. et al. : Science, 227, 1047 (1985)

149. タキキニン・ペプチド, Substance P と Substance K の中枢作用とその分布

高野行夫・永島　亮・波多江靖之・神谷大雄
増井治憲*・山田勝士**
(福岡大・薬・薬理, RI センター*, 医・薬理**)

〔要　約〕

最近新しく中枢における存在が認められたSubstance K （ＳＫ）の中枢作用を検討する目的でまず、ラットの運動量に及ぼす変化を調べた。中脳辺縁系と中脳皮質系のドパミンニューロンの源である腹側被蓋野（Ventral tegmental area: ＶＴＡ）の両側にＳＫを投与すると、濃度依存的(0.1 μg - 2.0 μg / side)に運動量(locomotor activity と rearing) が増加した。　他のタキキニン・ペプチドである Substance P （ＳＰ）, physalaemin, kassinin のＶＴＡ投与によっても同様に運動量の増加が認められた。　しかし、このＳＫによる運動量の増加はhaloperidol(0.1 mg/Kg, I.P.)によって抑制された。次に、脳内のＳＫ量の分布を調べる目的で、ＳＫの特異的抗体を作成し、ＳＰ量の分布とも比較した。　その結果ＶＴＡを含めてＳＫは脳内に広く分布しており、ＳＰの分布とほぼ一致する傾向を示した。すなわち黒質が最も高く、脚間核、外側視床下部、孤束核、手綱核、脊髄背側部で高い値が示された。　以上の結果はＳＫが脳内に存在し他の神経系と関与して生理的役割をはたしている可能性を示唆している。

Key word : Substance K, Substance P, Ventral tegmental area (VTA).

Substance P （ＳＰ）は中枢神経系に広く分布しており、その生理的役割が注目されているがその詳細については十分には明らかでない。　我々はＳＰの中枢作用の一つとして、延髄腹側部位から脊髄への下行性ＳＰニューロンが交感神経を介する血圧調節に重要な役割をはたしている可能性について、すでに報告した（１－６）。最近、中西らのグループによって、ＳＰには２つのタイプの前駆体が存在していることが発見され、１つはα－preprotachykinin、　他はβ－preprotachykininと命名された（７）。　そしてβ－preprotachykininにはＳＰのフラグメントと共に新しいタキキニン・ペプチドのフラグメントが見つかり、Substance K （ＳＫ）と名づけられた。
今回、我々はこれらペプチドの中枢作用を調べる目的で、中脳辺縁系と中脳皮質系のドパミンニューロンの源である腹側被蓋野（Ventral tegmental area：ＶＴＡ）にペプチドを投与し、ラットの行動変化に対する効果を検討した。さらにＳＫとＳＰの特異的抗体を作成し、これらペプチドの脳内分布を比較した。

【実験方法】

１］一般行動：　体重,217±6 ｇの雄性ラットを用い、 pentobarbital麻酔下で両側のＶＴＡにガイドカニューレを装着した。手術１週間後に各種ペプチドを１μlづつ両側のＶＴＡに投与した。一般行動はオープンフィールド法にて locomotor activity とrearing について測定した。　行動測定はすべて 8:00am - 1:00pm の時間内に一定条件下で行なった。

２］ＳＰとＳＫの定量：　ＳＰおよびＳＫを牛血清アルブミンと結合させ、　ウサギ（ New Zealand White）に免疫して抗血清を得た。　ＳＰの抗血清（ＦＰ０３）は最

終希釈１０万倍で使用可能で、ＲＩＡ最少検出量は約８pgであった。　この抗血清の関連ペプチドとの交差反応は次の通りである。physalaemin (12.1%), eledoisin (0.34%), kassinin (0.17%), SK (0.19%)。　一方、ＳＫの抗血清（ＦＫ０３）は最終希釈５万倍で使用可能で、ＲＩＡ最少検出は約１２pgであった。　この抗血清の関連ペプチドとの交差反応はeledoisin(44%), kassinin(93%)であったが、SP, physalaemin, neurotensin, TRH との交差反応は認められなかった（＜0.1%, 図１）。

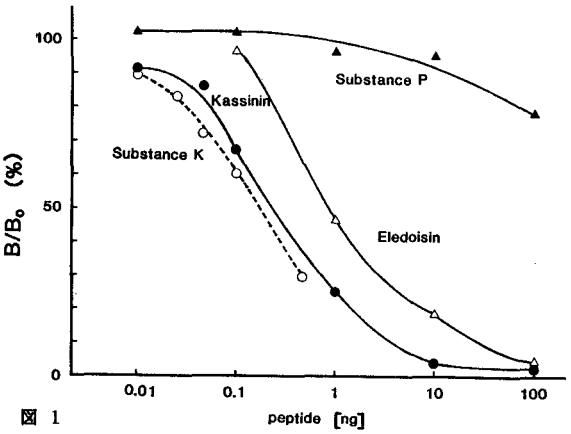


図 1

ラット脳各部位のＳＰ量およびＳＫ量は、断頭後ドライアイスですばやく凍結し、厚さ400 μmの凍結切片からmicropuncture 法にて試料を採取した後、Leemanらの方法（８）に従ってＲＩＡで測定した。

【結果】

１］一般行動；　ＳＫを両側のＶＴＡに投与すると濃度依存的に（0.1μg - 2.0μg / side) locomotor activityとrearing は増加した。　そこでＳＫに関連する各種タキキニン・ペプチドをＶＴＡに投与してラットの探索行動への効果を比較した　（図２）。　今回使用したいずれのペプチドも locomotor activityとrearing を増加させた。しかし、ＳＫやkassinin投与後の行動パターンはＳＰやphysalaemin 投与後のそれとは異なった。　さらにこのＳＫによるlocomotor activityやrearing の増加は　Haloperidol（0.1 mg / kg, I.P.）によって抑制された。

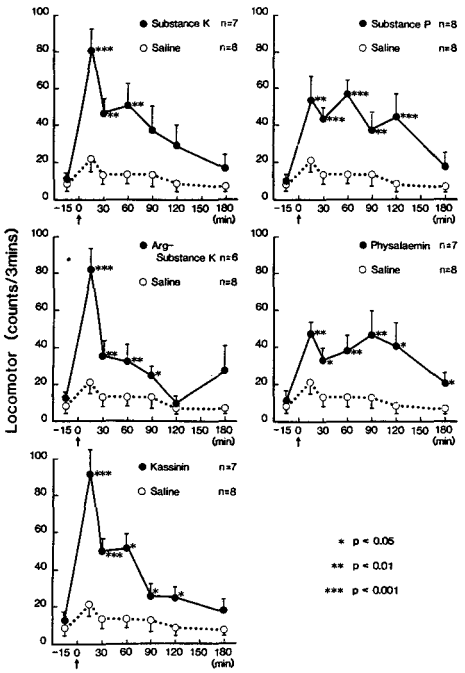


図 2

２］ＳＰ量およびＳＫ量の脳内分布：

表１に脳内各部位のＳＰ量とＳＫ量の分布を示した。　両者共、黒質が最も高い値を示し、脚間核（ＩＰ）、外側視床下部（ＬＨ）、孤束核（ＮＴＳ）、手綱核(N.habenulae), 脊髄背側部(Dorsal Horn)などが高い値を示した。　脳内でのＳＰ量と

表 1

	Substance P	Substance K	SP/SK
Frontal cortex	0.52 ± 0.07 (9)	N.D.	
Nucleus accumbens	1.97 ± 0.06 (12)	0.95 ± 0.15 (8)	2.07
Striatum			
central	1.48 ± 0.08 (11)	1.15 ± 0.35 (7)	1.29
dorso-lateral	1.00 ± 0.04 (12)	0.49 ± 0.10 (5)	2.04
Globus pallidus	1.84 ± 0.15 (10)	0.93 ± 0.17 (8)	1.98
Hypothalamus			
LH	3.23 ± 0.23 (9)	2.31 ± 0.44 (11)	1.40
VMH	2.52 ± 0.14 (9)	1.35 ± 0.20 (10)	1.87
Nucleus habenulae	6.51 ± 0.66 (11)	3.24 ± 1.10 (5)	2.01
Hippocampus	0.17 ± 0.02 (3)	N.D.	
Substantia nigra (SN)	9.64 ± 0.43 (9)	5.77 ± 0.71 (12)	1.67
Ventral tegmental area (VTA)	1.85 ± 0.29 (9)	0.93 ± 0.20 (8)	1.99
Interpedunculus nucleus (IP)	7.61 ± 0.76 (7)	2.27 ± 0.32 (6)	3.35
Raphe	4.41 ± 0.54 (4)	1.12 ± 0.22 (5)	3.94
Nucleus tractus solitarii (NTS)	7.36 ± 0.80 (6)	5.25 ± 0.74 (4)	1.40
Ventral medulla oblongata	3.63 ± 0.57 (4)	N.D.	
Spinal cord			
Dorsal horn	3.12 ± 0.35 (11)	2.17 ± 0.28 (7)	1.44
IML	1.95 ± 0.26 (5)	1.70 ± 0.13 (5)	1.15
Ventral horn	1.27 ± 0.16 (6)	N.D.	

Values are given in pg/μg protein.

ＳＫ量の分布傾向はほぼ一致しており、ＳＰのＳＫに対する比はおよそ 1.3 - 3.5 であった。

【考察】

今回の実験から、ＳＫはＳＰと同様にＶＴＡへ投与すると locomotor activity と rearing を増加させることが明らかになった。しかし、ＳＰ関連ペプチドとＳＫ関連ペプチドとの間には行動パターンに差が認められたことは興味深い。ＶＴＡには手綱核からＳＰニューロンが伸びており、さらにＶＴＡからはドパミンニューロンが中脳辺縁系や中脳皮質系領域へ終末を投射していることが知られている。ＳＫによる運動量の増加がhaloperidol によって抑制された結果と考え合わせると、ＳＫやＳＰ関連ペプチドによる運動量増加はＶＴＡにおけるドパミンニューロンの興奮のためと考えられる。しかし、脳におけるＳＫニューロンの諸性質に関しては現在よくわかっていない。そこで我々はＳＫの特異的抗体を作成し、ＳＫ量の分布を調べた。その結果ＶＴＡを含めてＳＫは脳内に広く分布していることが明らかになった。以上の結果はＳＫが脳内に存在し他の神経系、例えばドパミンニューロンと関与して生理的役割を果たしている可能性を示唆している。

－謝辞－ 本研究にあたり、ＳＫおよびそのフラグメントを合成していただいた塩野義製薬研究所の堤内正美博士、井上健博士に深謝します。本研究は文部省科研費 #59480420 、#60770186 、武田科学振興財団助成金の援助によった。

【文献】

1)高野行夫、神谷大雄、Loewy,A.D., 神経化学、 23 (1984) 400 -402.
2)Takano,Y., Martin,J.E., Leeman,S.E. and Loewy,A.D., Brain Res. 291 (1984) 168-172.
3)Takano,Y. and Loewy,A.D., Brain Res. 311 (1984) 144-147.
4)Takano,Y. and Loewy,A.D., Brain Res. 333 (1985) 193-196.
5)Takano,Y., Sawyer,W.B. and Loewy,A.D., Brain Res. 334 (1985) 105-116.
6)Takano,Y., Sawyer,W.B., Sanders, N.L. and Loewy,A.D., Brain Res. 337 (1985) 357-361.
7)Nawa,H., Hirose,T., Takashima,H., Inayama,S. and Nakanishi,S., Nature,306(1983)32-36.
8)Mroz,E.A. and Leeman,S.E., Substance P, Academic Press (1979) 121-137.

150. ラット胎児脳初代培養におけるアストログリアの neuronotrophic および maturation 効果について

吉田一成*・高坂新一・大谷光弘*・戸谷重雄*・塚田裕三
(慶応大・医・生理，脳外科*)

〔要　約〕

ラット胎仔脳を二次培養して得られるアストログリアを feeder として，ラット胎仔脳由来のニューロンと coculture を行ない，アストログリアのニューロンに対する影響を観察した。ラット胎生15日大脳半球をトリプシン処理し，poly−L−lysine でコーティングした（feeder(−)），あるいはアストログリアを単層培養した（feeder(+)）カバースリップ上で11日間培養した。ニューロンの生存率は，いずれの場合も細胞密度に依存したが，単層グリア上では著明に上昇した。培養2日目から6日間，培養液中に ^{3}H−Thymidine を添加し，標識されたニューロンの比率をオートラジオグラフィーで検定した。Feeder(−)で13−16％，feeder(+)で5−8％のニューロンがラベルされており，明らかな有意差が認められ，アストログリアが neuronal precursor cell の分裂を抑制していることが示唆された。また，位相差顕微鏡による経時的観察により，feeder(+)で神経突起の進展促進効果が認められた。これらのニューロンの生存，分化に対する効果は神経成長因子（NGF）には認められなかった。アストログリアの conditioned medium ではわずかにニューロンの分裂が抑制されたが，trophic effect は観察されず，ニューロンとグリアの接触が重要な意義を持つことが示唆された。

Key word：cell culture, neuron−glia interaction, maturation

中枢神経系の発生・分化に於いて，ニューロン―グリアの相互作用が重要な役割を果たしていると考えられる。我々は，ラット胎仔脳を継代培養して得られる，アストログリアを feeder とし，ラット胎生15日大脳半球のニューロンを培養し，グリアの neuronotrophic および maturation effect について若干の知見を得たので報告する。

（実験方法）

グリア細胞の培養及び保存：ラット胎生18日大脳半球をステンレスメッシュ（pore size 150μm）により分散，5×10^{6}個／flask の細胞を15％ FCS，6g／ℓ glucose，1mM glutamine，0.5g／ℓ $NaHCO_3$，40mg／ℓ gentamicin を含む Eagle's MEM を用い，poly−L−lysine でコーティングしたコーニング25mℓフラスコで14日間培養，さらに14日継代培養後，0.25％トリプシン・0.02％ EDTA 処理し（37℃，1 hr），10％ DMSO−90％ FCS に浮遊し凍結保存した。この方法で得られる細胞は，90％以上が，GFAP 陽性であり，neurofilament（NF）陽性細胞は認められなかった。

初代培養：ラット胎生15日大脳半球を，ステンレスメッシュ（pore size 250μm）に通した後，0.1％トリプシン処理（37℃，30min）により分散，さらに pore size 150μm ステンレスメッシュに通し，細胞を単離した。グリア細胞を7日間単層培養した径18㎜カバースリップ（feeder(+)），あるいは poly−L−lysine でコーティングしたカバースリップ（feeder(−)）をコーニング12ウエルプレートに入れ，$2-20\times10^{5}$個／2mℓ medium／well の細胞数で，隔日に培地を全量交換し，11日間培養した（37℃，5％ CO_2）。

形態観察：位相差顕微鏡による形態観察は経時的に行なった。

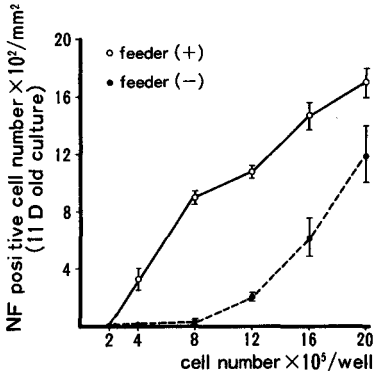
ニューロンの算定：培養細胞を，4％パラホルム，および5％酢酸・90％メタノール

で固定後，Labsystem社抗Neurofilament (NF)抗体を用い間接酵素抗体法で染色し，顕微鏡下で1㎟中のNF陽性細胞数を10箇所計測し，生存したニューロン数を推定した。

オートラジオグラフィー：培養開始翌日から6日間，0.01μCi／mℓ ^{3}H−Thymidine (^{3}H−Thd)を添加した。NF免疫染色後，エマルジョン（サクラNR−M2）を塗布，4℃，28日間露光後，現像した。顕微鏡下で，3㎟中のNF陽性細胞，およびNF，^{3}H−Thd二重標識された細胞数を計測し，分裂したニューロンの比率を推定した。

NGFおよびCMの効果：feeder㈠で，8×10^{5}，16×10^{5}個／wellの細胞数で，神経成長因子（NGF，50ng／mℓ），グリア細胞のconditioned medium（GCM；15％FCS・MEMで3日間培養後，0.22μm Milipore filterで滅菌したものを0.8mℓ添加），feeder㈩では，8×10^{5}個／wellの細胞数で，ウサギ抗NGF血清（āNGF；1,000倍希釈），正常ウサギ血清（NRS；1,000倍希釈）を添加しその効果を検定した。

Fig. 1



（結　果）

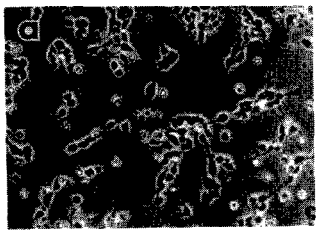
ラット胎生15日大脳半球dissociation cultureにおける，11日後のニューロンの生存率は細胞密度に依存するが，feeder㈩ではfeeder㈠に比し，著明に生存率が上昇した（Fig. 1）。feeder㈩とfeeder㈠におけるニューロンの形態変化を位相差顕微鏡により経時的に観察した。培養開始1，6時間後では明らかな差は見られないが，24時間後では，feeder㈠では，ニューロンは，一部aggregateし，neuriteは余り進展していないが（Fig. 2a），feeder㈩ではニューロンはグリアに接着し，その多くが長いneuriteを有していた（Fig. 2b）。feeder㈠では，細胞密度に関わりなく，NF陽性細胞の13−16％が^{3}H−Thdで標識された（Table 1）。^{3}H−Thdで標識された典型的ニューロンをFig. 3に示した。ところが，feeder㈩では，^{3}H−Thdで標識されるNF陽性細胞は，5−8％であり，feeder㈠に比し，有意に減少していた

Table 1

cell number (^{3}H-Thd labelled cell/NF positive cell(%))		
(x10^{5}/well)	feeder(-)	feeder(+)
2	(-)	(-)
4	(-)	6.0 ± 1.6
8	15.4 ± 19.2	4.6 ± 2.6
12	16.3 ± 7.0	7.6 ± 1.6
16	15.0 ± 3.7	6.3 ± 2.6
20	12.9 ± 2.5	4.6 ± 1.9

mean ± S.D.

Fig. 2



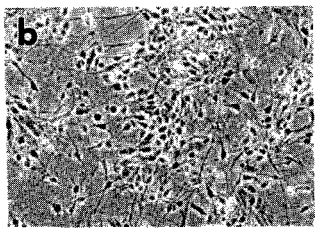
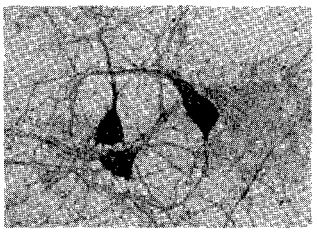


Fig. 3



($p<0.01$;Table 1)。

feeder (−)で，NGFはニューロンの分裂，生存に影響を与えなかった(Table 2)。GCMは，ニューロンの生存に与える効果は見られなかったが，^{3}H−Thdで標識されるNF陽性細胞の比率は減少傾向が見られた($p<0.1$; Table 2)。feeder (+)では，aNGF，NRSともに，ニューロンの生存分裂には影響を与えなかった(Table 2)。

Table 2

	NF positive cell (No/mm^2)	%^{3}H-Thd labelled cell
feeder(+) 8x10^{5}cells/well		
None	1,257 ± 73	6.7 ± 2.1
aNGF (x1,000)	1,362 ± 109	5.3 ± 2.0
NRS (x1,000)	1,305 ± 179	6.4 ± 2.3
feeder(-) 16x10^{5}cells/well		
None	764 ± 191	16.3 ± 6.2
NGF (50 ng/ml)	793 ± 170	14.8 ± 4.0
GCM (40%)	803 ± 199	11.0 ± 5.9
feeder(-) 8x10^{5}cells/well		
None	10 ± 9	
NGF (50 ng/ml)	11 ± 5	
GCM (40%)	11 ± 9	

mean ± S.D.

(考　案)

種々の成長因子，細胞接着因子が，細胞の分化に重要な役割を果たしていることが，最近明らかにされつつある。中枢神経系のニューロンに作用する因子の効果の判定は，主に，neurite−promoting, short term survivalを基準として行なわれており，種々のtissue extract，グリア細胞，筋細胞等のCMに活性物質が含まれていることが知られている[2),4),6),7),8)]。また，加藤らは[3)]，ラット胎仔脳を継代培養して得られるグリア芽細胞のCM中に，neuroblastomaの細胞分裂を抑制し，突起進展を促す因子(NGIF)を見いだし，その部分精製を行なっている。中枢神経系ニューロンの生存，分化には神経系固有の間質であるグリアが，重要な役割を担っていると考えられる。最近，ラット胎仔脳由来のneuronal cellがin vitroでも分裂することが報告された[1),5)]。我々はアストログリアをfeederとし，未だグリアが分化していない胎生15日大脳半球由来のニューロンをco cultureすることにより，グリアのニューロンに対する作用の検討を行なった。単層培養されたアストログリア上では，neuronal precursor cellの分裂の抑制，neuriteの進展の促進，および生存率の上昇が認められた。GCMではneuronal precursor cellの分裂がわずかに抑制されたものの，11日間の比較的長期培養下でのニューロンの生存率には改善は見られなかった。GCMがneuronotrophic effectを有することは，多くの研究者により明らかにされているが，今回の実験結果からニューロンの長期生存にはグリアとの接触がより重要な役割を果していることが示唆された。neuronal cellの分裂をわずかに抑制するGCMの効果はNGFとは異なるparacrine typeの成長因子によっているのかもしれない。

謝辞：初代培養にあたり，御指導，御助言いただいた東邦大学医学部生理学教室平野修助，阿相皓晃両先生に深謝いたします。実験に御協力いただいた仁井誠治，出井健之，上敷領由紀子三氏に感謝いたします。

REFERENCES
1) Asou H, Iwasaki N, Hirano S, et al. (1985) Brain Res. 332, 355-357
2) Banker GA. (1980) Science 209, 809-810
3) Kato T, Sakazaki Y, Yamakawa Y, et al. (1982) Develop. Brain Res. 645-357
4) Kato T, Yamakawa Y, Sakazaki Y, et al. (1982) Develop. Brain Res. 596-601
5) Kriegstein A, Dichter MA. (1984) Brain Res. 295, 184-189
6) Müller HW, Seifert W. (1984) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81, 1248-1252
7) Lindsay RM. (1979) Nature 282, 80-82
8) Varon S, Skaper SD, Barbin G, et al. (1984) J. Neurosci. 4, 654-658

151. 培養毛様体神経節ニューロンに働く神経突起伸展因子
－免疫化学・免疫組織化学的研究－

林　要喜知・三木直正　　（金沢大・がん研・薬理）

〔要　約〕

培養ニワトリ毛様体神経節(CG)ニューロンに働き、神経突起伸展を著明に誘導する因子（神経突起伸展因子、NOF）をニワトリ砂のう平滑筋組織より精製し、ウサギ抗NOF血清および、マウス抗NOFモノクロナル抗体を用いて、免疫化学的および免疫組織化学的にNOFの諸性質を調べた。

1）砂のうNOFは、SDS-PAGE（非還元条件下）では、分子量約700KDaの糖蛋白質であり、等電点（pI）5.1、ストークス半径、113 Å、S値12を示した。CGニューロン(8日齢胚）に対し、3.45 femto moles /cm^2 で著明な突起伸展を誘導した。

2）抗NOF血清を用いて組織化学を行うと、NOFの大部分が、砂のう平滑筋細胞間隙に存在することが明らかとなつた。この細胞間隙の染色は、心筋、骨格筋、肝臓あるいは、CGで認められたが、大脳、小脳、あるいは網膜では、認められなかつた。

3）NOFに対するモノクロナル抗体（３種：5F4、5A10および5F12）は、すべてIgG1（κ鎖）であり、イムノブロット分析において、NOF分子とのみ特異的に反応した。これらは、NOF分子を吸着するが、NOFの生物活性を全く阻害しなかつた。5A10や5F12による組織化学では、抗NOF血清と同様な結果が確認された。

Key word：　Neurite outgrowth factor, Monoclonal antibody, Extracellular matrix protein

末梢ニューロンの突起伸展は、ニューロンが接触し得る非ニューロンの膜表面、あるいは細胞間隙に存在する分子により誘導されると、今日考えられている。突起伸展の誘導因子については、現在までに幾つかのCandidatesが報告されている(2,7)。その１つとして、基底膜構成成分の、非コラーゲン性糖蛋白質であるラミニンが、最近注目されている(8)。我々は、先に培養ニワトリ副交感神経節ニューロンの突起伸展を著明に誘導する糖蛋白質（神経突起伸展因子、NOF）がニワトリ砂のう平滑筋に存在することを見い出し、これを精製し報告した(5)。今回、精製NOF標品を用いて、その物理化学的諸性質を調べるとと共に、ウサギ抗NOF血清、およびマウス抗NOFモノクロナル抗体を作製し、免疫化学的、および免疫組織化学的検索を行った。

［方法］

NOFは、成体ニワトリ砂のう抽出液より、培養毛様体神経節(CG)ニューロンの突起伸展反応を指標にして精製した。抗NOF血清は、精製NOF標品(1mg protein /ml）をフロイント完全アジュバントと混和したものを抗原とし、ウサギで作製した(4)。抗血清を用いた免疫組織化学は、ニワトリ胚(8－19日齢）より得た各組織の凍結切片あるいは初代培養細胞をZamboni液で固定し、Coonsの間接蛍光抗体法にて染色した(1)。抗NOFモノクロナル抗体の作製は以下の様に行った。BALB/Cマウス（♀）あたりNOF蛋白質100 μg を完全アジュバントと共に腹腔内に注射し、その後２週間ごとに２回、NOF蛋白質のみを腹腔内に注射した。最終ブースターの３日後、NS-1ミエローマ細胞と47% PEG（分子量約4,000)で細胞融合し、HAT培養液でハイブリドーマを得た。抗NOF抗体産生ハイブリドーマの検定はELISA法およびイムノブロット法(9)

により、HRP 結合ヤギ抗マウスIgG(H+L)を用い、ジアミノベンチジン（あるいは o-フェニレンジアミン）を発色基質として検出した。モノクロナル抗体による免疫組織化学は藤田の方法(3)に従った。サブクラスの決定はザイメット社のMonoAb-ID EIA kit を用いて行った。モノクロナル抗体による抗原の吸収は、Wewer らの方法(10)に従った。

［結果と考察］

NOF の物理化学的性質：砂のう抽出液より精製したNOF 分子の諸性質を表１に示した。SDS-PAGE(3－15%)による分子量は、非還元条件下で約700KDa、還元条件下で200KDaの単一バンドを示した。ショ糖密度勾配遠心法により、12S と推定された。Sepharose CL-6B （あるいは4B）ゲルロ過法によるストークス半径は113Åであり、アガロース(0.6%)等電点電気泳動法により、pI＝5.0 －5.2 （平均5.1 ）と推定された。ゲルロ過法により、Native NOF分子サイズが、1,200 －1,800 KDa の範囲にあると考えられた。これらのことより700KDaの 2－3 量体の可能性が示唆されるが、糖蛋白質で S値が比較的小さいこと、ストークス半径が大きいことより、線状構造を持つことが予想される。正確な分子構造については、更に検討する必要がある。精製NOF分子は培養CGニューロン（８日齢）の突起伸展を用量依存的に誘導した。最大突起伸展反応の50% を引き起こすNOF 量は、3.45 femto moles/cm^2であった。

抗NOF 血清による組織化学：抗ウサギNOF 血清の抗原特異性を調べるために、イムノブロット分析を行った（図１－ａ）。抗NOF 血清は、700KDaのNOF 分子とのみ反応し、砂のう抽出液の他の蛋白質とは反応しなかった。マウスラミニンとも一部交叉反応を示した。この抗血清で、１９日齢ニワトリ胚より得た砂のう平滑筋（図２－ａ）骨格筋（図２－ｂ）、ＣＧ（図２－ｃ）、心筋、および肝臓等を免疫組織化学的に染めだした所、どの組織も細胞間隙（あるいは細胞外表面）が著しく染色された。しかし中枢神経系（大脳、小脳あるいは網膜）は、ほとんど染色されなかった。以上よりNOF は、末梢組織に多い Extracellular matrix protein の一つと考えられた。次に、抗NOF 血清による活性阻害を調べたところ、抗NOF 血清は砂のうNOF の生物活性を阻害したが、マウスラミニンの作用を抑制しなかった。しかし、抗血清による抗原吸着実験を行った所、抗NOF 血清は、両蛋白質を吸収したが、NOF の吸収効率がラミニン分子の吸収に比べて30－60倍良好であった。これらのことより、NOF とラミニン分子は、一部共通な抗原性を持っていることが示唆された。一方、抗ラミニン血清を用いたNOF とラミニンの活性阻害及び吸収は、全く逆の傾向を示した。

抗NOF モノクロナル抗体の作製：180 種ハイブリドーマより、ELISA 法およびイムノブロット法を用いて、３種の抗NOF モノクロナル抗体産生細胞が検出された。これらより得られたモノクロナル抗体(5A10, 5F4, 5F12) はすべてIgG1 （κ鎖）サブクラスであった。5A10のイムノブロット法の結果を図１－ｂに示した。5A10は、NOF 分子に対応する700KDa蛋白質とのみ特異的に反応した。図３は、5A10による活性NOF 吸着の結果を示した。しかし３種のモノクロナル抗体は、どれも、NOF の生物活性を阻害しなかった。また、5A10、および5F12を用いて免疫組織化学を行ったところ、砂のう平滑筋細胞やCGニューロンの細胞外表面（あるいは細胞間隙）が染色され、ほぼ、抗NOF 血清を用いた結果と一致した。現在、モノクロナル抗体を用いて、更に詳細に

NOF とマウスラミニンとの相違あるいは、活性部位を調べるためにNOF 分子のプロテアーゼ限定分解産物の解析を検討中である。

表1　NOF の物理化学的性質。

Molecular weight (kDa)	
non-reducing conditions	700
reducing conditions	210
Sedimentation coefficient	
($S^0_{20,w} \times 10^{-13}$ s)	12
Stokes radius (Å)	113
Isoelectric point (pI)	5.1
ED_{50} for neuritic response	
(femto moles/cm^2)	3.45

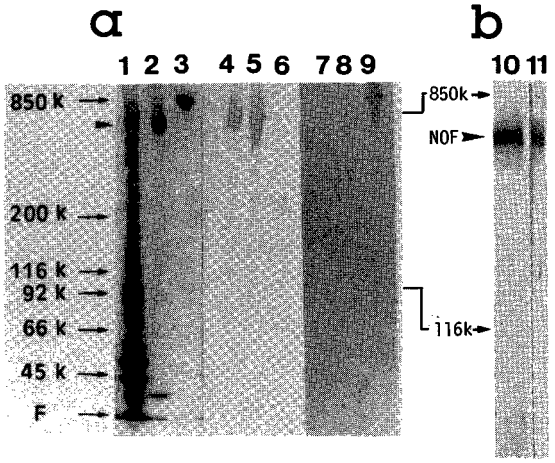
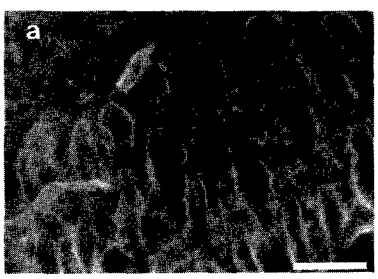


図1　ニワトリ砂のう抽出液中のNOF に対する、抗NOF 血清(lane 4,5,6)、抗ラミニン血清(lane 7,8,9,) およびモノクロナル抗体5A10(lane 11) のイムノブロット。lane 1,2,3及びlane 10 はCoomassie Blue 染色。lane 1,4,7；砂のう粗抽出液。lane 2,5,8,10,11；部分精製NOF 標品。lane 3,6,9 ；マウスラミニン。



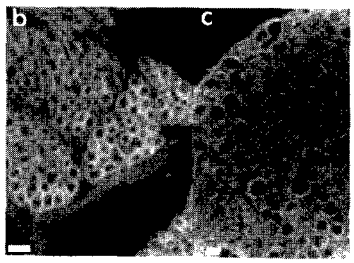


図2　ニワトリ19日齢胚砂のう(a)、骨格筋(b)、及びCG(c) の抗NOF 血清による染色像。Scale は20μm。

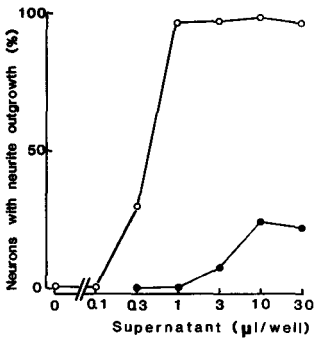


図3　モノクロナル抗体(5A10)によるNOF 吸収。NOF(1 μg 蛋白質) を5A10(10 μg) 或いはマウスIgG (10 μg) と反応(37 ℃、3h) させたのちprotein A-Sepharose に吸着させ、上清中のNOF 活性を測定した。

[謝辞] 抗マウスラミニン血清を分与下さった筑波大・林正男博士に感謝致します。

[文献]

1) Coons, A. H. (1958) in General Cytochem. Methods (Danielli, J. F.,ed) pp. 339-435. 2) Evercooren, A. B.-V. et al. (1982) J. Neurosci. Res., 8, 179-193. 3) 藤田 忍 (1983)生体の科学,34, 474-478. 4) Hayashi, Y. et al. (1984) J. Neurochem., 42, 504-512. 5) 林 要喜知. 三木直正(1984)神経化学,23, 267-269. 6) Miki, et al. (1981) J. Neurochem., 37, 627-633. 7) Rogers, S. L. et al. (1983) Dev. Biol., 98, 212-220. 8) Sanes, J. R. (1985) Nature, 315, 714-715. 9) Towbin, H. et al. (1979) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 76, 4350-4354. 10) Wewer, U. et al. (1983) J. Biol. Chem., 258, 12654-12660.

152. 脳内における神経成長因子

天野武彦　　(三菱化成・生命研・脳神経化学)

〔要　約〕

マウス顎下腺由来の神経成長因子(NGF)に対するモノクロナル抗体を用いて次の結果を得た。

1)NGFの生物活性を抑制するNGFに対するモノクロナル抗体10B-6はラット脳内に局在を示さないが、障害脳の再生過程ではアストロサイトにのみ局在が出現する。

2)10B-6はラット障害脳100,000g、60分のホモジネート上清の2次元電気泳動において等電点9.0付近、分子量16,000にC6i24dモノクロナル抗体と抗原スポットの一致が見られた。

3)グリア細胞の神経細胞に対する生存効果をグリア細胞C6の分泌蛋白に対するモノクロナル抗体C6i24dハイブリドーマは抑制した。

以上の結果より、NGF様分子が哺乳類脳内に存在し、グリア細胞によって産生されている事を強く示唆する。

Key word :　Brain, Nerve growth factor, glia cell

神経成長因子(NGF)の末梢神経に対する作用はR.Levi-Montalcini以来確立しているが(7)、中枢神経におけるNGFの存在は不明で、未だ確立されていない。中枢の培養神経細胞に対してNGFを与えるとcholine acetyltransferase(CAT)活性の増加が報告されているが(6)、脳内においてNGFが作用するとすれば、NGFは高分子で血液関門を通過しないと考えられるので、脳内におけるNGFの存在及び産生が予想される。中枢のグリア細胞は神経細胞に対する作用の一つとして、trophic factorが知られている(1,3,9)。我々はこの問題に対してNGFに対するモノクロナル抗体を作成し脳内における存在を追求した。この研究は一部、昨年神経科学学術集会において報告した。

〈実験方法〉

モノクロナル抗体はミエローマ細胞としてP3U1細胞を用い、BALB/c脾細胞10 にNGF (Collaborative Research)を1μg/mlの濃度でAdjuvant peptideと共に20分間作用させた後、マウス胸腺細胞のConditioned mediumと1:1に混合したDME:F12(1:1)の20%胎児牛血清(FCS)で5日間培養後、脾細胞を集め、P3U1:脾細胞1:2の割合で50%ポリエチレングリコール(#1500、和光)で細胞融合された後、HAT mediumで融合細胞を得た。得られたハイブリドーマは免疫組織学的にAnti-mouse IgG-FITCで局在するものを捜すと共に、Levi-Montalciniの方法に従って鶏化8日卵の脊髄神経節を用いてNGF 1ngとハイブリドーマ上清存在下で生物活性を調べた。免疫化学的にはpH4.0でC57BL顎下腺より抽出した100,000g、60分の上清を用いてSDS一次元電気泳動(PAGE)を行ない、展開した蛋白をニトロセルローズ膜に電気泳動的に転写し(富士理研)、ハイブリドーマ上清と4℃で18時間作用させた後アビジンビオチンを用いたパーオキシダーゼの発

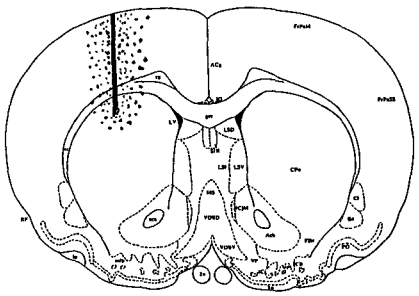


図1 ラット脳刺創のアストロサイトに出現する10B-6抗体の反応

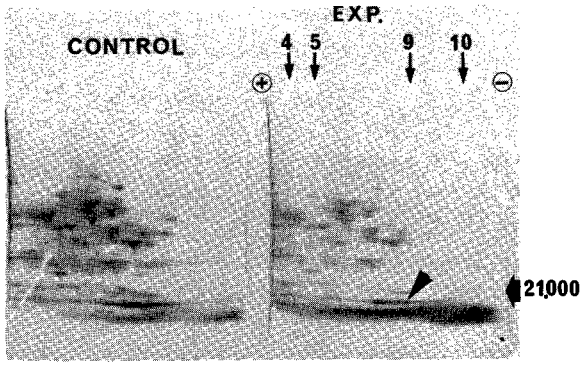


図2 ラット脳ホモジネート上清の二次元電気泳動。一次元は+と−を逆さにして泳動した。三角矢印はゲル染色像におけるスポットの位置、長い矢印はニトロセルローズ膜に蛋白をブロットした時の抗体の反応部位。

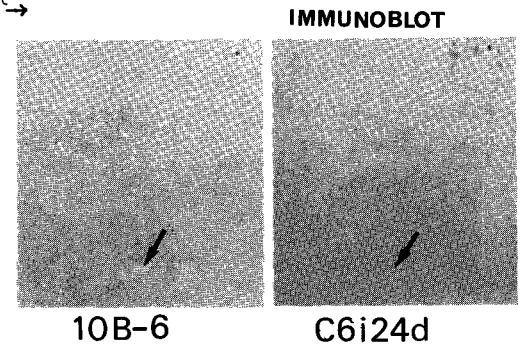


Table 1. Biological Activities of C6 Conditioned Medium

	Neuronal Survival	Inhibition of NGF Action
C6CM	+	−
10B-6	−	+
C6i24d	−	−
C6CM/10B-6	+	+
C6CM/C6i24d	↓	−

色によって調べた。二次元電気泳動法は真鍋らの方法によって行ない(8)、同じくWestern Blottingによりニトロセルローズ膜に転写したものを用いて抗原の局在を調べた。ラット脳の障害実験ではネムブタール麻酔後、頭蓋骨に正中線より外側約3mm、Bregmaより前方1mmの部位に外科用ドリルで孔をあけ、表面より垂直に約4mmの刺創をつくりスポンゲルで止血後縫合し、回復したラット脳を7日、14日、21日に取りだして組織学的に検索、あるいはホモジネートを用いて二次元電気泳動後Western Blottingを行ない、ビオチンストレプトアビジン-β-ガラクトシダーゼの発色で抗原の局在を調べた。神経細胞を培養48時間行ない神経細胞の生存に対する影響を測定した。培養液はインシュリン10μg/ml、トランスフェリン50μg/ml、Selenium 2nM、linoleic acid/BSA5μg/ml(molar ratio2:1)、ハイブリドーマEthanolamine 20nM、gulucose 3.5 g/l、glutamine 2mM、Vitamin(Gibco)を加えた(3,4)。培養プラスチックはpoly-L-ornithine又はpoly-L-lysine 0.02mg/mlで24時間コートしたものに、更に無血清培養したRN22細胞の無血清のConditioned mediumで24時間コートしたものを用い、24、48時間後位相差顕微鏡写真をとり生細胞と死細胞を測定した。CAT測定はFonumの方法を用いた。

〈実験結果〉

既に報告した如くNGFに対するハイブリドーマは3つのグループに分けることができた。1)ニワトリ脊髄神経節のNGFによる神経突起の伸長を抑制するもの2)グリア細胞に局在するもの3)神経細胞に局在するもの。3つのグループ共に一次元電気泳動で分子量28,000、50,000に局在した。更に二次元電気泳動でハイブリドーマ10B-6グリア細胞

C6の分泌蛋白に対するハイブリドーマ抗体C6i24dは、等電点9.0付近、分子量16,000にスポットをラット障害脳ホモジネート100,000 x g、60分の上清の二次元電気泳動においてβ-ガラクトシダーゼ発色で検出した(図2)。生物活性を抑制するハイブリドーマ10B-6はアセトン固定、パラホルムアルデヒド固定ラット脳の切片において、脳内に局在を示さないが、ラット脳に刺創を与えると1週間目より刺創周辺のアストロサイトにのみ局在反応の出現が見られ少なくとも21日まで増加した(図1)。CAT活性には上昇はみられなかった。NGFに対するモノクロナル抗体が認識する抗原蛋白の神経細胞の機能に与える作用については現在未だ不明であるが間接的にグリア細胞の神経細胞に対する作用で検討した。基本的にはS. Varonらのミクロ培養法、Poly-L-ornithine RN22のconditioned medium (RN22CM)、ハイブリドーマ上清を用いたが培養液、RN22CM C6CMハイブリドーマの培養等はすべて無血清の培養法を用いた。ラット胎児脳15日由来の神経細胞の無血清培養系にコントロール培養C6CM:培養液(1:1)をあるいはC6CM 25%:ハイブリドーマ上清25%:培養液50%で、C6i24dは培養神経細胞の生存に対するC6CMの効果を抑制した(50%以上)。この実験系におけるCAT活性に対する効果については検討中である(Table 1)。

〈この研究の問題点〉

10B-6の認識する抗原分子は未だ分離精製に至っていない。免疫化学的方法は有用であるが抗体の認識部位はアミノ酸数個によって決定される。in vitroの感作によって作られたNGFに対するモノクロナル抗体はすべてIgMで抗原体反応もIgGとは異なることが考えられる。NGFとモノクロナル抗体との結合については未だ決定的な結果が得られていない。抗NGF抗体10B-6はNGFの生物活性を抑制しポリクロナル抗体とよく似ているが抑制作用は弱くポリクロナル抗体と比較して希釈1/10までしか作用はみられない。グリア細胞の分泌する因子と同一かどうかは免疫化学的方法によって共にアミノ酸配列等蛋白化学の方法によって決定しなければならないと考える。10B-6がC6CMの神経細胞の生存に影響を与えないことはグリア細胞のTrophic factorとNGFの作用点は異なることが予想される。

〈文献〉

1)Amano, T. et al. Exp. Cell Res. 85, 399 (1974)
2)天野、小島、第8回神経科学学術集会、(1984)
3)Barbin, G.I., Selak, M., Manthorpe and Varon, S. Neuroscience 12, 33 (1984)
4)Barnes, D. and Sato, G. Anal. Biochem. 102, 255 (1980)
5)Fonum, F. J. Neurochem. 24, 407 (1975)
6)H. Gnahn et al. Dev. Brain Res., 9, 45 (1983)
7)Levi-Montalcini, R. and Angeletti, P.V. Physiol. Rev. 48, 534 (1968)
8)真鍋、高橋、奥山、免疫実験操作法p.3807 (1985)
9)Nieto-Sampedro, M. et al. Science, 217, 860 (1982)

153. 心臓細胞条件培養液中の神経突起成長因子の特性

山本亘彦　（大阪大・基礎工・生物工学）

〔要　約〕

種々の細胞の条件培養液中に存在する因子が，ポリオルニチンを塗布した培養皿基壁に接着して，培養神経細胞の突起成長を促進することが知られている(1,2)。この神経突起成長を促進する因子（Substrate conditioning factor, ＳＣＦ）をニワトリ胚の心臓細胞条件培養液（heart-cell conditioning factor, ＨＣＭ）から硫安，ＤＥＡＥセファロース，ハイドロキシルアパタイトを用いて部分精製した。その結果，ＳＣＦは10,000倍以上精製され，高い負電荷をもった糖タンパクであることがわかった。部分精製したＳＣＦをＳＤＳ電気泳動（βメルカプトエタノールを含む）によって分析すると，分子量330-400K,360K,220-240Kの３つの主バンドが検出された。これらのバンドは，心臓細胞が合成するポリペプタイドを^{35}Ｓメチオニンで標識したとき，放射能活性を示した。一方，βメルカプトエタノールを含まない条件で電気泳動したところ，これらのバンドは消失して新たに分子量 100万以上の領域にバンドが出現した。また，ゲルろ過によってＳＣＦの分子量は数百万であった。これらの結果から，ＳＣＦはＳ－Ｓ結合を含む複合体であると考えられる。

Key word :　neurite, conditioned medium, substratum

実験方法

心臓細胞条件培養液（ＨＣＭ）　9-10日目ニワトリ胚の心臓細胞を10%牛胎児血清を含むEagle's minimum essential medium （ＭＥＭ）中で培養して，3-4日目ごとに条件培養液（ＣＭ）を集めた。心臓細胞の放出するタンパクを標識するためには，^{35}Ｓメチオニンを含む培養液中で心臓細胞を培養した。

ＳＣＦの精製　ＨＣＭに硫安を40%飽和度になるように加えて，生じた沈澱を 0.1M NaCl,10mM リン酸ナトリウム（pH7.4 ）で溶解，透析後，ＤＥＡＥセファロース（DEAE Sepharose CL-6B）カラムに添加した。 0.4M NaClでカラムを洗った後，ＳＣＦは 1.0M NaClで溶出された（ＤＥＡＥ分画）。次にＤＥＡＥ分画をハイドロキシルアパタイトカラムに添加して，リン酸ナトリウム溶液の直線濃度勾配（5-200 mM）によって溶出を行なった。

ゲルろ過及びwheat germ lectin への結合　ＳＣＦの分子量を推定するためにゲルろ過カラム（Sepharose CL-4B ）を用いた。糖鎖が含まれているかどうかを調べるためにwheat germ lectin カラム（wheat germ lectin Sepharose 6MB）を用いた。

バイオアッセイ　培養皿をポリオルニチンで塗布した後，各精製段階の分画を加えて 12-24時間放置した。（この間にＳＣＦは培養皿表面に接着する。）溶液を捨て，ＭＥＭで洗った後，10－12日のニワトリ胚後根神経節（ＤＲＧ）の細胞を培養した（dissociated cell culture)。６時間後に固定し，培養皿ごとに任意に選ばれた 100個のニューロンの中で神経突起をもっているものの数を数えた。神経突起成長の活性，即ちＳＣＦ活性は，その百分率によって表わされた。

SDS電気泳動とフルオログラフィー　SDS電気泳動はLaemliの方法を用いた。但し，濃縮ゲルは 3%，分離ゲルは 5%と15%の2種類が用いられた。 5%，15%のゲルによって，各々分子量10^5 － 1.2×10^6，10^4 － 2×10^5 の範囲を示すことができた。泳動後ゲルはCBBによって染色した。フルオログラフィーのためには，泳動後ゲルの固定に引き続いてフルオログラフィー用増感剤に浸した。次にゲルを乾燥させた後，X線フィルムに密着，感光させた。

結果

SCFの精製

SCFは40%飽和度の硫安によって沈澱した。さらにSCFはDEAEセファロースに中性かつ低イオン強度で吸着して、高い負電荷を持つ物質として溶出された。SCFは数千倍濃縮され、DEAE分画の主な成分は分子量10万以上のポリペプタイドであった（図1－①）。DEAE分画はさらにハイドロキシルアパタイトカラムに添加された。このカラムから溶出された最も活性の強い分画（HA分画）を用いて、SCF活性に対するdose-response カーブを求めると（図2）、有効濃度（最大の半分の効果を得るのに必要なタンパク濃度）は、 0.28 $\mu g/m\ell$であった。この段階で10,000倍以上の精製度が得られた。HA分画の電気泳動のプロフィールは、DEAE分画のそれに似ていたが（図1－②）、相対的な染色強度は異なっていた。そこで、どのポリペプタイドがSCF活性に必要なのかを調べるために、ハイドロキシルアパタイトカラムから順次溶出された各分画のSCF活性とその分画に含まれるバンドの染色強度（デンシトメーターによって測定）が比較された。その結果、分子量330-400K，360K 220-240Kの3つのバンドがSCF活性と相関があった。

SCFの特性

SCF活性は90℃3分の熱処理及び、トリプシンによって失活した。従ってSCFはタンパクである。DEAE分画を wheat germ lectinカラムに添加すると、SCFはそれに吸着したが、Nアセチルグルコサミンによって溶出された。このことは、SCFが糖鎖をもっていることを示している。また、DEAE分画をゲルろ過カラムに添加して分子量の推定を行った。SCF活性は分子量数百万に対応する分画に現れた。

^{35}Sメチオニン標識HCMによる分析

^{35}Sメチオニンを含む培養液中で心臓細胞を培養した。得られたHCMは硫安、DEAEセファロースによって分画され、SCF活性を調べると共に、SDS電気泳動によって

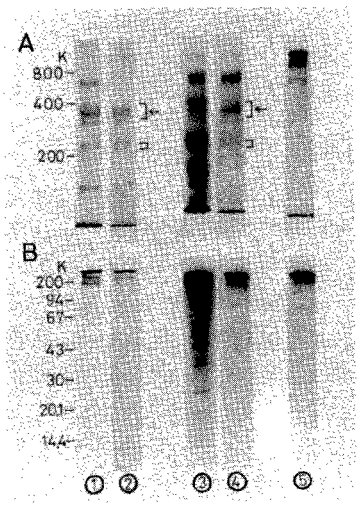


Fig. 1 SDS-gel electrophoresis of partially purified SCF
A, 5% gel. B, 15% gel.
①,② stained with CBB.
③,④,⑤ fluorography.
①,②,③,④ with β-mercaptoethanol.
⑤ without β-mercaptoethanol.
① DEAE fraction. ② HA fraction.
③ $(NH_4)_2SO_4$ fraction.
④ DEAE fraction. ⑤ DEAE fraction.

心臓細胞の合成ポリペプタイドを分析した。硫安分画には多くの標識されたポリペプタイドが含まれていたが（図１－③）、ＤＥＡＥ分画の主な成分は620-680K, 330-400K, 360K, 220-240Kの標識されたバンドとして現れた（図１－④）。この結果は上述のＳＣＦ活性と相関のあったポリペプタイド（分子量330-400K, 360K, 220-240K）が全て心臓細胞によって合成されたものであることを示している。ＤＥＡＥ分画をβメルカプトエタノールを含まない条件で電気泳動すると、分子量10^6 以上に標識されたバンドが現われただけで、それ以下の領域ではほとんどバンドは検出されなかった（図１－⑤）。

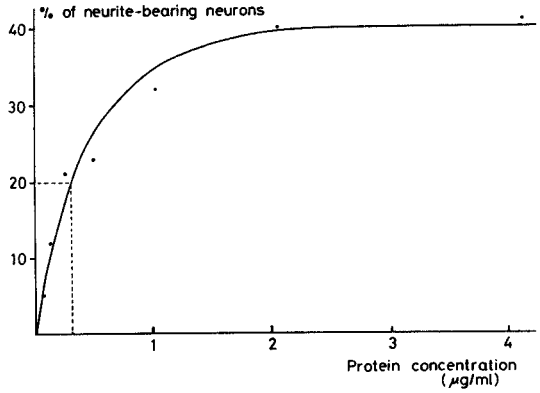


Fig. 2 Dose-response curve of partially purified SCF. The protein concentration that elicits half maximum response is 0.28 ug/ml (dashed lines).

考察

この研究で、ＳＣＦは１万倍以上精製され、その有効濃度は約 0.3μg/mℓであった。（この濃度は、ポリオルニチン塗布の培養皿に吸着するときのタンパク濃度を表わしている。）この値は、フイブロネクチンやラミニンが神経突起を成長させるのに必要な濃度よりずっと低い (3)。

心臓細胞によって合成されたポリペプタイド（分子量330-400K, 360K, 220-240K）がＳＣＦ活性に関与していることが示唆された。βメルカプトエタノール不含の電気泳動ではこれらのポリペプタイドの移動度は減少し、分子量10^6 以上にバンドが出現した。このことはゲル濾過によってＳＣＦの分子量が数百万と推定されたこととよくあう。従って、ＳＣＦはＳ－Ｓ結合によって結合している複合体であると思われる。

ＳＣＦは糖鎖を含んでいる。糖鎖の役割はこの実験ではわからないが、酸性な糖がＳＣＦ全体に負の電荷を与えてＳＣＦをポリオルチニン塗布の培養皿基壁に接着させていることが推測される。というのもＳＣＦの非常に高い負電荷は通常のタンパクの酸性度からは予期できないからである。さらに精製を進めることにより神経突起成長のメカニズムの手掛りが得られるであろう。

引用文献

(1) Collins,F., Proc.nat.Acad.Sci.(USA) 75,5210-5213 (1978)
(2) Lander,A.D. et al., J.Cell Biol. 94, 574-585(1982)
(3) Rogers,S.L. et al., Dev. Biol. 98, 212-220 (1983)

154. 神経成長因子およびコレラトキシンのタンパク質リン酸化における作用

橋本誠一・葛谷博磁　（東北歯大・生化）

〔要　約〕

PC12h細胞に神経成長因子(NGF)を作用させ、その細胞抽出液について[γ-^{32}P]ATPを基質としてリン酸化を行なうと、分子量100,000タンパク(Nsp100)のリン酸化が選択的に抑制される。このNsp100のリン酸化の抑制は、細胞にcholera toxin(CT)を作用させてもみられたが、常に分子量60,000タンパクのリン酸化の著名な増加を伴い、NGFの作用とは明らかに異なった。この分子量60,000タンパクのリン酸化の増加は、リン酸化の際cAMPを添加してもみられることからcAMP-dependent protein kinaseの活性化により惹起されているものと思われる。この他、A23187や高濃度のK^+によってもNsp100のリン酸化の抑制と分子量60,000タンパクのリン酸化の増加がみられたが、予め培養液中に過剰のEGTAを添加した後、A23187や高濃度K^+を作用させると、これらのタンパク質リン酸化の変化は消失した。またEGTAの前処理により、NGFおよびCTによるNsp100のリン酸化抑制も消失したが、CTによる分子量60,000タンパクのリン酸化の増加は阻害されなかった。以上のことから、CTは細胞内cAMP濃度の上昇を介して、またNGFはcAMPの関与しない系で細胞内遊離Ca^{++}濃度を上昇させ、Nsp100のリン酸化の抑制を惹起するものと思われる。

Key word：　Nerve growth factor, cholera toxin, protein phosphorylation

神経成長因子(NGF)は、交感神経系細胞の維持、発達に必須のペプチドホルモンである。ラット副腎クロマフィン細胞腫瘍由来の株細胞PC12は、NGFに応答して神経突起の形成、特異的な酵素の誘導など様々な形態学的・生化学的変化を示し、NGFの作用機構を研究するための有用なモデルとして広く用いられている。PC12細胞にNGFを作用させると細胞内のいくつかのタンパク質のリン酸化レベルが変わることが報告されている[1)2)3)]。このうち分子量100,000の可溶性タンパク質(Nsp100)は、intact cellレベルにおいても、またNGFを作用させてから、無細胞系で[γ-^{32}P]ATPを基質としてリン酸化を行なっても、ともに著明なリン酸化の抑制が見られる[3)4)]。NGFによるこのようなタンパク質リン酸化にかかわる作用は、PC12h細胞においても見られ、さらに小麦胚レクチンにより消失することから、fast receptorを介して発現されるものと考えられる[5)]。一方、NGFによるタンパク質リン酸化の変化は、cholera toxinやcAMP analogueにより模倣されることから、cAMPをsecond messengerとして発現されると考えられている[1)]。今回、我々は、NGFおよびcholera toxinのタンパク質リン酸化に対する作用を、無細胞系リン酸化反応により比較検討し、NGFの作用にcAMPは関与しないことを明らかにしたので報告する。

［実験方法］

1．細胞培養：PC12h細胞の培養は、7％ウシ胎仔血清、7％ウマ血清を含むDMEMを用い、175cm^2の培養フラスコで37℃、5％CO_2の条件で行なった[5)]。

2．タンパク質リン酸化：PC12h細胞を100mM PIPES pH6.9, 1mM $MgSO_4$, 0.1mM Na_2MoO_4, 10mM EGTAおよび1mM PMSFの組成の緩衝液中で30秒間超音波処理により破砕し、100,000×gで60分間遠心後、上清を50mM MES pH6.2, 10mM $MgSO_4$, 0.1mM Na_2MoO_4および2-4μCiの[γ-^{32}P]ATPを含む反応液中で37℃10分間リン酸化を

行なった。SDS sample buffer を加えて反応を停止し、SDS ゲル電気泳動を行なった後、Kodak XAR-5 フィルムを用いてオートラジオグラフを作製した。

[結果] PC12h 細胞の超音波処理上清を [γ-^{32}P] ATP とともにインキュベートすると、多数のタンパク質がリン酸化される。NGF を３時間作用させた細胞の超音波処理上清について同様にリン酸化を行なうと、分子量100,000 タンパク質(Nsp100)のリン酸化が選択的に抑制された（図１）。また、cholera toxin(CT) を３時間作用させた細胞においても同様にNsp100のリン酸化の抑制が見られたが、分子量60,000タンパクのリン酸化の著明な増加を常に伴った（図１）。この分子量60,000タンパクのリン酸化の増加は、リン酸化の際にcAMPを添加してもみられることから、CTが細胞内cAMP濃度を高めcAMP依存性タンパク質リン酸化酵素を活性化させることにより惹起されるものと思われる。NGF によるNsp100リン酸化の減少は、作用15分後から認められ、３時間後で最大であった。一方、CTによるNsp100リン酸化の減少は、作用１時間後まで認められず、３時間後に著明に見られた。この実験においてNGFは、作用15分後から分子量60,000タンパクのリン酸化を増加させたが、この作用は常に認められるわけではなかった。cholera toxin による分子量60,000タンパクのリン酸化の増加は、作用15分後から見られ、時間とともに増強した（図２）。また、PC12h 細胞をA23187あるいは高濃度K^+で３時間処理したのち、無細胞系でリン酸化を行っても、Nsp100のリン酸化の抑制および分子量60,000タンパクのリン酸化の増加がみられた。培養液にEGTA(3mM) を加え、１時間後にNGF, A23187, KCl(64.4mM) あるいはCTを添加して細胞を刺激しても、Nsp100のリン酸化の抑制は、認められなかった。また、A23187および高濃度K^+による分子量60,000タンパクのリン酸化の増加も消失したが、CTによる作用は認められた（図３）。次に、CTの作用濃度を変化させてEGTA添加の影響を検討した。EGTA添加30分後に0.05ng／㎖－50ng／㎖の濃度でCTを３時間作用させ、無細胞系でリン酸化を行なった。EGTA無添加の系では、５ng／㎖CTからNsp100リン酸化の著明な抑制が認められたが、EGTA前処理により消失した。一方、分子量60,000タンパクのリン酸化の増加は、0.5ng/㎖CTから認められ、EGTA前処理により阻害されなかった。即ち、EGTAは、CTによる細胞内cAMP濃度の上昇およびそれに伴うcAMP依存性タンパク質リン酸化酵素の活性化は阻害せず、Nsp100リン酸化抑制作用のみ阻害した（図４）。

[考察] Schubertら[6,7]は、PC12細胞にNGF を作用させると細胞内cAMP濃度が上昇すること、またcAMPがNGF の作用を模倣することを報告し、さらにNGF およびcAMP analogueがCa^{++} influx には影響を与えないで、Ca^{++} efflux を有意に増加させることから、NGF の作用は、cAMPをsecond messengerとし、細胞内Ca^{++}貯蔵部位からCa^{++}を遊離させることによって発現されると考えた。しかし、Landrethら[8]は、NGFがCa^{++} flux に変化を及ぼさないと報告し、一致を見ない。今回の我々の実験から、NGF およびCTのNsp100リン酸化抑制作用にCa^{++}が関与していることは明らかであり、恐らくCTは細胞内cAMP濃度の上昇を介して、またNGF はcAMPの関与しない系で細胞内Ca^{++}貯蔵部位からCa^{++}を遊離させNsp100のリン酸化の抑制を惹起するものと思われる。

[文献] 1 Halegoua,S. and Patrick,J.(1980) Cell 22, 571-581
2 Yu,M.W., Tolson,N.W. and Guroff,G.(1980) J.Biol.Chem. 255, 10481-10492
3 End,D., Hanson,M., Hashimoto,S. and Guroff,G.(1982) J.Biol.Chem. 257, 9223-9225

4 End, D., Tolson, N., Hashimoto, S. and Guroff, G. (1983) J. Biol. Chem. 258, 6549-6555
5 Hashimoto, S., Ikeno, T., Kuzuya, H. (1985) J. Neurochem. in press
6 Schubert, D. and Whitlock, C. (1977) Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 74, 4055-4058
7 Schubert, D., LaCorbiere, M., Whitlock, C. and Stallcup, W. (1978) Nature 273, 718-723
8 Landreth, G., Cohen, P. and Shooter, E. M. (1980) Nature 283, 202-204

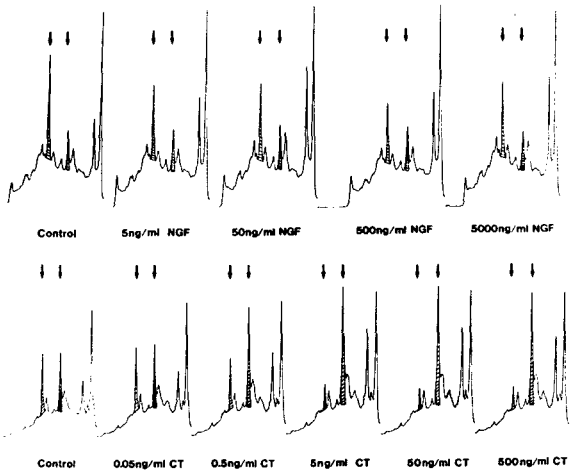


Fig. 1. Effect of the treatment of PC 12h cells with NGF or cholera toxin on the cell-free protein phosphorylation. Cells were treated for 3 hours with various concentrations of nerve growth factor or cholera toxin. Left and right arrows in the densitometer tracings indicate the position of Nspl00 and Mr= 60,000 protein, respectively. Nspl00 peak had the following relative densities: control,100;5ng/ml NGF,68; 50ng/ml NGF,70;500ng/ml NGF,56;5000ng/ml NGF,72: control,100;0.05ng/ml CT,107 0.5ng/ml CT,85;5ng/ml CT,44;50ng/ml CT, 41;500ng/ml CT,40.

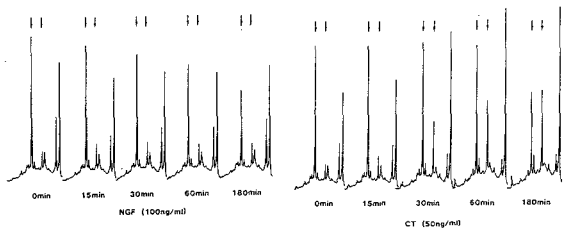


Fig. 2. Time course of the effects of NGF and cholera toxin(CT) on the cell-free protein phosphorylation in PC 12h cells. Left and right arrows in the densitometer tracings indicate the position of Nspl00 and Mr=60,000 protein, respectively.

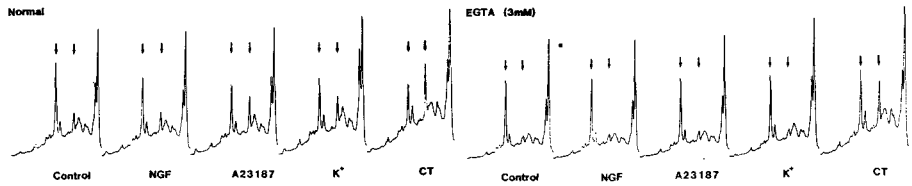


Fig. 3. Effect of the pre-addition of EGTA into cell culture followed by the treatment of cells with NGF, A23187, high K^+, or cholera toxin on the cell-free phosphorylation of soluble proteins in PC 12h cells.

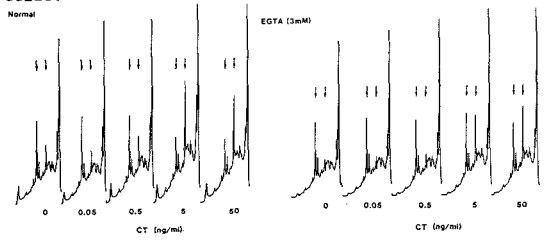


Fig. 4. Effect of the pre-addition of EGTA into cellculture followed by the treatment of cells with various concentrations of cholera toxin on the cell-free phosphorylation of soluble proteins in PC 12h cells.

155. 外因性 GM_1 ganglioside のラット中枢 5-HT 神経終末修復促進効果

小島秀樹・案納直子・石橋義広・横尾秀康
山田茂人・堤　哲之・安楽茂己・西　彰五郎
稲永和豊*・G. Jonsson**・A. Gorio***
(久留米大・医・脳研, 精神*, Karolinska Ins.**, Fidia Res. Lab.***)

〔要　約〕

5－hydroxytryptamine（5－HT）神経毒物の 5, 7－dihydroxytryptamine（5, 7－HT）をラットの大脳皮質内に持続的に注入して5－HT神経の変性モデルを作製した。このモデルに GM_1 ganglioside（GM_1）を投与し変性した5－HT神経終末に対する修復促進効果を5－HTと5－hydroxyindole acetic acid（5－HIAA）を指標として生化学的に調べた。浸透圧ミニポンプ（1 μl／h）から 5, 7－HT（2－4 mM）を大脳皮質内に7日間注入した場合，5－HTと5－HIAA は注入点の周囲数㎜にわたって有意に減少した。この所見は殊に注入点の尾側で著しかった。

GM_1（20mg／kg／day, i.p.）を 5, 7－HT（2mM）注入の前，3日間とその後7日間連続して投与した場合，5－HTは注入点で有意に増加し，5－HIAAは注入点とその尾側で有意に増加していた。この事実は GM_1 は障害を受けた5－HT神経終末の代謝回転を促進させることを示しており，殊に注入点では5－HT 神経終末の修復が促進された結果として5－HT が増加したことが考えられる。

Key word： GM_1 ganglioside, 5－hydroxytryptamine, 5,7－dihydroxytryptamine

＜緒言＞

外因性 GM_1 の中枢神経修復促進効果が注目されている（2, 4）。GM_1 の中枢5－HT神経終末の修復促進効果については，Jonsson ら(1)の新生幼弱ラットを用いた研究によって証明されているが，成熟ラットの中枢5－HT神経終末に対する外因性 GM_1 の神経修復促進効果についてはまだ報告を見ない。

そこで，われわれは成熟ラットの大脳皮質内に密に分布する5－HT神経終末を5－HT神経毒物の 5, 7－HTによって局所的に破壊して5－HT神経終末の変性モデルを作製した。そして，このモデルに対する外因性 GM_1 の効果を検討した処，外因性 GM_1 は成熟ラットの場合も障害を受けた中枢5－HT 神経終末の修復に促進的に作用することを示唆した生化学的事実を得たので報告する。

＜方法＞

中枢5－HT神経終末の変性モデルの作製：雄性ウィスターラット（150g）を使用した。右側大脳皮質（bregma の右外側3㎜，後方3㎜，深1～1.5㎜）内にカニューレ（Terumo, 27G×$^3/_4$）を刺入固定し，テフロンチューブで背部皮下の浸透圧ミニポンプ（Alzet, 2001, 1μl／h）と接続した。5, 7－HT creatinine sulfate（1－2－4 mM）をアスコルビン酸（1mg／ml）を含む無菌生食に溶解した後，浸透圧ミニポンプに詰め，皮質内に持続注入した。ミニポンプは7日後にエーテル麻酔下に取り出した。

GM_1 の投与：GM_1（Fidia, 20mg／kg／day）を生食に溶解し腹腔内に注射した。GM_1 の投与は5, 7－HT注入前，3日間とその後，7日間連続して投与した。GM_1 の最終投与日から14日後に断頭した。

5－HTと5－HIAAの同時定量：氷上で左右の大脳皮質を水平断にスライスしこれをさらに約1㎜幅の小スライスに10等分した。各サンプルはドライアイス上で凍結し，分析まで－80℃に保存した。サンプルを蟻酸（0.1N）200μl中でホモジナイズし，12,000g 10分間遠沈し，その上清（40μl）をECDつきHPLCに注入した(5)。移動層に0.15Mモノクロール酢酸（pH3.0）に0.7mM EDTA，650μM SOS と8％アセトニトリルを含んだ溶液を用いた。蛋白の定量はLowry法(3)に準じた。
各ラットの5,7－HTの注入点を起点としてその前後の各サンプル(幅約1㎜）中に含有されている5－HTと5－HIAA量を各サンプルに対応した反対側皮質内の5－HT と5－HIAA量の％で表示した。統計処理にはStudentのt検定を用いた。

＜結果＞

Ⅰ．5,7－HTの大脳皮質内注入による5－HT神経終末の変性モデルの作製

右側の大脳皮質内に生食を7日間注入してその14日後に断頭した場合，右側各皮質部位の5－HTと5－HIAAの変化はいずれも反対側のそれと比較して10％以内であった。皮質各部位に含まれる5－HTと5－HIAA濃度の平均値はそれぞれ4.5 ng／mg prot.と2 ng／mg prot.であった。1mM 5,7－HTを右側皮質内に7日間注入してその14日後に断頭した場合，右側皮質内の5－HT は反対側のそれと較べて殊に注入点およびその尾側において有意に減少していたが，5－HIAA は注入点の尾側3㎜で約40％減少していた（Figs. 1 and 2）。2mM 5,7－HTを同様に注入した場合，5－HTの減少は注入点とその吻側1㎜および1－3㎜で認められた。5－HIAA の有意な減少は注入点とその後方1～3㎜で認められた（Figs. 1 and 2）。
4mM 5,7－HT を同様に注入した場合，その効果は2mM 5,7－HTのそれとほぼ同様であった。
2mM 5,7－HTの5－HT神経毒性作用の経時的変化を調べた処，5,7－HT の投与終了から断頭までの期間が7日又は14日間の場合，5－HTと5－HIAAの減少パターンに差は認められなかった。

Ⅱ．2mM 5,7－HTによる5－HTと5－－HIAAの減少に対するGM1の効果

GM1（20mg／kg／day，i.p.）を5,7－HTの注入開始の前，3日間そして注入開始後，7日間投与した場合，5－HTと5－HIAAの減少の有意な増加が5,7－HT注入点で見い出された(Figs. 3 and 4)。特に5－HIAAは注入点の尾側（1－3㎜）で有意に増加していた。

＜考察＞

5,7－HTによる5－HT，5－HIAAの減少は反対側の皮質内においては全く観

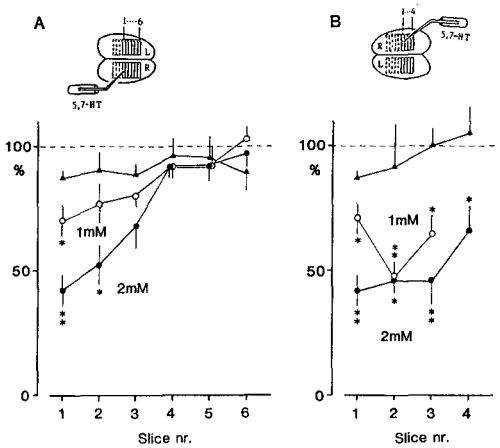


Fig.1. Spatial distribution of 5-HT in the cerebral cortex in parieto-frontal direction(A,slice no.1-6) and parieto-occipital direction(B,slice no.1-4) after unilateral infusion of saline(▲—▲),1mM(○—○) or 2mM(●—●)5,7-HT via an osmotic minipump for 7 days. A cortical slab was prepared by a tangential section and divided at regular intervals into nine pieces on each side(L=left;R=right)as indicated in the figure. Slice no. 1 of the right side contained the site of 5,7-HT infusion.Each point shows the mean±SEM(n=4-5),expressed as percentage of non-infused control side.
＊P＜0.05,＊＊P＜0.01

察されなかった。このことは5,7－HTの5－HT神経毒性効果の拡がりが注入側の一部にのみ限られていることを示す。5－HTと5－HIAAの有意な減少は2mM以上の5,7－HTを使用した場合にみられた。このことは，5－HT神経の破壊を生じるための5,7－HTの濃度は2mM 以上であることを示している。

今回の実験によってGM1 の投与により5,7－HTの注入点で，5－HTが有意に増加し，5－HIAAは注入点とその尾側で有意に増加していた。この事はGM1 は障害を受けた5－HT神経終末の代謝回転を促進させることを示しており殊に注入点では5－HT神経終末の修復が促進された結果として5－HTが増加したことが考えられる。

今後，この点を5－HTの免疫組織化学法を用いて検証する必要がある。

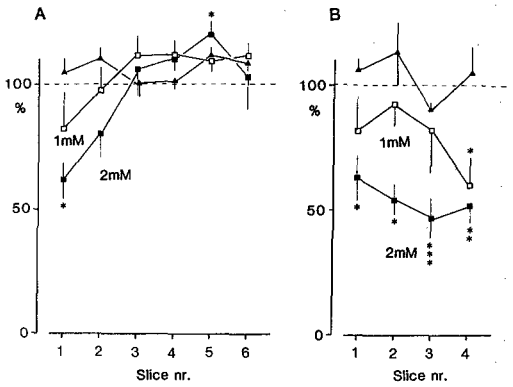


Fig.2. Spatial distribution of 5-HIAA in the cerebral cortex in parieto-frontal direction(A,slice no. 1-6)and parieto-occipital direction(B,slice no.1-4)after unilateral infusion of saline(▲—▲),1mM(□—□)or 2mM(■—■)5,7-HT via an osmotic minipump for 7 days. Slice no.1 of the right side contained the site of 5,7-HT infusion. Each point shows the mean ±SEM(n=4-5), expressed as percentage of noninfused control side.
*P＜0.05,**P＜0.01,***P＜0.001

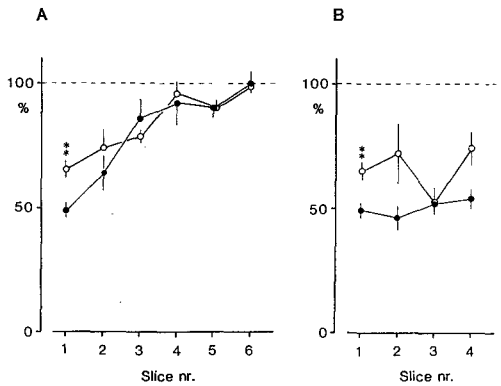


Fig.3. Effect of GM_1(20mg/Kg/day,IP,○—○)or saline (●—●),on the spatial distribution of 5-HT in the cerebral cortex in parieto-frontal(A) and parieto-occipital(B) directions after unilateral infusion of 2mM 5,7-HT for 7 days. Each point represents the mean±SEM(n=5-7), expressed as percentage of noninfused control side.
**P＜0.01

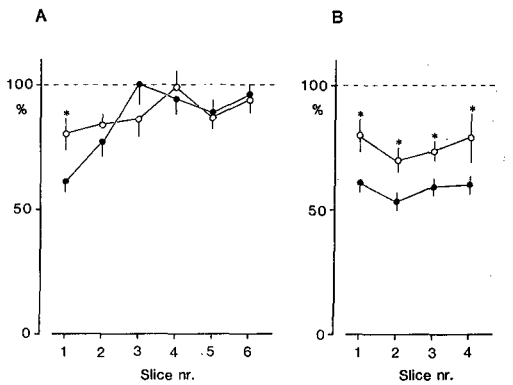


Fig.4. Effect of GM_1(20mg/Kg/day,IP,○—○)or saline (●—●),on the spatial distribution of 5-HIAA in the cerebral cortex in parieto-frontal(A) and parieto-occipital(B) directions after unilateral infusion of 2mM 5,7-HT for 7 days. Each point represents the mean±SEM(n=5-8), expressed as percentage of noninfused control side.
*P＜0.05

＜文 献＞

1. Jonsson,G. et al.(1984) Develop.Brain Res.,16,171-180.
2. Kojima, H. et al.(1984) Neuroscience, 13,1011-1022.
3. Lowry,O.H. et al.(1951) J.Biol.Chem., 193,265-275.
4. Toffano,G. et al.(1984) Brain Res., 296, 233-239.
5. Yokoo, H. et al.(1985) Kurume Med. J., in press.

156. 神経成長因子および海馬由来因子等によるラット中隔野培養神経細胞のコリナージック機能の増大

畠中　寛・津久井弘子・二本松伊都子
（三菱化成・生命研・脳神経科学）

〔要　約〕

①１６日胚ラット脳より中隔野領域を摘出し、トリプシンで分散させた後、無血清完全合成培地で培養した。これによりほぼ神経細胞のみの培養系を確立した。②この系において、中隔野神経細胞は神経成長因子（ＮＧＦ）に応答し、Choline Acetyltransferase（ＣＡＴ）活性を数倍に上昇させた。ＮＧＦのＥＤ$_{50}$値は約１ng/mlであった。ＮＧＦの作用は抗ＮＧＦ抗体でほぼ完全に抑制された。③１８日胚ラット脳より培養下に移した海馬の神経細胞の条件培養液はまた、中隔野神経細胞のＣＡＴ活性を増大させた。この作用はＮＧＦの作用とは以下の点で異なっていた。１）ＣＡＴ活性を上昇させるに必要な培養日数がＮＧＦの場合に比べ長い。２）抗ＮＧＦ抗体の抑制を受けない。３）ＮＧＦとの同時添加時において単純総和より高い値を与える。④生後３日のラット大脳皮質から得られた損傷修復因子もまた、中隔野神経細胞のＣＡＴ活性を増大させ、正常の皮質組織抽出液に比べ、その上昇は有意であった。⑤以上の結果は脳の老化との関係が注目されている中枢神経系のコリナージックニューロンが培養下においてＮＧＦ等の因子によってその機能が制御されている可能性を示している。

Key Words: Nerve Growth Factor, Septum Cholinergic Neurons, Hippocampus
Neurotrophic Factors, Cerebral Cortex Injury Factors

神経細胞の分化に際し、神経性栄養因子と呼ばれる一群の蛋白質が生理的に重要なはたらきを担っている[1),2)]。その最もよく知られた例が神経成長因子（ＮＧＦ）であり、ＮＧＦは末梢神経系において交感および知覚神経細胞の生存と分化に必須な役割を果していることが良く知られている[3),4),5)]。一方、ＮＧＦの中枢神経細胞への作用については不明な点が多かった[6)]。しかし、ＮＧＦが培養下においた中枢神経細胞のCholine Acetyltransferase（ＣＡＴ）活性を有意に上昇させることが知られるようになり[7),8),9)]、また特に最近、Korschingら[10)]が、海馬組織中に比較的高濃度のＮＧＦおよびｍＲＮＡ^{NGF}を検出するに及び、ＮＧＦの中枢作用が注目を集めるようになった。今回我々は、ラット１６日胚脳組織より中隔野の神経細胞を培養下におき、ＮＧＦなど種々の神経性栄養因子候補の作用を調べたので報告する。

【実験方法】

１６日胚ラット(Wistar系)から中隔野組織の摘出は、Inagakiら[11)]の解剖図をもとに行った。トリプシンによって分散したのち神経細胞はArimatsuら[12)]の方法に基づいて培養した。細胞はプレートに10^6cells/cm^{2}の濃度で血清を含む培地で一日培養したのち、無血清完全合成培地（ＴＩＰ／ＤＦ培地[13)]）にかえ，ＮＧＦ等を加え培養を続けた。この系の培養中隔野細胞がほぼ全て神経細胞であることは抗ニューロフィラメント抗体を用いて確認できた。

１８日胚ラットからの培養海馬神経細胞の条件培養液（ＨｐＣＭ）は３～４日間ＴＩＰ／ＤＦ培地での培養の後、ＹＭ１０膜上で２０倍に濃縮して用いた。大脳皮質損傷修復因子（ＣＩＦ）として、生後３日のラット前頭部皮質に２ｍｍ角の穴を穿ちジェルフォームを埋め、１週間後、その傷の周辺を含む組織を摘出しそのホモジェネートの４６万Ｇ上清を用いた。対照として同じ部位の組織を同令ラットより摘出して用いた。

ＣＡＴ活性はFonnum法[14)]を一部改良して用いた。蛋白量はBovine Immunoglobulinを標準とするLowry法あるいはBradford法を用いた。

図1　中隔野神経細胞におけるＣＡＴ活性に及ぼすＮＧＦ（Ａ図　●で示す）およびＨｐＣＭ（Ｂ図　▲で示す）の作用

培養の方法およびＣＡＴ活性の測定は本文の通り。○は無添加対照群を示す。横軸はＴＩＰ／ＤＦ培地に変えてからの培養日数を示す。ＮＧＦはマウス顎下腺より精製した2.5Ｓ型分子を１００ng/ml加えた。ＨｐＣＭとして２０倍濃縮液を1/20量加えた。それぞれの値は４点の平均値とS.D.を示す。１日目のＮＧＦ添加群を除く全ての添加群は相当する対照群と比べ $P<0.025$ で有意であった。

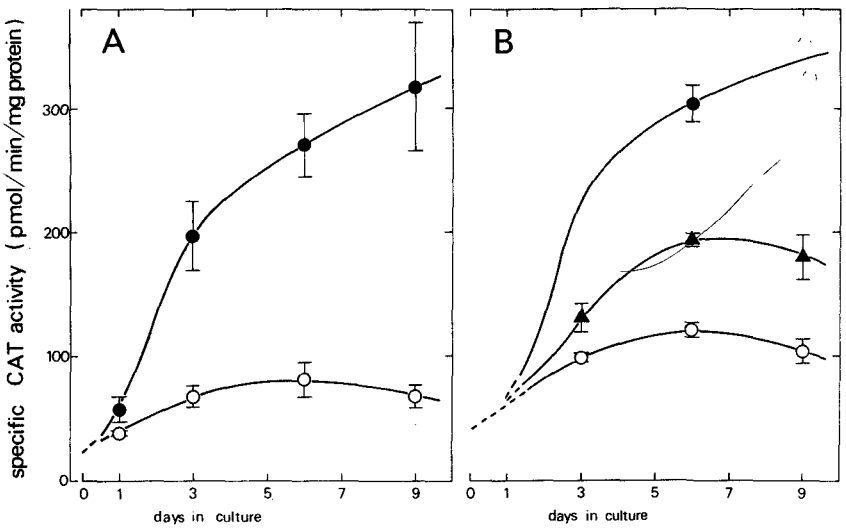


図2　中隔野神経細胞におけるＣＡＴ活性に及ぼすＮＧＦ作用の用量依存曲線

横軸に示す種々の濃度のＮＧＦを加えて３日間培養した。４点の平均値とS.D.を示す。

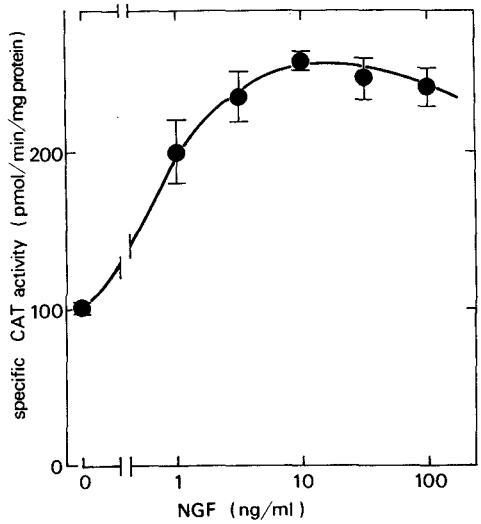
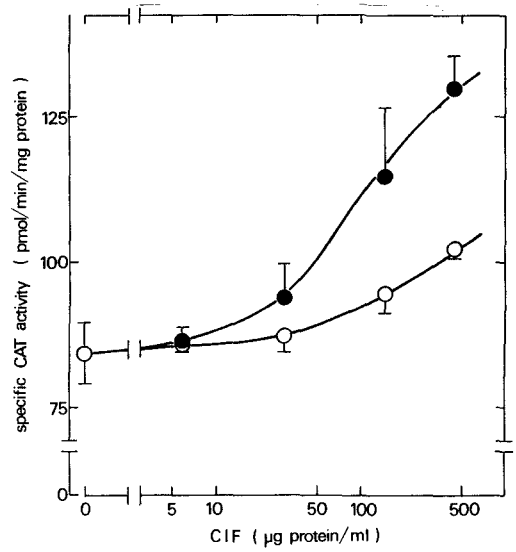


図3　中隔野神経細胞における大脳皮質損傷修復因子（ＣＩＦ）によるＣＡＴ活性の促進

●:Operation群，○:Sham-operation群．４点の平均値とS.D.を示す。抽出液を加えて３日間培養した。



【結果と考察】

図１-Ａは培養中隔野神経細胞のＣＡＴ活性へのＮＧＦの増強作用を見たものである。ＮＧＦを含まない培養下のＣＡＴ活性は大きな変動を見せなかったが、１週間を過ぎて活性が僅かに減少してゆく傾向が見られた。一方、１００ng/mlのＮＧＦ存在下でのＣＡＴ活性は、１日の培養では対照群との差は殆ど見られず、３日目になって初めて対照群の２.９倍に、６日目で３.３倍に著しく増加した。図２に３日間の培養でのＮＧＦによるＣＡ

表1　中隔野神経細胞におけるＣＡＴ活性に及ぼすＮＧＦとＨｐＣＭの作用の分離

ＮＧＦは１００ng/ml、ＨｐＣＭは２０倍濃縮液の1/20量をＴＩＰ／ＤＦ培地に加え、６日間培養した。ヒツジ抗ＮＧＦ抗体はグロブリン蛋白として２μg/ml用いた。値は４点の平均およびS.D.である。抗ＮＧＦ抗体無添加群について、それぞれ、対照群とはP<0.025で有意であった。なお、これらの４群については、ＣＡＴ活性測定時に５０μM 4-(1-naphthyl vinyl)-pyridineによる阻害効果を調べた結果、それぞれ、８４.８，８３.６，８５.５，８６.０%、活性が阻害され、測定値がＣＡＴ活性に特異的であることが示された。

additions	specific CAT activity (pmol/min/mg protein)	(%)	(%)
none	83.4 ± 9.3	(100)	
Anti-NGF Ab (2μg/ml)	102.1 ± 7.4		(100)
NGF (100ng/ml)	314.6 ± 37.6	377	
NGF + Anti-NGF Ab	117.1 ± 15.0		115
HpCM (1:1 equiv.)	146.6 ± 16.4	176	
HpCM + Anti-NGF Ab	170.9 ± 8.6		167
NGF + HpCM	421.1 ± 32.0	505	
NGF + HpCM + Anti-NGF Ab	212.9 ± 5.8		209

Ｔ活性促進の用量依存曲線を示した。ED_{50}値は約１ng/mlである。図１-Ｂは同様にＨｐＣＭによるＣＡＴ活性の増強作用を見たものである。ＮＧＦの作用とは異なり、３日間の培養ではそれ程十分ではなく６日間の培養で対照と比べ１.５倍のＣＡＴ活性の促進が見られた。ＨｐＣＭの作用はＮＧＦとは異なることを表１において抗ＮＧＦ抗体を用いて調べた。抗ＮＧＦ抗体はＮＧＦの作用をほぼ完全に抑制したが、ＨｐＣＭの作用については殆ど影響を与えなかった。またＮＧＦとＨｐＣＭとの同時添加効果を調べてみたが、作用は単純な総和以上になった。この結果もまたＨｐＣＭの作用がＮＧＦ作用とは異なるものであることを示している。図３はＣＩＦによるＣＡＴ活性促進作用をみたものである。対照として用いた正常の組織抽出液に比べ３倍程度の高い能力を持っていた。ＨｐＣＭおよびＣＩＦ中の神経性栄養因子の性質については現在研究中である。

以上の結果は培養下における中隔野神経細胞のコリナージックな性質がＮＧＦを初めとする種々の神経栄養因子候補によって増強されることを明らかに示している。このことは脳の老化が中枢神経系のコリナージックな機能を破壊している可能性が高いことから見て、ＮＧＦおよびＨｐＣＭの示す作用との関係が極めて注目される。

【謝辞】
ヒツジ抗ＮＧＦポリクローナル抗体は、Dr.K.KorschingとProf.H.Thoenen(Max-Plank-Institute for Psychiatry,Munchen)、マウス抗ニューロフィラメントモノクローナル抗体は、藤田 忍博士と小幡邦彦教授（群馬大学，医，薬理）より、それぞれ戴いたものであり、ここに深く感謝致します。本研究の遂行にあたり御討論頂きました本研究所の川村 浩部長に感謝いたします。

【文献】

１．畠中　寛、蛋白質核酸酵素，**30**巻,586-593,1985
２．畠中　寛、東京医学，91巻,226-231,1984
３．畠中　寛、蛋白質核酸酵素，**29**巻,1937-1954,1984
４．畠中　寛、医学の歩み，133巻,1010-1014,1985
５．M.TAKAHASHI,H.TSUKUI & H.HATANAKA, Brain Res.,in press
６．H.THOENEN & Y.-A.BARDE, Pysiol.Rev.,**60**,1284-1335,1980
７．P.HONEGGER & D.LEONOIR, Dev.Brain Res.,3,229-238,1982
８．H.GNAHN,F.HEFTI,R.HEUMANN,M.E.SCHWAB & H.THOENEN, Dev.Brain Res.,**9**,45-52,1983
９．F.HEFTI,J.HARTIKKA,F.ECKENSTEIN,H.GNAHN,R.HEUMANN & M.SCHWAB, Neurosci.,5,55-68,1985
１０．S.KORSCHING,G.AUBURGER,R.HEUMANN,J.SCOTT & H.THOENEN, EMBO J.,4,1389-1393,1985
１１．S.INAGAKI,M.SAKANAKA,S.SHIOSAKA,E.SENBA,H.TAKATSUKI,H.TAKAGI,Y.KAWAI,H.MINAGAWA & M.TOHYAMA,Neurosci.,**7**,251-277,1982
１２．Y.ARIMATSU,H.TSUKUI & H.HATANAKA, submitted
１３．H.HATANAKA, Brain Res.,**222**, 225-233,1981
１４．F.FONNUM,J.Neurochem.,24,407-409,1975

157. ラット中枢神経系の Neuronotrophic factor
－特に海馬由来因子について－

高坂新一・吉田一成*・大谷光弘*・戸谷重雄*・塚田裕三
（慶応大・医・生理，脳外科*）

〔要　約〕

ラット胎仔大脳半球の dissociation culture に於いてニューロンの生存は細胞密度に依存し，細胞密度が低い場合にはニューロンは数日で大多数死滅する。この条件下で種々の因子を添加し，9日間培養を行なった後，ニューロフィラメント陽性細胞数を算定することにより，ニューロンに対する栄養因子の効果を判定することが可能であった。この培養系に於いて，4週令正常雌ラットの海馬，中隔核，大脳皮質，脳幹，小脳の各抽出液，および神経成長因子（NGF）の効果の検定を行なった。海馬，中隔核，脳幹の抽出液中には，中枢のニューロンに対する高い trophic effect が認められたが，大脳皮質ではその効果は低く，小脳抽出液，NGFは無効であった。次に，Septo-hippocampal tract である fimbria fornix（f.f.）を切断し，海馬由来因子への影響を経時的に観察した。海馬抽出液の neuronotrophic effect は，f.f. 切断後，1，3，21日では明らかな変化は認められなかったが，7，14日で有意に上昇した。f.f. 切断後14日の海馬抽出液の trophic effect は，熱，トリプシン処理により完全に失活し，蛋白成分が関与していることが示唆された。

Key word： Neuronotrophic factor, Hippocampus, Primary culture

主に末梢の知覚神経節細胞，交感神経節細胞の生存，分化に関与する因子として，神経成長因子（NGF）等の存在が知られており[7]，その物理学的性質も明らかにされているが，中枢神経系のニューロンに作用する因子の詳細は不明である。今回我々は，ラット胎仔大脳半球の primary culture による neuronotrophic factor（NTF）の assay system を確立し，海馬抽出液に高い neuronotrophic effect があり，中隔核から海馬への cholinergic afferent pathway である fimbria fornix（f.f.）を切断することによりその効果が増強されることを見いだしたので，報告する。

（実験方法）

初代培養：胎生16日ラット（Wistar albino）大脳半球を，髄膜，血管などを除去後，ステンレスメッシュ（pore size 250 μm）に通した後，0.1％トリプシンで37℃，30分処理し，さらに pore size 150 μm のステンレスメッシュに通し，単離された細胞を培地（15％FCS，6 g/ℓ glucose，1 mM glutamine，0.5 g/ℓ $NaHCO_3$，40 mg/ℓ gentamicine を含む Eagle's MEM）に浮遊した。poly-L-lysine でコーティングした径18 mm のカバースリップを入れたコーニング12ウエルプレートで 8×10^5 個／2 mℓ medium／well で培養を開始した（37℃，5％ CO_2）。培地は，隔日に全量交換し，9日間培養した。

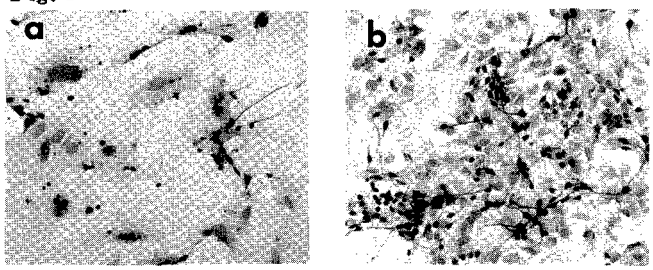
ニューロン数の算定：培養細胞を4％パラホルム，および5％酢酸90％メタノールで固定し，Labsystem 社抗 neurofilament（NP）抗体による間接酵素抗体法で染色し，光学顕微鏡下で1 mm^2 に存在するNF陽性細胞数を10箇所計測し，生存したニューロン数を推定した。

脳抽出液の調整：雌ウイスターラット（4週令，体重40－60 g）を遮血後，脳各部位

（大脳皮質，海馬，中隔核，脳幹，小脳）を摘出し，20 vol.（V/W）の 2×10^{-5} M leupeptin 添加 Eagle's MEM で homogenize し，100,000 g，60 min の遠心上清を 0.22 μm Milipore filter で沪過滅菌し凍結保存した。Septo-hippocampal tract の切断は，エーテル，ケタミン麻酔下で stereotaxic に行い（bregma 後方 1.8 mm で左側 f.f. を幅 5 mm にわたり切断），1，3，7，14，21日後に同側海馬を摘出し，同様に抽出液を調整した。Neuronotrophic effect の判定：前述の培養プレートに，抽出液 50 μl を 15 % FCS・MEM で 0.5 ml に希釈し，培養初日から培地交換毎に添加した。コントロールには，0.5 ml 15 % FCS・MEM を添加した。抽出液の neuronotrophic effect は培養 9 日目に於ける NF 陽性細胞数で判定した。最も効果の強い f.f. 切断 14 日後の海馬の抽出液を，熱処理（100 ℃，30 min），0.1 % トリプシン処理（37 ℃，30 min）し，その影響を観察した。トリプシン処理に用いた抽出液は leupeptin を含まない MEM で homogenize した。また，同時に 2.5 S NGF（50 ng/ml）の効果の判定も行なった。

（結果）

Fig. 1



ラット胎生 16 日 大脳半球の dissociation culture を低細胞密度（8×10^5個/well）で行なうと，大多数のニューロンは培養開始後早期に死滅する（Fig. 1a）。この条件下で，脳組織抽出液を添加すると，培養 9 日目にも多数の NF 陽性細胞を認め（Fig. 1b），中枢神経系のニューロンに対する trophic factor の効果の検定が可能であった。

脳各部位の抽出液の検定を行なうと，海馬，中隔核，脳幹に高い neuronotrophic effect が認められた。大脳皮質抽出液もやや有効であったが，小脳抽出液はほとんど効果がなかった（Table 1）。f.f. を切断すると海馬抽出液の neuronotrophic effect は，1，3，20日では前値と有意差は認められなかったが，7，14日後で有意に増大した（Fig. 2）f.f. 切断 14 日後の海馬抽出液の neuronotrophic effect は，熱処理，およびトリプシン処理により完全に失活し（Table 2），蛋白成分の関与が示唆された。NGF にはラット胎仔大脳半球ニューロンに対する trophic effect は認められなかった（Table 2）。

（考案）

中枢神経系のニューロンに作用する成長因子の研究は，主に脳移植，細胞培養等の手段を用いて行なわれている。最近，Varon ら[5,6]，microculture system による短期培養系で，種々のグリア細胞，心筋細胞の conditioned medium（CM）中の low molecular weight agents が，中枢ニューロンの生存率を高めることを報告した。また，Müller ら[3,4]種々の組織抽出液，グリア細胞の CM に，ラット海馬ニューロンに対する neuronotrophic および neurite-promoting effect があること

Table 1 Effects of Brain Extracts

Extract	NF positive cell number (mean ± S.D./ mm²)
None	9 ± 5
Hippocampus	345 ± 79
Cerebral Cortex	161 ± 47
Septal Nucleus	347 ± 105
Brain Stem	379 ± 95
Cerebellum	38 ± 9

Fig. 2

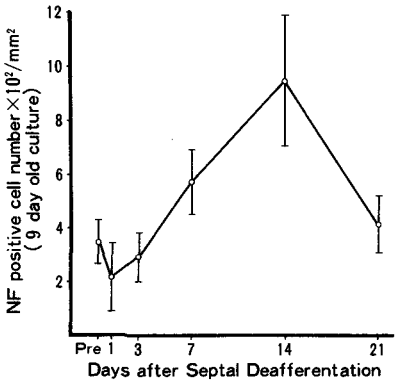


Table 2 Characterization of Hippocampal Extract

Treatment	NF positive cell number (mean ± S.D./ mm²)
None	8 ± 9
Hippocampal Extract 14 POD	
No Treatment	274 ± 27
Heat (100°C, 30 min)	10 ± 7
1% Trypsin (37°C, 30 min)	19 ± 9
NGF (50 ng/ml)	13 ± 9

を見いだした。組織傷害と成長因子の関係も注目されており，Manthorpe らは[2]，ラットの脳損傷部位にNTFが集積することを，移植実験および培養系で見いだした。また Gage らは[1]，中隔核からの cholinergic afferent pathway である f.f. を切断することにより海馬から diffusible survival factor が放出され，移植した頸部交感神経節細胞が生着するようになることを報告している。我々は，海馬には中枢神経系のニューロンに対するNTFも存在すると考え，ラット胎生15日大脳半球（大脳皮質および海馬）の dissociation culture に於ける脳抽出液の効果を検討した。抽出液中に含まれるNTFは微量であると考えられるが，9日間の比較的長期培養による sensitive な assay system を確立し，その効果を検定し得た。Neuronotrophic effect は海馬のほか，中隔核，脳幹に高く，大脳皮質にもわずかに認められたが，小脳，NGFには認められず，海馬由来因子（HNTF）は f.f. 切断により増加した。ニューロンに作用する成長因子には，NGFのように target-derived growth factor（TDGF）と呼ばれる，作用するニューロンの極めて限定された成長因子があるが，HNTF は海馬および大脳皮質のニューロンに作用することから TDGF とは異なった autocrine あるいは paracrine type の成長因子であると考えられる。その作用機序，及び f.f. 切断による活性上昇の機序は現在のところ不明であり，中隔核ニューロンに対する効果も併せ，更に検討しなくてはならない。最後に，熱およびトリプシン感受性であることから，HNTF には蛋白成分が関与していると考えられた。

謝辞：初代培養にあたり御助言，御指導いただいた，東邦大学医学部生理学教室，平野修助，阿相皓晃両先生に深謝いたします。実験に御協力頂いた，出井健之，仁井誠治，上敷領由紀子三氏に感謝いたします。

REFERENCES

1) Gage FH, Björklund A, Stenvi U. (1984) Nature 308, 637-639
2) Manthorpe M, Nieto-Sampedro M, Skaper SD, et al. (1983) Brain Res. 267, 47-56
3) Müller HW, Seifert W. (1982) J. Neurosci. Res. 8, 195-1252
4) Müller HW, Seifert W. (1984) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81, 1248-1252
5) Selak I, Skaper SD, Varon S, (1985) J. Neurosci. 5, 23-28
6) Varon S, Skaper SD, Barbin G, et al. (1984) J. Neurosci. 4, 654-658
7) Varon S, Adler R. (1980) Current Topics in Developemental Biology, Vol. 16, Academic Press, 207-252

158. 海馬可溶性神経発育促進因子の partial purification について

小鹿幸生・田中　亮*・S.H. Appel**
（名古屋市大・医・第二内科，第一生化*，Baylor 大・神経内科**）

〔要　約〕

海馬組織には培養中隔中心核のコリン作動性神経の発育を促進する polypeptidesと思われる可溶性因子が存在する事を報告してきた。本報告ではこの可溶性因子の部分的精製を試みたので報告する。2週令ラット500匹の海馬組織よりPBSに可溶な成分（蛋白量として650mg）を抽出し，その生物学的活性を中隔中心核の培養組織のACh産生能を指標に測定した所，総活性は14130BUであった。本標品は高濃度でAChの産生能を抑制する傾向が認められた。しかし，酢酸酸性で沈殿物を除去後，Cut off 5000 daltonの超限外濾過膜で濾過した濾液には，この様な抑制効果は認められず，総活性は37000BUと増加した。以後Bio-Gel P2 Column fractionation, n-butanol：acetic acid：water＝4：1：1を用いたpreparative silica G TLC, sephadex G25 columnとn-butanol：acetic acid：water＝4：1：5のsystemを用いたpartition chromatography（PC）を実施した。活性因子はP2 columnでvitamin B_{12}とNADHの間にelutionされ，TLCではRf＝0.14～0.20，PCでRf＝0.12に移動した。精製の全過程に於ける物理的精製率は約90000倍で，最終的に38μgのfluorescamine陽性物，26900BUの活性を回収する事が出来た。

Key word：　hippocampal trophic factor, peptide purification, medial septal nucleus,

緒言：神経系の発育・再生時に於ける標的細胞とその分布神経との間の相互の調節はよく知られた現象である(1)。神経発育因子（NGF）の発見以来，近年このような現象は分子レベルで研究が進められ，骨格筋の発育を促進する神経組織由来因子(2)(3)，更には脊髄前角細胞の発育を促進する筋肉由来因子(4)や毛様体神経節の神経細胞の発育に関与する眼組織由来因子(5)の物理的性質の検討及び精製が進められている。我々は中枢神経系に於て，中隔中心核コリン作動性神経の形態的，神経生物化学的発育を促進する特異的可溶性因子が，その標的組織である海馬に存在し，この因子は蛋白分解酵素などに対する性質からpolypeptidesである可能性を報告してきた(6)(7)。今回，この海馬由来因子の精製を試み，約90000倍の精製を達成したので報告する。方法：〔生物学的活性測定法〕従来の方法(6)(7)に準じ，胎令16日目のラット脳から摘出した中隔中心核を細片後，Falcon社製35mm plastic culture dishe中で，海馬不溶性成分10μg/ml又はFCS 1％を含むBottenstein等の改変N_2培養液を用い培養した。培養3日目より海馬可溶性因子を培養系に添加，培養9日目に培養組織のアセチルコリン（ACh）産生能を測定，可溶性因子無添加群を対照とし，ACh産生能促進効果を海馬可溶性因子の生物学的活性とした。ACh産生能は培養組織を〔^{3}H〕choline chlorideを含む緩衝液中で37℃，30分incubation後，free〔^{3}H〕choline chlorideをcholine kinaseでphosphocholineに転換，〔^{3}H〕AChをtetraphenylboronで抽出し，その量を測定した。培養組織のACh産生能は単位培養組織片当たりの〔^{3}H〕ACh量で表現した。〔可溶性組織抽出液作製法〕500匹の2週令ラット脳より海馬組織を抽出，6－7倍容の氷冷PBS中でglass-Teflon homogenizerを用いhomogenize後，100,000×g，2時間4℃で遠心分離を実施，上清をstarting materialとした。〔精製法〕step(1)海馬抽出液に氷酢酸を最終濃度2Nとなる様に加え，沈殿物を100,000×g，4時間4℃で遠沈除去し，上清をAmicon社製YM5 filter(cut off 5000 daltons）を用い，圧縮窒素ガスにて陽圧（45PSI）超限外濾過を実施した。Step(2)超限外濾液を凍結乾燥後0.2N酢酸に溶解，Bio-Gel P2 columnでfractionationを実施した。Column sizeは1.5×50cm, elution

buffer は 0.2 N酢酸，elution speed は毎時 5 cm，fraction volum は 0.9 ml であった。また，elution pattern は 280 nm 及び 260 nm で吸光度を測定し検討した。Step (3) Bio－Gel P 2 column fractionation の活性分画を pool し，凍結乾燥後少量のメタノール：酢酸＝8：2 溶液に溶解，Preparative Silica G TLC を実施した。展開液には n–butanol：acetic acid：water ＝ 4：1：1 を用い，spot の同定には fluorescamine（0.5 mg/ml acetonitrile）spray を用いた。また，polypeptides の TLC plate からの抽出には，2N酢酸で 3 回，次いで 2 N酢酸：pyridine：acetonitrile＝2：1.5：18 溶液で 2 回実施，有機溶媒を除去後，凍結乾燥保存した。Step (4) TLC の活性分画を sephadex G25 Column（0.7 × 30 cm）を用い partition chromatography (9)を実施した。n–butanol：acetic acid：water ＝ 4：1：5 を system とする lower phase で column を equilibrate 後，sample を upper phase に溶解し organic phase で develop した。developing speed は 0.55ml/tube/15min.，80 tube develop 後 pyridine：0.2 N acetic acid＝1：4 の混合液で column を discharge し再利用に供した。fraction pattern は fluorescamine 法で蛍光強度を測定し検討した。〔蛋白量測定法〕bovine serum albumin を標準に Lowry 法で測定すると共に，微量の sample については Angiotensin Ⅱ を標準に fluorescamine 法を用い測定した(9)。sample を 300mM の boric acid（pH 8.5）250μl に溶解，fluorescamine 0.1mg/ml DMSO 液 500 μl を加え，excitation wave length 390 nm，emission wave length 475 nm で測定した。〔生物学的活性単位〕対照群と比較し，培養組織の ACh 産生能を 70 % 促進する蛋白（polypeptide）量を一生物学的単位（BU）とした。結果及び考察：Crude 海馬抽出液の蛋白濃度は一般に約 4 mg/ml であり，500 匹のラット海馬より約 650 mg の蛋白を得る事が出来た。この抽出液は中隔中心核培養組織の ACh 産生を濃度依存性に増加せしめ，約 60 μg/ml で飽和を示したが，それ以上の濃度では抑制傾向を示した。本標品の生物学的活性は 46 μg/ml で，650 mg 中の総活性は約 14130 BU であった。crude 抽出液に酢酸を加え，遠沈後超限外濾過フィルター（YM5）にて濾過した濾液（below YM5，B 5）の総蛋白量は Lowry 法で 22 mg，fluorescamine 法で 261 mg であった。検討した濃度範囲で B 5 は培養組織にほとんど抑制効果を示さず，3.0 μg/ml の蛋白濃度（Lowry 法）で飽和を示した（Fig(1)）。検量線より検討した生物学的活性は 0.6 μg/ml（fluorescamine 法にて 7.1 μg/ml）であり，総活性量は約 37000 BU であった。総活性量が crude 標品に比し約 2.6倍増加を示したが，これは crude 標品中の macro molecule が培養組織に悪影響を与えるものと考えられた。B 5 を凍結乾燥後少量の 0.2 N acetic acid に溶解，数回に分け Bio–Gel P2 column fractionation を実施すると，中隔中心核培養組織の ACh 産生を促進する因子は vitamin B12 と NADH との中間に elution され，Ribonuclease A，vitamin B12，NADH，Z－Glu－Tyr，Tryptophan を用いた分子量測定から，その分子量は約 900 と考えられた（Fig (2)）。数回の fractionation に於ける蛋白の回収率は 82 ～ 84 % であった。pool した活性分画の総蛋白量は Lowry 法で 3.7 mg，fluorescamine 法で 46.5 mg で，本法での精製率をそれぞれの蛋白測定法により算定すると約 6 倍，5.6 倍であった。また，dose response curve による pool 活性分画の生物学的活性は Lowry 法で 0.12 μg/ml, fluorescamine 法で 1.51 μg/ml，総活性量は 30800 BU で，活性の回収率は約 83 % であった。次に pool した Bio–Gel P2 column active fraction を十数回に分け，preparatie silica G TLC を実施した。本法に於ける蛋白及び活性の回収は比較的困難であり，種々の展開液，抽出法を試みたが，前記の方法が最も効率的であった。本法で活性物質は Rf 0.14 ～ 0.20 の部に移動し，TLC に application した資料の約 10 % がこの部の matrix から抽出され

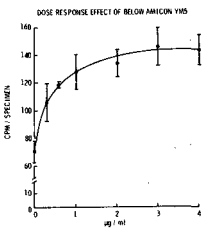


Fig (1)

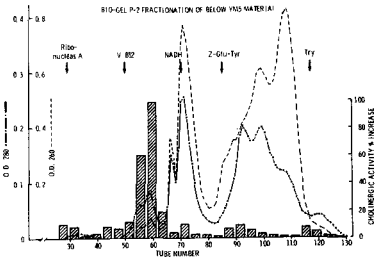


Fig (2)

た（fluorescamine 法）。また，総蛋白（ polypeptide ）の matrix からの回収率は 60 ～ 77 %（平均 68 %）であったが，dose response curve より得た生物学的活性は 0.13 ～ 0.25 μg/ml（fluorescamine 法），総活性は 26900 BU，活性の回収率は約 87 % と比較的良好であった。活性の回収率に比し，蛋白の回収率が低かったが，これは Rf の相異により matrix から抽出される割合が異なるものと考えられた。最後に TLC より抽出した活性分画 3.5mg（fluorescamine法）を数回に分け sephadex G 25 を用い partition chromatography（PC）を実施した。本 system を用いた PC では蛋白の回収率は 95 %以上であったが，column に application した sample の 65 %以上が discharge の際に回収され，少量の物質のみが develop 時に分画される事が判明した。一方，培養組織の ACh産生能を促進する因子はほとんど develop 中に分画され，本法は海馬因子の精製には非常に有用である事が確認された。活性因子は Rf = 0.12 の近傍に分画され（ Fig (3) ），pool した活性分画の総蛋白（poly peptide ）量は fluorescamine 法で 38 μg，生物学的活性は 2.0 ng/ml，総活性量は 19000BU で，活性の回収率は約 71 % であった。

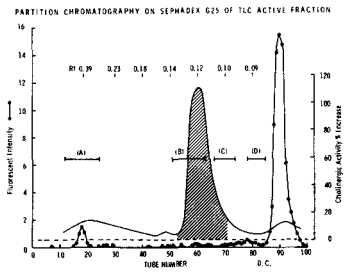


Fig (3)

以上の全精製過程に於ける物理的精製率は約 90000 倍，生物学的活性の精製率は約 270000 倍であった。また，B 5 以後の過程に於ける活性の回収率は 62 % であった（Table (1)）。

Table 1. Purification rate of each step

	Total Protein(mg)		BU (μg/ml)		Total BU	Recovery rate(%)	
	Lowry	Fluores	Lowry	Fluores		Protein	activity
Crude:	650		46		14130		
B5 :	22	261	0.6	7.1	37000		260
P2 :	3.7	46.5	0.12	1.51	30800	82–84	83
TLC :		3.5		0.13	26900	60–77	87
PC :		0.038		0.002	19000	95	71

文　献：

1. Black, I.B., Ann Rev Neurosci, 1: 183–214, 1978
2. Markelonis, G.J. et al, J. Neurochem, 37: 95–99, 1981
3. Buc-Caron, M.H. et al, Dev Biol, 95: 378–386, 1983
4. Smith, R.G. et al, Science, 219: 1079–1081, 1983
5. Manthorpe, M. et al, J. Neurochem, 34: 69–75, 1980
6. Ojika, K. et al, Proc Natl Acad Sci USA, 81: 2567–2571, 1984
7. 小鹿幸生他，神経化学，23: 351–353, 1984
8. Yamashiro, D., Nature, 201: 76–77, 1964
9. Udenfriend, S. et al, Science, 178: 871–872, 1972

159. 牛副腎髄質アクトミオシンの Ca^{2+} 制御機構

田中敏彦・神田啓子・伊藤和幸・藤尾　慈
祖父江憲治・垣内史朗　（大阪大・医・高次研・神経薬理生化）

〔要　約〕

副腎髄質アクチン・ミオシン相互作用のCa^{2+}制御機構を明らかにするため，牛副腎髄質より各種の収縮関連蛋白質を分離・精製し再構成実験をおこない，アクチン側およびミオシン側の両側制御機構が存在するという結果を得た．

まず，Ca^{2+}感受性を持つアクトミオシンを分離した．そのMg^{2+}-ATPase および超沈殿現象が10^{-6}M以上のCa^{2+}で活性化されること，カルモデュリン拮抗剤で阻害されることから，Ca^{2+}感受性因子は平滑筋同様にカルモデュリン（ＣａＭ）であることが示唆された．次に，副腎髄質ミオシン軽鎖キナーゼ（ＭＬＣＫ）を，ニワトリ砂嚢平滑筋ＭＬＣＫに対する抗体によって同定し，ＣａＭアフィニティーカラムなどを用いて部分精製した．両ＭＬＣＫは，アクトミオシンより精製したミオシンをCa^{2+}ＣａＭ依存性にリン酸化し，またactin-activated Mg^{2+}-ATPase 活性を増強した．

私たちは砂嚢平滑筋より，アクトミオシン相互作用をアクチン側から制御するカルデスモン（CaD_{150}）を発見したが，副腎髄質にも分子量の異なるCaD_{77}が存在することを見いだし精製した．CaD_{77}は副腎髄質において，平滑筋のCaD_{150}と同様のflip-flop 機構によりアクチン側の制御を行なっていることを見いだした．

Key word : Ca^{2+}-sensitive actomyosin of adrenal medulla, myosin light chain kinase (MLCK), caldesmon

副腎髄質からのカテコールアミン分泌にはＣａ$^{2+}$とＡＴＰが必要であり，アクチンやミオシンなど収縮系蛋白質の関与が考えられ，骨格筋の“興奮－収縮連関”に対応させて，“刺激－分泌連関”と呼ばれている(4)．カテコールアミン分泌の機序を解明するためには，副腎髄質におけるアクチン・ミオシン相互作用の制御機構を明らかにすることが重要である．このため，牛副腎髄質より各種の収縮関連蛋白質を分離・精製し，超沈殿とMg^{2+}-ATPase 活性を指標として再構成実験をおこない，アクチン・ミオシン系のＣａ$^{2+}$制御機構を検討した．

［実験方法］

<u>Ca^{2+}感受性アクトミオシン標品</u>　血小板アクトミオシン調整法と同様の方法で新鮮な牛副腎髄質をhomogenize・抽出・硫安分画し，さらに高イオン強度で溶解・低イオン強度で沈殿のcycle を２回繰り返して得た(7)．

<u>ミオシン</u>　江橋の方法によりアクトミオシンから粗ミオシンを抽出・分離し，これをSepharose 4Bカラムクロマトグラフィーを用いて精製した(1,3)．

<u>アクチン</u>　Spudich らの方法により，ウサギ骨格筋より精製した(5)．

<u>ＭＬＣＫおよびカルデスモン</u>　砂嚢平滑筋ＭＬＣＫ抽出法に準じて，牛副腎髄質をhomogenize・抽出・硫安分画し，ここからＣａＭアフィニティーカラムによりＣａＭ結合蛋白質分画を得た．これを DEAE-セルロースカラムにapply して，20 - 400 mM KCl linear gradient で溶出した．約180 mM KClで溶出された分画を粗ＭＬＣＫとして使用した(7)．カルデスモン$_{77}$は，同じカラムの100 mM KCl付近の分画を集めて濃縮し，Sephacryl S-300 ゲルクロマトグラフィーを行ない精製した(6)．

超沈殿　20 mM imidazole-HCl (pH 6.9), 0.5 mM DTT, 60 mM KCl, 10 mM $MgCl_2$, 0.4 mM ATP, 種々のCa^{2+}濃度（図参照）を含む反応液中，30℃でアクトミオシンの超沈殿を調べた．反応はATP 添加で開始，濁度を分光光度計(660 nm)でモニターした．

ATPase活性　反応液は20 mM imidazole-HCl (pH 6.9), 0.5 mM DTT, 60 mM KCl, 2 mM $MgCl_2$, 1 mM ATP, 種々のCa^{2+}濃度（図参照）を含む．ATP 添加で反応開始，30℃で5分間反応させた後，冷トリクロロ酢酸で停止し，Youngburg & Youngburg 法で遊離リン酸を測定した(9)．

［結果］

100 g の牛副腎髄質より約200 mgのCa^{2+}感受性アクトミオシンが得られた．ゲル電気泳動（図1）では，ミオシン・アクチンが主なbandであった．このアクトミオシンのMg^{2+}-ATPase （図2）と超沈殿は，ともに10 M以上のCa^{2+}濃度で活性化された．

超沈殿の実験系に trifluoperazine (TFP), chlorpromazine (CPZ), W-7, promethazine (PM) などのカルモデュリン拮抗剤を添加したところ，濃度依存性に超沈殿の阻害がみられ，それぞれのI_{50}は15, 70, 85, 440 μMであった（図3）．

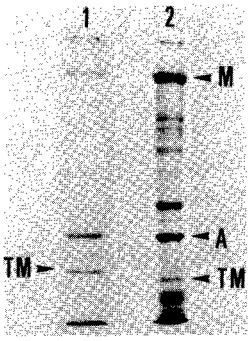


図1．ｱｸﾄﾐｵｼﾝ のSDS-ﾎﾟﾘｱｸﾘﾙｱﾐﾄﾞｹﾞﾙ電気泳動
lane 1: rabbit skeletal muscle
lane 2: adrenal medulla
M, myosin; A, actin; TM, tropomyosin

砂嚢平滑筋ＭＬＣＫ(135 k) およびＣａＤ$_{150}$に対する抗体を用いたイムノブロッティング法により，牛副腎髄質アクトミオシン中に砂嚢平滑筋とは分子量の異なるＭＬＣＫ(165k)とＣａＤ$_{77}$が存在することがわかった（図4）．

Mg^{2+} -ATPaseの実験系にＣａＤ$_{77}$を添加すると，濃度依存性にATPase活性の阻害がみられた（図5）．ＣａＤ$_{150}$添加でも同様の結果であり，またミオシンのリン酸化には影響がなかった．

ミオシンのMg^{2+}-ATPase 活性はＦ－アクチン添加により増加するが，Ca^{2+}ＣａＭ・ＭＬＣＫ存在下ではその増加がCa^{2+}非存在下の２倍以上であった（図6）．

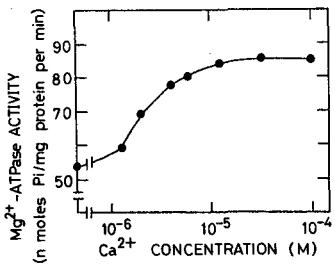


図2．Ca^{2+}濃度とMg^{2+}-ATPase 活性
Actomyosin (0.3 mg/ml) was incubated in a medium containing various concentrations of Ca^{2+} as indicated.

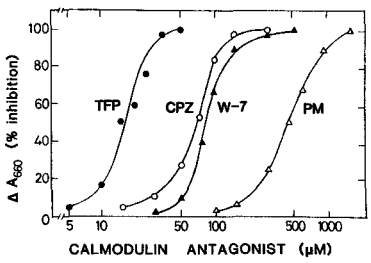


図3．ｶﾙﾓﾃﾞｭﾘﾝ拮抗剤による超沈殿の阻害
Various amounts of calmodulin-reacting agents were added to the reaction mixture containing 0.1 mM $CaCl_2$.

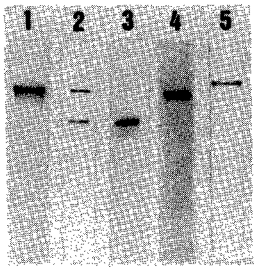


図4．イムノブロッティング法によるMLCK・CaDの同定
Proteins were subjected to SDS-polyacrylamide gel electrophoresis. The gels were stained with Coomassie brilliant blue. lane 1,gizzard CaD_{150}; lane 3, CaD $_{77}$; lane 4, gizzard MLCK. CaD and MLCK in medullary actomyosin were detected by immunoblotting method using anti-gizzard CaD_{150} IgG (lane 2) and anti-gizzard MLCK IgG (lane 5), respectively.

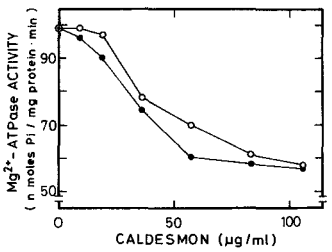


図5．CaD によるMg^{2+}-ATPase 活性の阻害
Increasing amounts of CaD_{150} (○) or CaD_{77} (●) were added to the reaction mixture as in Fig. 3.

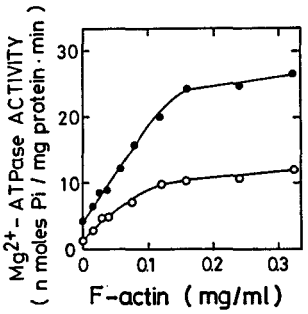


図6．ミオシンMg^{2+}-ATPase 活性と Ca^{2+}・CaM依存性MLCK
Medullary myosin (0.4 mg/ml) was incubated in a medium consisting of 20 mM imidazole・HCl (pH 6.9), 10 mM $MgCl_2$, 0.5 mM DTT, 25 μg/ml of MLCK and 0.1 mM $CaCl_2$ (●) or 1 mM EGTA (○). F-actin was added as indicated.

［考察］

副腎髄質に関して，アクトミオシン様蛋白質(8)やアクチンやミオシンを分離したという報告があるが，副腎髄質アクトミオシンの制御機構はほとんど不明であった．

Ca^{2+}感受性アクトミオシンのMg^{2+}-ATPase および超沈殿現象が10^{-6}M以上のCa^{2+}で活性化され，カルモデュリン拮抗剤で阻害されることから，Ca^{2+}感受性因子はカルモデュリンであることが示唆される．副腎髄質にもＭＬＣＫが存在し，部分精製したＭＬＣＫは，ミオシンをCa^{2+}ＣａＭ依存性にリン酸化し，またactin-activated Mg^{2+}-ATPase活性を増強した．即ち，平滑筋と同様のミオシン側制御機構(2) が存在する．

私たちは砂嚢平滑筋より，アクトミオシン相互作用をアクチン側から制御するカルデスモン（ＣａＤ$_{150}$）を発見したが，副腎髄質にもＣａＤ$_{77}$が存在しＣａＤ$_{150}$と同様のflip-flop 機構によりアクチン側の制御を行なっていることを見いだした．

以上，副腎髄質アクトミオシンには，アクチン側およびミオシン側の両側制御機構が存在するという結果を得た．現在，副腎髄質カテコールアミン分泌へのアクトミオシン系の関与を検討中である．

［参考文献］

1. Ebashi, S. (1975) J. Biochem. 79, 229-231
2. Hartshorne, D.J. & Siemankowski, R.F.(1981) Annu.Rev.Physiol.43, 519-530
3. Kanda, K., Sobue, K. and Kakiuchi, S. (1985) J. Biochem. 97, 961-964
4. Rubin, R.P. (1974) Calcium and the Secretory Process (ed. Rubin, R.P.) Plenum Press, New York
5. Spudich, J. A. and Watt, S. (1971) J. Biol. Chem. 246, 4996-4971
6. Sobue, K., Tanaka, T., Kanda, K., Ashino, N. and Kakiuchi, S.(1985) Proc. Natl. Acad. Sci. USA (in press)
7. Sobue, K., Tanaka, T., Kanda, K., Takahashi, K., Ito, K. and Kakiuchi,S. (1985) Biomed. Res. 6, 93-102
8. Trifaro, J. M. and Ulpian, C. (1975) FEBS Lett. 57, 198-202
9. Youngburg, G.E. & Youngburg, M.V. (1930) J. Lab. Clin. Med. 16, 158-166

160. ニューロフィラメント・アクチンフィラメント相互作用：Ca^{2+} による制御機構

岡部登志男・田中敏彦*・高橋克彦*・鬼頭ひろ志*・祖父江憲治*
（大阪大・医・精神，高次研・神経薬理生化*）

〔要　約〕

神経系細胞骨格の構成要素であるニューロフィラメント(NF)とアクチンフィラメント間の相互作用及びそのCa^{2+}制御機構について，low-shear falling-ball 法，電子顕微鏡観察などにより検討を行い，以下の結果を得た。1) アクチンフィラメントにNF標品を添加すると，NF標品の濃度に依存して粘度が上昇し，ついにはゲル化をきたす。2) この相互作用は10^{-6}M以上のCa^{2+}で抑制され（ゾル化），このゾル－ゲル変換は，Ca^{2+}濃度に依存して可逆的である。3) Triton処理によりNF標品のゲル化能及びCa^{2+}感受性が失われないことから，NF・アクチンフィラメント相互作用はNF標品中に混在する膜分画によるものではないと考えられる。4) NF・アクチンフィラメント相互作用を制御するCa^{2+}感受性因子は0.6M KCl処理でNF標品より抽出される。このことから，Ca^{2+}感受性因子はNF標品に付随していると推定される。電子顕微鏡下でこのCa^{2+}感受性因子を含む分画をアクチンフィラメントに添加するとアクチンフィラメントがCa^{2+}依存性に断片化するのが観察された。5) 0.6M KCl処理後のNF標品はゲル化能を有するが，Ca^{2+}感受性は消失する。6) Ca^{2+}感受性因子はゲルクロマトグラフィー上で66Kであった。

Key word：　Ca^{2+}-sensitive actin fragmenting factor, neurofilament, actin filament

細胞運動や細胞形態維持などに関わる物質基盤として細胞内線維状蛋白質が注目されるようになってきた。殊に，これら線維状蛋白質より構成される細胞構築は細胞骨格という概念のもとに最近広く受けいれられている。ニューロンでは細胞骨格構成要素として，ニューロフィラメント（ＮＦ），微小管，アクチンフィラメント（Ｆ－アクチン）の三種類の線維状蛋白質がある。この三種類の蛋白質は，細胞内で相互に三次元的網目構造を形成して軸索輸送，分泌，ニューロンの分化・伸長等の現象に深く関わっていると考えられる。近年，ＮＦ・微小管間，微小管・Ｆ－アクチン間の相互作用の生化学的並びに形態学的検索が進められてきた（7）が，ＮＦ・Ｆ－アクチン間の相互作用についてはこれまで報告がなかった。今回我々は，ＮＦ・Ｆ－アクチン相互作用並びにそのCa^{2+}制御機構を解明する目的で，以下のような実験を行った。

［方法］

ＮＦ標品の調整　1) intact ＮＦはRunge等の方法（6）を一部改変して牛脳白質より分離した。2) Triton処理ＮＦはintact ＮＦ中に終濃度0.5％となるようにTriton X-100を加え，混入した膜分画を可溶化し，遠心により除去したＮＦ分画である。3) 0.6M KCl処理ＮＦ　intact ＮＦ又はTriton処理ＮＦを0.6M KCl中で一昼夜透析した後，225,000×g，30分間超遠心して上清と沈澱分画に分離し，沈澱分画をKCl処理NFとした。

アクチンはSpudich & Wattの方法（8）に従いウサギ骨格筋より分離した。

Low-shear falling-ball 法はMac Lean-Fletcher & Pollardの方法（5）に従った。

SDS-PAGEはLaemmliの方法（3）で行い，蛋白質濃度はMicrobluret法（2）で測

定した。

〔結果〕

ＮＦ・Ｆ－アクチン相互作用は low-shear falling-ball 法により粘度変化を測定した。図１は，添加するＮＦ標品濃度変化に伴うＦ－アクチン粘度をCa^{2+}存否により測定したものである。intact ＮＦはCa^{2+}非存在下では濃度依存性に粘度上昇を示し，ついにはゲル化する。Ca^{2+}存在下では著明な粘度上昇を示さず，ＮＦ・Ｆ－アクチン相互作用はCa^{2+}存否に依存していることが明らかになった。（図１，○・●）。

次に，intact ＮＦとＦ－アクチン相互間のCa^{2+}濃度依存性を検討した。ＮＦ・Ｆ－アクチン相互作用は10^{-6}Ｍ以上のCa^{2+}によって阻害される（図２）。

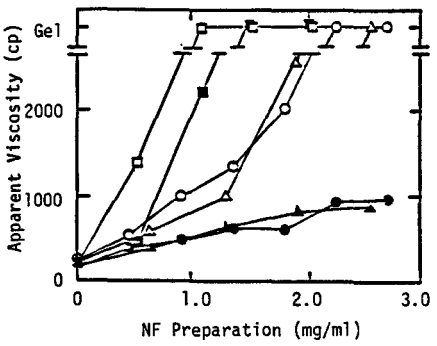


図１　ＮＦ標品によるF-ｱｸﾁﾝ粘度の変化
ｱｯｾｲ条件：　F-actin (0.42 mg/ml), 20 mM imidazole-HCl (pH 7.2), 100 mM KCl,0.1 mM DTT and 0.2 mM CaCl$_2$ (●, ▲, ■) or 1 mM EGTA (○, △, □)
ＮＦ標品：intact NF (○, ●), triton 処理 NF (△, ▲)
0.6 M KCl 処理 NF (□, ■)

ＮＦ標品中にはＮＦのトリプレット（200K，160K，68K）以外にもチューブリンをはじめ他の蛋白質が混在している。又，電子顕微鏡でＮＦ標品中に微量の膜分画が混入していることから intact ＮＦを Triton X-100 処理し膜分画を除去したＮＦとＦ－アクチンの相互作用を調べたが，ＮＦ標品のゲル化能及びそのCa^{2+}感受性は intact ＮＦと Triton 処理ＮＦとで有意の差がみられなかった（図１，△・▲）。SDS-PAGEでも両者の蛋白質パターンに差はみられなかった。すなわち，膜分画中にＮＦ・Ｆ－アクチン相互作用に影響を及ぼす因子は含まれていない。

続いて，ＮＦ・Ｆ－アクチン相互作用におけるCa^{2+}感受性因子の検討を行った。intact NF 又は Triton 処理ＮＦを 0.6 M KCl で一昼夜透析した後，超遠心にて上清と沈澱分画（0.6 M KCl 処理NF）に分離した。SDS-PAGE では intact NF と 0.6 M KCl 処理ＮＦ間でＮＦトリプレットに差は認められなかった。次に 0.6 M KCl 処理ＮＦ

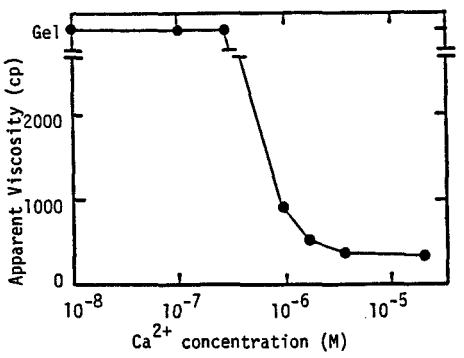


図２　intact NF･F-ｱｸﾁﾝ相互作用におけるCa^{2+}の効果
intact NF (3.34 mg/ml), F-actin (0.42 mg/ml)
他のｱｯｾｲ条件はCa^{2+}濃度以外は図１と同じ．

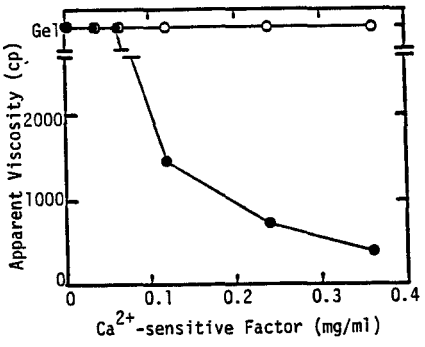


図３　0.6 M KCl処理NF・F-actin 相互作用
におけるCa^{2+}感受性因子の効果
0.6 M KCl 処理NF(3.6 mg/ml), F-actin(0.91 mg/ml)
0.2 mM CaCl$_2$ (●) or 1 mM EGTA (○)
他のｱｯｾｲ条件は図１と同じ．

・F－アクチン相互作用を検討した。0.6 M KCl 処理ＮＦのゲル化能は保持されているが，Ca^{2+}感受性は失われている（図１，□・■）。これはCa^{2+}感受性因子が 0.6 M KCl 処理により可溶化されたことを示唆している。実際，0.6 M KCl で抽出した上清分画を透析し，イオン強度を低下させた後，0.6 M KCl 処理ＮＦ・Ｆアクチン系に添加すると，上清分画の添加濃度に従ってCa^{2+}感受性が回復する（図３）。

以上の結果より，ＮＦ標品に付随していたCa^{2+}感受性因子が 0.6 M KCl 処理により抽出されたことが明らかとなった。

次にCa^{2+}感受性因子のＮＦ・Ｆ－アクチン間の作用機作を検討した。ネガティブ染色による電顕観察で，Ca^{2+}感受性因子を含む抽出分画はＮＦ・Ｆ－アクチンを直接解離させるのではなく，Ｆ－アクチンの断片化をCa^{2+}依存性におこすことが明らかとなった。これはＮＦ標品を含まないＦ－アクチンのみへのCa^{2+}感受性因子の添加によっても，Ｆ－アクチンの粘度の低下をきたすことから確認された。このCa^{2+}感受性因子はゲルクロマトグラフィー上で分子量６６Ｋに溶出された。

〔考察〕

以上よりＮＦとＦ－アクチン間に相互作用がみられ，ＮＦとＦ－アクチンとが架橋すること並びに，ＮＦ付随のCa^{2+}感受性因子がその相互作用に重要であることを示した。

ニューロンにおいてアクチンが著明な線維構造を形成していることが確認されている部位は軸索膜直下である（４）。Hirokawa はこの部位でＮＦとアクチンフィラメントの連絡を観察しており（１），ＮＦ・Ｆ－アクチン相互作用が存在することは形態学的にも支持される。

我々の結果から，ＮＦ・Ｆ－アクチン間の架橋は，１）ＮＦが直接Ｆ－アクチンと結合する，２）ＮＦ付随蛋白質がCross-linker となる，という２つの可能性が考えられるが現在検討中である。

〔文献〕

1) Hirokawa, N. (1982) J. Cell. Biol. 94, 129-142.
2) Itzhaki, R. F. & Gill, D. M. (1964) Anal. Biochem. 9, 401-410.
3) Laemmli, K. (1970) Nature. 227, 680-685.
4) LeBeux, Y. J. & Willemont, J. (1975) Cell Tiss. Res. 160, 1-36.
5) MacLean-Fletcher, S. D. & Pollard, T. D. (1980) J. Cell. Biol. 85, 414-428.
6) Runge, M. S., Schlaepfer, W. W. & Williams, R. C., Jr. (1981) Biochemistry. 20, 170-175.
7) Sobue, K., Tanaka, T., Ashino, N. & Kakiuchi, S. (1985) Biochim. Biophys. Acta 845, 366-372.
8) Spudich, J. A. & Watt, S. (1971) J. Biol. Chem. 246, 4966-4971.

161. Protein kinase C に対する単クローン抗体の作製と免疫組織化学

北野達郎・斎藤尚亮*・河本純子・橋本　規
吉川　潮・田中千賀子*・西塚泰美
（神戸大・医・第二生化，薬理*）

〔要　約〕

種々の神経伝達物質の受容伝達機構には細胞膜イノシトールリン脂質の代謝回転が関与していることが知られている。我々はこのイノシトールリン脂質の代謝回転に関連して活性化をうける蛋白質リン酸化酵素、protein kinase C について解析を行なっている。今回、protein kinase C に対する単クローン抗体の作製を行ない、ラットの神経組織における本酵素の局在を免疫組織化学的方法により検討した。

単クローン抗体は、ラット大脳より均一蛋白質として精製した protein kinase Cを抗原としてマウスを免疫し、3種類の単クローン抗体を得た。ウエスターンブロッティング法によりこれらの抗体が protein kinase C と特異的に反応することが確認された。

これらの抗 protein kinase C単クローン抗体を用いラットの神経組織の免疫染色を施したところ、 protein kinase C 陽性反応が認められた。ラット小脳においてはプルキニエ細胞のすべての細胞質、即ち perikaryon、dendrite、axon に強い protein kinase C陽性反応が認められた。

Key word： protein kinase C, immunohistochemistry, rat brain

〈 緒言 〉

種々の神経伝達物質やホルモン等の外界シグナルの受容伝達機構には、カルシウムイオンの動員と protein kinase C が密接に関与している。即ち、これらの外界シグナルは細胞膜イノシトールリン脂質の代謝回転を促進し、このリン脂質の代謝回転により生成される産物のうちイノシトール3リン酸は細胞内カルシウムの動員をもたらし、もう一方の産物であるジアシルグリセロールは protein kinase Cを活性化し、特異的な蛋白質リン酸化反応をひき起こす（1，4）。Protein kinase Cは各種の臓器、組織に広く分布するが、神経組織には特に強い本酵素活性が検出される。今回、protein kinase C に対する単クローン抗体を作製し、本酵素の神経組織における局在を解析した。

〈 実験方法 〉

① 単クローン抗体の作製：Protein kinase Cはラット大脳より単一蛋白質として精製した(3)。精製 protein kinase C を用いて BALB／C マウスを免疫し、脾細胞をとり出しマウスミエローマ細胞（P3U1)と細胞融合を行ない、HAT培地にてハイブリドーマ細胞を選別の後、スクリーニング、クローニングを行なった。得られたクローン細胞をマウス腹腔内にて増殖させ、腹水からEyらの方法（2)に従い、単クローン抗体をプロテインA－セファロースカラムクロマトグラフィーを用いて精製した。

② 抗体価の測定：単クローン抗体のスクリーニングは、精製 protein kinase Cをプレートに吸着し、ハイブ

リドーマ培養上清との反応の後、ＥＬＩＳＡ法により行なった。単クローン抗体の protein kinase Ｃに対する結合能は、単クローン抗体と protein kinase Ｃとの反応の後、Staphylococcus aureus (Cowan Ⅰ) を加え反応を行ない、反応液の遠心上清中の protein kinase Ｃ活性の測定により判定した。

③ ウェスターンブロッティング法： Protein kinase ＣのＳＤＳスラブゲル電気泳動を行ない、Towbinらの方法(５)により protein kinase Ｃをニトロセルロース膜に転写し、単クローン抗体と反応の後、ペルオキシダーゼ標識抗マウスIgGと反応し、ペルオキシターゼ反応により発色させた。

④ 免疫染色法： ウイスター系ラットをペントバルビタール麻酔下にて、左心室にカニューレを挿入し、0.01Mリン酸緩衝液生理食塩水にて灌流し、さらに4％ パラホルムアルデヒド、0.5％ グルタールアルデヒド、0.2％ ピクリン酸を含むリン酸緩衝液にて灌流固定した。脳組織を摘出し、4％ パラホルムアルデヒド、0.2％ ピクリン酸を含むリン酸緩衝液にて後固定し、サッカロース液にて洗浄の後、ビブラトーム切片を作製した。切片を浮遊状態にて、抗 protein kinase Ｃ単クローン抗体 (IgG量 5 μg／ml) を用いて免疫染色を施した。

〈結果および考察〉

ラット大脳より精製した protein kinase Ｃを用いてマウスを免疫し３種類の単クローン抗体が得られた。得られた３種類の単クローン抗体、ＣＫⅠ－３３、ＣＫⅠ－９７、ＣＫⅡ－９０、はプロテインＡ－セファロースカラムに吸着されることより３種類ともIgG 抗体であり、このカラムからの溶出条件からそれぞれ表１に示すサブクラスに属すると推定された。これらの単クローン抗体の protein kinase Ｃに対する結合能は、図１に示すように、ＣＫⅠ－３３は結合能が低いが、ＣＫⅠ－９７、ＣＫⅡ－９０は高い結合能を示した。またこれら３種類の単クローン抗体を混合した抗体を用いると、同一抗体量において ＣＫⅠ－３３、ＣＫⅠ－９７、ＣＫⅡ－９０、それぞれ単独の抗体よりも高い反応性を示すことから、これら３種類の単クローン抗体はそれぞれ protein kinase Ｃ の異なる部位を認識している可能性が高い。一方、ウエスターンブロッティング法によりこれらの単クローン抗体が protein kinase Ｃと反応することが確認された。また、ラット大脳粗抽出物を抗原として用いた場合、これらの単クローン抗体は protein kinase Ｃと推定される蛋白質バンドとのみ反応することよりこれらの抗体は protein kinase Ｃに対して特異性が高いと考えられる。

これら３種類の単クローン抗体を用いて、ラット脳組織において免疫染色を行なった結果、３種類の抗体とも神経組織に強い免疫反応を認め、３種類の抗体とも形態学的に同一の所見が得られた。また各単クローン抗体を精製した protein kinase Ｃとの吸収反応の後、免疫染色を行なうと免疫反応は消失した。この結果から、これらの単クローン抗体による陽性反応は protein kinase Ｃの存在を示すものと考えられる。小脳においては図２に示すように免疫反応はプルキニエ細胞のすべての細胞質、即ち、 perikaryon、dendrite、axon に認められ、プルキニエ細胞の樹状構造が詳細に観察された。免疫反応は細胞体から、樹状突起の細い突起にまで同様の強さ

で認められたが、小脳皮質における他の神経細胞は全く染色されなかった。また、他の神経組織をはじめ各種の生体組織においても protein kinase C陽性反応が免疫組織化学的に証明された。単クローン抗体を用いた protein kinase C の免疫組織化学的解析は、本酵素の局在を明らかにするとともに、本酵素の生理作用を解明するうえで有用であると考えられる。

表1　Protein kinase Cに対する単クローン抗体

Monoclonal antibody	Subclass
CKI-33	IgG_{2a}
CKI-97	IgG_{2b}
CKII-90	IgG_1

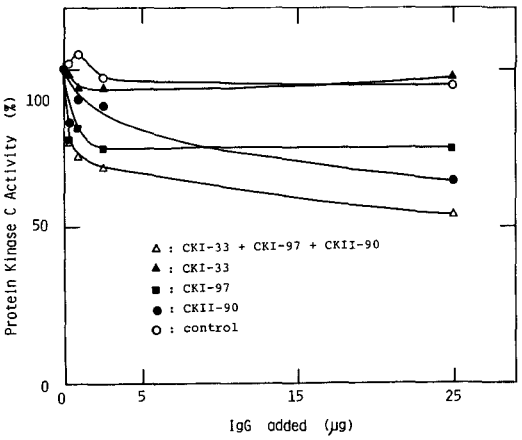


図1　単クローン抗体の protein kinase Cに対する結合能

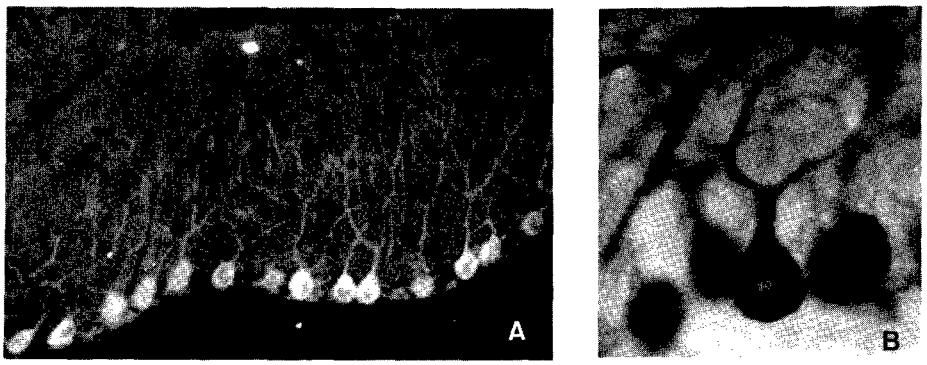


図2　抗 protein kinase C単クローン抗体を用いたラット小脳の免疫染色
A：FITC・蛍光抗体法（弱拡大）
B：Peroxidase－anti－peroxidase 法（強拡大）

〈文　献〉

1. Berridge, M.J. and Irvine, R.F. (1984) Nature, 312, 315-321
2. Ey, P.L., Prowse, S.J., and Jenkin, C.R. (1978) Immunocytochemistry, 15, 429-436
3. Kitano, T., Go, M., Kikkawa, U., and Nishizuka, Y. (1985) Methods Enzymol., in press
4. Nishizuka, Y. (1984) Science, 225, 1365-1370
5. Towbin, H., Staehelin, T., and Gordon, J. (1979) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 76, 4350-4354

162. Protein kinase C によるリン酸化の，adenylate cyclase に対する影響について

渡辺康裕・S. Bauer*・K.H. Jakobs*
（大阪大・医・第一薬理，ハイデルベルグ大・薬理研*）

〔要　約〕

受容体刺激と共役するadenylate cyclase 調節とphosphoinositide代謝間の相互作用を検討するため，protein kinase Cを直接に活性化するtumor-promoting phorbol ester によるヒト血小板の前処理、または、部分精製されたprotein kinase C のヒト血小板膜分画への添加の、adenylate cyclase 活性調節における影響を検討した。

その結果、それらの処置により、forskolin またはNa-Fによるadenylate cyclase 活性は変化せず、PGE_1刺激活性は増加し、阻害的GTP 結合蛋白を介するepinephrine による阻害は減じた。また、AC活性におけるGTP 作用において、阻害相のみが消失した。Ns の欠如するcyc⁻ S49 lymphoma cellにおいても、TPA 処置により、somatostatinによるAC活性の阻害は減じた。最後に、PKC は、精製された阻害的GTP 結合蛋白のα－subunit（41 K dalton）をリン酸化した。

以上の結果より、活性化されたprotein kinase Cにより、阻害的GTP 結合蛋白がリン酸化され、その結果、hormone によるGTP 依存性阻害的GTP 結合蛋白を介するAC活性の阻害が抑制されると考えられる。

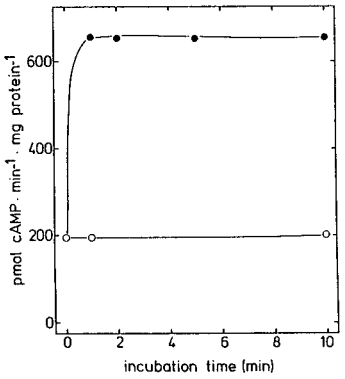
Key word：inhibitory GTP-binding Protein, protein kinase C, phorbol ester.

ヒト血小板において、prostaglandin（PGE_1, I_2, D_2）は刺激的GTP 結合蛋白（Ns）を介して、adenylate cyclase (AC) の活性を増加させ、又、血小板でのcyclic AMP レベルも上昇させる。epinephrine (Epi) は阻害的GTP 結合蛋白（Ni)を介して活性を減少させ、cAMPレベルも低下させる。一方、thrombinは、AC活性を減少させるが、cAMPレベルを減少させない（1）。thrombinは、phosphoinositide代謝を高める故に、Epi とthrombinの差異は、PI代謝の変化が、AC系に影響をあたえると考え、Ca-activated,phospholipid-dependent protein kinase（protein kinase C, PKC）によるphosphorylation がreceptor-AC systemにあたえる影響について、tumor-promoting phorbol ester（12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate, TPA)（7）をもちいて検討した。

実験方法

ヒト血小板、または cyc⁻ S49 lymphoma cell 膜分画をもちいた（2、4）。TPA処理は、血小板suspensionを37°C、5 min 0.5 % aceton または 1 μM TPA とともにincubateしたのち、膜分画を得た。PKC は、Kawaharaらの方法（6）により、hen oviduct より部分精製（約800 倍、300 mU/mg protein）した。PKC 1 mU/ml をAC activity assay medium に加えて、膜分画に対する影響を検討した。AC activity は、50μM α-^{32}P ATP (0.2 μCi/tube), 2 mM $MgCl_2$, 1 mM IBMX, 0.1 mM cAMP, 1 mM DTT, 5 mM creatine phosphate, 0.4 mg/ml creatine kinase, 2 mg/ml BSAに、膜分画を加えて、25°C、10 min反応させ、測定した（3）。

図 1 Time course of TPA modulation of PGE_1 plus GTP stimulation of human platelet adenylate cyclase. Intact human platelets were pretreated for the indicated periods of time without (○) and with 1 μM TPA (●). After membrane preparation, adenylate cyclase activity was determined with 10 μM PGE_1 and 10 μM GTP.



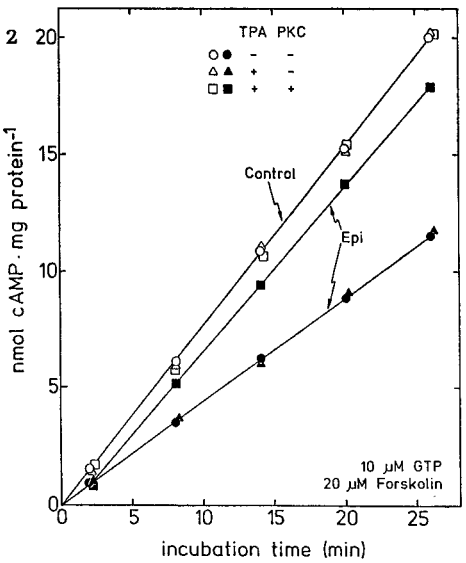
実験結果と考察

［TPA 処置ヒト血小板AC活性］

ヒト血小板suspensionを1 μM TPAにてincubateし、その膜分画のAC活性を測定した。basal 活性、forskolin(FO)-stimulated, NaF-stimulated AC 活性は変化しなかったが、PGE_1刺激AC活性は、GTP が存在しない場合、または、低濃度の場合には、変化がなかったが、高濃度のGTP の存在にて、AC活性は増大した。この時、TPAのhalf maximal効果は、約10 nM, maximal効果は1 μMで観られた。 TPA 処置の効果は37°C、1 分間にてほぼmaximal に達した（図１）。

次に、TPA 処置ヒト血小板AC活性における阻害を観た。 PGE_1－stimulated AC活性におけるEpi の阻害のtime course において数分間のtime lagのあと、Epi による阻害は減じた。また、unstimulated 並びに stimulated AC活性におけるEpi, thrombin の阻害は、TPA 処置により減じた。 tumor non-promoting phorbol ester である4-O-methyl TPAは、それらの効果はなかった。 FO-stimulated AC 活性における、"P-site" に作用するdideoxyadenosine, 高濃度Ca^{2+}による阻害は変化しなかった。

図 2

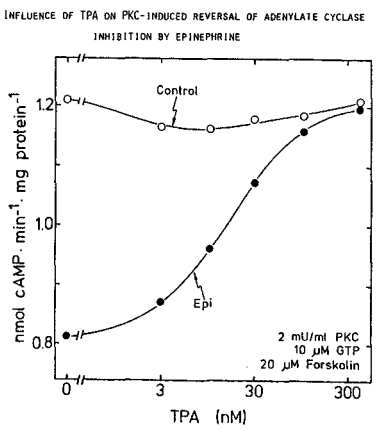


FORSKOLIN STIMULATION OF ADENYLATE CYCLASE WAS NOT AFFECTED BY TPA AND PKC. FURTHERMORE, TPA ALONE HAD NO EFFECT ON EPINEPHRINE-INDUCED INHIBITION. HOWEVER, PKC IN COMBINATION WITH TPA REVERSED THE EPINEPHRINE-INDUCED INHIBITION AFTER A LAG PHASE OF ABOUT 2 MIN AT 30°C.

［部分精製PKC 処置によるAC活性の変化］

ヒト血小板suspensionにおけるTPA 処置の効果が、PKC のdirectな刺激であるのかを観るため、部分精製PKC をAC assay mediumに加え、その影響を観た。図２はFO-stimulated AC活性、並びに、30 μM Epi による阻害のtime course を示す。FO-stimulated AC活性は、TPA 単独添加、並びに、TPA にて活性化されたPKC を添加した場合ともに変化しなかったが、Epi 30 μM の阻害は減じた。この際、GTP 濃度が高濃度の場合（約10 μM ）、Epi の阻害は減じたが、GTP 濃度が低い場合、propranolol 10 μM 存在下、Epi 30 μM はAC活性をむしろ増した。次に、PGE_1-stimulated AC活性におけるTPA-activated PKC 添加の効果を観た。TPA-activated PKC 添加にてPGE_1-stimulated AC活性は増加し、さらにEpi による阻害は減じた。この時、TPA のhalf

図３



INFLUENCE OF TPA ON PKC-INDUCED REVERSAL OF ADENYLATE CYCLASE INHIBITION BY EPINEPHRINE

IN THE PRESENCE OF PKC, ADDITION OF TPA CAUSED A CONCENTRATION-DEPENDENT REVERSAL OF EPINEPHRINE-INDUCED INHIBITION OF ADENYLATE CYCLASE. THE EFFECT OF TPA WAS HALF-MAXIMAL AND MAXIMAL AT ABOUT 10 AND 100 NM, RESPECTIVELY.

maximal また maximal 濃度は、前述の結果と同様であった。（図３）次にAC活性に対するGTP の影響を観た。TPA-activated PKC の添加により、GTP 低濃度（～0.1 μM～）におけるAC活性は変化せず、Ｎｉと関連するGTPによる阻害相（１μM～）は消失した（図４）。これらの結果より、TPA はPKC を活性化し、その作用をもつと考えられた。

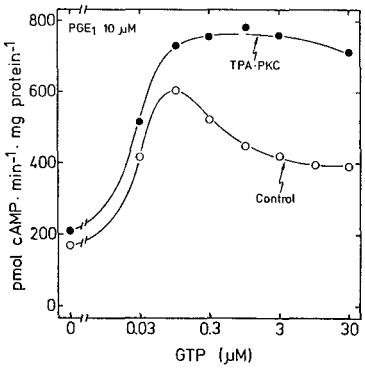
［cyc⁻ S49 cell を用いて］

Ｎｓが欠如するcyc⁻ S49 cell を用いて同様に検討した。FO-stimulated AC活性におけるsomatostatinの阻害を観た。種々の濃度のTPA により処置されたcellより得られた膜分画のAC活性におけるsomatostatinの阻害は減じた。

この様に、TPA はPKC を直接に活性化してヒト血小板にて刺激性受容体・AC系を構成するACのcatalytic moiety, Ｎs-protein, 刺激性受容体、並びに、その三者間の相互作用には影響せず、抑制性受容体・AC系に影響すると考えられた。TPA 処理の影響は、Islet-activating proteinによるＮｉのADP-ribosylationの結果と同様であった。さらに、図４の結果より、Ｎｉの機能に特異的に関連すると考えられる。最後に、phosphatidylserine, Ca^{2+}により活性化されたPKC は、精製されたＮｉ蛋白の α-subunit(41 K dalton)をリン酸化した（５）。

以上の結果は、AC活性は、Ｎｉ（α-subunit）におけるリン酸化、脱リン酸化により調節されること、また、AC活性調節とPKC を生理的に活性化するphosphoinositide代謝の間に密接な関連があることを示す。

図４



INFLUENCE OF PKC ON STIMULATION OF HUMAN PLATELET ADENYLATE CYCLASE BY PGE_1 AND ITS REGULATION BY GTP

References (1) Aktories, K. and Jakobs K.H. (1984) Eur.J.Biochem. 145, 333-338. (2) Jakobs, K.H., Lasch P., Aktories, K., Minuth, M. and Schurtz, G. (1982) J.Biol.Chem. 257, 2829-2833. (3) Jakobs, K.H., Saur W. and Schurtz, G. (1976) J.Cyclic Nucleotide Res. 2, 381-392. (4) Jakobs, K.H. and Schurtz, G. (1983) Proc.Natl.Acad.Sci.USA. 80, 3899-3902. (5) Katada, T., Gilman, A.G., Watanabe, Y., Bauer, S. and Jakobs K.H. Eur.J.Biochem. in press. (6) Kawahara, Y., Takai, Y., Minakuchi, R., Sanao, K. and Nishizuka, Y. (1980) Biochem.Biophys.Res.Commun. 97, 309-317. (7) Nishizuka, Y., Takai, Y., Kishimoto, A., Kikkawa,U. and Kaibuchi, K. (1984) in Recent Progress in Hormone Research (Greep, R.O., edi.) 40, 301-345, Academic Press, Orland.

163. カルモデュリン拮抗剤マストパランの細胞内マイクロインジェクションによるゾウリムシの行動変化

芳賀信幸・黒田洋一郎*

(東北大・理・生物, 東京都神経研・神経生化*)

〔要　約〕

1．　ゾウリムシ（Paramecium）は刺激をうけると膜電位依存性Caチャンネルが開いて、外液のCaイオンが細胞内に流入する。細胞内Caイオン濃度が一時的に上昇すると、繊毛の波打ち方向が反転し、逆方向に泳ぐようになる（回避反応）。

2．　この回避反応の過程におけるカルモデュリン分子の関与を探るため、強いカルモデュリン・アンタゴニスト活性をもつマストパランをゾウリムシにマイクロインジェクションし、その遊泳行動を観察した。

3．　マストパラン（1．2 μM）の細胞内注入により、ゾウリムシの後退遊泳の継続時間は短くなり、注入後、約20－30分で最短値（無処理の約40％）をとり約80分後には回復した。

4．　このマストパランの効果は1　2 nM から有効で濃度依存性がみられた。また、マストパラン注入による遊泳速度や遊泳動作に著しい変化はみられなかった。

5．　後退遊泳の継続時間はCa内向き電流の大きさに比例している証拠があるので、マストパランはカルモデュリンを介してCaチャンネルの修飾に関与している系に作用している可能性が考えられる。

Key word：　Calmodulin, Mastoparan, Paramecium behavior.

[Introduction]

マストパラン（Mastoparan ；MP）はハチ毒腺より肥満細胞の脱か粒を指標に精製されたテトラデカペプチドで(1) 細胞外投与により副腎髄質クロマフィン細胞などからカテコールアミンの遊離(2) や神経細胞の脱分極(3) を起こすことが知られている。近年、MPが高い親和度（Kd≈1nM）でカルモデュリン分子と結合し、カルモデュリンの活性を阻害することが判明した(4)。また、ホスホジエステラーゼのカルモデュリンによる活性化はカルモデュリン・アンタゴニストとして知られているW－7よりも低い濃度のMPによって阻害された(5)。

原生動物ゾウリムシ（Paramecium）類は、障害物への接触などの刺激によって細胞膜が脱分極し、膜電位依存性Caチャンネルが開き、細胞内Caイオン濃度上昇が起こる。この上昇したCaイオンレベルによって繊毛の波打ちが反転し、ゾウリムシは逆方向へ泳ぎ出し、通常、約40－60秒間　逆方向への泳ぎを継続する。この逃避行動ができないミュータントが数多く得られており、Caチャンネルの異常が発見されている(6)。また，野生株の細胞質をミュータントに細胞内注入すると、この機能が回復することが知られ(7)、この回復に有効な物質（Curing factor）の精製も進んでいる(8)。

本研究は　この後退遊泳に伴う物質変化の過程にカルモデュリン分子が関与しているかどうかを探るために、マストパランのマイクロインジェクションを試みたものである。

［実験方法］

Paramecium caudatum G３型（野生型）に約４０pl（細胞容積の約１０％）の種々の濃度のＭＰを二本針法で注入し（小泉の方法の変法）[9]、一定時間後に通常液（１０％ lettuce juice medium in Dryl's soln ）から、テスト液（２０Ｋ－Dryl's soln; ２０ mM KCl，１ mM Na_2HPO_4，１ mM NaH_2PO_4，２ mM Na－citrate，１．５ mM $CaCl_2$）に移し 後退遊泳を測定した。

［結果と考察］

Fig. １に示したように１．２ μMのＭＰを細胞内注入したゾウリムシの後退遊泳時間は注入後２０－３０分で最大変化を起こし無処理（４０秒間）の約４０％に短縮された。この短縮効果はゆっくりと回復し、注入８０分後には元の長さにもどる可逆的変化であった。１０倍濃度のＭＰを同様に注入したとき、この効果は増強され、とくに注入後の回復が大巾に遅れた。ＭＰの濃度を変化

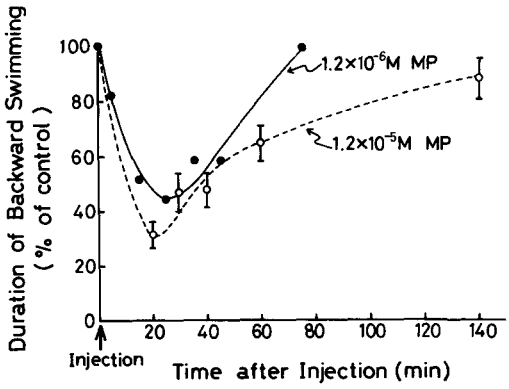


Fig. 1

させ後退遊泳時間をみるとFig. ２のように １２ nM－１２ μMまで濃度に正比例して後退遊泳時間の短縮が起こった。しかし １２０ μM 以上のＭＰの注入は細胞に対してtoxic で行動を観察できなかった。見かけのEC_{50}は 約０．２ μM，同じＭＰ標品を用いて測定した脳ホスホジエステラーゼ／カルモデュリン（阪大、祖父江先生よりの御恵与）活性系でのIC_{50}は約０．１μMであった。注入したＭＰの細胞内での分散を考慮するとこの２つの数値は良く一致していると考えられる。

遊泳速度や遊泳動作そのものは、ＭＰ注入後も変化しなかったので ＭＰは、繊毛運動器官ではなく、後退遊泳を調節しているシステムに特異的に作用している可能性が高い。また ＭＰを２つに切ったヘプタペプチド ＭＰ１－７，ＭＰ８－14はカルモデュリン活性をほとんど阻害しないが両者をそれぞれ１２ μMになるよう混合して細胞内注入したところ このような後退遊泳時間の短縮はみられなかった。さらに細胞外にカルモデュリン・アンタゴニスト Ｗ－７（約２０ μM）を投与すると、やはり後退遊泳時間が短縮し、同時に内向きＣａ電流も減少することが報告されて

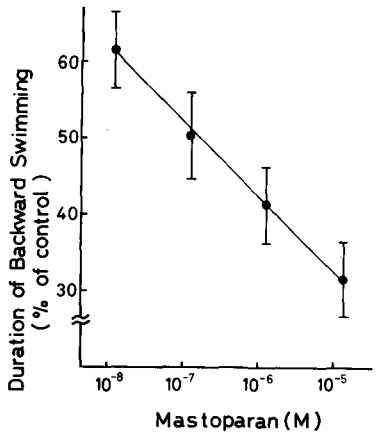


Fig. 2

いる(10)。また種々の後退遊泳に異常を起こすミュータントの解析や、 curing factorによるＣａチャンネルの機能回復の実験から後退遊泳時間の長さは、内向きＣａ電流の大きさに比例していることが明らかにされている(8,11)。

以上のことから、ＭＰの作用は カルモデュリンによるＣａチャンネルの修飾を介している可能性が示唆されるが 今後、電気生理学的解析を行う必要がある。

本研究の一部は文部省科学研究費特別研究(59123006)の援助により行われた。

［文献］

1) Hirai,Y. et al (1979) Chem. Pharm. Bull 27, 1942.
2) Kuroda, Y. et al (1980) Proc. Japan Acad. 56, Ser B 660.
3) Ohguchi, Y. et al (1984) Jap. J. Physiol. 46, 366.
4) Malencik, D.A.& Anderson, S.R. (1983) B.B.R.C. 114, 50-56.
5) Barnett, M. et al (1983) Biochem. Pharm. 19, 2929.
6) Satow,Y. & Kung, C. (1980) J. Exp. Biol. 84, 47-71.
7) Haga, N. et al (1982) J. Cell Biol. 82, 559-564.
8) Haga, N. et al (1984) Cell 39, 71-78.
9) 芳賀信幸 (1984) 細胞工学 3, 717-724.
10) Hennessey, T.M.& Kung, C. (1983) J. Exp. Biol. 110,169-181.
11) Haga, N. et al (1984) J. Neurogenetics 1, 259-274.

164. ラット脳におけるカルシウム拮抗薬とムスカリン性アセチルコリン結合部位の相互作用

片山禎夫・鬼頭昭三・松林弘明・三好理絵
(広島大・医・第三内科)

〔要　約〕

私共は，RRAを用いた結合阻害実験により，カルシウム拮抗薬であるverapamilがm−ACh antagonistと互いに結合を阻害するというデータを得られたので，報告した。最近，糸賀とEhlertの研究によってカルシウム拮抗薬がニューロン自体にも特異的に結合する事が確証され，注目されている。

本実験では，Wistar系雄ラット大脳皮質mitochondrial synaptosome分画を用い，標識物質，非標識物質を同時に加え，吸引ろ過法により，結合型リガンドの放射性活性を定量した。

結果は，^{3}H−nitrendipineの特異的結合は，m−ACh agonist, antagonistいずれにも阻害を受けなかった。^{3}H−verapamilの特異的結合は，m−ACh agonistでは阻害を受けず，m−ACh antagonistでは高度の阻害を受けた。一方^{3}H−QNBの特異的結合は，カルシウム拮抗薬のうちnicardipine, verapamilにおいて，高度の阻害を受けた。この事より，(1)カルシウム拮抗作用を示す，nitrendipineとverapamilの結合部位は異なる。(2) verapamilの結合により，m−AChRは変化し，m−ACh antagonist結合により，verapamil結合部位が変化すると考察される。

Key word：　カルシウム拮抗薬，m−ACh，RRA

〔目的〕

カルシウムチャンネル拮抗薬は，従来より狭心症，高血圧等の心血管系障害に対する治療薬として，特に薬理学的作用機序の観点から注目されている。最近，糸賀とEhlertの研究によってカルシウムチャンネル拮抗薬が血管平滑筋のみでなく，消化管平滑筋に，さらにニューロン自体にも特異的に結合する事が確証された。(1,2)よってカルシウムチャンネル拮抗薬の薬理学的特性の研究に新天地を開いたと云えよう。

カルシウムイオンは，筋収縮性蛋白を活性化するばかりでなく，中枢性及び末梢性神経伝達と関係しており，かつ神経終末におけるニューロトランスミッターの放出を調節している事も知られている。カルシウムイオンは細胞膜伝導及び細胞内伝達において，第二の伝達系の1つとして重要な役割を果していると考えられている。このカルシウム伝達系は，もう1つのsecond messenger系の代表である，cAMPと相関していると考えられている。

中枢神経系の大部分のアセチルコリン受容体（AChR）は，ムスカリン様アセチルコリン受容体（m−AChR）であることは知られているが，AChRは，agonistによって刺激されると，細胞内へのCa流入を誘発し，phospholipase A_2が活性化され，その結果遊離された不飽和脂肪酸によって，膜結合性guanilate cyclaseが活性化される。それにより，効果器細胞内のcyclic GMP（cGMP）レベルが上昇するとされている。

私共は，この実験において，radio recepto assay（RRA）を用いて，ラット大脳皮質synaptosome分画への，カルシウムチャンネル拮抗薬の結合が，各種ACh作動薬により，どの様に変化するのか，また反対に，ACh作動薬の結合が，化学構造の異なる数種の

カルシウムチャンネル拮抗薬によりどの様に変化するのかを検索することを目的とした。(3, 4)

[方法]

(1) ^{3}H 標識物質

カルシウムチャンネル拮抗薬は, ^{3}H−verapamil (83.9Ci/mmol), ^{3}H−nitrendipine (79.5Ci/mmol), ACh 拮抗薬は, ^{3}H−QNB (30.1Ci/mmol) を用いた。

(2) 非標識物質

カルシウムチャンネル拮抗薬として, nifedipine, nicardipine, diltiazem, verapamil, ACh 作動薬として, pilocarpine, carbachol, methacholine, ACh 拮抗薬として, ムスカリン様の, atropine, QNB, ニコチン様の, d−tubo−curarine を用いた。

(3) 細胞膜下分画

Wistar 系雄ラット (200−250g) の大脳皮質を10倍容量の氷冷 0.32M sucrose 中でホモジナイズし, 900×g で10分間遠沈し, その上清をさらに, 11,500×g で20分間遠沈して, mitchondrial synaptosome 分画 (P_2 分画) を得た。

(4) 緩衝液

^{3}H−nitrendipine の結合実験では, 50mM Tris/HCl pH 7.4 を用いた。^{3}H−verapamil の結合実験では, 50mM Tris/HCl pH 7.4 + 0.1% bovine serum albumin を用いた。^{3}H−QNB の結合実験では, 0.1M phosphate buffer を用いた。

(5) フィルターペーパー

^{3}H−nitrendipine 及び ^{3}H−QNB の結合実験には, Whatman GF/B を用いた。^{3}H−verapamil の結合実験には, 0.3% polyethylenimine 前処置の Whatman GF/C を用いた。

(6) 光源

^{3}H−nitrendipine, nicardipine, nifedipine を用いる時は, sodium light 下で行なった。

(7) インキュベーション条件

上記の ^{3}H 標識物質を用いた結合実験は 27℃, 60min である。

[結果]

(1) ^{3}H−nitrendipine 結合に対して ACh agonist である, pilocarpine, carbachol, methacholine はいずれも無影響であった。

(2) ^{3}H−nitrendipine 結合に対して, m−ACh antagonist である QNB, atropine 及び n−ACh antagonist である, d−tubo−curarine は, いずれも無影響であった。

(3) ^{3}H−verapamil 結合に対して, pilocarpine, carbachol は無影響であったが, methacholine のみは, 10^{-4}M では, 40%, IC_{50} は, 7×10^{-5}M の抑制を示した。

(4) ^{3}H−verapamil 結合に対して, m−ACh antagonist である QNB は, maximal inhibition は 100%, IC_{50} は 1×10^{-5}M, atropine は, maximal inhibition は 45%, IC_{50} は 5×10^{-4}M の抑制を示した。n−ACh antagonist である d−tubo−curarine は無影響であった。

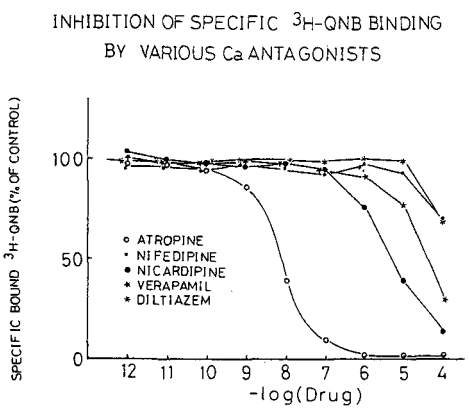
(5) ^{3}H−QNB 結合に対して, nifedipine, diltiazem で, maximal inhibition は, それぞれ 28%, 30% であった。nicardipine, verapamil は, maximal inhibition は, 86%, 70% で, IC_{50} は, nicardipine で 9×10^{-5} M, verapamil で 9×10^{-4} M で抑制を示した。

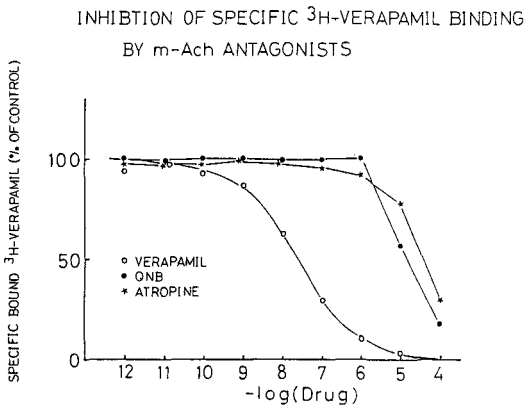
［考察］

^{3}H−nitrendipine 及び ^{3}H−verapamil を用いた各種 ACh 作動薬による結合阻害実験において，^{3}H−nitrendipine は，ACh agonist 及び antagonist ともいずれにも阻害を受けなかった。一方，^{3}H−verapamil は，ACh agonist では阻害を受けず，ACh antagonist により阻害を受けた。ACh antagonist の ^{3}H−nitrendipine binding と ^{3}H−verapamil binding に対するこの作用の違いは，化学構造の異なるカルシウムチャンネル拮抗薬の結合部位が異なることを示している。また，^{3}H−verapamil binding を m−ACh agonist は抑制せず，antagonist のみが抑制する所見がある一方で，ACh antagonist である ^{3}H−QNB binding を verapamil が強力に抑制する所見より，ACh antagonist が結合した m−ACh receptor と verapamil binding site が中枢神経系において密接な相互作用を示すと考えられる。一方 ACh agonist と結合した m−ACh receptor は verapamil binding site とは相互作用を示さないと考えられる。

また，^{3}H−QNB binding を dihydropyridine 系である nicardipine が強力に抑制したが，同じ dihydropyridine 系の nifedipine が抑制せず，このことは，化学構造において，側鎖が異なるために，nifedipine, nicardipine の binding site は異なると考えられる。

1. Ehlert, F. J., Itoga, E., Roeske, W. R., and Yamamura, H. I. (1982) Biochem. biophy Res. Com. 104, 937−943
2. Schoemaker, H., Itoga, E., Boles, R. G., Roeske, W. R., Ehlert, F. J., Kito, S., and Yamamura, H. I., (1982) The Proceeding of the Workshop on Nitrendipine Meething N. Y.
3. Itoga, E., Kito, S., Matsubayashi, H., Miyoshi, R., and Mixuno, K. (1984) In Neurotransmitter Receptors (Kito, Shozo., Segawa. T., Kariyama, K., Yamamura, H. I., and Olsen, R. W.) pp. 193−204 N. Y.
4. Ehlert, F. J., Roeske, W. R. and Yamamura, H. I. (1981) In Cholinergic Mechanisms (Pepeu, G., and Ladinsky, H.) pp. 609−619 N. Y.





165. ラット脳カルモデュリン特異性 N－メチル化酵素の精製とその特性

森野日出緒・川本立夫・柿本泰男・三宅正治*
（愛媛大・医・精神，機器センター*）

〔要　約〕

ある種の蛋白質は生合成後リン酸化、アセチル化、Ｎ－メチル化などの修飾を受け、その機能を果たすようになると考えられている。　多くの種のカルモデュリン（ＣａＭ）の１１５番目のリジン残基はトリメチル化を受けているが、タコなどの一部のＣａＭはメチル化を受けていない。　今回、我々は１）タコＣａＭを基質として蛋白質Ｎ－メチル化酵素をラット脳可溶性画分より約7000倍にまで精製した。　最終酵素標品の比活性は 9,7nmol/min/mg　でタコＣａＭ、Ｓ－アデノシルメチオニンに対するＫｍはそれぞれ22nM、0,8μＭであった。　２）本酵素はタコＣａＭのみをメチル化し、ウシＣａＭ、ＣａＭ以外のＣａ$^{++}$結合蛋白質、ヒストン・チトクロームＣなど既知のメチル化蛋白質をメチル化しなかった。３）本酵素はMn^{++}（$>10^{-7}$）またはCa^{++}（$>10^{-4}$M）を要求した。４）本酵素の生成物がモノ、ジおよびトリメチルリジンであることを高速液体クロマトグラフィー（HPLC）を用いて確認した。５）本酵素がメチル化するＣａＭ中のリジン残基はトリプシン限定分解ペプチドのＨＰＬＣによるマッピングから１１５番目のリジン残基であることを確認した。以上より、本酵素はＣａＭ特異性Ｎ－メチル化酵素であると考えた。

Key word：Octopus calmodulin, Protein N-methylation, Trimethyllysine

我々の研究室ではヒト尿中でのメチルアルギニンの発見[3]を端緒として蛋白質Ｎ－メチル化に関する研究を行なってきた。[4]　現在、ミエリン塩基性蛋白質・ヒストンなど種々の蛋白質がＮ－メチル化を受けていることが知られている。[7]　三宅ら[6]およびJackson[2]らによりラットおよびウシのカルモデュリン（ＣａＭ）がトリメチルリジン（ＴＭＬ）を含むことが発見され、その後、多くの種のＣａＭの１１５番目の残基がＴＭＬであることが明らかになった。しかし、タコや粘菌などのＣａＭは例外的にＮ－メチル化されていないが、Ｎ－メチル化を受けたＣａＭと同様に酵素活性化能を持つことが報告されている。[1][9]最近、ＣａＭのＮ－メチル化酵素がラット脳細胞質に存在することが報告された。[8]　今回我々はタコＣａＭが脳のＮ－メチル化酵素のよい基質となることを見出し、この酵素を精製し、その特性を調べた。

実験方法

１）実験材料：ウシ脳およびタコＣａＭは矢沢のＴＣＡ法[11]およびDEAE-Cellulose，Sephadex G-100，Phenyl-Sepharose CL-4B　クロマトグラフィーで精製し、SDS-PAGE上単一な標品を得た。タコCaM-Sepharose 4BはKleeらの方法[5]によって調整した。

２）Ｎ－メチル化酵素活性の測定：反応後２００μｌの組成は、５μｇ基質蛋白質、2,5μＭＳ－アデノシル－Ｌ－[メチル－^{3}H]－メチオニン（ＳＡＭ）（0,5μCi／0,5 nmol）酵素標品、0,1Ｍヘペス緩衝液、ｐＨ8,0、３mM２－メルカプトエタノール、0,1 mM MnClで、反応は３７°Ｃ、５分間行なった。１０％ＴＣＡでの洗浄、アルカリ処理を行なった後、ギ酸で溶解して放射活性を測定した。

３）メチルアミノ酸の分析：蛋白質を水解処理し、塩基性アミノ酸分画を調整した後、

島津ＳＣ－０７／Ｓ１５０４カラムを用い、0,1Ｍクエン酸ナトリウム、ｐＨ7,1を溶離液として４５°Ｃ、流速0,2 ml／minでメチルリジン体を分離した。

４）ＣａＭのトリプシン分解ペプチドの分離：ＣａＭを1／25量のＴＰＣＫ－トリプシンと１０mM炭酸水素ナトリウム、ｐＨ8,0、２mMＥＧＴＡ中で３７°Ｃ、１時間反応させた。分解物の高速液体クロマトグラフィー（ＨＰＬＣ）によるマッピングは μ Bonda pack Phenylカラムを用いた Vanaman らの方法[10]を一部変更して行なった。

５）蛋白定量：蛋白定量は Lowry らの方法あるいは Nakamura らの方法で行なった。

実験結果

１）Ｎ－メチル化酵素の精製：ウィスター系ラットの脳75,8ｇの１０万×ｇ上清から表１に示すような４段階の操作によりＮ－メチル化酵素を精製した。本酵素の至適ｐＨは7,5－8,5であり、ＳＡＭおよびタコＣａＭに対するＫｍはそれぞれ0,8 μＭ、２２nＭであった。ゲルロ過法に基づく推定分子量は5,6～5,8万であった。最終標品はＳＤＳ－ＰＡＧＥ上数本のバンドを示し、未だ混入蛋白質が存在すると考えられた。

表１、脳Ｎ－メチル化酵素の精製

Step	Protein (mg)	Total activity (nmol/min)	Specific activity (pmol/min/mg)	Purification (fold)	Yield (%)
1 105Kxg Supernatant	1560	2.15	1.38	1	100
2 $(NH_4)_2SO_4$ Fraction (40-70%)	503	2.60	1.99	1.4	121
3 Sephacryl S-200	25.9	1.27	49.0	35.5	59.1
4 Phospho-Cellulose	8.47	0.98	116	84.4	45.6
5 Calmodulin-Sepharose	0.0189	0.18	9740	7060	8.6

２）精製Ｎ－メチル化酵素の基質特異性：本酵素のタコおよびウシ脳ＣａＭ、種々の Ca^{++} 結合蛋白質、既知のメチル化蛋白質に対する基質特異性を表２に示した。タコＣａＭのみに著しいメチル基の取り込みが見られ、ウシＣａＭを含め他の蛋白質にはわずかの取り込みしか認められなかった。

表２、脳Ｎ－メチル化酵素の基質特異性

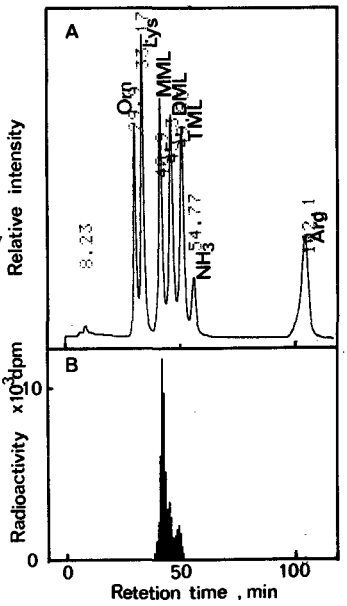
Substrate (5 μg)	^{3}H-Methyl incorporation (pmol/ 5 min)
Calmodulin,octpus	11.9
Calmodulin,bovine brain	0.1
Myosin light chains,rabbit	0.1
Troponin C,rabbit	0.3
S-100,bovine brain	0.1
Myelin basic protein,bovine	n.d.
Histone,calf thymus f_1	n.d.
Histone,calf thymus f_{2a}	n.d.
Histone,calf thymus f_{2b}	0.2
Histone,calf thymus f_3	n.d.
Cytochrome C horse heart	n.d.
Albumin, bovine serum	n.d.

３）精製Ｎ－メチル化酵素への２価イオンの影響：本酵素に対する Mn^{++},Ca^{++},Mg^{++} の影響を調べた。Mn^{++} と Ca^{++} はそれぞれ 10^{-7},10^{-4} Ｍで本酵素を十分に活性化したが Mg^{++} はわずかしか活性化しなかった。

４）精製Ｎ－メチル化酵素の生成物の同定：タコＣａＭがＮ－メチル化を受けていることを確認するために、［メチル－^{3}H］－ＳＡＭと精製酵素とともに反応させたタコＣａＭを Laemnli の方法で SDS-PAGE にかけた。染色後、ゲルを２mm毎の切片にし、各切片を過酸化水素で溶解させ、放射活性を測定した。放射活性はタコＣａＭのバンドと一致し、さらにタコＣａＭと同様にＣａ依存性の電気泳動度の変化を示した。［メチル－^{3}H］－タコＣａＭを６Ｎ塩酸、１１０°Ｃ、２４時間水解した後、塩基性アミノ酸分画を調整し、先述の条件下でＨＰＬＣにかけ、１分毎に分画し、放射活性を測定した。図１に示すように、放射活性はモノ、ジ、トリメチルリジン

の保持時間に一致した三峰性のピークを示した（回収率84％）。本条件下ではアルギニンとメチルアルギニン体はほぼ同じ保持時間を示すが、その溶出域では放射活性を認められなかった。次にウシＣａＭと［メチル－^{3}H］－タコＣａＭをトリプシンで限定分解してＨＰＬＣによりペプチドマップを作製した（図２）。同時に１または２分毎に分画し、アミノ酸分析と放射活性の測定を行なった。放射活性はピークＡに一致し検出された（回収率８２％）。ピークＡはアミノ酸分析の結果からＣａＭのトリプシン分解ペプチドＴ１１（107－１２６）と推定した。

図１、メチル化タコＣａＭ水解物のアミノ酸分析



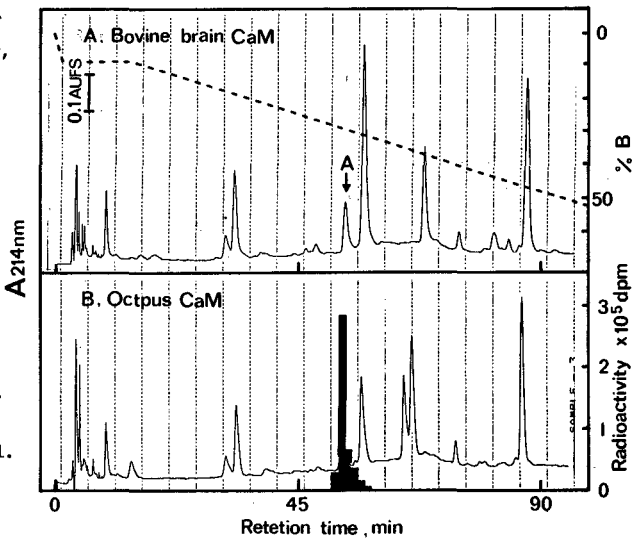
Ａ．アミノ酸標準液のクロマトグラム

Ｂ．［メチル－^{3}H］－タコＣａＭ水解物塩基性アミノ酸分画のクロマトグラム

考察

今回、蛋白質（リジン）：Ｎ－メチル化酵素をラット脳細胞質から約7000倍に精製したが、本酵素は以下の２点からＣａＭに特異的なＮ－メチル化酵素であると考えられる。(1)本酵素は１１５番目のリジン残基が既にトリメチル化されているウシＣａＭにはメチル基を転移せず、メチル化を受けていないタコＣａＭにのみメチル基を転移する。(2)本酵素によりタコＣａＭに転移したメチル基はトリプシン限定分解ペプチドの分析から１１５番目のリジン残基を含むペプチドのみに確認される。また、本酵素は、Mn^{++}またはCa^{++}要求し、既知の蛋白質（リジン）Ｎ－メチル化酵素とは異なる特性を示した。今後、さらに精製を進めるとともに、本酵素の特性について検索したい。

図２、ウシ脳ＣａＭとメチル化タコＣａＭのペプチドマップ



文献

1) Bazar,W.and Clarke,M. (1981) J.Biol. Chem. 256, 3598-3608.
2) Jackson,R.L., Dedman,J.R.,Schreiber, E.E., Bhathagak,P.K., Knapp,R.D. and Means,A.R. (1977) Biochem. Biophys.Res.Commun., 77, 723-729.
3) Kakimoto,Y. and Akazawa,S. (1970) J.Biol.Chem. 245, 5751-5758.
4) 柿本 泰男、 三宅 正治 (1974) 代謝 11, 1303-1319.
5) Klee,C.B. and Krink,M.H. (1978) Biochemistry 17, 120-126.
6) Miyake,M. and Kakiuchi,S. (1978) Brain Res. 139, 378-380.
7) Paik,W.K. and Kim,S. (1980) in Protein Methylation (Meister,A. ed.) pp. 8-25. John Wiley & Sons, New York
8) Sitaramayya,A., Wright,L.S. abd Siegel,F.L. (1980) 255, 8894- 8900.
9) Seaman,K.B. and Moore,B.W. (1980) J.Biol.Chem. 255, 11644-11647.
10) Vanaman,T.C. (1983) Methods Enzymol. 102, 296-310.
11) Yazawa,M., Sakuma,M. and Yagi,K. (1980) J.Biochem. 87, 1313-1320.

166. 白鼠上頚神経節の節前，節後神経切断とカルモデュリン

大島章子・佐野　護・河村則子・北島哲子・永田　豊*
（愛知県コロニー研・形態，藤田学園保衛大・医・生理*）

〔要　約〕

カルシウム結合蛋白であるカルモデュリンは，神経系においていくつかの重要な役割を果たしていると考えられているが，その詳細は明らかでない。神経組織におけるカルモデュリンの動態を明らかにすることを目的として白鼠上頚交感神経節の節前，あるいは，節後神経切断におけるカルモデュリンの変化を生化学的，及び免疫組織学的に調べ，以下の結果を得た。

1．白鼠上頚交感神経節のカルモデュリン量は，mg蛋白あたり，4.0ugであった。

2．節前神経切断をおこなった後のカルモデュリン量には，大きな変化は認められなかった。

3．節後神経切断をおこなうと，神経節あたりのカルモデュリン量は大きく増加したが，蛋白量も増加するため，蛋白あたりのカルモデュリン量はむしろ減少した。

4．カルモデュリンに対する特異的抗体を用い，免疫組織学的局在をみると，いずれの場合も神経繊維に強い反応がみられた。

5．シナプス結合の非常に少ない迷走神経節のカルモデュリン量はmg蛋白あたり 4.9 ugであった。

Key word：　Calmodulin, Superior cervical ganglion, Axotomy

白鼠上頚交感神経節では，節前繊維が節後神経細胞とシナプス結合をしているが，節前神経切断をおこなうと，節前繊維のWaller変性がおこり，アセチルコリン合成酵素活性が消失する。節後神経を切断すると，逆行性に神経細胞の変性がおこり，ドーパミン水酸化酵素活性が消失することがしられている(1) 一方，カルモデュリンは多機能を持つカルシウム結合蛋白であるが，神経系では，神経伝達物質の合成，遊離など重要な機能に関与していると考えられている。上頚神経節の節前或いは節後神経の切断による変化が，カルモデュリンにおよぼす影響について，生化学的および免疫組織学的に調べた。比較のため，シナプスが非常にすくない迷走神経節のカルモデュリン量についても調べた。

材料と方法

1．上頚神経節の摘出，節前或いは節後神経の切断手術は，Wistar系白鼠（体重 200－220g）を用い，既報(2) に従い実施した。

2．カルモデュリン定量にはウシ網膜のアデニル酸シクラーゼの活性化を用いた。カルモデュリン除去網膜アデニル酸シクラーゼの調製，及び活性測定は既報(7) に従った。上頚神経節（１ケ），迷走神経節（２ケ）は 0．5ml の１mMEDTA，１mMDTT を含む20mMTris緩衝液（pH 7．5)を加え，テフロングラスホモゲナイザー及び超音波で破砕した。ホモジェネートの一部は，Lowry らの方法(6) 蛋白の定量に用いた。残りは Gallien らの方法(3) に従い，TCA 処理後，カルモデュリン定量用試料とした。１mM $CaCl_2$，４％TCA を添加し４度Ｃ５分後，１Ｍの Trisで中和し，更に10mMTris緩衝液（pH 7．5)に対し透析後，その20ulをアデニル酸シクラーゼの活性測定系に添加した。

3．免疫組織化学には、カルモデュリンに対する精製特異抗体(4) を用いた。上頸神経節及び迷走神経節の固定は，既報の脳の固定法(8) にて行なった。凍結ミクロトーム切片及びパラフィン切片を作成し、前者は脳と同様、後者はヒト各種臓器に用いたのと同様の方法(9) でカルモデュリンの免疫組織学的局在を調べた。対照実験には非免疫ウサギIgG を用いた。

実験結果

1．カルモデュリンの微量定量

神経網膜のアデニル酸シクラーゼは，比活性が高く，脳組織の酵素に匹敵する。更に脳組織以上に顕著なカルモデュリン感受性を示すことを見出し，去年の本学会で報告した。この性質を利用し，カルモデュリンの微量定量を試みた。カルモデュリンをあらかじめEGTA，及び 0．5%Lubrol PXで除去したウシ神経網膜標品のアデニル酸シクラーゼ活性に対する添加カルモデュリンの効果を，図1に示したが数ngのカルモデュリンが定量可能であった。

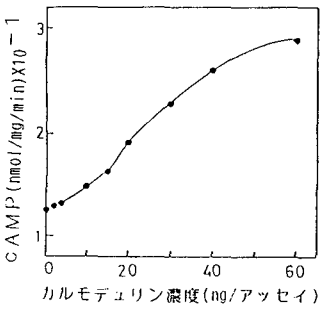


図1．ウシ網膜カルモデュリン依存性アデニル酸シクラーゼによるカルモデュリンの定量曲線

2．上頸神経節，迷走神経節のカルモデュリン量

材料と方法の項で述べた方法で，それぞれの神経節のカルモデュリン定量用試料を調製し，網膜アデニル酸シクラーゼを用いて定量した。未処置の上頸神経節，節前，節後神経切断7日目の上頸神経節，迷走神経節の蛋白量，及び神経節あたり，或いはmg蛋白あたりのカルモデュリン量を表1に示した。未処置の上頸神経節のカルモデュリン量は，神経節あたり約 330ng，mg蛋白あたり約 4ugであった。節前神経切断では蛋白量，カルモデュリン量とも大きな変化はなかった。一方，節後神経切断では，神経節あたりのカルモデュリン量は大きく増加したが，切断により蛋白量も増加するため，mg蛋白あたりのカルモデュリン量は未処置のものより低下していた。迷走神経節のカルモデュリン量は，上頸神経節の値より若干大きくmg蛋白あたり 4．9ug であった。

表1．節前(denervation)、節後神経切断(axotomy) 7日後の上頸神経節(SCG) 及び迷走神経節(NG)のカルモデュリン量。

		カルモデュリン量(ng)	
	蛋白量(ug)	神経節あたり	蛋白あたり(/ug)
SCG	83.6± 11.8	334.7± 47.5	4.00 ± 0.05
SCG(den)	93.1± 9.9	385.0± 32.3	4.17 ± 0.51
SCG(axo)	143.5± 25.2	458.5± 25.2	3.30 ± 0.68
NG	34.2± 9.2	162.3± 37.3	4.94 ± 0.13

3．上頸神経節及び迷走神経節のカルモデュリンの免疫組織学的局在

材料と方法の項で述べた方法で，上頸神経節，迷走神経節を固定し，作成した凍結ミクロトーム切片とパラフィン切片上のカルモデュリンの免疫組織学的局在を，精製特異的抗カルモデュリンIgG，ペルオキシダーゼ標識ヤギ抗ウサギIgG，DAB 反応を

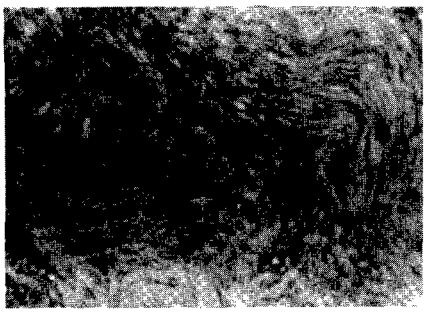
用いて調べた。この方法では，神経細胞体より神経繊維に明確な反応が認められた。節前，節後神経切断をおこなった上頸神経節でも同様に残存する神経繊維に反応がみられたが，特に図2で示すように節後神経切断で生じる渦巻状の構造に強い反応がみられた。迷走神経節では一部の神経繊維が強い反応を示した。

考察

上頸神経節は脊髄から標的器官へ行く神経の中継点であり，コリン作動性節前繊維が節後神経細胞とシナプス結合をしている。その節前繊維を切断すると，節前繊維はWaller変性をおこし，切断7日目にはアセチルコリン合成酵素が消失する　。シナプスも変性をおこすが，カルモデュリン量には大きな変化はなかった。このことは変性シナプスにもカルモデュリンが残っているか，或いはシナプスにおけるカルモデュリン量が全体量に対し大きい比率を占めていない可能性を示唆する。迷走神経節にはシナプスが非常に少ないと考えられているが，カルモデュリン量は上頸神経節より若干大きかった。一方節後神経を切断すると，節後神経細胞は逆行性に変性し，一部の神経細胞は脱落する。切断7日目には，節後神経細胞内の神経伝達物質合成酵素が消失する　。このような状態でもカルモデュリンの神経節あたりの量をみると減少せず逆に増加していた。節後神経切断により蛋白質を含む細胞成分が増加することがしられている。組織学的にみると神経繊維の増加とグリア細胞と考えられる細胞が増殖しグリオーシスをおこすのが認められている。免疫組織学的にカルモデュリンの局在をみると，カルモデュリンは未処置，処置にかかわらず，神経繊維に明確な反応を示した。更に節後神経切断上頸神経節では図2に示すように渦巻状に強い反応が認められた。最近，Koenigらは，神経繊維の再生時に，カルモデュリンを含む小胞が軸索内を早く動くのを報告している(5)が，節後神経切断後のカルモデュリンの挙動を考えると興味深い。免疫電顕など更に詳細な検討が必要と考えられる。

REFERENCES
1. Ando,M.,Nanba,T.,Okuya,M. & Nagata,Y. (1983) Brain Res. 267,313-321.
2. Ando,M.,Miwa,M.,Kato,K. & Nagata,Y. (1984) J. Neurochem. 42, 94-100.
3. Gallien,C.,Weinman,J.,Painteau,D. & Weinman,S. (1984) Exp. Cell Res. 155, 397-405.
4. Kitajima,S.,Seto-Ohshima,A.,Sano,M. & Kato,K. (1983) J. Biochem. 94, 559-564
5. Koenig,E.,Kinsman,S.,Repasky,E. & Sultz,L. (1985) J. Neurosci. 5, 715-729.
6. Lowry,O.H.,Rosenbrough,N.J.,Farr,A.L. & Randall,R.J. (1951) J. biol. Chem. 193, 265-275.
7. Sano,M. (1984) Bull. Japan Neurochem. Soc. 23, 318-320.
8. Seto-Ohshima,A.,Kitajima,S.,Sano,M., Kato,K. & Mizutani,A. (1984) Cell Struct. Funct. 9, 337-344.
9. Seto-Ohshima,A.,Sano,M. & Mizutani,A. (1985) Acta Histochem. Cytochem. in press.

図2．節後神経切断7日目のカルモデュリンの免疫組織学的局在



167. PC12 細胞の神経線維伸長とカルモデュリン

北島哲子・大島章子・佐野　護　（愛知県コロニー研・形態）

〔要　約〕

カルモデュリンの神経細胞に於ける役割を明らかにすることを目的とし、PC12細胞を用いて、NGF による神経細胞への分化過程に於けるカルモデュリンの挙動を調べた。

1．PC12細胞は、NGF 存在下で神経線維の伸長が促進され、神経細胞への分化の指標とされるが、フォルスコリンによっても同様の神経線維伸長作用が認められた。

2．カルモデュリンの局在を免疫組織化学的に検討したところ、細胞質にその局在が認められたが、神経線維に強い局在は認められなかった。NGF 、フォルスコリンによる神経細胞への分化に伴って、有意な局在の変化は認められなかった。

3．酵素抗体法により、カルモデュリンの定量を行なったところ、蛋白あたりのカルモデュリン量は、細胞の神経線維伸長を伴う分化の前後で著しい変化はみられなかった。

4．カルモデュリン阻害剤のW13 とカルミダゾリウムを添加すると、神経線維伸長の強い抑制が認められたが、カルモデュリンに親和性の低いW12 には、同様の効果が認められなかった。このことから、神経線維伸長の過程にカルモデュリンが重要な機能を果たしている可能性が示唆される。

Key word：Calmodulin,　PC12 Cell ,　NGF

カルモデュリンは神経細胞に特に含量が高く(3,7,8)、神経細胞での役割に興味が持たれている。ラットの褐色細胞腫由来のPC12細胞は、神経成長因子(NGF) によって、神経線維が伸長し、カテコールアミンの放出が促進され(2)、アセチルコリンエステラーゼ(5) などの活性が増加し、神経細胞様に分化することが知られている。この細胞分化に伴うカルモデュリンの挙動を調べることを目的として、PC12細胞内のカルモデュリン、チュブリンの免疫組織化学と、カルモデュリンの定量、およびカルモデュリン阻害剤の効果を調べた。

＜実験方法＞　組織培養は、5%牛胎仔血清、10% 馬血清を含むDMEMを用い、37℃　5%炭酸ガス中で行なった。カルモデュリンは酵素抗体法により定量した(3)。α－チュブリン抗体はアマシャム製のモノクローナル抗体を、他の抗体はウサギに免疫させて得た。二次抗体はマイルス製ペルオキシダーゼ標識抗ウサギまたは抗マウス抗体を用いた。

＜結果と考察＞　PC12細胞は、NGF 50 ng/ml、フォルスコリン(Fk) 10 μM で、ほぼ同様に神経線維を伸長させた。PC12細胞の免疫組織化学的研究の結果、カルモデュリンは細胞質と分裂細胞の紡錘糸に局在し、チュブリンは細胞質や神経線維にその局在が認められた（図1）。

PC12細胞のカルモデュリンを酵素抗体法で定量した結果、可溶性画分のカルモデュリン量は10 20μg/mg蛋白、ホモジェネートでは1 2μg/mg蛋白であり、フォルスコリン存在下に若干減少の傾向があったが、神経線維伸長による有意な変化は認められなかった（図2）。

一方、カルモデュリン阻害物質であるW13 とカルミダゾリウムを用いて、PC12細胞の神経線維伸長に及ぼす効果を調べた（図3）。50μM のW13 添加で、顕著に神経線維の伸長が抑えられたが、カルモデュリンに親和性の低いW12 はこの濃度ではほとんど変化が認められ

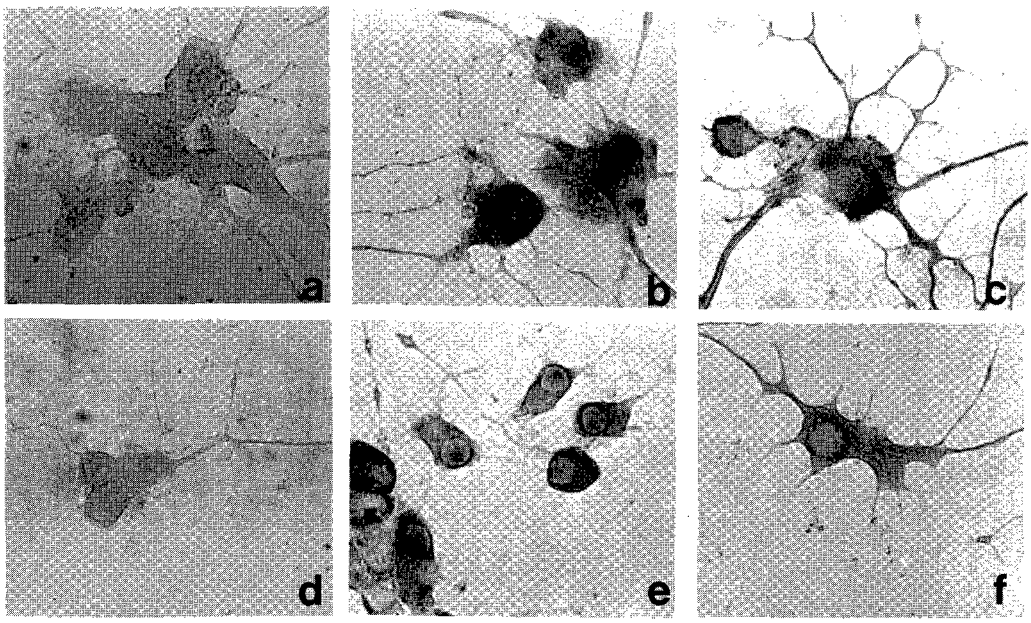


図１．　PC12細胞のカルモデュリンとチュブリンの免疫組織化学

a,b,c:NGF 50 ng/ml添加、d,e,f:フォルスコリン 10 μM 添加。
a,d:非免疫、b,e:抗カルモデュリン、c,f:抗チュブリン

なかった。W13 のこの抑制効果は24時間後に最も顕著になるが、48時間後にはほぼ完全に回復した。NGF やフォルスコリンを添加して神経線維が伸長した後にW13 を添加した場合には、神経線維の萎縮が観察された。培地と48時間インキュベートしたW13 をPC12細胞に投与して、この萎縮効果を調べたところ、新しく調製したW13 に比べて著しく減衰した。これらの結果から、W13 が培地中で失活する可能性が示唆される。

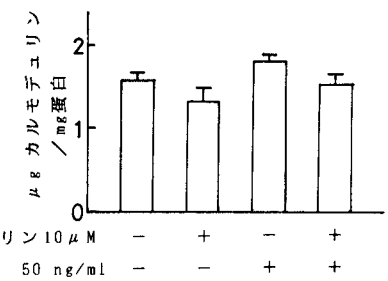


図２．　PC12細胞のカルモデュリン量

このW13 の抑制効果は、NGF に比べてフォルスコリンによる神経線維の伸長に対して、より効果的であった。W13 と類縁のW7は細胞のG期からM期への移行を阻害すると言われているが(1,6) 、PC12細胞ではこの濃度のW13 によって同様の阻害効果は観察できなかった。

また、カルモデュリン阻害物質として最も特異性が高いとされるカルミダゾリウムを培地へ添加すると、5 ～ 7μM では一旦神経線維の伸長がやや促進され細胞分裂能も上がるかにみられるが、48時間以降に顕著な抑制効果が観察された。フォルスコリンに比べてNGF に対する方が抑制効果が低かった。神経線維伸長後に添加しても同様であった。カルミダゾリウム、W13 いずれの場合も、培地から除くと再び神経線維の伸長が認められた。

カルモデュリン阻害物質による神経線維伸長抑制の事実は、Ca結合蛋白質であるカルモデュリンが、神経線維伸長の過程で、何らかの役割を果たしている可能性を示唆している。

＜謝辞＞　PC12細胞を分与頂いた佐賀医科大学の小池先生、ならびにNGFを供与頂いた三菱化成生命科学研究所の畠中先生の御厚意と御指導に深く感謝致します。

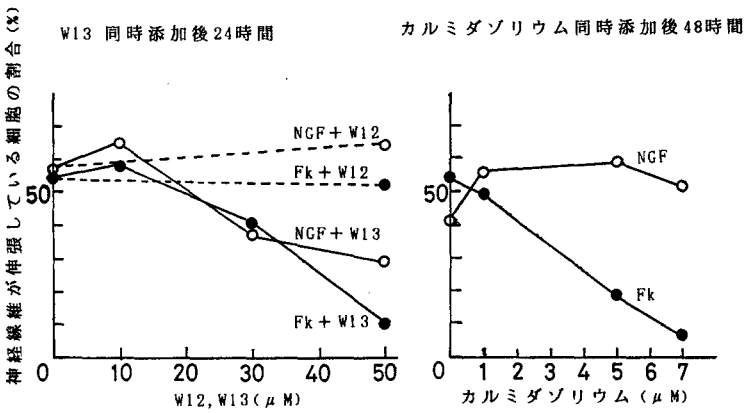


図３．　カルモデュリン阻害剤のPC12細胞神経伸長抑制効果

＜引用文献＞

1．　Chafouleas,J.G., Lagace,L., Bolton,W.E., Boyd III,A.E., and Means,A.R. (1984) Cell 36, 73-81

2．　Greene,L.A., and Rein,G. (1977) Brain Res. 129, 247-263

3．　Kakiuchi,S., Yasuda,S., Yamazaki,R., Teshima,Y., Kanda,K., Kakiuchi, R.,and Sobue,K. (1982) J. Biochem. 92, 1041-1048

4．　Kitajima,S., Seto-Ohshima,A., Sano,M., and Kato,K. (1983) J. Biochem. 94, 559-564

5．　Riger,F., Shelanski,M.L., and Green,L.A. (1980) Dev. Biol. 76, 238- 243

6．　Sasaki,Y., and Hidaka,H. (1982) Biochem. Biophys. Res. Commun. 104, 451-456

7．　Seto-Ohshima,A., Kitajima,S., Sano,M., Kato,K., and Mizutani,A. (1983) Histochem. 79, 251-257

8．　Wood,J.G., Wallace,R.W., Whitaker,J.N., and Cheung,W.Y. (1980) J. Cell Biol. 84, 66-76

168. ラット Synaptic Junction 画分による Ca^{2+}／Calmodulin 依存性の微小管重合阻害

鈴木龍雄・田中　亮・藤井敏弘*
（名古屋市大・医・第一生化，信州大・機能高分子*）

〔要　約〕

脳微小管重合に対するSynaptic Junctionの影響を調べた。ATP存在下でSJにより微小管重合の初速度と程度が、Ca^{2+}/CaM依存性に阻害された。ATP存在下で37°C，20分間温置のあとでは、35％の阻害をうけた。熱処理したSJ、ATP添加後0°Cでの温置、EGTAやW-7存在下では阻害はみられなかった。阻害効果は混入しているプロテアーゼやCaMによるものではない。阻害に要するfree Ca^{2+} level は 10^{-6}Mであった SJはCa^{2+}/CaM依存性の内因性プロテインキナーゼ活性を有していた。SJ添加により微小管タンパク質の内因性のリン酸化はCa^{2+}/CaM依存性の阻害をうけ、それに必要とされるfree Ca^{2+} level は 10^{-6}Mであった。SJと同様の効果は、major Postsynaptic Densty Protein (mPSDp)を主要成分として含む、N-lauroyl sarcosinate不溶性画分(NLS-P_2P)でもみられた。以上のことから、シナプス後部において、Ca^{2+}濃度の変動を引き金として、微小管重合が調節され、シナプスの可塑性に関わっている機構が示唆された。

Key word： major PSD protein, synaptic junction, microtubule assembly

Synaptic Junction (SJ)画分や、Postsynaptic Density (PSD)画分は、Ca^{2+}/CaM (calmodulin)依存性プロテインキナーゼを含み、そのα-subunitは分子量51kのmajor PSD proteinと報告されている (3, 6, 7)。しかし、このmPSDpの生理作用に関しては、ほとんど報告がない。微小管重合はCaMにより直接(5, 8, 9, 11)、あるいは微小管タンパク質のリン酸化を通じて(2, 12, 13)、コントロールされることが報告されている。脳可溶性画分に存在するCa^{2+}/CaM依存性プロテインキナーゼは、微小管重合を阻害するほか(12)、重合状態にある微小管に対して脱重合をひきおこすことが知られている(13)。今回我々は、SJ画分および、mPSDpを主要タンパク質として含む、*N-lauroyl sarcosinate*不溶性P_2画分(NLS-P_2P)を用いて、シナプス後部における微小管重合の調節機構について調べた。

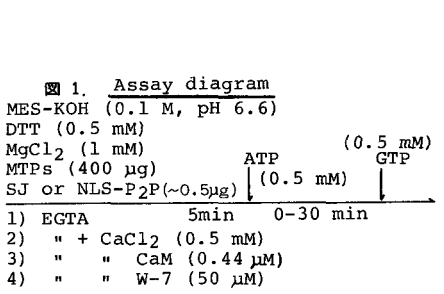
[METHODS]

SJは、Wistar rat大脳からCotmanとTaylorの方法(1)により調整し、−70°Cに保存し、3か月以内に使用した。また、解凍後は3時間以内に使用した。NLS-P_2Pの調整P_2画分はWistar rat大脳から調整した（タンパク濃度，4 mg/ml）。これに1容の6％NLS溶液を加え、37°Cにて1時間温置したあと、遠心で得た沈さを5 mM HEPES (pH 7.4)に溶かし、−70°Cに保存した（0.45 mg/ml）。微小管タンパク質は、

AMP-PNP, 5-adenylylimidodiphosphate; CaM, calmodulin; DTT, dithiothreitol; MAPs, microtubule-associated proteins; mPSDp, major postsynaptic density protein; NLS-P_2P, N-lauroyl sarcosinate-insolubule material of P_2 fraction; PSD, postsynaptic density; SJ, synaptic junction; MTPs, microtubule proteins

ブタ脳から重合脱重合を３回繰返して得(4, 10)、使用まで－７０°Cに保存した。微小管重合は３７°Cにおける濁度変化により測定した。測定条件の概略は図１に示した。final volumeは0.4 mlである。ＳＪの効果発現におけるCa^{2+}濃度の影響は、0.255 mMのEGTAを含む前記反応液に、種々の量の$CaCl_2$を加えて調べた。free Ca^{2+}濃度はKatzらの方法(6)により計算した。微小管タンパク質のリン酸化は、重合度測定と同一条件で行った(final volumeは1/10)。反応は[γ-^{32}P]ATP添加により開始し、３７°Cで１分間温置した。そのあと電気泳動を行ない、オートラジオグラムでリン酸の取り込みをみた。

図１. Assay diagram



[RESULTS]

微小管重合に対する影響　ATP存在下で、SJおよびNLS-P_2Pは微小管重合をCa^{2+}/CaM依存性に阻害した(Table I, II)。この場合、重合の初速度と程度の両者が阻害された。SJやNLS-P_2Pの非存在下でも、ATPと温置すると、重合は僅かに阻害されるが、SJやNLS-P_2Pの存在下では、さらに強く阻害された(Table I, II, 図２)。ATP非存在下、およびAMP-PNPでは阻害はみられなかった(Table I, III)。熱処理(１００°C, ４分)したSJ, NLS-P_2Pや、ATPとの温置を０°Cで行なった時には阻害は僅かであった(Table I, III)。この阻害に必要とされるfree Ca^{2+} levelは10^{-6} Mであった。また、SJやNLS-P_2Pで抑制された微小管重合は、taxolにより完全に回復した。SJやNLS-P_2Pは－７０°Cで保存中、３－４カ月で失活した。

Table I. Effect of SJ on microtubule assembly

Condition		ΔOptical density at 350 nm	
		Preincubation with ATP 0 min	10 min
MTPs+SJ	+Ca, +CaM, +ATP	0.062±0.0040 (100)	0.046±0.0038 (74.2)
"	EGTA, +ATP	0.108±0.0017 (100)	0.100±0.0037 (92.6)
"	+Ca, +W-7, +ATP	0.061±0.0021 (100)	0.056±0.0021 (91.8)
"	+Ca, +CaM, -	0.056±0.0017 (100)	0.051±0.0019 (91.1)
MTPs alone	+Ca, +CaM, +ATP	0.058±0.0057 (100)	0.052±0.0024 (89.7)
MTPs+heated SJ	+Ca, +CaM, +ATP	0.055±0.0041* (100)	0.048±0.0037* (87.3)

Figures in the parentheses represent percentages of control assembly (0-min preincubation).
* n=4,
without *, n=3
MTP, microtubule protein

Table II. Effect of NLS-P_2P on microtubule assembly

Condition	Addition	ΔOptical density at 350 nm Preincubation with ATP (min) 0	5	10
(a) MTPs+ NLS-P_2P	(EGTA)	100%	93.3%	92.7%
	Ca+CaM	100	81.0	74.0
	Ca+W-7	100	96.8	91.9
(b) MTPs alone	Ca+CaM	100	109	93.4

Figures are averages of more than 2 experiments each with differences smaller than 5%.

微小管タンパク質のリン酸化に対する影響　SJは内因性のCa^{2+}/CaM依存性プロテインキナーゼ活性を有しており、４つのタンパクバンドがリン酸化された。このうち分子量５１kのものがmPSDpで、SJ中に含まれるCa^{2+}/CaM依存性プロテインキナーゼのα-subunitである。NLS-P_2Pも同様のプロテインキナーゼ活性を有していた。SJやNLS-P_2Pの添加により、微小管タンパク質の内因性のリン酸化は阻害された(図３)。この効果はW-7により打ち消され、熱処理した

Table III. ATP requirement for inhibition by NLS-P_2P of microtubule assembly (a), and effect of heat-treated NLS-P_2P on microtubule assembly (b)

Condition	Addition	ΔOptical density at 350 nm Preincubation time (min) 0	10
(a) MTPs+ NLS-P_2P (Ca+CaM)	ATP	100%	74.0±3.09%
	none	100	89.7±2.73
	AMP-PNP	100	90.5
(b) MTPs+ heated NLS-P_2P	ATP (Ca+CaM)	100	89.9±2.74

SJやNLS-P_2Pではみられなかった（図３）。リン酸化の増加するバンドは検出されなかった。Ca^{2+}/CaMとSJ、あるいはNLS-P_2P存在下での微小管タンパク質のリン酸化は、５－１０分でピークに達し、以後減少した。また、リン酸化阻害に必要とされるfree Ca^{2+} levelは10^{-6}Mであった。

[DISCUSSION]

脳微小管重合は、SJ画分や、mPSDp（PSD中のCa^{2+}/CaM依存性プロティンキナーゼ）を主要タンパク成分として含むNLS-P_2Pにより、ATP存在下でCa^{2+}/CaM依存性の阻害をうけた。SJやNLS-P_2Pのこの効果は、EGTAやW-7の存在下、ATP非存在下、0°C、熱処理SJ，NLS-P_2Pではみられなかった。また、SJやNLS-P_2Pは－７０°Cで保存しても３－４カ月で失活した。SJやNLS-P_2Pの重合阻害効果は何らかの酵素作用によると考えられるが、混入しているプロテアーゼやCaMによるものとは考えにくい。重合測定と同じ条件で、SJおよびNLS-P_2Pは微小管タンパク質の内因性のリン酸化をCa^{2+}/CaM依存性に阻害した。重合阻害、リン酸化阻害のいずれの場合にも、必要とされるfree Ca^{2+}のlevelが10^{-6}Mであることから、in vivoでも、この現象が起っていると考えられ、記憶や学習を含めて、シナプスの可塑性に関わっている可能性が考えられた。

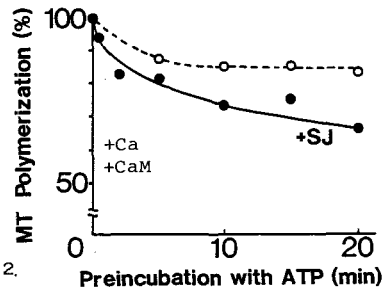


図２.

図３.

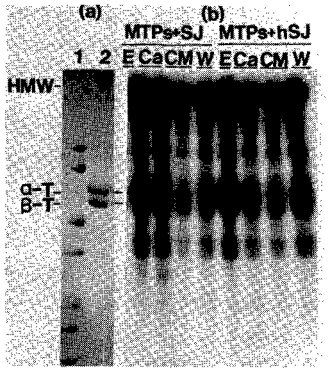


図２.
Effect of SJ on microtubule assembly. The broken line indicates microtubule assembly without SJ, and the solid line with SJ.

図３.
Phosphorylation profiles of microtubule proteins in the presence of either SJ or heat-treated SJ (hSJ). a. Coomassie-stained reaction mixture (*SJ+MTPs*). b. *autoradiogram*. E, EGTA; Ca, +Ca; CM, +Ca &CaM; W,+W-7; MTPs, Microtubule proteins.

[REFERENCES]

1) Cotman, C. W. and Taylor, D. (1972) J. Cell Biol., 55, 696. 2) DeLorenzo, R. J. et al.(1982) Progress in Brain Res., 56, 255. 3) Goldenring, J. R. et al. (1984) J. Neurochem., 42, 1077. 4) Ihara, Y. et al.(1979) J. Biochem., 86, 587. 5) Kakiuchi, S. and Sobue, K. (1981) FEBS Lett., 132,141. 6) Katz, A. M. et al.(1970) Biochim. Biophys. Acta. 205, 473. 6) Kelly, P. T. et al. (1984) Proc. Nat. Acad. Sci. USA 81, 945. 7) Kennedy, M. B. et al. (1983) Proc. Nat.Acad. Sci. USA 80, 7357. 8) Kumagai, H. and Nishida, E. (1979) J. Biochem., 85, 1267. 9) Nishida, E. et al. (1979) J. Biochem., 85, 1257. 10) Shelanski, M. L. et al. (1973) Proc. Nat. Acad. Sci. USA 70, 765. 11)Sobue, K. et al. (1981) FEBS Lett., 132,137. 12) Yamamoto, H. et al. (1983) J. Neurochem., 41, 1119. 13) Yamauchi, T. and Fujisawa, H. (1983) Biochem. Biophys. Res. Commun., 110, 287.

169. 脳のカルモデュリン依存性プロテインキナーゼⅡと筋肉のカルモデュリン依存性グリコーゲン合成酵素キナーゼの比較（第2報）

山内　卓・藤沢　仁　（旭川医大・第一生化）

〔要　約〕

ラットの脳のカルモデュリン依存性プロテインキナーゼⅡ（キナーゼⅡ）とウサギの筋肉のカルモデュリン依存性グリコーゲン合成酵素キナーゼはよく似た酵素であるが互いに少し異った性質をもっている。そこで，この違いが種差によるものか，組織の違いによるものかを調べるために，ウサギの脳からキナーゼⅡを精製し，ラットの脳のキナーゼⅡやウサギの筋肉のグリコーゲン合成酵素キナーゼと比較した。その結果，ウサギの脳のキナーゼⅡは，サブユニットの分子量，ペプチドの組成，酵素の触媒活性，免疫学的性質，自己リン酸化による酵素活性の調節，リン酸化による電気泳動の移動度の変化などの点で，ラットの脳のキナーゼⅡと全く同じ性質を示し，両酵素が同じ酵素であることが明らかとなった。一方，ウサギの筋肉のグリコーゲン合成酵素キナーゼは，基質特異性や自己リン酸化による酵素活性の調節などの点では，脳のキナーゼⅡと同じ性質を示した。しかし，両者は，サブユニットの分子量，ペプチドの組成，免疫学的性質，自己リン酸化による電気泳動の性質の変化などの点で違いが認められた。従って，脳のキナーゼⅡと筋肉のグリコーゲン合成酵素キナーゼは組織の違いによるアイソザイムであることが明らかとなった。

Key word： Calmodulin-dependent protein kinase II, Glycogen synthase kinase, Isozyme.

カルモデュリンはCa^{2+}の関与する細胞機能の調節や神経機能の調節に重要な役割を果している。我々は，ラットの脳に三種類のカルモデュリン依存性プロテインキナーゼが存在し，その一つであるキナーゼⅡが，トリプトファン水酸化酵素やチロシン水酸化酵素の活性化を行うことおよび脳の微小管の重合脱重合の調節を行い，神経細胞内のダイナミックな過程に関与することなどを明らかにし(7－11)，キナーゼⅡが神経機能の調節に大きな役割を担っている可能性を示した。最近，ウサギの筋肉のグリコーゲン合成酵素キナーゼが，基質特異性やリン酸化部位の特異性の点で，ラットの脳のキナーゼⅡと同じ性質を示すことが明らかとなった（2.5)。しかし，両酵素はサブユニットの分子量やモノクローナル抗体との反応性に差が認められた(5)。これらの結果から，我々はキナーゼⅡとグリコーゲン合成酵素キナーゼは極めて近い類縁関係にあるが別の酵素である可能性を第57回生化学会で報告した。しかし，このような両酵素の違いが，組織の違いを反映しているのか，種の特異性に由来する差なのかは明らかではなかったので，今回我々は，ウサギの脳からキナーゼⅡを精製しラットの脳のキナーゼⅡやウサギの筋肉のグリコーゲン合成酵素キナーゼと比較したところ，脳の酵素と筋肉の酵素は組織のちがいによるアイソザイムであることが明らかとなったので報告する。また，この酵素活性は筋肉に比較して脳で非常に活性が高いことが明らかとなりキナーゼⅡは脳で重要な働きをしているものと考えられる。

〔実　験　方　法〕

ラットの脳のキナーゼⅡは以前に報告した方法(9)で精製した。同じ方法で，ウサギの脳からキナーゼⅡを精製した。ウサギの脳のキナーゼⅡは脳の抽出液から41％の

収率で1051倍精製された。精製酵素の比活性はラットの脳のキナーゼⅡと一致した。また，酵素の基質特異性はラットの脳のキナーゼⅡおよびウサギの筋肉のグリコーゲン合成酵素キナーゼと一致した。ウサギの筋肉のグリコーゲン合成酵素キナーゼはWoodgett達の方法(6)で精製した。キナーゼⅡの活性は，トリプトファン水酸化酵素の活性化反応，あるいは，ミオシン軽鎖のリン酸化反応によって測定した(7.9)。キナーゼⅡとグリコーゲン合成酵素キナーゼの自己リン酸化は，基質蛋白を加えないで，リン酸化反応と同じ条件下で行った。ラット脳のキナーゼⅡに対するモノクローナル抗体との免疫沈降反応は以前に報告した方法(5)で行った。SDSポリアクリルアミドスラブゲル電気泳動は0.1％SDS存在下に行った(1)。

〔実験結果・考察〕

ラットの脳のキナーゼⅡはSDSゲル電気泳動で50kDaの主要成分と60kDaの少量成分の二つのバンドを示す。酵素をCa^{2+}とカルモデュリン存在下にATPと反応させるとキナーゼⅡは自己リン酸化され，主要成分は54kDaに，少量成分は63kDaの位置に移動度が変化する(図1)。図1はコマジーブルーによる蛋白質の染色を示しているが^{32}Pのとり込みをオートラジオグラフィーで調べた場合にもリン酸化により電気泳動度の移動度がおそくなることが確かめられた。同様にウサギの脳のキナーゼⅡもSDSゲル電気泳動で50kDaの主要成分と60kDaの少量成分の二つのバンドを示す。自己リン酸化により電気泳動の移動度がラットの脳のキナーゼⅡと同様な変化が認められ，ウサギの脳のキナーゼⅡはラットの脳のキナーゼⅡと同じ挙動を示すことが明らかとなった（図1)。これに対しウサギの筋肉のグリコーゲン合成酵素キナーゼはSDSゲル電気泳動で57kDaと58kDaの二成分から成り，脳のキナーゼⅡとは分子量が異っていた。グリコーゲン合成酵素キナーゼも自己リン酸化されるが，脳の酵素と異り，リン酸化による電気泳動の移動度に変化がみられなかった。これらの結果は，ラットの脳のキナーゼⅡとウサギの脳のキナーゼⅡは同じ酵素であるが，脳のキナーゼⅡは筋肉のグリコーゲン合成酵素キナーゼとは異った酵素であることを示している。このこと

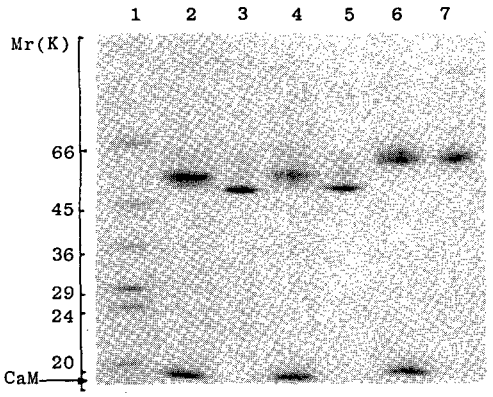


Fig. 1. SDS-polyacrylamide gle electrophoresis of autophsphorylated (lanes 2,4,and 6) and non-phosphorylated (lanes 3,5, and 7) CaM kinase II and glycogen synthase kinase. Lane 1, standard protein; lanes 2 and 3, rat brain CaM kinase II; landes 4 and 5, rabbit brain CaM kinase II; lanes 6 and 7, rabbit muscle glycogen synthase kinase.

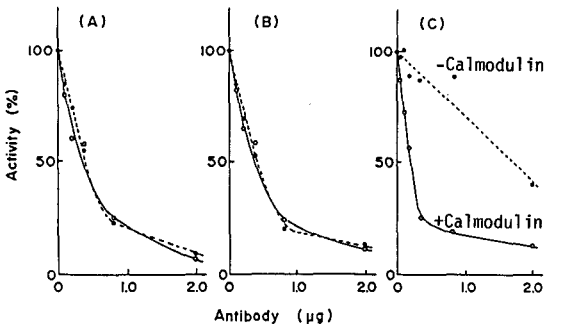


Fig. 2. Immunotitration of CaM kinase II from rat brain and from rabbit brain and glycogen synthase kinase from rabbit skeletal muscle. (A) CaM kinase II from rat brain, (B) CaM kinase II from rabbit brain, (C) glycogen synthase kinase from rabbit skeletal muscle.

は，これらの酵素をトリプシン消化した後，それぞれのペプチドを電気泳動により分析することによっても確かめられた。

Table I. Comparison of activity of CaM kinase II isozyme of brain and skeletal muscle

Animal	Cerebral cortex		Skeletal muscle	
	unit/mg protein	unit/g tissue	unit/mg protein	unit/g tissue
Mouse	4.7	133	0.2	5.7
Rat	8.8	328	0.9	30.1
Guinea pig	7.0	198	0.3	9.5
Rabbit	6.3	185	0.9	41.5

我々は，ウサギの筋肉のグリコーゲン合成酵素キナーゼが，ラットの脳のキナーゼⅡのモノクローナル抗体に対してカルモデュリンが存在する物合にはキナーゼⅡと同じ反応性を示すが，カルモデュリンが存在しない場合には，その反応性が著しく低下することを報告した(5)。そこで，ウサギの脳のキナーゼⅡとこのモノクローナル抗体との反応性をカルモデュリンの存在する場合としない場合について比較した。その結果，図2に示すように，ウサギの脳のキナーゼⅡは，このモノクローナル抗体と反応し，カルモデュリンの存在にかかわらず同じ反応性を示すことが明らかとなり，このことはウサギの脳のキナーゼⅡはラットの脳のキナーゼⅡと同じ免疫学的性質をもつことを示している。以上の結果からウサギの脳のキナーゼⅡは，ラットの脳のキナーゼⅡと同じ酵素であるが，筋肉のグリコーゲン合成酵素キナーゼとは異っており，脳の酵素と筋肉の酵素は互いにアイソザイムであることが明らかとなった。

我々はキナーゼⅡの活性が，ラットでは他の組織に比較して脳で極めて高いことを明らかにしているが，このことが他の動物でも観察されるかどうかを調べるために，脳と筋肉の抽出液において，キナーゼⅡのアイソザイム活性として，トリプトファン水酸化酵素の活性化反応によって測定することにより酵素活性を比較した。その結果表1に示すように，ラットばかりでなく，ウサギ，マウスおよびモルモットのいずれの動物でも脳の活性が筋肉の活性に比較して著しく高いことが明らかとなった。このことは，キナーゼⅡが脳で重要な働きをしていることを示唆している。

最近，肝臓のカルモデュリン依存性グリコーゲン合成酵素キナーゼも基質特異性が広く，脳のキナーゼⅡや筋肉のグリコーゲン合成酵素キナーゼと類似した性質を示すことが報告された(3,4)が，サブユニットの分子量が二つのキナーゼのいずれとも異っているので(3)，これら三つのキナーゼは近縁関係にあるアイソザイムであると考えられ，これらの酵素の各々の組織での生理的役割が注目される。

〔文　　献〕

1. Laemmli, U. K. (1970) Nature 227, 680-685
2. McGuinness, T. L, Lai, Y. Greengard, P., Woodgett, J. R. and Cohen, P. (1983) FEBS Lett. 163, 329-334
3. Payne, M. E., Schworer, C. M. and Soderling, T. R. (1983) J. Biol. Chem. 258, 3276-3282
4. Schworer, C. M. and Soderling, T. R. (1983) Biochem. Biophys. Res. Commun. 116, 412-416
5. Woodgett, J. R., Cohen, P., Yamauchi, T.and Fujisawa, H. (1984) FEBS Lett. 170, 49-45
6. Woodgett, J. R., Davison, M. T. and Cohen, P. (1983) Eur. J. Biochem. 136, 481-487
7. Yamauchi, T. and Fujisawa, H. (1980) FEBS Lett. 116, 141-144
8. Yamauchi, T. , Nakata, H. and Fujisawa, H. (1981) J. Biol. Chem. 256, 5404-5409
9. Yamauchi, T. and Fujisawa, H. (1983) Eur. J. Biochem. 132, 15-21
10. Yamauchi, T. and Fujisawa, H. (1983) Biochem. Biophys. Res. Commun. 110, 287-291
11. Yamauchi. T. and Fujisawa, H. (1984) Arch. Biochem. Biophys. 234, 89-96

170. 脳 Ca^{2+}, カルモデュリン依存性プロテインキナーゼに対するモノクローン抗体の作製とその性質

福永浩司・佐藤　宏・宮本英七　（熊本大・医・第一薬理）

〔要　約〕

1）精製したラット脳 Ca^{2+}、カルモデュリン依存性プロテインキナーゼを BALB/c マウスの腹腔内に注射し、モノクローン抗体産生ハイブリドーマを作製して、抗体を得た。2）得られたモノクローン抗体は IgM であった。3）モノクローン抗体は酵素の 4.9 万サブユニットのみに反応し、6 万のサブユニットには反応しなかった。また、酵素精製上近くに位置するフォスフォジエステラーゼ、カルシニューリンおよび他のカルモデュリン結合蛋白質とは交叉反応を示さなかった。4）イムノブロット法にて、脳内分布を調べると、調べた範囲の脳内部位に 4.9 万サブユニットが検出され、特に大脳、海馬に高濃度に存在した。5）全身の臓器について、イムノブロット法を用い、脳酵素のモノクローン抗体に対する反応性を検索した。脾臓、胃、膵臓、肺、脂肪組織では分子量 5.2 万蛋白質、心臓、骨格筋では 5.5 万蛋白質が反応した。6）モノクローン抗体に反応した諸臓器の蛋白質は Ca^{2+}、カルモデュリン存在下にリン酸化された。7）脳酵素に特異的である微小管蛋白質を基質にして酵素活性を測定すると、諸臓器でモノクローン抗体で得た結果と相関した。8）これらの結果は、いづれの臓器にも脳酵素に類似したアイソザイムの存在することを示唆している。

Key word： Brain Ca^{2+}, calmodulin-dependent protein kinase, monoclonal antibody, isozyme

我々はラット脳細胞上清分画(1)および顆粒分画(2)よりゲル沪過法で分子量 64 万を示す Ca^{2+}、カルモデュリン依存性プロテインキナーゼを均質な蛋白質にまで精製し、その性質について明らかにした。我々の研究およびこれまでの一連の研究結果より、本酵素は微小管蛋白質(1,3)、シナプシン I (4,5)、チューブリン(6)、カルスペクチン（フォドリン）(7)、トリプトファン水酸化酵素(8)、チロシン水酸化酵素(9)、フォスフォジエステラーゼ(10)、グリコーゲン合成酵素(11)、をリン酸化し、これらの蛋白質－蛋白質相互作用、酵素活性調節に関与している。最近、この多様な機能を有するプロテインキナーゼが、脳以外の組織、肝臓、骨格筋、膵臓、下垂体前葉細胞、心臓において見出され、その異同が注目されている。今回、我々は脳 64 万酵素に対するモノクローン抗体を作製し、その性質について検討した。さらに脳内分布、組織分布を検索したので報告する。

〔実験材料と方法〕

脳の 64 万酵素は既報(2)の方法に従い精製した。カルモデュリンを除いた脳の微小管蛋白質は既報(1)の方法に従い得た。脳 64 万酵素のモノクローン抗体 (H.2.5) 産生ハイブリドーマの作製は既報の方法に従った(12)。BALB/c マウスにミョウバン沈殿した抗原 20μg と百日咳死菌体 1×10^9 個を混合し、腹腔内に投与し（初回免疫）、その後 2 週間おきに 20μg の抗原を生理食塩水に懸濁して腹腔内に投与した。マウス血清中の抗体価を確認後、細胞融合して、クローニングを 2 回以上行なった。イムノブロット法は Laemmli (13) による SDS-PAGE 後、ニトロセルロース膜に転移し、アビジン－ビオチン法にて行なった。ラットの種々の組織の Ca^{2+}、カルモデュリン依存性プロテインキナー

ゼは上清分画、顆粒分画を含めた粗抽出液からDEAEセルロースとカルモデュリン親和性カラムにて部分精製した。酵素活性は基質として脳の微小管蛋白質を用いて、既報(1)の方法で測定した。

〔実験結果と考察〕

1）モノクローン抗体の性質

モノクローン抗体(H.2.5)は免疫沈降法により検索すると、Anti IgG_1、IgG_{2a}、IgG_{2b} には反応せず、Anti IgM に反応し、IgM と考えられた。

2）モノクローン抗体の特異性

H.2.5 の特異性についてイムノブロット法を用いて検討した。精製した64万酵素および酵素の精製過程で得られるカルモデュリン結合蛋白質分画においてH.2.5 はSDS-PAGE 上の分子量4.9万の蛋白質とのみ反応した（Fig.1)。脳の精製64万酵素は4.9万と6万の蛋白質から成立っている(Fig.1、Protein staining)（後述)。H.2.5 は4.9万蛋白質とのみ反応し、6万蛋白質とは反応しなかった。

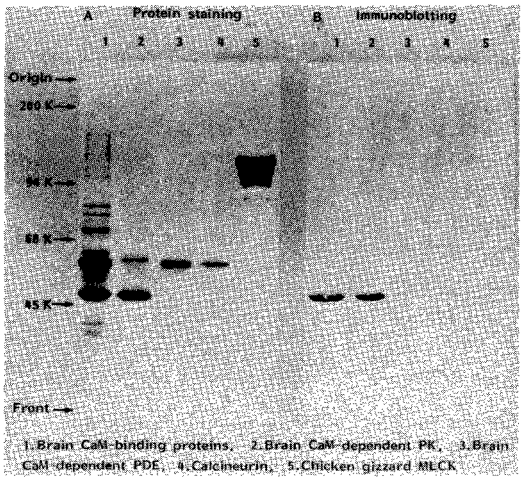


Fig. 1 Specificity of monoclonal antibody against brain calmodulin-dependent protein kinase

3）64万酵素のサブユニットの検討

モノクローン抗体を用いて免疫沈殿を行ない、沈殿分画について、SDS-PAGE、オートラジオグラフィーにて検索すると、4.9万蛋白質とともに6万蛋白質が存在することがわかった。従って、64万酵素のサブユニットは4.9万と6万蛋白質と考えられる。

4）64万酵素の脳内分布

ラット脳を6個所の部位に分け、カルモデュリン結合蛋白質分画を調製し、イムノブロット法を用いて、酵素の存在を調べた。調べたいずれの部位にも酵素の4.9万のサブユニットを認め、特に蛋白質量当り大脳、海馬に濃度高く存在することがわかった。

5）モノクローン抗体を用いての64万酵素の組織分布の検索

種々の組織から、カルモデュリン結合蛋白質分画を調製し、H.2.5 を用いてイムノブロット法による64万酵素の検索を行なった。Fig.2 に示すように脾臓、胃、骨格筋、膵臓、肺、心臓、脂肪組織においてH.2.5 と交叉反応を示す蛋白質が同定された。これらの蛋白質の分子量は脾臓、胃、膵臓、肺、脂肪組織では5.2万、心臓では5.5万、骨格筋では主に5.5万であった。いずれも脳の4.9万のサブユニットとは分子量的に異なっていた。調べた組織の中で、精巣、腎臓、小腸、肝臓ではH.2.5 反応蛋白質を検出できなかった。小腸を除いていずれも、Ca^{2+}、カルモデュリン依存性微小管蛋白質キナーゼ活性が存在しているので（後述)、量的に検出限度を越えているためと考えられる。さらに各組織のH.2.5 に交叉反応性を示す蛋白質は Ca^{2+}、カルモデュリン存在下にリン酸化を受けた。最近、心臓より精製した同一範疇の酵素は5.5万の同一サブユニットからなりH.2.5 に対して交叉反応を示し（岩佐、宮本 未発表)、本研究結果

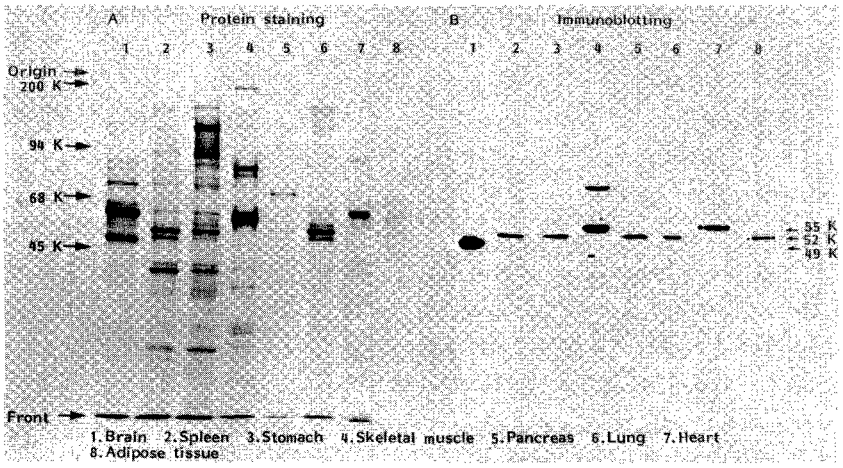


Fig. 2 Immunoblot of calmodulin-binding proteins of rat various tissues

と一致している。

6）酵素活性を指標としての酵素の組織分布

我々は微小管蛋白質が特異的に64万酵素を検出し得ることを報告した(1,3)。各組織からカルモデュリン結合性蛋白質分画を調製し、分画中に含まれる蛋白質、活性を測定した（Table 1)。微小管蛋白質キナーゼは脳において最も高く、脾臓、胃は脳の21%、16%の値を示した。他の組織は脳の9%以下であり、小腸では検出されなかった。これらの結果は、モノクローン抗体を用いて得た上記の結果とほぼ一致していると結論される。

	CaM-binding proteins (μg/g tissue)	CaM-dependent protein kinase activity (pmol/min/g tissue)	(%)
Brain	126.0	2800	100
Spleen	89.0	596	21
Stomach	31.7	450	16
Skeletal muscle	10.4	243	9
Lung	6.0	186	7
Pancreas	7.0	166	6
Heart	11.3	139	5
Liver	21.3	126	4
Adipose tissue	1.8	120	4
Testis	12.7	114	4
Kidney	13.5	85	3
Intestine	14.7	0	0

Table 1 Tissue distribution of calmodulin-dependent protein kinase

今回、我々は脳の64万酵素に対するモノクローン抗体を用いて、種々の組織における64万酵素と同じ免疫原性を有する蛋白質を検索した。交叉反応を示す蛋白質はCa^{2+}、カルモデュリン依存性に自己リン酸化されること、別に行なった酵素活性測定結果と一致することから、酵素のサブユニットと考えられる。このことは多様な機能的活性を有するCa^{2+}、カルモデュリン依存性プロテインキナーゼが脳神経系のみならず広範囲に分布していることを示している。

〔参 考 文 献〕

1) Fukunaga K., Yamamoto H., Matsui K., Higashi K. & Miyamoto E. (1982) J. Neurochem. 39, 1607-1617. 2) Fukunaga K., Yamamoto H., Tanaka E. & Miyamoto E. (1984) Biomed. Res. 5, 165-176. 3) Yamamoto H., Fukunaga K., Tanaka E. & Miyamoto E. (1983) J. Neurochem. 41, 1119-1125. 4) Kennedy M.B., McGuinness T. & Greengard P. (1983) J. Neurosci. 3, 818-831. 5) Bennett M.K., Erondu M.E. & Kennedy M.B. (1983) J. Biol. Chem. 258, 12735-12744. 6) Goldenring J.R., Gonzalez B., McGuire J.F.Jr. & DeLorenzo R.J. (1983) J. Biol. Chem. 258, 12632-12640. 7) Sobue K., Kanda K. & Kakiuchi S. (1982) FEBS Lett. 150, 185-190. 8) Yamauchi T. & Fujisawa H. (1983) Eur. J. Biochem. 132, 15-21. 9) Yamauchi T. & Fujisawa H. (1981) Biochem. Biophys. Res. Commun. 100, 807-813. 10) Fukunaga K., Yamamoto H., Tanaka E., Iwasa T. & Miyamoto E. (1984) Life Sci. 35, 493-499. 11) Iwasa T., Fukunaga K., Yamamoto H., Tanaka E. & Miyamoto E. (1983) FEBS Lett. 161, 28-32. 12) 渡辺 武，高津 務（1980）免疫実験操作法，9, 2963-2967. 13) Laemmli U.K. (1970) Nature 227, 680-685.

171. Cytosine arabinoside 処置ラットにおける運動失調に及ぼす TRH およびその類縁体 DN-1417 の影響

栗原悦雄・福田尚久・成実重彦・佐治美昭・名川雄児
(武田薬品・中央研・生物研)

〔要　約〕

Cytosine arabinoside (Ara-C)処置で認められたラットの運動失調に対する TRH (thyrotropin-releasing horomone)ならびにその類縁体 DN-1417 の効果と小脳 cyclic GMP (cGMP)の役割について検討した。1. TRH および DN-1417 それぞれ 5 あるいは 10mg/kg 腹腔内 (i.p.) 投与ならびに dibutyryl cGMP の 100μg/5μℓ の脳室内投与は運動失調の改善を認めた。2. Ara-C 処置により低下した小脳 cGMP 含量は TRH および DN-1417 それぞれ 5 あるいは 10mg/kg i.p. 投与により増加した。3. Ara-C の諸種用量処置ラットの小脳 cGMP 含量低下と運動失調重篤度の間に相関関係が認められた。4. TRH および DN-1417 それぞれ 10^{-5}M の in vitro 添加による小脳 cGMP 生成増加作用は glutamate receptor blocker の glutamic acid diethylester (GDEE) 10^{-6}M の併用で抑制されたが，muscarinic receptor blocker の atropine 10^{-6}～10^{-4}M の併用では抑制されなかった。また glutamate 10^{-4}M による同生成増加は GDEE 10^{-6}M により抑制されたが，carbachol および aspartate それぞれ 10^{-4}M による増加は抑制されなかった。以上の成績から Ara-C 処置ラットの示す運動失調に TRH および DN-1417 が有効であり，両薬物は Ara-C 処置により低下した cGMP 含量を小脳 glutamate 系を介して回復させ，運動失調改善をもたらすと考えられる。

Key word： TRH analog DN-1417, spino-cerebellar degeneration, cytosine arabinoside

脊髄小脳変性症の治療に TRH (thyrotropin-releasing hormone) が有効であることが注目を浴びて以来，その基礎的，臨床的研究が精力的に進められている。一方，小脳を形成する神経細胞のある種のものは生後増殖を始めながら次第に一定の細胞層を構築することが知られている(1)。そこで幼若期に DNA-polymerase 阻害剤である cytosine arabinoside (Ara-C) を投与し，小脳形成不全ラットを作り脊髄小脳変性症モデルとし，この動物で認められる運動失調に及ぼす TRH およびその類縁体 DN-1417 (γ-butyrolactone-γ-carbonyl-L-histidyl-L-prolinamide citrate) の効果を検討した。また，この動物の小脳 cyclic GMP (cGMP) 含量が正常動物に比べて著明に減少していることが明らかになった。そこで両薬物の小脳 cGMP に及ぼす影響ならびに運動失調と小脳 cGMP の関連についても検討を加えた。

〔実験方法〕

生後 2 および 3 日目の 2 回，Ara-C 10, 20, 30, 40 および 80mg/kg を皮下 (s.c.) 投与した 4 週齢の JCl：SD 系ラットを実験に用いた。以下特に記しない場合は 40mg/kg s.c. 処置のラットを用いた。

1. 転倒回数および自発運動量の測定：TRH 投与後 30 分間または DN-1417 投与後 1 時間転倒回数を視覚的に，自発運動量 (SMA) を Animex (感度 40μA) で同時測定した。転倒回数／SMA の比を運動失調の指標にした。なお glutamate receptor blocker の glutamic acid diethylester (GDEE) との併用の場合は，GDEE は TRH 投与 10 分前に，また DN-1417 とは同時に腹腔内 (i.p.) 投与した。転倒回数および SMA は TRH 投与後 30 分間，DN-1417 投与 30 分後から 30 分間測定した。

2. 回転棒上滞留試験：低用量の Ara-C 処置動物では転倒行動が認められなかったの

で直径 3.5 cm，8回／分の回転棒上の滞留時間を Ara-C の諸種用量投与動物において測定し，運動失調重篤度の1つの指標とした。

3. Ara-C処置ラット小脳切片における諸種薬物添加時の cGMP の測定：小脳切片を tissue chopper で作製し，theophylline，glucose 各10mM 含む95％O_2，5％CO_2の混合ガスで飽和した Krebs-Ringer's phosphate buffer に懸濁し，諸種薬物存在下で15分間 incubate した。反応停止は5% trichloroacetic acid（TCA）で行ない（最終蛋白濃度約1～2mg／mℓ），水飽和エーテルで TCA を除去後，ヤマサ cGMP キットを用いラジオイムノアッセイにより測定した。蛋白量は Lowry 法により行なった。

〔実験成績〕

1. Ara-C処置ラットの運動失調における TRH および DN-1417 の影響：生理食塩水投与時の転倒回数／SMA の比を100％とした時，TRH および DN-1417 それぞれ5あるいは 10mg／kg i.p. 投与により比の低下がみられ，失調の改善が認められた（Fig. 1）。



*p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001 vs Saline Control. n=8-9.

Fig. 1. Effect of TRH and DN-1417 on the ataxia in Ara-C treated rats.

2. 小脳 cGMP 含量に及ぼす TRH および DN-1417 の影響：Ara-C処置により低下した小脳 cGMP 含量は TRH および DN-1417 それぞれ5あるいは 10mg／kg i.p. 投与で用量依存性に増加した。

3. Ara-C諸種投与量と運動失調重篤度および小脳 cGMP 含量低下の相関性：諸種用量（10，20，30，40 および 80mg／kg s.c.）の Ara-C処置した個々のラットの全脳に対する小脳重量の比と小脳 cGMP 含量との間に相関関係がみられ，小脳の発育形成が損われる程，cGMP 含量も低下した。また回転棒上の滞留時間の短い程 cGMP 含量も低下し，失調の重篤度と小脳 cGMP 含量低下の間に相関関係が認められた（Fig. 2）。

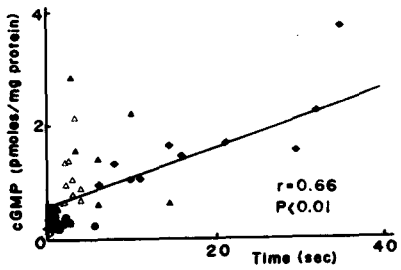


Fig. 2. Correlation between ataxia (rota rod test) and cerebellar cGMP levels. Ara-C treatment, ◆: 10 mg/kg, ▲: 20 mg/kg, △: 30 mg/kg, ●: 40 mg/kg, ◇: 80 mg/kg.

4. Dibutyryl cGMP の脳室内投与の運動失調に及ぼす影響：Ara-C処置ラットにおける dibutyryl cGMP 50 および 100μg／5μℓ 脳室内投与で動物の運動失調が用量に依存して回復した。

5. Ara-C処置ラット小脳切片における各種薬物 in vitro 添加時の cGMP 生成に及ぼす影響：Ara-C処置ラット小脳切片における TRH および DN-1417 のそれぞれ 10^{-5}M in vitro 添加により cGMP 生成増加がみられた。この増加に対しては，muscarinic receptor blocker である atropine 10^{-6}，10^{-5} および 10^{-4}M のいずれの併用添加によっても有意な抑制がみられなかった。Ara-C処置ラット小脳切片における TRH および DN-1417 のそれぞれ 10^{-5}M 添加による cGMP 生成増加作用は GDEE 10^{-6}M との併用添加で拮抗された。小脳の興奮性伝達物質と考えられている acetylcholine（carbachol），glutamate および aspartate それぞれ 10^{-4}M 添加で小脳切片における cGMP 生成増加がみられたが，GDEE 10^{-6}M 併用添加で glutamate による増加のみが抑制され，carbachol および aspartate による増加は抑制されなかった（Fig. 3）。

6. TRHおよびDN−1417とGDEE in vivo 併用時の小脳cGMP含量ならびに動物の運動失調に及ぼす影響：Ara−C処置で低下した小脳cGMP含量のTRHおよびDN−1417それぞれ10mg／kg i.p. 投与による回復作用はGDEE 200mg／kg i.p.併用投与により抑制された。また，Ara−C処置で認められたラットの運動失調のTRHおよびDN−1417それぞれ10mg／kg i.p. 投与による改善作用もGDEE 200mg／kg i.p. 併用投与により抑制された。

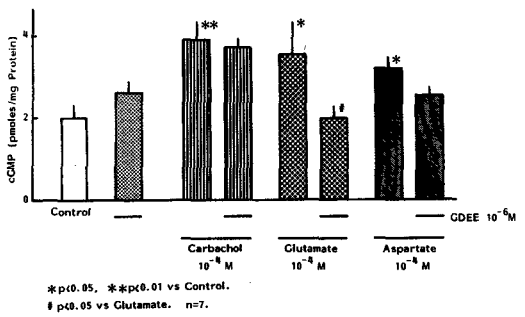


Fig. 3. Effect of GDEE on accumulation of cGMP elicited by carbachol, glutamate and aspartate in cerebellar slices of Ara-C treated rats.

〔考察〕

小脳のcGMP含量は他の脳内諸部位に比較して約10倍高く，しかも小脳中でもプルキンエ細胞に高濃度含まれている（5）ことから，cGMPはプルキンエ細胞の機能制御に関与していることが推測される。事実，免疫組織化学的検索ではcGMP−dependent protein kinaseがプルキンエ細胞に局在していること(4)，さらにはその基質となる28,000−daltonの蛋白質もプルキンエ細胞に高濃度認められたとする報告がある(6)。また解剖学的にも小脳における唯一の出力系がプルキンエ細胞であることから，小脳cGMPレベルの変動がプルキンエ細胞の活動を制御し，さらには動物の運動制御に重要な役割を果たしていることが考えられる。本実験において① Ara−Cの諸種用量処置ラットの小脳cGMP含量低下と運動失調重篤度の間に相関関係が認められた，② TRHおよびDN−1417によりAra−C処置で低下した小脳cGMP含量の回復と運動失調改善が認められた，③ dibutyryl cGMPの脳室内投与で運動失調改善が認められた。これらの成績が上記仮説を支持していると思われる。

次にTRHおよびDN−1417による小脳cGMP含量増加機構について検討した。小脳cGMP含量は線条体－小脳経路によっても制御されることが報告されている（2，3）。一方，本実験では小脳切片におけるTRHおよびDN−1417のin vitro添加でcGMP生成増加がみられた。この成績はTRHおよびDN−1417には小脳への直接作用でcGMP増加をもたらす性質があることを示唆している。また，小脳切片におけるこれら両薬物によるcGMP生成増加はGDEEの併用で抑制された。さらにGDEEはglutamateによるcGMP生成増加のみを抑制し，carbacholおよびaspartateによる増加は抑制しなかった。TRHおよびDN−1417はAra−C処置により低下したcGMP含量を小脳glutamate系を介して回復させ，運動失調を改善したと思われる。

〔文献〕

1. Adlard, B.P.F. et al. Brit. J. Pharmacol. 54, 33−39 (1975).
2. Biggio, G. et al. Advance in Biochemical Psychopharmacology, Raven Press, New York. vol. 18, p 227−244 (1978).
3. Lawtié, J. P. et al. J. Neurochem. 37, 801−803 (1981).
4. Lohman, S. M. et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 78, 653−657 (1981).
5. Mao, C. C. et al. Brain Res. 90, 335−339 (1975).
6. Schlichter, D. J. et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 77, 5537−5541 (1980).

172. *dw* マウスと *lit* マウスの行動異常と視交叉上核との関係

野口鉄也・杉崎哲朗・工藤玄恵*・佐藤　勇**
（東邦大・医・第二生理，病理*，総研**）

〔要　約〕

先天性内分泌異常ミュータントマウス—下垂体性小人症マウス（dw），成長ホルモン単独欠損症マウス（lit），原発性甲状腺機能低下症マウス（hyt）—の視交叉上核（SCN）と松果体を形態学的ならびに生化学的に検索した。

dwとlitマウスのSCNは未熟であり，とくに，SCNの腹側$\frac{1}{3}$部位—視神経の線維（網膜視床下部路）を受けている部位—で細胞数と細胞の大きさが減少していた。加えて，両マウスの松果体も形態学的に未熟な像を示し，N－アセチルトランスフェラーゼ（NAT）活性も低値であった。これとは対照的に，hytマウスではSCNも松果体も正常マウスに匹敵する発育した像を示し，松果体NAT活性も正常のレベルを示していた。しかし，SCNの大きさ，視神経の形態，及びミエリン形成にはミュータントマウスと正常群の間に差は認められなかった。

以上のことから，dw，lit両マウスにみられる松果体の発育遅滞及び自発活動量の低下とその日内周期の消失はSCNの発育遅滞に起因することが示唆され，加えて，SCNの発育にも成長ホルモンが不可欠であることが示めされた。

Key word：Inherited hormone-deficient mutant mice, Suprachiasmatic nucleus, Pineal body.

〔緒　言〕

視交叉上核（SCN）は齧歯類の生理現象と行動の日内周期を維持するに必須であることが知られている（6，18）。さらに，松果体は内分泌器官の中で最も容易にその活動の日内周期を調らべることが出来る。すでに，われわれは先天性内分泌異常ミュータントマウスのうち，下垂体性小人症マウス（dw）と成長ホルモン単独欠損症マウス（lit）が自発活動量の低下と，その日内周期の消失を示すことを報告した（7，8）。加えて，成長ホルモンがマウス運動領野の錐体細胞の発育にも不可欠であることを示した（9，10，11）。

そこで今回は，前記2ミュータントマウスに原発性甲状腺機能低下症マウス（hyt）を加えて，3者の間で，行動パターン，松果体とSCNとの関連を追及した。

〔材料と方法〕

動物：　dw，lit，hytマウスはいずれもジャクソン研究所より購入し，自家繁殖を行った（7，8，12）。

組織学的検索：　40日令のマウス脳切片をNissl染色し，検索を行った。測定には微測接眼レンズを用いた。抗MBP抗体による視神経の染色は既報の方法（5）を用いた。

生化学的検索：　N－アセチルトランスフェラーゼはDeguchiとAxelrodの方法（9），CNPase活性はKurihara と Tsukada（5），Tsukadaら（17）の方法によった。

自発活動量の測定：　既報の方法（7）に従い行った。

〔結　果〕

視交叉上核の細胞処見：　視交叉上核の核容積は各ミュータントマウスと正常対照群との

間に差はなかった。最大面積を示す前額断切片について，核を占める細胞の数をかぞえたところ，dwとlitマウスでは腹側$\frac{1}{3}$部位で対照に比して減少していた。しかし，hytマウスでは差はなかった。また背側$\frac{2}{3}$部位の細胞数はいずれのミュータントマウスでも正常対照群と差はなかった（Table1）。

Table 1.

CELL NUMBER OF THE SCN OF THE dw, lit, and hyt MUTANTS

	Ventral one-third of the SCN	Dorsal two-third of the SCN	Total
+/?	235 ± 31	375 ± 54	610
dw/dw	173 ± 21 *	371 ± 43 NS	544
lit/+	257 ± 35	345 ± 51	602
lit/lit	176 ± 30 *	338 ± 48 NS	514
hyt/+	242 ± 25	356 ± 48	598
hyt/hyt	251 ± 30 NS	373 ± 53 NS	624

The results are expressed as the cell number present in the area of each portion of 4-μm thick frontal plane. Values are expressed as mean ± SD of 10 animals. All differences from the respective control were significant by Student's t-test. * p<0.001, NS; not significant.

次に細胞の大きさを検討したところ，dwとlitマウスでは腹側，背側いずれでも小型の細胞からなることが明らかとなり，hytマウスでは異常は全く認められなかった。（Table2）。

Table 2.

CELL SIZE IN THE SCN OF THE dw, lit, and hyt MUTANTS

	Ventral one-third of the SCN		Dorsal two-third of the SCN	
	Major axis (μm)	Minor axis (μm)	Major axis (μm)	Minor axis (μm)
+/?	8.22 ± 1.20	6.62 ± 0.88	9.81 ± 1.57	7.32 ± 1.55
dw/dw	7.16 ± 1.09 *	5.92 ± 0.93 *	8.11 ± 1.23 *	6.54 ± 0.75 *
lit/+	10.5 ± 1.9	7.27 ± 0.67	10.9 ± 2.5	9.00 ± 1.50
lit/lit	8,59 ± 2.09 *	5.50 ± 1.47 *	8.28 ± 0.86 *	7.11 ± 1.08 *
hyt/+	10.1 ± 2.2	7.70 ± 1.43	10.4 ± 2.7	7.65 ± 0.79
hyt/hyt	9.66 ± 2.07 NS	7.55 ± 0.99 NS	10.2 ± 2.9 NS	7.35 ± 1.06 NS

Values are expressed as mean ± SD of 10 mice. All differences from the respective control were significant by Student's t-test. * p<0.001, NS; not significant.

松果体細胞処見：dwとlitマウスの松果体はその大きさが極めて小さく，未熟な組織処見を示し，濃縮した核をもった小さな細胞から成り立っていた。しかし，hytマウスの松果体は大きく，正常に匹敵する発育した像を示し，2種類の大きな松果体細胞によって構成されていた（データーは省く）。

Table 3.

DIURNAL CHANGE OF PINEAL NAT ACTIVITY OF THE dw, lit, AND hyt MUTANTS

pmol/10 min/pineal

	10:00 AM a	10:00 PM b	11:00 AM L-isoproternol c
+/?	4.98 ± 0.47	2.33 ± 0.53 *	2.53 ± 0.39 *
dw/dw	2.29 ± 0.22 *	1.28 ± 0.15 *	1.30 ± 0.49 *
lit/+	4.97 ± 0.43	2.41 ± 0.43 *	2.51 ± 0.41 *
lit/lit	1.90 ± 0.12 *	1.01 ± 0.13 *	1.43 ± 0.20 *
hyt/+	4.65 ± 0.57	2.65 ± 0.06 *	2.47 ± 0.37 *
hyt/hyt	4.67 ± 0.47 NS	2.75 ± 0.03 *	2.53 ± 0.39 *
Rat	3.98 ± 0.53	256 ± 31 *	289 ± 20 *

The activity wasmeasured at 10:00 AM and 10:00 PM. L-Isoproterenol (10mg/kg) was injected subcutaneously 2 and 4 hr before they were killed at 11:00 AM. Values are expressed as mean ± SD of five experiments. a: All differences from the respective control were significant by Student's t-test. b and c: All differences from the 10:00 AM values were significant by Student's t-test. * p<0.001, NS; not significant.

松果体NAT活性：正常マウスではNAT活性は明時に高く，暗時では明時の$\frac{1}{2}$に減少していた。他方，dwとlitマウスのNAT活性は明時，暗時ともに正常の$\frac{1}{2}$に減少していた。しかし，hytマウスでは正常対照群と差はなく，明，暗時の変動も同様であった。また，いずれのマウスでも，明時のL－isoproterenol投与により松果体NAT活性は有意に低下した（Table3）。

視神経組織処見とCNPase活性：抗ブタMBP抗体で各マウス視神経横断面を染めてみた。dw，lit，hytいずれのミュータントマウスでもその太さは減少の傾向を示していたが，抗MBP抗体に良く染まり，その染色部位，強さも正常対照群と差はなく，組織学的には良く発達した像としてとらえられた（データーは省く）。CNPase活性を測定してみると，各ミュ

ータントマウスと正常対照マウスとの間に差は全く認められなかった（Table 4）。

自発活動量とその日内周期： dwとlitマウスは自発活動量が減少していると同時に，その日内周期も消失していた。しかし，hytマウスでは豊かな自発活動量を示すとともに日内周期も良く保たれていた（データーは省く）。

Table 4.
CNPase ACTIVITY IN THE OPTIC N. OF THE dw, lit and hyt MICE.

	μmol/mg protein of homogentae/ min
+/?	10.1 + 0.3 (6)
dw/dw	10.3 ∓ 0.2 (6) NS
lit/+	10.1 + 0.2 (6)
lit/lit	10.3 ∓ 0.3 (6) NS
hyt/+	9.98 + 0.25 (6)
hyt/hyt	10.0 ∓ 0.3 (6) NS

Values are expressed as mean + SD, with the number of mice in parentheses. NS; not significant.

〔考　察〕

3種のミュータントマウスのSCNを検索したところ，dw，litマウスでRHT線維の入る腹側$\frac{1}{3}$の部位（4）がとくに未熟であり，hytマウスは正常と変りはなかった。このことはSCN腹側$\frac{1}{3}$部位が自発活動の日内周期の維持に重要な役割を演じていることを示唆していた。また，SCNの神経活動は生後2週目に確立し（16），この時期は生理現象（1）と行動パターン（3）の日内周期の発現と一致している。われわれは運動領野の錐体細胞の発育がdw，litマウスで遅滞し（9，11），hytマウスで正常に進行していること（13）を報告している。このことから，SCN神経細胞の発育にもまたGHが関与していると考えられ，GH投与によって行動パターンが正常化すること（7）からもこのことは強く支持された。RHTからの入力がSCNの発育を左右するか否かはShibataら（16）の報告があり，われわれの結果と同様，両者は無関係であった。他方，dw，litマウス松果体は著しく発育遅滞で，NAT活性も低値であった。さらにSCNの支配をうける行動パターンの面でも両マウスは異常であり，これらは明らかにSCNの発育遅滞に起因すると考えられた。ラット松果体NAT活性は暗時に高く，明時に低い。マウス松果体NAT活性をみると，明時にやや高く暗時にひくく，L－isoproterenol投与により減少した。既にPeromyscus leucopus（14），Spermorphilus mexicans（15）の仕事からもMus musclus とRattus norveigicus では松果体インドール代謝が遺伝的に異ると思われる。

〔文　献〕

(1) Deguchi, T., Pro. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 72, 2814-2828, (1975)
(2) Deguchi, T. and Axelrod, J. Anat. Rec. 50, 1714-1719, (1972)
(3) Fuchs, J. and Moore, R.Y. Pro. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 77, 1204-1208 (1980)
(4) Ito, T. and Matsushima, S. Anat. Rec. 159, 447-452, (1967)
(5) Kurihara, T. and Tsukada, Y. J. Neurochem. 14, 1167-1174, (1967)
(6) Morin, L.P., Fitzgerald, K.M., Rusak, B. and Zucker, I. Psychoneuroendocrinol. 2 73-98, (1977)
(7) Noguchi, T., Sugisaki, T. and Tsukada, Y. J. Neurochem. 38, 257-263, (1982)
(8) Noguchi, T., Sugisaki, T. and Tsukada, Y. Neurochem. Res. 10, 1097-1106, (1985)
(9) Noguchi, T., Sekiguchi, M., Sugisaki, T., Tsukada, Y. and Shimai, K. Devl. Brain Res. 10, 125-138, (1983)
(10) Noguchi, T. and Sugisaki, T. Exp. Neurol. 89, in press, (1985)
(11) Noguchi, T., Sugisaki, T. and Tsukada, Y. Neurochem. Path. 2, 123-138, (1984)
(12) Noguchi, T. and Sugisaki, T. J. Neurochem. 42, 891-893, (1984)
(13) Noguchi, T., Sugisaki, T., Satoh, I. and Kudo, M. J. Neurochem. In press, (1985)
(14) Petterborg, L.J., Richardson, B.A. and Reiter, R.J. Life Sci. 29, 1623-1627, (1981)
(15) Reiter, R.J. Endocrinol. 10, 113-121, (1984)
(16) Shibata, S., Oomura, Y., Liou, S.Y. and Ueki, S. Devl. Brain Res. 13, 29-35, (1984)
(17) Tsukada, Y., Nagai, K. and Suda, H. J. Neurochem. 34, 1019-1022, (1980)
(18) Zucker , I., Rusak, B. and King, R.G., Jr. Adv. Psychobiol. 3, 35-74, (1976)

173. *El* マウス脳の sequence complexity

平山栄一・山上　栄・大西　博・森　浩一
撫井弘二・川北幸男　（大阪市大・医・神経精神）

〔要　約〕

El マウスの発作感受性に相関する遺伝情報の転写機構を明らかにするため、その中心的役割を担っているmRNAの塩基配列の複雑性について、DNA-RNA hybridization法を用いて、発作非感受性のddYマウスと比較した。El とddYのunique DNAの飽和hybrid曲線より、Cot 1/2は共に 3.3×10^3 (mol. sec/l)であった。El(+)、El(o)、ddYの全脳より調製したPoly(A^+)-mRNAのunique DNAとの飽和hybrid値は、El(+)：3.81、El(o)：3.85、ddY：4.00%で、Kaplanに従いマウスのunique sequence のgenomeの大きさを3.25×10^9 (nt)として計算したところ、El(+)、El(o)、ddYのsequence complexityは、各々1.24×10^8、1.25×10^8,1.30×10^8 (nt)でEl(+)とEl(o)の間では有意差はみられなかったが、ddYとの間では有意差が存在した。また、El とddYのPoly(A^+)-mRNAを等量ずつ加えて行ったadditional hybridizatinで得られた飽和hybrid値は、4.04%でddYと有意差はみられなかった。つぎに、核のPoly(A^+)-hnRNAも同様な飽和hybridizationを行った。El(+)、El(o)、ddYの飽和hybrid値はそれぞれ、18.24、18.29、18.28%で有意差はみられなかった。これより、El とddYのPoly(A^+)-mRNAのsequence complexityの相違が、発作感受性に関与している可能性が推測された。

Key word： El mouse, Hybridization, Sequence complexity

El マウスの発作では、核RNAに存在するHnRNAの合成が阻害されるが、この現象は HnRNA分子内のoligo(A)鎖の形成阻害によることが明らかになった[5]。これは、El マウスの発作では、転写過程が抑制されることを示唆する。今回は、El マウスの発作感受性の素質について、転写機構に検討を加えた。

［方法］

1）実験動物：生後週一回放り上げ刺激を加え、痙攣を誘発させたEl マウスと痙攣履歴のないEl(o)マウスとに分けた。対照として非痙攣性のddYマウスを用いた。

2）unique[^{3}H]-DNAの調製：DNAはEl マウスの肝よりMarmurの方法[6]で調製した。このDNAを超音波処理で、400～600 nucleotidesに切断し、Chelex-100、Sephadex G-100で精製した。DNAを熱変性後、Cot 250まで反応させ、HAPカラムで一本鎖unique DNAと二本鎖反復配列DNAに分離した。この操作を再度繰り返して、Cot 250でreassociateしなかったunique DNAを、Cot 22,000まで反応させ、HAPカラムで分けると二本鎖のunique DNAが得られた。これをNick translation法[2]で[^{3}H]-dCTPよりlabelした。生じたunique[^{3}H]-DNAを、フェノール抽出、エタノール沈殿、Chelex-100、Sephadex G-50で精製した。Unique[^{3}H]-DNAの比放射活性は3.5×10^6～1.7×10^7 dpm/μgであった。

3）RNAの抽出：Polysomesの調製は前報[3]に従った。生じたPelletをProteinase K 処理、Phenolで RNA抽出し、Oligo(dT)カラムを用いて[1]、Poly(A^+)-mRNAを分離した。Poly(A^+)-hnRNAはFavaloraらの方法[4]を多少改変して行った。核を0.1% Triton X-100で精製し、Proteinase K、DNAase処理を行い、Phenolで抽出して、Oligo(dT)カラムを用いて、Poly(A^+)-hnRNAを分離した。

4) DNA-RNA saturation hybridization反応：Unique[^{3}H]-DNAとRNAとを1：1000の濃度比で0.4M-Nap、0.1% SDS反応液にEppendorf tubeの中で溶解し、100℃、5分間、熱変性した後、mineral oilを重層[3]し、63℃のoil bathの中でincubateした。適当なRotで反応を止め、DNA-RNA hybrid量をS_1 nuclease-DEAE cellulose filter法[7]を用いて測定した。

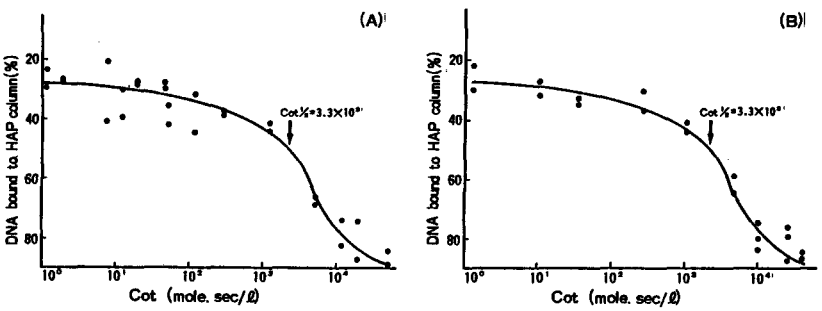


Fig.1 Reassociation kinetics of unique[^{3}H]-DNA probe and total sonicated DNA fragment from Eℓ mice(A) and ddY mice(B). Second-order rate constants and Cot½ are 0.3×10^{-3} ℓ/mol. sec, 3.3×10^3 mol. sec/ℓ respectively.

[結果と考察]

Fig. 1は、El とddYマウスのunique [^{3}H]-DNAとcold DNAとを1：10,000の濃度比で反応させたDNA reassociation curveである。El とddYの飽和hybrid値は85.7%、84.8%で、Cot 1/2はいずれもFig.1に示したとおりである。El とddYとのunique DNA genomeの大きさや複雑さの程度は、ほぼ類似しているものと推察される。Fig. 2は El(+)、El(o)、ddYマウスのPoly(A^+)-mRNAのSaturation hybridization curveである。それぞれの飽和hybrid値は、Yeast t-RNAとunique[^{3}H]-DNAのreactivityで得られた補正値をTable 1に示した。さらに ddY + El(+)として、ddYとEl(+)マウスの等量のPoly(A^+)-mRNAを混和して行ったadditional hybridization値を加えた。これより、El(+)とddYとの間では有意差がみられるが、El(+)とEl(o)とでは差は存在しなかった。また、El(+)とddYとのadditional hybridizationで得られた値は、ddYとほぼ類似したhybrid形成能を示している。このことは、ElマウスのPoly(A^+)-mRNAにおけるsequence com-plexityはddYより僅かに低いこ

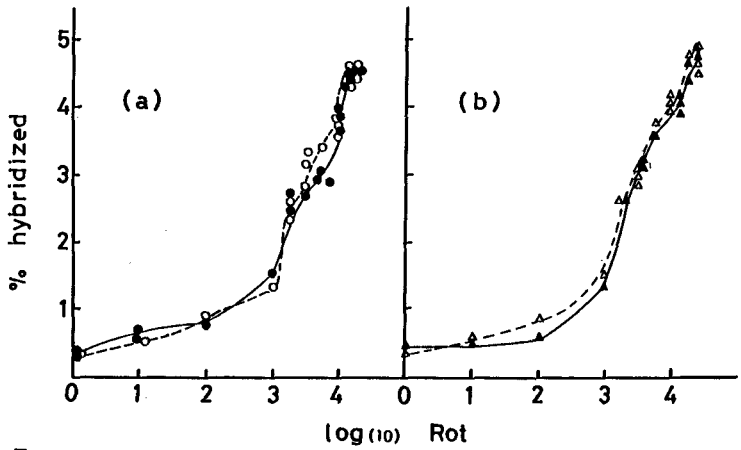


Fig.2 Saturation hybridization of Poly(A)-mRNA to Unique[^{3}H]DNA
(a) ●：El(+), ○：El(o), (b) △：ddY, ▲：ddY+El(+)

とを示唆している。また、Poly(A⁺)-mRNAの平均鎖長を1,400 nucleotides[5]と規定したとき、Elは ddYより配列の異なったmRNAがやや少ないことを意味している(Table1)。

Table 1 Saturation hybridization of Polysomal Poly(A⁺)-RNA to unique[³H]-DNA

Polysomal Poly(A⁺) RNA	Unique DNA hybridization at saturation (%) Rot observed[1]	Rot corrected[2] (Mean ± S.D.)	Sequence Complexity of Polysomal Poly(A⁺) RNA (Nt)	Number of different sequence[4]
Eℓ(+)	4.20±0.05	3.81±0.06	1.24×10⁹	89000
Eℓ(0)	4.24±0.09	3.85±0.10	1.25×10⁹	89000
ddY	4.36±0.02	4.00±0.03	1.30×10⁹	93000
ddY+Eℓ(+)	4.40±0.06	4.04±0.09	1.31×10⁹	94000

(a, b, c, d, P<0.05)

1. Hybrid values were obtained from hybridization reaction mixtures incubated to Rot >13000
2. Hybrid values were corrected for DNA duplex content and reactivity of ³H-DNA tracer.
3. Complexity estimate calculated on the basis that the unique DNA of mouse haploid genome is 3.25×10⁹ nt.
4. These values were obtained considering the number average length of Brain mRNA were 1400 nucleotides.

Poly(A⁺)-hnRNAのsequence complexityについてEl(+)、El(o)、ddYマウスとで比較した。結果をTable 2に示す。飽和hybrid値はEl(+)、El(o)、ddYの間で有意差は認められなかった。Sequence complexityにも三者で差は認められず、Poly(A⁺)-hnRNAの平均鎖長を4,500nucleotides[5]とした時、配列の異なったPoly(A⁺)-hnRNAの数も同じであった。これらから、ElとddYマウス mRNAの塩基配列の差異は、Poly(A⁺)-hnRNAのprocessingやsplicingにおいて生じた可能性が示唆される。いずれにしても、こうした塩基配列の差異がElの痙攣の結果生じたものではなく、素因によるものであることを推測しうる。

今後、さらに痙攣との関係について他系マウスとの比較や、脳のregionalでの検討も必要と思われる。

Table 2 Saturation hybridization of Poly(A⁺)-hn RNA to Unique [³H] DNA

Poly(A⁺)-hnRNA	Unique DNA hybridization[1] at saturation (Mean±SD) (%)	Sequence complexity[2] of Poly(A⁺)-hn RNA (nt)	Number of different[3] sequence
Eℓ(+)	18.24 ± 1.10	5.93 × 10⁸	132,000
Eℓ(0)	18.29 ± 1.75	5.94 × 10⁸	132,000
ddY	18.28 ± 0.77	5.94 × 10⁸	132,000

1. Hybridization values were obtained from hybridization reaction mixtures incubated to Rot >15000.
2. Complexity estimate calculated on the basis that the unique DNA of mouse haploid genome was 3.25×10⁹ nt.
3. These values were obtained considering the number average length of brain hn-RNA was 4,500 nt.

[文献]

1) Aviv, J., Leder, P. (1972) Proc. Natl. Acad. Sci. (USA) 69, 1408
2) Balmain, A., Birnie, G. D. (1979) Biochi. Biophys. Acta. 561, 155
3) Chikaraishi, D. M., Samir, S. Dub and Noboru Sueoka (1978) Cell 13, 111
4) Favalora, J., R. Treisman and R. Kamen (1980) In Methods Emzymol. Eds. by L. Grossman and K. Mold ane (New York: Academic Press), 65, 718
5) Kaplan, B. B. (1982) Handbook of Neurochem. 2, 1
6) Maumur, J. (1961) J. Mol. Biol. 3, 208
7) Maxwell, I. H., Van Ness, J., Hahn, W. E. (1978) Nucleic acid Res., 7, 2033
8) Onishi, H., Yamagami, S., Mori, K., Kawakita, Y. (1984) Exp. Neurol., 83, 98
9) Yamagami, S., Mori, K. (1977) J. Neurochem., 23, 707

174. 抗精神病薬 Zotepine のセロトニン（5HT-1, 5HT-1A, 5HT-1B, 5HT-2）受容体に対する作用について

原田俊樹・藤原　豊・福田賢司・梶田三郎
佐藤光源・大月三郎　（岡山大・医・神経精神）

〔要　約〕

21匹のラットを7匹ずつ3群に分け，それぞれに10日間Zotepine 10mg／kg／日腹腔内注射（ZTP群），Zotepine 10mg／kg／日腹腔内注射およびLiCl餌 30mEq／kg 投与（ZTP＋Li 群），生理食塩水 1ml／kg／日腹腔内注射（Saline 群）し，72時間の断薬期をおいて断頭し，前頭皮質，海馬，線条体を切り出し，それぞれの部位のセロトニン（5HT—1，5HT—1A，5HT—1B，5HT—2）受容体の変化をラジオリセプターアッセイ法を用いて調べた。その結果，ZTP群およびZTP＋Li 群において，前頭皮質の5HT—2受容体の特異的結合の著明な減少と，線条体の5HT—1受容体および5HT—1A受容体の特異的結合の増加を認めた。
臨床的にZTPおよびZTP・Li 併用療法の躁病に対する有効性が知られており，今回の実験結果との関係について若干の考察を加えた。

Key word：Zotepine，5HT—1 receptors，5HT—2 receptors

Zotepine（ZTP）は近年わが国で合成された抗精神病薬であり，臨床的に著明な抗躁及び鎮静効果を有していることを特徴としている[6,7,10]。われわれはこれまで，ZTPの抗躁，鎮静効果の機序を理解するために，ラジオリセプターアッセイ（RRA）を用いて，中枢各種受容体に対するZTPの力価を in vitro で測定し，他剤と比較してきた。その結果，ZTPは他剤と比較してセロトニン—1（5HT—1）受容体に対する力価が著しく強く（Table 1）[2]，さらに脳部位別に5HT—1受容体に対する力価を検討したところ，ZTPの5HT—1受容体に対する強力な作用は部位別に大差ないが，spiperoneやhaloperidolなどのbutyrophenone系薬剤では海馬と線条体の力価の間に著しい差があることがわかった（Table 2）。
これらのことから，われわれは5HT—1受容体の異種性と抗精神病薬との関係について論じ，ZTPの強力な5HT—1受容体への作用は，spiperoneに高親和性をもつ5HT—1A受容体[9]への作用よりも低親和性をもつ5HT—1B受容体への作用をより大きく反映しているものと考えた[3]。

Table 1. IC_{50} Values of Various Neuroleptic Drugs (nM)

	DA	$5HT_1$	$5HT_2$	NA	ACH
Zotepine	10.5 (0.90)	280 (0.64)	11.1 (1.34)	3.9 (0.42)	463 (1.35)
Chlorpromazine	8.5 (1.10)	2960 (0.49)	9.5 (1.16)	4.9 (0.35)	194 (1.28)
Haloperidol	3.1 (0.68)	4220 (0.51)	61.0 (0.45)	70.5 (0.69)	10,700 (1.10)
Spiperone	1.6 (2.23)	1530 (0.38)	3.8 (1.11)	20.9 (0.73)	8,700 (1.11)

( ) : Hill Coefficients
DA : dopamine-2, $5HT_1$: serotonin-1, $5HT_2$: serotonin-2
NA : alpha-1 noradrenalin, ACh : muscarinic acetylcholine

Table 2. IC_{50} Values of Various Neuroleptic Drugs (μM) of ^{3}H-5HT Binding

	F.C.	HIP.	ST.	B.S.
Zotepine	1.07 (0.75)	0.84 (1.11)	1.41 (0.87)	1.85 (0.67)
Chlorpromazine	2.69 (0.67)	1.88 (1.00)	4.11 (0.81)	7.04 (0.92)
Haloperidol	4.73 (0.80)	1.85 (0.63)	16.2 (0.62)	33.9 (1.39)
Spiperone	1.59 (0.46)	0.23 (0.48)	15.1 (0.53)	9.21 (0.78)

( ) : Hill Coefficients
F.C. : frontal cortex, HIP. : hippocampus
ST. : striatum, B.S. : brain stem

今回は，ZTP単独，およびZTPとLiCl（Li）の併用でラットに慢性投与実験を行ない，RRAを用いて脳部位別に各種5HT受容体の変化を調べたので報告する。

［実験方法］

対象はSprague—Dawley系雄性ラット（日本クレア，体重250～300g，8週齢）21匹である。21匹をZTP投与群（ZTP群），ZTP+Li 投与群（ZTP+Li 群），Saline群の3群に7匹ずつ分け，12時間の明暗周期，

室温 24℃の条件下で飼育した。ZTP 群，ZTP+Li 群には ZTP 10mg/kg/日を 10 日間にわたり 1 日 1 回ほぼ定刻に腹腔内注射し，さらに ZTP+Li 群は同期間 LiCl 30mEq/kg を含む餌で飼育した。Saline 群には生理食塩水 1ml/kg/日を同期間腹腔内注射した。各注射最終施行時 ZTP+Li 群の餌も他群と同様の固形餌に変更し，その後 72 時間の断薬期をおいて断頭し，Glowinski & Iversen の方法[1]に従って，前頭皮質，海馬，線条体を切り出し，それぞれの湿重量を測定した後，−80℃で測定日まで凍結保存した。

結合実験の測定系を Table 3 に示す。受容体標本は組織を湿重量の 25 倍容量の 50mM Tris–HCl buffer (pH=7.4, 25℃)に入れ，Polytron–PT10 と glass homogenizer でホモゲナイズし，43,000g, 20 分間の遠沈を行ない得られた pellet を上記と同様の buffer に懸濁し，そのホモジネイトを 30 分間，37℃で pre–incubation した。その後，再び上記と同様の遠沈を行ない得られた pellet を同様に buffer に懸濁し，そのホモジネイトを receptor preparation とした。

TABLE 3. ASSAY SYSTEM (1TUBE=1ML)

	5HT-1	5HT-1A	5HT-1B	5HT-2
Receptor Preparation (mg protein/ 1 tube)	rat frontal cortex, hippocampus striatum crude membrane fraction (0.3-0.5)			
Pre-incubation	30 min at 37°C			
^{3}H-ligand (nM)	^{3}H-5HT (1.0)			^{3}H-ketanserin (1.0)
Medium	50 mM Tris-HCl buffer (pH=7.4,25°C)			
Specific Binding	Binding in blank minus Binding in the presence of 100μM 5HT	Binding in blank minus Binding in the presence of 1.0μM spiperone	Binding in the presence of 1.0 μM spiperone minus Binding in the presence of 100 μM 5HT	Binding in blank minus Binding in the presence of 100μM 5HT
Incubation time & temperature	30 min at 25°C			
Filter	Whatman GF/C filter			
Washing	5 ml x 2 with ice-cold Tris-HCl buffer			

結合実験は，5HT–1, 5HT–1A, 5HT–1B に対しては，最終濃度 1nM の ^{3}H–5HT を，5HT–2 に対しては，最終濃度 1nM の ^{3}H–ketanserin を用いた。反応液は ^{3}H–ligand 液 0.1ml，ホモジネイト 0.1ml，および全容量が 1ml となるように buffer を加えた。

Incubation は各結合実験とも 30 分間，25℃振盪しながら行ない，ついで氷冷 buffer 5ml で 2 回洗浄しながら Whatman GF/C filter で吸引ろ過した。各特異的結合の求め方については Table 3 を参照されたい。上記測定はいずれも triplicate で行ない，filter 上の放射活性を測定した。さらに蛋白質の測定はヒト結晶アルブミンを標準とし，Lowry 法[4]によって行ない，特異結合は fM/mg protein 単位で求めた。

［実験結果］

前頭皮質においては (Table 4)，Saline 群に比べて ZTP 群，ZTP+Li 群で有意に 5HT–2 受容体の特異的結合の減少をみとめた。

海馬においては (Table 5)，それぞれの 5HT 受容体で各群間に有意な差はみとめられなかった。

線条体においては (Table 6)，Saline 群に比べて ZTP 群，ZTP+Li 群で有意に 5HT–1 受容体と，5HT–1A 受容体の特異的結合の増加をみとめた。

また，いずれの脳部位のいずれの 5HT 受容体においても，ZTP 群と ZTP+Li 群の間には有意な差は認めなかった。

Table 4. The changes of 5HT receptors in rat frontal cortex following chronic zotepine administration

	5HT-1	5HT-1A	5HT-1B	5HT-2
Saline	43.1 ± 7.7 (n=6)	22.4 ± 8.1 (n=7)	23.2 ± 3.8 (n=6)	29.4 ± 4.2 (n=6)
Zotepine	46.6 ± 8.7 (n=7)	25.6 ± 6.1 (n=5)	25.6 ± 2.9 (n=7)	12.2 ± 2.8* (n=7)
Zotepine + Lithium	45.2 ± 5.7 (n=6)	24.4 ± 10.0 (n=7)	24.5 ± 3.8 (n=6)	15.7 ± 4.6* (n=7)

These values represent means ± S.D. of specific binding (fM/mg protein) at 1 nM of each ligand (5HT-1, 5HT-1A, 5HT-1B : ^{3}H-5HT, 5HT-2 : ^{3}H-ketanserin).

* P< 0.01 vs Saline (ANOVA)

Table 5. The changes of 5HT receptors in rat hippocampus follewing chronic zotepine administration

	5HT-1	5HT-1A	5HT-1B	5HT-2
Saline	80.4 ± 10.9 (n=7)	56.5 ± 5.0 (n=6)	26.9 ± 3.4 (n=7)	6.7 ± 2.4 (n=7)
Zotepine	77.5 ± 5.7 (n=7)	50.0 ± 5.3 (n=7)	27.6 ± 1.7 (n=7)	4.7 ± 1.6 (n=7)
Zotepine + Lithium	83.5 ± 11.0 (n=6)	55.4 ± 9.1 (n=6)	28.1 ± 2.6 (n=6)	6.1 ± 1.4 (n=6)

These values represent means ± S.D. of specific binding (fM/mg protein) at 1 nM of each ligand (5HT-1,5HT-1A,5HT-1B : ^{3}H-5HT, 5HT-2 : ^{3}H-ketanserin).

［考　察］

今回の結果をまとめると，ZTP 群，ZTP+Li 群の前頭皮質における 5HT–2 受容体の特異的結合の減少と，線条体における 5HT–1 及び 5HT–1A 受容体の特異的結合の増加である。ZTP の 5HT 受容体への作用の主要な部分であると思われる 5HT–1B 受容体の変化はいずれの部位でもみられなかった。これまでのわれわれの in vitro での実験結果[2,3] と

今回の実験結果及びZTPの臨床効果などから，われわれは次のように考察した。

まず，ZTPの臨床効果から[6,7,10] ZTPの抗躁効果はきわめて迅速にあらわれ，かつLiの併用でその効果が増すことが明らかになっている。

今回のわれわれの実験結果ではLiを併用することでZTPの作用が増すことを反映するデータはなく，またin vitroでのZTPの強力な作用部位であると思われる5HT—1B受容体の変化もみられなかった。

Table 6. The changes of 5HT receptors in rat striatum following chronic zotepine administration

	5HT-1	5HT-1A	5HT-1B	5HT-2
Saline	37.7 ± 2.1 (n=6)	11.4 ± 1.9 (n=6)	26.3 ± 2.9 (n=6)	30.9 ± 3.0 (n=5)
Zotepine	44.2 ± 5.9* (n=6)	15.8 ± 3.8** (n=6)	28.4 ± 3.0 (n=6)	28.5 ± 4.9 (n=6)
Zotepine + Lithium	44.3 ± 6.3* (n=7)	17.0 ± 4.6** (n=7)	27.2 ± 2.6 (n=7)	27.1 ± 5.1 (n=7)

These values represent means ± S.D. of specific binding (fM/mg protein) at 1 nM of each ligand (5HT-1,5HT-1A,5HT-1B : ^{3}H-5HT, 5HT-2 : ^{3}H-ketanserin).

* P<0.05 vs Saline (t-test)
** P<0.05 vs Saline (ANOVA)

これらのことから，今回の慢性投与による線条体の5HT—1及び5HT—1A受容体の変化は，ZTPの抗躁効果と直接関連するとは考え難い。また，5HT—2受容体については従来より抗うつ剤の慢性投与によりdown—regulationが生じることが明らかにされており[8]，この変化が抗うつ作用と関連するのではないかと考えられているが，Mikuniら[5]は抗精神病薬のchlorpromazineでも同じ現象がおこると報告し，今回のわれわれの結果でも，抗躁効果とともに強力なうつ転作用を有す[7,10]ZTPで同じ現象がおこっていることから，5HT—2受容体のdown—regulationは抗うつ作用とは直接関連ないものと考えられ興味深い結果である。

〈文　献〉

1) Glowinski, J. and Iversen L. L. (1966) J. Neurochem. 13, 655-669
2) Harada, T., Ebara, T. and Otsuki, S. (1984) Folia Psychiatr. Neurol. Jpn. 38, 473-480
3) Harada, T., Sato, M. and Otsuki, S. (unpublished)
4) Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L. and Randall, R. J. (1951) J. Biol. Chem. 193, 265-275
5) Mikuni, M. and Meltzer, H. Y. (1984) Life Sci. 34, 87-92
6) 西園昌久，福井　敏（1983）精神医学　25，295—309
7) 大月三郎，原田俊樹（1985）臨床精神医学　14，309—321
8) Peroutka, S. J. and Snyder, S. H. (1980) Science 210, 88-90
9) Schnellmann, R. G., Waters, S. J. and Nelson, D. L. (1984) J. Neurochem. 42, 65-70
10) 氏家　寛，堀井茂男，江原　嵩，大月三郎（1983）臨床精神医学　12，1575—1586

175. 老年痴呆における choline acetyltransferase 最大活性とコリン親和性異常

越村邦夫・加藤智信・遠山育夫・中村重信・亀山正邦
（京都大・医・神経内科）

〔要　約〕

choline acetyltransferase（CAT）の最大活性とCATのコリンに対する親和性を，老年痴呆10例，痴呆のない老年者6例の剖検脳大脳皮質およびMeynert 基底核（nbM）について検討した。nbMを含む無名質や大脳皮質におけるCAT最大活性の分布パターンは，老年痴呆と同年齢の対照群との間に差は認められず，nbMで最も高いCAT活性が認められた。また，nbMにおけるCAT最大活性は，大脳皮質で検索した5部位（Brodmann 4, 7, 10, 17, 22野）のうち3部位（Brodmann 10, 17, 22野）におけるCAT最大活性と有意な相関を示した。そのうち，Brodmann 22野とnbMの活性が最も強い相関関係にあった。

大脳皮質，nbMいずれのCAT最大活性も老年痴呆患者では同年齢の対照群に比べて低値傾向にあった。そのうち，大脳皮質Brodmann 10, 17, 22野およびnbMでのみ有意の低下が認められた。

側頭葉におけるCATのコリンに対する親和性を測定したところ，老年痴呆で有意に低下していた。これらの結果は老年痴呆剖検脳におけるCATは量的のみならず，質的変化をきたしていることを示唆する。

Key word：Senile dementia, choline acetyltransferase（CAT）, affinity for choline

Alzheimer病や老年痴呆の病態解明や治療剤開発のために，中枢性コリン作動系の研究が活発に行われている。とくに，Meynert基底核（nbM)から大脳皮質への投射が，Alzheimer病と関連して注目されている(8)。コリン作動系障害の検索に際して，若年発症の初老期痴呆と高令発症の老年痴呆は病理学的変化が似ているところから，一つの範疇としてとり扱われてきた。しかし，臨床的には初老期痴呆と老年痴呆との間にいくつかの点で差がみられるため，初老期痴呆と老年痴呆におけるコリン作動系の異常を比較することが必要である。

本報告では，nbMと大脳皮質のcholine acetyltransferase（CAT)の最大活性の相関を検討した。次に，高年者（平均83.6歳）におけるCATの最大活性を老年痴呆と痴呆のない者について比較した。さらに，CATのコリンに対する親和性についても検索した。

【方法】老年痴呆10例，痴呆のない老年者6例の剖検脳を用いて検索した。老年痴呆群の年齢中央値は83.5歳，対照群は82歳であり，死後剖検までの時間の中央値は老年痴呆群で5時間，対照群で4時間といずれも差は認められなかった。老年痴呆の診断は症状，知能指数，CT所見，脳波および剖検後の組織学的診断によった。

剖検脳は−80℃にて保存し，検索時に解凍し3mm幅の冠状断スライスを作製した。前交連および視索を目標にして，nbMを同定し，5mm平方の小片に分割した。分割した小片は0.5mlの0.1Mリン酸ナトリウム（pH7.4）を加えてホモゲナイズした。また，大脳皮質は白質や脳軟膜を除いた後4倍量の同じ緩衝液を加えてホモゲナイズした。ホモジェネートは活性測定前30分に1％Triton X−100を加えた。CAT活性はFonnumの方法により測定した(1)。ホモジェネート2μlを50mMリン酸ナトリウム（pH7.4），10mMコリ

ン塩酸塩，10mM EDTA，300mM NaCl，0.1mM physostigmine，0.54mM [^{3}H] アセチルCoA（0.05μCi）に加えて全量7μlにして，37℃ 10分間反応させた。CAT活性測定は，triplicateに行い，ホモジェネートを加熱したものを対照とした。蛋白量はLowryの方法(3)により測定した。酵素活性は，nmolアセチルコリン生成／分／100mg 蛋白として表した。km値はLineweaver−Burk plotより求めた(2)。統計処理はMann−whitney法とPearson 法によって行った。

【結果】無名質におけるCATの最大活性を対照群と種々の疾患について測定した結果を図1に示す。疾患によるCAT活性分布の著しい差は認められなかった。無名質の小片におけるCAT活性は一様ではなく，無名質におけるコリン作動系大細胞の組織学的分布とよく一致していた。無名質における最も高い活性はnbMの位置に相当していた。

nbMと大脳皮質の5部位における老年痴呆患者と対照群のCAT活性を表1に示す。大脳皮質におけるCAT活性は老年痴呆患者と対照群で同じ分布パターンを示した。nbMのCAT活性は，大脳皮質で検索した5部位のうち3部位（Brodmann 10, 17, 22野）におけるCAT活性と有意な相関を示した（表2）。そのうち，Brodmann 22野とnbMの活性が最も強い相関関係にあった。

老年痴呆患者のnbMと大脳皮質におけるCAT活性は対照群のCAT活性より低値傾向にあった（表4）。大脳皮質における低下の程度はその部位のCAT活性とnbMのCAT活性の相関の程度と平行していた。しかし，有意なCAT活性の低下はBrodmann 10, 17, 22野にのみ認められ，その低下程度も初老期痴呆ほど著しくなかった。

CATのコリンに対する親和性を側頭葉Brodmann 22野でコリンの6濃度を用いて測定した。老年痴呆患者と対照群の迷数plotの代表

Fig. 1. Distribution of CAT activity in substantia innominata

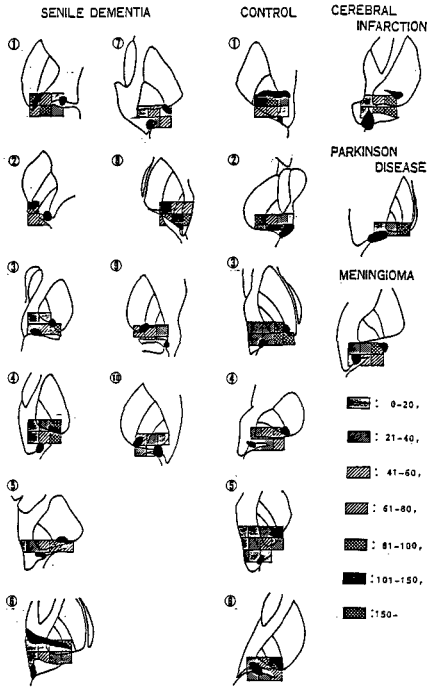


TABLE 1. CAT activity of cortex and nbM

SENILE DEMENTIA

	age	sex	area4	area7	area10	area17	area22	nbM
1.	76	M	8.69	7.45	10.19	5.45	14.23	120.70
2.	82	M	2.12	3.79	4.69	1.59	4.55	70.40
3.	85	M	4.37	5.41	5.11	3.06	2.16	39.38
4.	75	F	6.37	6.82	5.15	4.15	9.97	90.88
5.	78	F	4.69	4.72	5.87	3.41	7.45	62.80
6.	82	F	7.02	4.74	7.54	3.80	6.51	42.80
7.	88	F	4.05	4.04	5.87	3.60	9.46	58.95
8.	88	F	9.32	6.58	6.99	4.70	6.36	71.09
9.	90	F	13.68	9.78	9.41	5.64	5.86	64.50
10.	92	F	8.24	5.14	3.57	3.31	6.90	66.20

CONTROL

	age	sex						
1.	77	M	11.24	6.66	11.33	6.69	16.17	179.00
2.	78	M	5.54	5.71	6.48	4.18	10.87	132.41
3.	86	M	8.51	7.74	8.08	5.81	9.94	92.77
4.	82	F	6.34	5.02	6.14	3.84	9.93	61.70
5.	82	F	10.82	7.47	10.93	6.70	16.97	135.26
6.	97	F	15.29	11.02	14.34	7.75	14.99	104.42

CAT activity: expressed as nmol ACh/min/100mg prot

TABLE 2. Correlation between CAT activity in nbM and cortical areas

	area 4	area 7	area10	area17	area22
nbM	r=0.418	r=0.367	r=0.597	r=0.646	r=0.844
	n.s.	n.s.	p<0.02	p<0.01	p<0.001

TABLE 3. CAT activity of senile dementia and control

	age	area4	area7	area10	area17	area22	nbM
SENILE	83.60	6.86	5.85	6.45#	3.87#	7.35#	68.77#
DEMENTIA	±1.80	±1.00	±0.55	±0.63	±0.36	±0.99	±6.99
CONTROL	83.67	9.62	7.27	9.55	5.83	13.15	117.59
	±2.71	±1.34	±0.79	±1.19	±0.57	±1.21	±6.17
%		71.3	80.5	67.5	66.4	55.9	58.5
		n.s.	n.s.	p<0.02	p<0.005	p<0.005	p<0.02

age: expressed as years old, mean±SEM
CAT activity: expressed as nmol ACh/min/100mg prot, mean±SEM

例を図2に示すが，全例このように直線関係をとっていた。老年痴呆におけるkmは対照群のKmより有意に高値であった（表4）。

【考察】CATの最大活性はnbMに最も高く，大脳皮質のCAT活性との間に種々の程度の相関を示した。その相関の程度はnbMからの投射の程度を反映するものと考えられる(9)。

老年痴呆脳でもCAT最大活性は低下傾向にあるものの，初老期痴呆脳でのCAT活性(5)と比べてその程度が低かった。同様の報告は，Rossorら(6)によっても報告されている。従って，初老期痴呆と老年痴呆を区別して検討する必要があると思われる。

acetylcholine合成の律速段階は神経細胞へのコリン取り込み段階であると報告されている(7)。そのためCATのコリンに対する親和性を検討することが大切である。Mohanら(4)は加齢によりCATのコリン親和性が低下すると報告している。老年痴呆におけるコリン親和性低下はCAT蛋白の質的変化を示唆しており，acetylcholine合成の効率を低下させるものと考えられる。

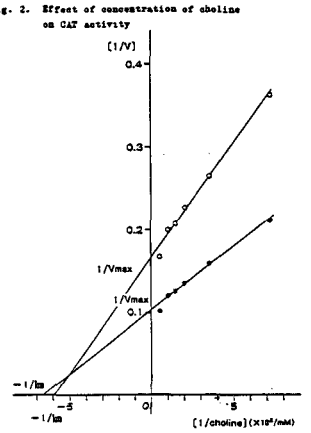


Fig. 2. Effect of concentration of choline on CAT activity

TABLE 4. Affinity for choline

SENILE DEMENTIA				CONTROL			
	age	sex	Km		age	sex	Km
1.	76	M	2.58	1.	77	M	0.91
2.	82	M	1.51	2.	78	M	1.52
3.	85	M	2.74	3.	86	F	1.31
4.	75	F	1.11	4.	82	F	1.81
5.	78	F	1.59	5.	82	F	1.22
6.	82	F	1.49	6.	97	F	1.49
7.	88	F	1.88				
8.	88	F	1.69				
9.	90	F	3.70				
10.	92	F	1.46				
	83.60		1.98		83.67		1.38
	±1.80		±0.24#		±2.71		±0.11

age: expressed as years old, mean±SEM
Km: expressed as μM, mean±SEM #p<0.05

【文献】

1. Fonnum, F, (1975) J. Neurochem. 24, 408－409.
2. Hersh, L. B., and Peet, M. (1977) J. Biol. Chem. 252, 4796－4802.
3. Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L., and Randall, R. J. (1951) J. Biol. Chem. 193, 265－275.
4. Mohan, C., and Radha, E. (1978) Exp. Geront. 13, 349－356.
5. Nakamura, S., Koshimura, K., Kato, T., Yamao, S., Iijima, S., Nagata, H. Miyata, S., Fujiyoshi, K., Okamoto, K., Suga, H., and Kameyama, M. (1984) Clin. Therap. 7, 18－34.
6. Rossor, M.N., Iversen, L. L., Reyneodo, G.P., Mountjoy, C. Q., and Roth, M. (1984) Br. Med. J. 288, 961－964.
7. Simon, J. R., Atweh, S., and Kuhan, M.J. (1976) J. Neurochem. 25, 909－922.
8. Whitehouse, P. J., Price, D. L., Clark, A.W., Coyle, J. T., and Delong, D. R. (1981) Ann. Neurol. 10, 122－126.
9. Wilcock, G.K., Esiri, M.N., Bowen, D.M., and Smith, C.C. T. (1983) Neuropathol. Appl. Neurobiol. 9, 175－179.

176. 髄液 Cholinesterase 活性の微量定量法と none neurological disease に於ける活性について

岩田　悟・小鹿幸生・山本正彦　(名古屋市大・医・第二内科)

〔要　約〕

中枢性コリン作動性ニューロンの生体内機能を反映すると考えられる髄液 acetyl cholinesterase (AchE) 活性を microplate spectrophotometric system で測定した。同時に pseudocholinesterase (PchE) 活性・蛋白量も測定し検討した。対象は非神経・精神疾患々者 100 例で外科手術の腰椎麻酔時に採取した水様透明な髄液を用いた。①測定条件の設定，②髄液を採取する際，AchE に濃度勾配が存在するか否かについて検討したが，6 mℓ以内の採取では濃度勾配は存在しなかった。③髄液を－20 ℃で凍結保存し測定時に融解をくり返したが AchE活性の低下は認めなかった。④同一患者で，日をかえて採取した髄液では AchE活性は変動しなかった。⑤患者の年令は 15～75才 (平均 43±14 才)，髄液 AchE 活性・ PchE 活性・蛋白量の平均値は各々 12.55±3.46mu/mℓ, 4.19±1.09mu/mℓ, 0.503±0.160mg/mℓ であった。年令と AchE・PchE 活性に相関は認めなかった。PchE 活性も同様な傾向を示した。髄液蛋白量と AchE 活性との間には有意な相関はなかったが，PchE 活性との間には相関が認められた(r=0.57)。更に PchE 活性と AchE活性との間にも有意な相関が認められた (r＝0.73)。⑥年令，AchE 活性の異なる 5 例で髄液 AchE の Km. Vmax を検討した。Km は 1.71×10^{-4}M, Vmax は 8.4～18.5 μM/min であった。

Key word : Cholinergic neuron.　Acetylcholinesterase.　Pseudocholinesterase.

緒言：中枢性コリン作動性ニューロン (C h.N.)は大脳皮質；基底核・脊髄前角運動ニューロン・脳神経の運動核・自律神経の節前神経等，前脳から脊髄にまで広汎に分布している。殊に線条体と無名質には大型神経細胞として多く存在し，前者は疎に，後者は密に存在している。無名質中の Meynert 核と大脳皮質，中隔核と海馬との直接的線維連絡が証明され(1)(2)これらの Ch.N. は学習や記憶の機序に重要な役割を演じているとされている。Ch.N.の機能を生物化学的に検討するには Cholineacetyltransferase (CAT)や AchE の活性を指標とする事ができる。しかし，神経組織内の CATや AchE 活性を直接測定する事は，特に疾患との関係に於て論じようとした場合困難である。また，CATは Ch.N. に特異性が高く，ChE はやや特異性に劣り，Ch.N. 以外の小脳・黒質・淡蒼球などにも存在する事が報告されている(3)が，CATの測定法に比し AchE の活性測定法は比較的容易である事から，近年，Alzheimer 病・痴呆・老化・精神病などの疾患と髄液中の AchE活性について検討がされ始めた(4)(5)(6)(7)。疾患と髄液AchE活性との関係は報告者により異なり，一致しない部分が多い。我々は独自に髄液中の AchE 活性の Kinetic study を検討する目的で，その微量定量法を用い，測定条件の検討及び神経疾患を有しない患者多数例について髄液蛋白量，AchE・PchE 活性及び AchE の Km などについて検討したので報告する。

－方法－

〔髄液〕　対象は神経・精神症状を有しない患者 100 例，年令 15～75 才 (平均 43±14才) である。全例外科手術時の腰椎麻酔に際し髄液を約 1mℓ採取した。採取後は－20℃で凍結保存をし，必要に応じ融解して使用した。

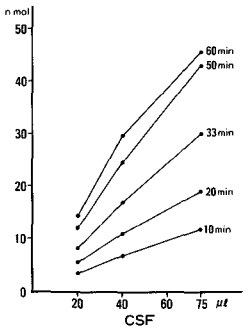
〔Cholinesterase測定法〕　AchE 活性測定には Acetyl β－methylthiocholine を，PchE活性測定には基質として S－butyrylthiocholine iodide をそれぞれ 8.7×10^{-4}M を用いた。髄液 30 μℓ と基質及び dithiobis－nitrobenzoate (DTNB) 1.09×10^{-4}M とを Falcon 社製 96 Well multi Well plate 中で 24℃，一定時間反応後，

産生された5−thio−2−nitro−benzoic acidの量をコロナ社製MTP22 microphotometerを用い405nmで吸光度を測定した。検量曲線は既知濃度のglutathioneをDTNBと反応させ作製し，その吸光度より髄液1mℓ中のコリンエステラーゼが単位時間（分）に分解するthiocholine量を算定し1μg/mℓ/minを一単位とした。

〔髄液AchEのKm測定〕 種々の活性を示す患者髄液30μℓとDTNB 1.09×10^{-3}M及び各種濃度（8.7×10^{-5}, 1.2×10^{-4}, 1.7×10^{-4}, 2.1×10^{-4}, 2.8×10^{-4}, 4.3×10^{-4}, 8.6×10^{-4}M）のAcetylβ−methylthiocholineとを24°C，45分間反応させ，産生された5−thio−2−nitro−benzoic acid量から，Lineweaver−BurkのReciprocal plotを用いKmとVmaxを検討した。

〔蛋白量測定〕 Bradford法を用い，Bio−Rad社製Coomasie Brilliant BlueをWhatman No. 2 filterで濾過後，純水で6倍に稀釈し髄液4μℓ（10倍稀釈髄液40μℓ）と混合後，micro photometerを用い610nmで吸光度を測定した。検量曲線作製には既知濃度のBovine Serum Albuminを用いた。

図1



髄液量とincubation timeの設定

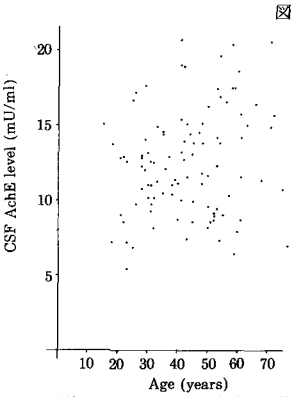
−結果及び考察−

〔測定条件設定〕 上記の基質及びDTNBの濃度を用い，数例の患者髄液20・40・75μℓをそれぞれ10・20・33・50・60分，24°Cでincubationを実施し，incubation timeと髄液量との関係を検討した。この結果産生された5−thio−2−nitrobenzoic acid量が30nmol以上とならないように条件を設定する事が必要であると考えられた（図1）。40μℓ以下の髄液量を使用する場合，incubation time 10〜60分で両者の間に直接関係が認められ，本実験では髄液30μℓ incubation time 45分と設定した。

〔髄液の採取に関する検討〕 腰椎穿刺で髄液を採取する場合，AchEに濃度勾配が存在するか否かについて検討した。7例の患者で腰椎穿刺を行い，初圧測定時に採取した髄液1mℓと約5mℓ採取後の終圧測定時に採取した髄液1mℓでAchE・PchE活性，蛋白量を測定し比較検討したが有意な差は認められなかった。髄液中のAchEの濃度勾配はこの量の髄液採取では存在しないと思われた。

〔髄液の保存に関する検討〕 AchE活性は−25°Cで凍結保存し，測定時に融解を繰り返しても50日後にも80%の活性を保つと報告されている。我々の保存法は−20°Cの凍結保存で，必要に応じ融解した。AchEの安定性を確かめるため，7検体で日時をかえて2回AchE活性を測定した。2回目のAchE活性値は低下せず逆に約27.5%上昇した。この原因の可能性として内因性Acetylcholine（Ach）が存在し，基質と競合する可能性も示唆され，内因性Achを除去する目的でアンモニウムサルフェートによる塩析を行った。20・40・60・80%の濃度でAchEを塩析し，上澄に含まれる内因性Achを除去した後でAchE活性を測定したが活性値の上昇は認められなかった。2回目のAchE活性の上昇の原因は少くとも内因性Achによるものではないと考えられ，今後の課題と思われた。

図2



髄液Ach活性(mU/ml)と年令との関係

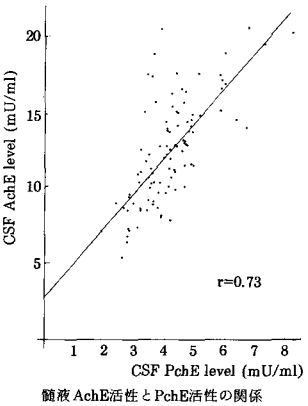
〔同一患者におけるAchE活性の再現性〕 症状の固定した同一患者で異なる日時に複数回，髄液採取し得た症例ではAchE活性は殆ど変動しなかった。

〔AchE・PchE活性及び蛋白量の測定値の検討〕

前述の患者100例を対象に髄液のAchE・PchE活性・蛋白量を測定すると，その平均値は各々12.55±3.46mu/mℓ，4.19±1.09mu/mℓ，0.503±0.160mg/mℓであった。年令と各々の値について検討した所，AchE活性と年令との両者の間には明らかな相関は認められなかった（図2）。従来の報告では，年令とAchEの活性は相関し，年令と共に活性の増加を認めるとする報告(4)(6)，これに反し相関を認めないとする報告(7)などがあり，一定した傾向は得られ

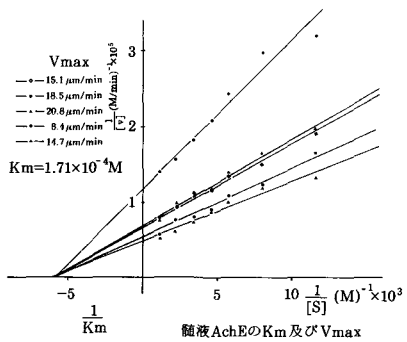
ていない。今回我々の神経・精神症状を有しない多数例の検討では，同一年令群でもその活性は広く分布する事から，今後疾患との関係を論ずる際に注意が必要と思われた。年令とPchE活性との間にも明らかな相関は認められず，更に年令と蛋白量との間にも相関を認めなかった。次に蛋白量とAchE活性との間の相関を検討したが明らかな関係は認められなかった。一方，髄液蛋白量とPchE活性との間には正の相関が認められr＝0.57であった。PchE活性はAlzheimer病やControl群でも加令と共に上昇する傾向が報告されている(8)。また，加令と共に髄液蛋白量の増加が報告されている(5)が，今迄にPchE活性と髄液蛋白量が相関したとする報告は認められず，興味有る結果であった。更に，AchE活性とPchE活性との間には強い相関（r＝0.78）が認められた（図3）。この様な報告は今迄に認められず，更に詳細な検討が必要と考えられた。

図3



髄液AchE活性とPchE活性の関係

図4



髄液AchEのKm及びVmax

〔髄液AchEのKm,Vmaxの検討〕　対象100例から任意に選んだ5例についてはKmとVmaxを検討した。5例の年令は15,28,40,40,71才で，それぞれのAchE活性値は16.9，23.8，24.8，9.6，17.4mu/mℓであった。各々の例でKmは同値を示し1.71×10^{-4}Mで，Vmaxはそれぞれ15.1，18.5，20.8，8.4，14.7μm/minであった（図4）。本検討で得られたKmは赤血球膜のAchEのKmをAcetylthiocholineを基質として測定した値（1.4×10^{-4}M）と類似した結果であった(9)。脳内のAchEは細胞結合型と溶解型があり，10％は溶解型として細胞内外に存在している。その両者の比が疾患により異なる可能性や髄液中の各種proteinaseの関与の可能性も考えられ，神経・精神疾患とAchE活性の関係について検討する際にはAchE, PchEのKinetic studyを実施することが必要であると思われた。

終わりに髄液を提供していただいた野垣病院肛門外科諸先生方に深謝致します。

文献：

1. Johston, MV, et al (1979) Proc Natl Acad Sci USA 76: 5392−5396
2. White house PJ. et al (1981) Ann. Neurol 10: 122−126
3. F. Fonnum (1975) Research methods in neurochemistry ED3, 253−275
4. Tune L, et al (1985) Ann Neurol 17: 46−48
5. H. Soininen, et al (1981) Acta neurol Scandinav. 64 217−224
6. Stephen I. Deutsch, et al (1983) Biological Psychiatry 18.12: 1363−1373
7. Harvey S. et al (1984) Arch Neurol 41 756−757
8. Perry, E.K (1980) Age and aging 9, 1−8
9. Ellman G.L. et al (1961) Biochemical pharmacology 7, 88−95

177. ミエリン形成不全マウス（Jimpy）脳ミクロソームの脂肪酸伸長及び縮合

竹下正純・斉藤寿仁・吉田　敏　　（大分医大・生化）

〔要　約〕

ミエリン形成不全マウス(Jimpy)の脳ミクロソームについて長鎖及び極長鎖脂肪酸伸長及び縮合反応について検討した。種々のAcyl-CoAを基質として脂肪酸伸長反応を行うと、加えた基質による反応の外に、主として16:0→18:0及び20:4→22:4の反応が観察される。縮合反応の時間経過は20:0-CoAを基質とした場合最初の20分はほぼ直線的に上昇するが、30分以後は下降傾向を示した。内在性基質による縮合反応は下降しなかった。外部基質による反応を内在性基質によるものから分別するために［^{14}C］-16:0-CoAとmalonyl-CoAによる伸長反応及び縮合反応について調べた。生成18:0はラジオガスクロで基質からよく分かれた。また縮合生成物(2-heptadecanone)もヘキサン層に分別できた。脂肪酸伸長反応では、外部基質による活性はいずれもjimpyで低下するが、16:0では差が少なく、より長い18:0,18:1及び20:0の伸長活性はjimpyで著しく低下していた。縮合反応も同様に16:0を基質とした場合は差が少なく、より長鎖の脂肪酸で大きな差を示した。内部基質による反応は伸長、縮合反応共差が少なかった。以上の結果からミエリン形成に特徴的な極長鎖脂肪酸の伸長活性がjimpyにおいて強く低下し、この低下は縮合活性の低下を反映しているものと考えられる。

Key word：
Jimpy mouse, fatty acid elongation, condesation.

ミエリン形成不全マウス(jimpy)はオリゴデンドログリアの欠失により中枢神経系のミエリンの欠損を来す遺伝性疾患モデル動物である。このマウスにおいて脳ミクロソームの長鎖及び極長脂肪酸伸長酵素系の活性低下をみることはMuradら(1)その他によって比較的早くから認められていた。しかしどの酵素活性が低下しているかなどその内容に関しては知られていない。我々は脂肪酸伸長反応系の解析のため、最初の段階の縮合反応について解析してきたが、今回はjimpyマウスの脂肪酸伸長活性を検討すると共に縮合反応についても検索し、jimpyにおいてこの活性が低下していることを見出したので報告する。

〔実験方法〕

（ａ）Jimpyマウスは生後20日前後で震えのはっきりでたものを用いた。また同日令の正常マウスを対照として用いた。脳ミクロソームの調整は前に報告した方法によって行った(2)。

（ｂ）［^{14}C］-Palmytoyl-CoA伸長反応の組成は、0.1M K-Pi,pH7.4, 50μM malonyl-CoA, 50μM NADPH, 50μM palmitoyl-CoA, 1-［^{14}C］-palmitoyl-CoA 0.1μCi,bovine serum albumin 50μg, microsome 0.5～1mg, 全量0.5mlとし、37℃ 30分incubateした。ラジオガスクロクロマトグラフィーによる測定は、前に報告した方法(2,3)によって行った。縮合反応の場合はNADPHを除いた反応系を用いた。縮合反応生成物はケン化処理、H_3PO_4で中和した後hexaneで抽出し、脂肪酸部分をTMTFTH(trimethyl trifluorotoryl ammonium hydroxide)で除去し、Hexane層をさらにdigitonineで振った後N_2気流中でevaporateし測定にかけた。

（c）[^{14}C]-Malonyl-CoAのacyl-CoAへの取り込みによる脂肪酸伸長活性の測定は前に発表した方法で行い(2)、縮合活性はNADPHを除いた系で反応後前記の方法で抽出測定した。

〔結果と考察〕

20:0-CoAを外部基質として[^{14}C]-malonyl-CoAの取り込みによる脂肪酸伸長及び縮合反応のラジオガスクロストグラムをFig.1.に示した。ここでは内在基質による反応を強調するためにATP及び$MgCl_2$を加えてある。Elongationでは外部基質からの22:0,24:0の他に内在基質から18:0,22:4の生成を認めた。

Condensationでも20:0からの縮合生成物21:0-2-one及び内在基質から17:0-2-one,21:4-2-oneの生成を認めた。

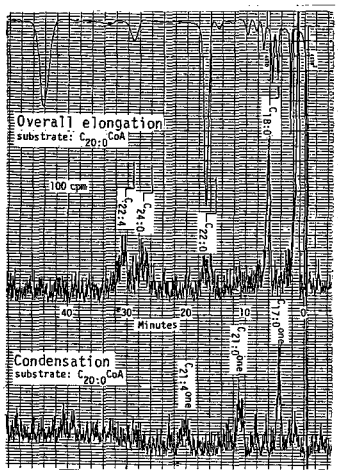


Fig. 1. Radio-GLC of elongation (upper) and condensation (lower) products. [^{14}C]-Malonyl-CoA incorporation into 20:0-CoA was detected.

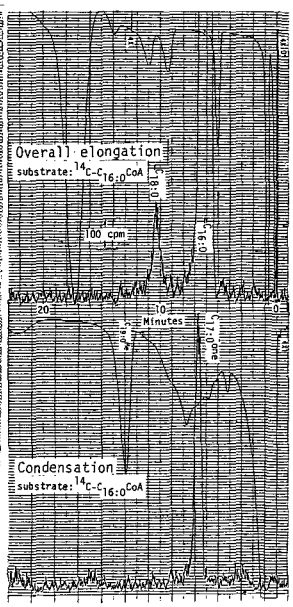


Fig. 2. Elongation and condensation of [^{14}C]-palmitoyl-CoA detected by radio-GLC.

16:0-CoAを基質とした場合は外部と内在性基質による反応生成物が区別出来ない。外部基質による反応のみを見るために1-[^{14}C]-palmitoyl-CoAを基質としてmalonyl-CoAとの反応を測定した。Fig.2.のごとくelongationの生成物18:0の放射活性は基質から充分に分離できた。またcondensationによる17:0-2-oneもヘキサン層から測定できた。

縮合反応の時間的経過は、20:0-CoAを基質とした場合最初の20分程度直線的に上昇するが以後遅くなり30分以降は下降を示した。これに対して内在性基質による縮合反応は30分前後で反応は遅くなるが下降することはなかった。他方1-[^{14}C]-palmitoyl-CoAを基質とした場合は30分以後反応は低下傾向を示したが下降は認められず、内在性基質による17:0-2-one生成と似た傾向を示した。

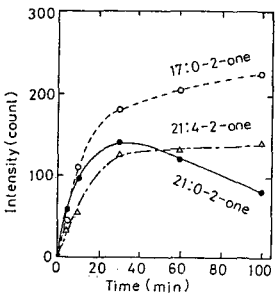


Fig. 3. Condensation of 20:0-CoA as a function of time. 17:0-2-one and 21:4-2-one are the products from endogenous substrates.

種々の飽和、モノ不飽和脂肪酸を基礎とする脂肪酸伸長及び縮合反応をjimpyと正常マウスについて比較した(Table.1)。同時に測定された内在性基質による活性も合わせて示した。脂肪酸伸長反応では外から加えた基質による活性は調べた全ての脂肪酸についてjimpyマウスで低下していたがその程度は[^{14}C]-16:0-CoA elongationで差が少なく、18:0-CoA,

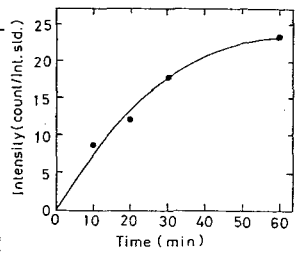


Fig. 4. Condensation of exogenous [^{14}C]-palmitoyl-CoA as a function of time.

18:1-CoA及び20:0-CoA elongationでは、それぞれ17.4, 39.8, 17.6（22:0の生成）30.0%(24:0の生成)であり、jimpyマウスで著しく低下していた。縮合反応も同様に[^{14}C]-16:0-CoA及び内在性基質で差が少なく、18:0-CoA,18:1-CoA及び20:0-CoA condensationでそれぞれ50.2, 33.4及び39.0%であり、jimpyマウスで対照の1/2～1/3の活性であった。今回測定したjimpyマウスにおけるelongation活性は18:0-CoA,18:1-CoAを基質とした場合及び20:0-CoA→22:0でMurad & Kishimoto(1)とほぼ同率の減少であった。16:0-CoA,22:0-CoAでは減少程度はやや異なるが、Murad & Kishimoto(1)らは16:0-CoAでは[^{14}C]-malonyl-CoAの取り込みで測定しており、22:0-CoAでは直接外から加えた基質で測定しているので、ここでの差は反応系が異なるため考えられる。脂肪酸伸長反応の中で18:0以後の飽和及びモノ不飽和脂肪酸伸長反応はミエリン形成に特徴的なcerebrosideの主な構成脂肪酸の合成反応と考えられている。これに対して、16:0及び20:4の伸長反応は細胞膜に一般的なリン脂質などの構成脂肪酸の合成反応と見ることができる。従ってTable.1.の結果は外部基質と内在性基質による反応性の差というよりは、細胞膜に一般的な脂肪酸合成のための16:0→18:0及び20:4→22:4とミエリン形成に特徴的な極長鎖飽和及びモノ不飽和脂肪酸伸長反応の差ということができよう。更に今回の実験から脂肪酸伸長反応の低下は対応する脂肪酸縮合反応の低下を反映している可能性が考えられる。

Table 1. Activities of microsomal fatty acid elongation and condensation in brain of jimpy and normal mice.

Substrate	Product	Overall fatty acid elongation Normal (nmol/hr/mg prot.)	Jimpy (nmol/hr/mg prot.)	% of normal	Endogenous	Normal (nmol/hr/mg prot.)	Jimpy (nmol/hr/mg prot.)	% of normal
$^{14}C_{16:0}$CoA	$C_{18:0}$	2.82	1.93	68.4				
$C_{18:0}$CoA	$C_{20:0}$	0.23	0.04	17.4	$C_{18:0}$	0.07	0.05	71.4
					$C_{22:4}$	0.15	0.09	60.0
$C_{18:1}$CoA	$C_{20:1}$	0.91	0.36	39.8	$C_{18:0}$	0.44	0.35	79.5
					$C_{22:4}$	0.47	0.44	93.6
$C_{20:0}$CoA	$C_{22:0}$	0,17	0.03	17.6	$C_{18:0}$	0.13	0.11	84.6
	$C_{24:0}$	0.10	0.03	30.0	$C_{22:4}$	0.27	0.19	70.4
		Condensation (cpm/hr/mg prot.)		%		(cpm/hr/mg prot.)		%
$^{14}C_{16:0}$CoA	$C_{17:0}$-2-one	571	434	76.0				
$C_{18:0}$CoA	$C_{19:0}$-2-one	532	267	50.2				
$C_{18:1}$CoA	$C_{19:1}$-2-one	305	102	33.4				
$C_{20:0}$CoA	$C_{21:0}$-2-one	592	231	39.0	$C_{17:0}$-2-one	230	175	76.1
					$C_{21:4}$-2-one	182	134	73.6

〔文献〕

1) Murad.S.,and Kishimoto,Y.(1978) Arch.Biochem.Biophys. 185, 300-306

2) 竹下正純,吉田敏(1983) 神経化学 22, 405-407

3) Yoshida,S.and Takeshita,M.(1984) Biochim.Biophys.Acta. 795, 137-146

178. 黄疸ラット小脳におけるニューロンとグリア細胞マーカー蛋白および環状ヌクレオチドの挙動

青野幸子・加藤兼房*・加藤泰治**・佐藤　浩
田中　亮**・柏俣重夫
(愛知県コロニー研・周生期，生化*，名古屋市大・医・生化**)

〔要　約〕

遺伝的に高ビリルビン血症を示す Gunn ラットの小脳を用いてビリルビンの神経およびグリア細胞への影響を調べる目的で、神経細胞の指標タンパクとして γ-enolase、グリア細胞の指標タンパクとして S-100b,α-enolase を選び、酵素免疫測定法によってそれぞれのタンパクの量的日齢変化を検討した。γ-enolaseは 15,30日齢で対照のヘテロ接合体 (j+) に比べてホモ接合体 (jj) で減少したが、8日齢では jj,j+間で差はみられなかった。S-100bについては既に 8日齢で有意の差がみられ、8,15,30日齢とも jj で約 2倍増加していた。α-enolaseについては S-100b ほどの差はみられなかったが、やはり 15,30日齢の jjで増加していた。これらの結果から、ビリルビンの細胞毒性は神経細胞において著しく、一方グリア細胞ではその毒性が弱いことが明らかとなった。またプルキンエ細胞の機能と密接な関連のある cGMP について日齢をおって量的変動を調べたところ 30 日齢の jj 小脳では j+ に比べて著しい減少がみられた。グリア細胞の増殖あるいは分化に関連のある cAMP および glia maturation factor (GMF)についても検討を行ったところ、jj,j+ 間で著明な差はみられなかった。

Key word : Gunn rat, Neuronal and glial markers, cyclic nucleotides

【序論】

高ビリルビン血症を示す Gunn ラットホモ接合体 (jj) では、ビリルビンが原因で小脳低形成が誘発される (17,18,21,23)。低形成のおきた小脳では SDS電気泳動上、分子量 250K のタンパク (GR-250) の激減および分子量 50Kのタンパク (GR-50)の著増がみられる (1,5)。GR-250はプルキンエ細胞に特徴的とされる P400 タンパク(13)であることが明らかとなっており (1)、その減少はプルキンエ細胞の変性、消失という形態学的変化 (20) とよく一致する。一方 GR-50はグリア細胞の指標タンパクとして知られている glial fibrillary acidic protein (GFAP) (4) として同定されており (2)、また免疫組織化学的手法により jj 小脳では抗 GFAP 抗血清による反応生成物が対照のヘテロ接合体 (j+) に比べて多いことも明らかとなっている(2,15)。これらの事実によって神経細胞とグリア細胞ではビリルビン毒性の発現様式に大きな違いがあることが示唆された。SDS電気泳動法では定量化が困難であるので、神経細胞およびグリア細胞に対するビリルビンの影響をより詳細に検討するために、前者の指標タンパクとして γ-enolase (19),後者の指標として S-100b (3) と α-enolase (19) の量を酵素免疫測定法を用いて測定した。また cGMP 代射系はプルキンエ細胞の機能と密接な関係をもつことが報告されているので (14,16)、ビリルビンによるそれらへの影響を明らかにするための第一段階として、Gunnラット小脳の cGMP 量を日齢を追って測定した。一方培養系では GFAP の増加に cAMP が関与しているという報告がある(22)ので、GFAPの増加がみられる Gunn ラット小脳で cAMP 量を測定した。また培養グリア細胞は glia maturation factor (GMF) によってその発達が促進されること

が報告されている（11）ので、生後15日齢のGunnラット小脳を用いてGMF活性について予備的な検討を加えた。

【方法】

（動物）小脳は生後8,15,30日齢のSD系Gunnラット（SDGR）（6）jjおよび同腹のj+より得た。GMF活性測定では15日齢のjj 8頭分、j+ 5頭分をそれぞれ1試料とした。

（酵素免疫測定法）採取した小脳を、9倍量の50 mM sodium phosphate buffer (pH 7.0) - 5 mM $MgCl_2$ でホモゲナイズし、15,000 x gで20分遠心した後その上清を試料とした。α-, γ-enolase量はKatoら（7）、S-100b量はKimuraら（10）の方法に従って測定した。

（cAMP,cGMP量の測定）小脳は液体窒素で凍結したラットより採取した。採取した小脳から過塩素酸でcAMP,cGMPを抽出し、Steinnerら（24）のradio-immunoassay法に従い、cAMP,cGMP-assay kit（Yamasa）を用いて測定した。

（GMF活性）数頭分の小脳を9倍量の20 mM Tris-HCl buffer (pH 7.4) でホモゲナイズし15,000 x gで2時間遠心した後その上清を試料とした。培養グリア芽細胞を用いてbioassayを行い ^{3}H-thymidineのとりこみによりGMF活性を測定した（9）。

【結果および考察】

神経細胞の標識タンパクであるγ-enolase（19）は小脳では生後著しく増加することが報告されており（8）、j+でも同様の結果が得られた（table 1）。jjではその増加は少なく15日齢でjj,j+間の差が明らかとなった（table 1）。γ-enolaseは小脳組織ではgranule細胞をはじめとするほとんどの神経細胞に存在するが15日齢以後のjjでの減少が著しいことを考えるとプルキンエ細胞ばかりではなくgranule細胞もかなりビリルビンによって障害されているといえよう。グリア細胞の標識タンパクであるS-100bタンパクは単位タンパク量当たり8日齢で既にjj,j+間で差がみられ、8,15,30日齢でいずれもjjの方がj+に比べて約2倍増加していた（table 2）。この結果は神経細胞に比べてグリア細胞はビリルビンによる障害を受けにくいことを示唆しており以前報告したGR-50あるいはGFAPの結果（1,2,5）ともよく一致する。しかし、jjの小脳当たりのS-100b量は8日齢ではj+と差は無いものの15日齢ではj+の約60％、30日齢では約35％にすぎず（table 2）、神経細胞ほどではないがグリア

Table 1. Contents of γ-enolase in homozygous (jj) and heterozygous (j+) Gunn rat cerebella

days	pmol/mg of protein		pmol/cerebellum	
	jj	j+	jj	j+
8	11.3 ± 1.2 (6)	10.2 ± 1.2 (6)	13.0 ± 4.1 (6)	14.8 ± 3.1 (6)
15	12.8 ± 2.4 (5)	18.6 ± 2.0 (6)*	15.4 ± 3.8 (5)	76.2 ± 12.2 (6)**
30	47.6 ± 5.7 (8)	70.3 ± 9.1 (6)**	47.0 ± 15.4 (8)	402.4 ± 44.0 (6)**

Mean ± S.D. with the number of animals in parenthesis.
* p<0.005; ** p<0.001.

Table 2. Contents of S-100b protein in homozygous (jj) and heterozygous (j+) Gunn rat cerebella

days	μg/mg of protein		μg/cerebellum	
	jj	j+	jj	j+
8	0.7 ± 0.1 (6)	0.4 ± 0.04 (6)**	0.7 ± 0.3 (6)	0.6 ± 0.1 (6)
15	1.2 ± 0.04 (5)	0.6 ± 0.1 (6)**	1.5 ± 0.2 (5)	2.4 ± 0.5 (6)*
30	5.8 ± 0.7 (8)	2.8 ± 0.4 (6)**	5.7 ± 1.8 (8)	16.0 ± 2.4 (6)**

Mean ± S.D. with the number of animals in parenthesis.
* p<0.005; ** p<0.001.

細胞もビリルビンによって障害を受けている可能性のあることが示唆された。正常小脳では α-enolase は日齢変化のほとんどないタンパクであるが (8)、jj では 8日齢以後若干増加がみられ、ほぼ S-100b と同様であった。cGMP量は、プルキンエ細胞の成熟と並行しながら、ともに増加することが報告されている (25) が、j+小脳でそれに一致する結果を得た (table 3)。15日齢以後 j+ 小脳ではプルキンエ細胞の樹状突起が著しく発達するのに対し、jj小脳では細胞の消失がありcGMP量の著しい減少はそれを裏づけるものと考えられる (table 3)。脳重当たりでは 15 日以前に既に、jj小脳で cGMP 量の減少がおきており (table 3) この減少がプルキンエ細胞の障害による二次的なものかビリルビンによって cGMP 生成あるいは分解に異常が生じたためにおきたものかは現時点では明らかではない。一方 cAMP 量は jj小脳で若干増加していたが脳重当たりでは各日齢とも jj, j+間で大きな差はみられなかった (table 4)。この結果は cGMP 代謝系はビリルビンによって大きな影響を受けるが cAMP代謝系は障害を受けにくいことを示唆していると思われる。またこれはグリア細胞が、比較的ビリルビンによる障害性が低いことの背景の一部の説明になるかもしれない。

Table 3. Contents of cGMP in homozygous (jj) and heterozygous (j+) Gunn rat cerebella

days	pmol/mg of protein		pmol/g wet of weight	
	jj	j+	jj	j+
8	0.2 ± 0.1 (6)	0.2 ± 0.03 (6)	10.1 ± 4.9 (6)	13.1 ± 1.1 (6)
15	0.4 ± 0.2 (6)	0.5 ± 0.1 (5)	19.9 ± 8.6 (6)	41.8 ± 8.3 (5)*
30	0.8 ± 0.2 (6)	4.2 ± 1.4 (6)**	46.1 ± 10.2 (6)	392.4 ± 123.4 (6)**

Mean ± S.D. with the number of animals in parenthesis.
* p<0.005, ** p<0.001.

Table 4. Contents of cAMP in homozygous (jj) and heterozygous (j+) Gunn rat cerebella

days	pmol/mg of protein		pmol/g of wet weight	
	jj	j+	jj	j+
8	7.0 ± 1.1 (6)	6.6 ± 0.8 (6)	355.1 ± 49.0 (6)	361.8 ± 48.0 (6)
15	9.2 ± 1.0 (5)	7.6 ± 0.6 (6)*	441.1 ± 49.9 (5)	596.2 ± 58.4 (6)**
30	13.5 ± 1.8 (6)	8.3 ± 1.2 (6)***	835.1 ± 139.2 (6)	793.8 ± 129.6 (6)

Mean ± S.D. with the number of animals in parenthesis.
* p<0.01, ** p<0.005; *** p<0.001.

グリア細胞の増殖あるいは分化は cAMP だけではなく GMFによっても影響されることが報告されているので (11)、Gunnラット小脳で予備的な検討を行ったところ、jj、j+とも ^{3}H-thymidine の basal uptake level からみて約 2倍の GMF活性があったが両者の差は明らかではなかった。以上これらの結果は、ビリルビン細胞毒性は一理由は必ずしも明らかでないが一神経細胞において強く発現され、グリア細胞では比較的軽度であること、および jj 小脳では神経細胞障害に伴い gliocytosisの生じていることを生化学的に支持するものと考えられる。

(1) Aono, S., Sato, H., Semba, R., and Kashiwamata, S. (1983) Neurochem. Res. 8, 743-756. (2) Aono, S., Sato, H., Semba, R., Kashiwamata, S., and Eng, L. F. (1985) J. Neurochem. 44, 1877-1884. (3) Cicero, T. J. Cowan, W. M., Moore, B. W., and Suntzeff, V. (1970) Brain Res. 18, 25-34. (4) Eng, L. F., Vanderhaeghen J. J., Bignami, A., and Gerstl, B. (1971) Brain Res 28, 351-354. (5) Kashiwamata, S., Aono, S., and Semba, R. K. (1980) Experientia 36, 1143-1144. (6) Kashiwamata, S., Keino, H., Sato, H., Aono, S., Semba, R., and Aoki, E. (1985) Proc. JAAMHD 1, 28-34. (7) Kato, K., Suzuki, F., and Semba, R. (1981) J. Neurochem. 37, 998-1005. (8) Kato, K., Suzuki, F., Watanabe, T., Semba, R., and Keino, H. (1984) Neurochem. Int. 6, 51-54. (9) Kato, T., Fukui, Y., Turriff, D. E., Nakagawa, S., Lim, R., Arnason, B. G. W., and Tanaka, R. (1981) Brain Res. 212, 393-402. (10) Kimura, S., Kato, K., Semba, R., and Isobe, T. (1984) Neurochem. Int. 6, 513-518. (11) Lim, R., Mitsunobu, K., and Li, W. K. P. (1973) Exp. Cell Res. 79, 243-246. (12) Ludwin, S. K., Kosek, J. C., and Eng. L. F. (1976) J. Comp. Neurol. 165, 197-208. (13) Mallet, J., Huchet, M., Pougeois, R., and Changeux, J.-P. (1976) Brain Res. 103, 291-312. (14) Mao, C. C., Guidotti, A., and Landis, S. (1975) Brain Res. 90, 335-339. (15) Mikoshiba, K., Kohsaka, S., Takamatsu, K., and Tsukada, Y. (1980) J. Neurochem. 35, 1309-1318. (16) Nairn, A. C. and Greengard, P. (1983) Fed. Proc. 42, 3107-3113. (17) Sato, H., Semba, R. K., and Kashiwamata, S. (1977) Biol. Neonate 32, 158-165. (18) Sawasaki, Y., Yamada, N., and Nakajima, H. (1976) J. Neurochem. 27, 577-583. (19) Schmechel, D. E., Marangos, P. J., Zis, A. P., Brightman, M., and Goodwin, F. K. (1978) Science 199, 313-315. (20) Schmechel, D. E., Brightman, M. W., and Marangos, P. J. (1980) Brain Res. 190, 195-214. (21) Schutta, H. S. and Johnson, L. (1967) J. Neuropath. Exp. Neurol. 26, 377-396. (22) Sensenbrenner, M., Devilliers, G., Bock, E., and Porte, A. (1980) Differentiation 17, 51-61. (23) Sisson, T. R. C., Goldberg, S., and Slaven, B. (1974) Pediat. Res. 8, 647-651. (24) Steiner, A. L., Parker, C., and Kipnis, D. M. (1972) J. Biol. Chem. 247, 1106-1113. (25) Steiner, A. L., Ferrendelli, J. A., and Kipnis, D. M. (1972) J. Biol. Chem. 247, 1121-1124.

179. 家族性アミロイドポリニューロパチーの発症機構の生化学的解明と早期診断法の確立

松尾壽之・寒川賢治・中里雅光*・栗原照幸*
松倉　茂*・俵　　哲**
（宮崎医大・第二生化，第三内科*，山鹿市民病院・内科**）

〔要　約〕

筆者らは，1983年より家族性アミロイドポリニューロパチー（FAP）の発症機構を解明するために，生化学的研究を進めてきた。FAP患者からアミロイド線維蛋白を分離精製し，その主成分はプレアルブミンの30番目のバリンがメチオニンへ置換した異常プレアルブミンであることを報告した。この異常プレアルブミンは，他の家系の各種臓器から抽出したアミロイド線維にも共通して見い出されている。さらに，この異常プレアルブミンが，FAP患者血清中に特異的に存在していることを明らかにした。本邦のFAPは血清中の $Val^{30} \rightarrow Met$ 置換を有する異常プレアルブミンが，組織に沈着して発症すると考えられる。このアミノ酸置換は，Val codon の5′側の1塩基置換に基因しており，本症の遺伝の本質はプレアルブミン遺伝子上の分子異常によることが明らかにされた。

FAPの発症は30歳前後であり，従来の診断法として発症後の生検しかなかったために，早期発見や遺伝相談の必要性から非侵襲的で確実な早期診断法の開発が永く望まれていた。筆者らはこの問題を解決するために，以上の生化学的知見をもとに血清異常プレアルブミンに対する特異的ラジオイムノアッセイを開発した。

Key word：Familial Amyloidotic Polyneuropathy
Prealbumin Variant, Early Diagnosis

1. アミロイド線維蛋白の構造決定

家族性アミロイドポリニューロパチー（以下FAP）のアミロイド線維蛋白は，免疫学的にプレアルブミンと関係することが知られていた。しかし本線維蛋白は難溶性であり，精製および酵素消化もきわめて困難であり，N末端からの一次構造解析は不可能であった。著者らは，正常プレアルブミンとのペプチドマップの比較が，本蛋白の一次構造決定に有用であることを見い出した。そして，本邦FAPのアミロイド線維蛋白の主成分は1アミノ酸置換を有する異常プレアルブミンであることを明らかにした。

典型的なFAPの臨床像を示し，全経過10年で死亡した症例の剖検腎臓と甲状腺より，生食水・水抽出法によりアミロイドを抽出した。アミロイドは可溶化後，Sephadex G-100でゲル ろ過を行った。分子量14,000の位置に，アミロイドに特異的なピークを認めた。このピークはSDS電気泳動上，単一バンドであり，従来この段階で精製は充分なものとして構造解析が進められていた。しかし，逆相高速液体クロマトグラフィー（HPLC）で分析すると，非常に多くのピークを含み，ゲル ろ過だけでは精製は不充分であることが明らかにされた。そこでHPLCによる再クロマトにより完全に単一ピークとして分離精製した後，構造解析を行った(5)。

精製された線維蛋白のアミノ酸組成は正常プレアルブミンよりMetが1残基多い（文献5を参照）。そこでMetを特異的に切断するブロムシアン分解を行い，得られたフラグメントを逆相HPLCで比較すると，線維蛋白からは正常プレアルブミンには存在しないピークCB-IIが得られた（文献5を参照）。このペプチドのアミノ酸組成は[14-30]に一致し，しかも30番目のValはMetに置換している。この知見はさらにエ

ドマン分解により確認された。

アミロイド線維蛋白のN末端のブロムシアンペプチドとして，4個のフラグメントが得られた（文献5のFig. 2)。これは蛋白のGly^{1}, Pro^{2}, Thr^{3} が順次欠如している[2−13]，[3−13]，[4−13]と[1−13]の4種類のフラグメントが存在しているためである。ブロムシアンペプチドの解析によりアミロイド線維蛋白の[1−30]のアミノ酸配列は $Val^{30}\longrightarrow$ Met を除きプレアルブミンと一致することが明らかにされた。[31−127]のアミノ酸配列は正常プレアルブミンとのトリプシンペプチドマップの比較により明らかにされた。アミロイド線維蛋白は酵素消化に抵抗性を示し，通常の条件ではトリプシン消化を受けない。そこで70%ギ酸中で変性した。本法により線維蛋白スムースなトリプシン消化が可能になった。

両蛋白のトリプシンペプチドマップを比較すると，線維蛋白からは新たなピークT4′が認めれ，正常プレアルブミンからのT4は消失していた（文献5を参照)。T4は配列決定により[22−34]であることが判明した。線維蛋白からのT4′は，同様にして Met^{30} を含む[22−34]であった。すべてのトリプシンペプチドの構造決定により30番目以外にはアミノ酸置換がないことが明らかにされた。

以上より本邦FAPの線維蛋白は，正常プレアルブミンの30番目のValがMetへ置換した異常プレアルブミンよりなることが明確にされた。さらに本蛋白は[1−127]，[2−127]，[3−127]，[4−127]の4種類の異常プレアルブミンからなるN末端のmicroheterogeneityが存在している。

2. 血中異常プレアルブミンの証明

アミロイド線維を形成している異常プレアルブミンの由来を明らかにするために，FAP患者血清プレアルブミンの一次構造解析を行った。血清よりアフィニティークロマトグラフィーとイオン交換クロマトグラフィーを用いプレアルブミンを分離精製した。正常プレアルブミンとのトリプシンペプチドマップの比較をもとに，構造解析はなされた(1)。

患者血清プレアルブミンからは正常プレアルブミンには存在しないピークT4′が認められた。T4′は $Val^{30}\longrightarrow$Met異常プレアルブミンの[22−34]であった。患者血清プレアルブミンからは線維蛋白と異なり，正常プレアルブミン由来のピークT4も得られた。従って，FAP患者血清プレアルブミンは正常と異常のプレアルブミンから構成されている。本邦FAPは血清中の $Val^{30}\longrightarrow$Met異常プレアルブミンが，組織に沈着して発症すると考えられる。

3. ラジオイムノアッセイによる血清早期診断法

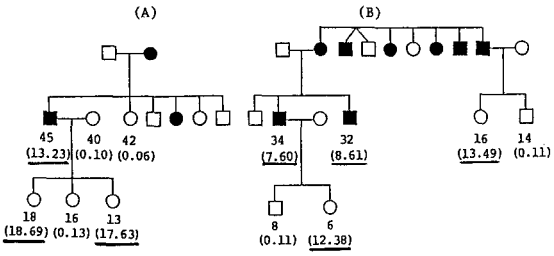
従来，生検によってしか診断法がなかった本症例に対して，血清を用いた簡便かつ非侵襲的で確実な診断法を開発した。正常と異常のプレアルブミンの構造上の相違は，わずか1個のアミノ酸置換であり，異常プレアルブミンに対する抗体を作製しても両者の分別定量は不可能である。異常プレアルブミンは，Met^{30} であることに着目し，ブロムシアン分解，トリプシン消化で異常プレアルブミンのみから得られる[22−30]のノナペプチドに対する高感度のRIAを作製した。血清5μlをブロムシアン分解，トリプシン消化後，測定した(2)。

正常人50例（2〜70才）の異常プレアルブミン濃度は0.08〜0.12 mg/dl（平均0.10±0.02

mg/dl)であった。これはRIAのbackgroundであり，実際には正常ヒト血清中には異常プレアルブミンは存在していない。原発性・続発性アミロイドーシスの症例および遺伝していないFAP患者同胞例(20人)にも，血中異常プレアルブミンは認められなかった。

生検により診断が確定されたFAP患者18例では，全例に高濃度(6.46～12.37 mg/dl)の異常プレアルブミンが検出された。異常プレアルブミンの存在はFAP患者に特異的であり，本症の血清診断法となりうる(3)。

FAPは20～40歳で発症する。本法の早期診断法としての適応を検討するために，FAP患者の子供12例(6～18才)の血清異常プレアルブミンを測定した。半数の6例には認められなかったが，他の6例では12.38～18.69 mg/dlの異常プレアルブミンがすでに存在していた(4)。図はFAP 2家系内の異常プレアルブミン濃度と年令を表わしている。患者の子供における異常プレアルブミンの存在の割合は，本症が常染色体優性遺伝であることに一致している。



RIAによる血清診断法により，従来困難であったFAPの早期診断が可能となり，早期治療への道が開けた。さらに本法は，FAPに対する新たな治療法の開発のパラメーターになるとともに，本疾患が多発している地域でのスクリーニングテストとしても有用である。本法は諸外国のFAPにも広く適用でき，今後の本症の診断，治療，予防に有用である。

謝辞：血清試料の提供に協力いただいた熊本大学第1内科荒木淑郎教授，広島大学第3内科鬼頭昭三教授に深く感謝致します。

文　献

1) Nakazato, M., Kangawa, K. et al. (1984)
Biochem. Biophys. Res. Commun. 122, 712-718

2) Nakazato, M., Kangawa, K. et al. (1984)
Biochem. Biophys. Res. Commun. 122, 719-725

3) Nakazato, M., Kurihara, T., Kangawa, K. and Matsuo, H. (1984)
Lancet ii, 1274-1275

4) Nakazato, M., Kurihara, T., Kangawa, K. and Matsuo, H. (1985)
Lancet i, 99

5) Tawara, S., Nakazato, M. et al. (1983)
Biochem. Biophys. Res. Commun. 116, 880-888

180. β－フェニルエチルアミンによる常同行動変化とラット中枢各部位のモノアミンおよび代謝産物の変化

石橋賢治・松本　孝・平野　誠・平野　均
中村　薫・中原辰雄*・内村英幸
（国立肥前療養所，九州大・理・化学*）

〔要　約〕

β-フェニルエチルアミン(PEA)をラットに反復投与(50 mg/kg, i.p., 28日間)することによって常同行動に対する過敏性獲得(behavioral sensitization)の現象を確認した。この常同行動の変化と脳内モノアミンとの関連をみるために、高感度のHPLC-ECD法を用いた同時測定法によって、常同行動に対する過敏性が形成されたラットの各モノアミン関連物質を脳部位別に測定した。その結果、PEA反復投与群のHVAレベルが前頭前野内側部・外側部、前部帯状回皮質、扁桃核及び尾状核－被殻で急性投与群に比べて有意に増加したことから生化学的にもDAニューロン系のsensitizationがおこつていることが推測された。さらに、広範な部位の5-HIAA及び中脳皮質系を中心としたNEレベルの変化も認められ、かつ投与期間依存的な傾向であった。PEA反復投与による過敏性獲得に対応して、DAニューロン系のみならず5-HT及びNEニューロン系も活動性が亢進している可能性が示唆された。測定した他のモノアミンおよび代謝産物にはほとんど変化がみられなかったため、PEA単回投与後の経時変化を検討した。その結果、15分時と早い時点でDOPACの減少、3-MTの増加、中脳皮質系でのNEの減少がみられた。DOPACと3-MTの変化はDAのreuptake阻害作用、NEの変化はNE release促進のためと考えられた。

Key word：　ß-Phenylethylamine-induced stereotypy,　Sensitization,　HVA

β-フェニルエチルアミン(PEA)は人を含む哺乳動物に微量に存在し、アンフェタミンと類似した化学構造と薬理作用を有する。慢性の妄想型分裂病患者の24時間尿中PEA排泄量が非妄想型及び健常者に比して高値を示す(8)、あるいは慢性分裂病の中にはPEAを基質とする血小板MAO活性が低下している群がある(6)などの臨床生化学的知見があり、PEAの利用障害と慢性分裂病の病態との関連性が示唆されている。PEAを慢性的に反復投与しても常同行動出現に対する耐性は生じず(5)，むしろ常同行動が増強され過敏性が形成される(1,2)。PEAは神経伝達物質或いは調節因子と考えられているものの、脳内モノアミン系へ作用の詳細は明らかにされていない。今回、PEAの急性および慢性反復投与時の常同行動変化と、脳内諸部位における各モノアミンとその代謝産物の変化をHPLC-ECDを用いた同時定量法によって測定した。さらにPEA単回投与後の経時変化も各部位について検討した。

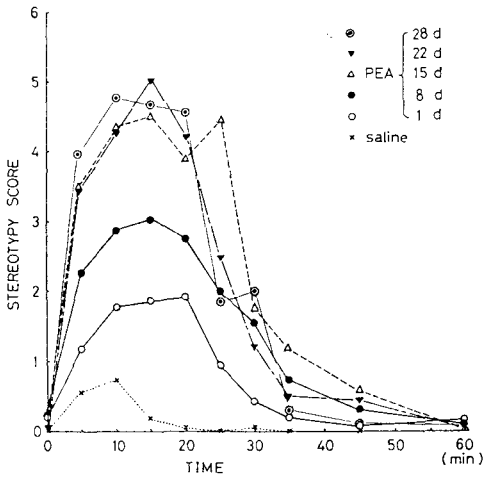


Fig. 1. Effect of acute and repeated ß-phenylethylamine on stereotyped behavior in rat.

《方法》Wistar系雄性ラット(体重 250-280 g)を用いて次の２つの実験をおこなつた。①PEA反復投与による常同行動の変化および脳内モノアミンとその代謝産物の測定：PEA(50 mg/kg, i.p.)を28日間投与したものを慢性反復投与群(R)とし、同様にsalineを投与し、28日のみPEA(50 mg/kg, i.p.)を投与し

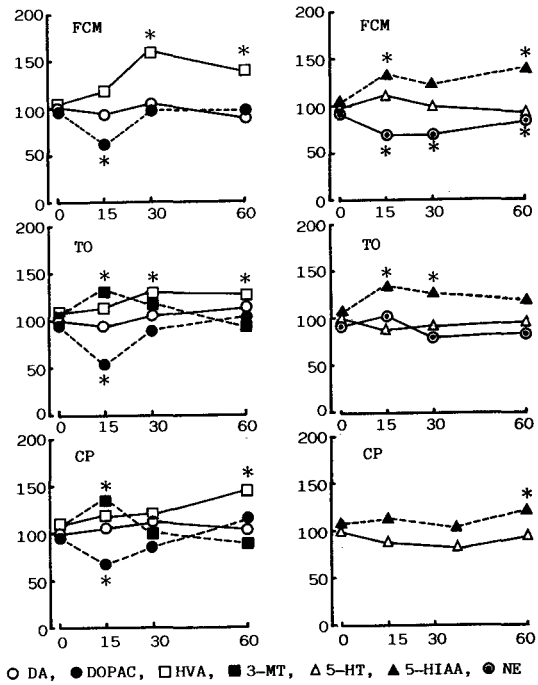
たものを急性投与群(A)とした。対照群(C)にはsalineのみ28日間投与した。行動評価はBorisonらの評価尺度(1)に準じ、投与後5分間隔で1時間記録し、評価時以外は群居飼育した。各群とも最終投与後1時間目に断頭した。②PEA単回投与による脳内モノアミンとその代謝産物の経時変化：PEA(50 mg/kg, i.p.)を1回投与し、投与後15分、30分、60分で断頭、対照群としてsalineを同様に投与し、断頭も同様に行った。断頭後速やかに脳を摘出、-80℃で凍結後クリオスタット(-12℃)内で300μmの連続切片を作製した。各切片は-20℃のプレート上でKönigとKlippel(4)のアトラスに従って各部位をマイクロナイフで切り出した。切り出し部位は、前頭前野極部(FCP)，前頭前野内側部(FCM)，前頭前野外側部(FCL)前部帯状回皮質(ACC)，嗅結節(TO)，側坐核(AC)，中隔(SP)，扁桃核(AM)，尾状核-被殻(CP)の9部位である。切り出した各部位を0.1Mギ酸でホモジナイズ後遠心(17,700×g，10分，5℃)し、上澄をHallmanら(3)の方法に準じたHPLC-ECD法でNE，DA，HVA，DOPAC，3-MT，5-HT，5-HIAAを同時測定した。

《結果》 PEAによる常同行動変化をFig.1に示す。Head bobbingは投与開始後8日目より明らかに出現し、常同行動の強さは経日的に増大し、3乃至4週間までほぼ最大値を維持した。PEA注射後常同行動が出現するまでの潜時は8日目10分程度であったが15日目以降では5分以内となり、反復投与によって短縮化した。モノアミンとその代謝産物の変化はTable 1にみられるようにHVAは急性投与群では対照群と比較してFCP(+56 %)，TO(+32 %)，AC(+26 %)，SP(+23 %)，CP(+24 %)で有意に増加した。FCM(+63 %)，FCL(+109 %)，ACC(+67 %)，AM(+68 %)，CP(+41 %)では反復投与群のHVAは急性投与群に比して有意に増加していた。5-HIAAは急性投与群ではSPとCPを除く他の部位で、また反復投与群では測定した全部位で対照群に比較して20-30%程度の有意な増加がみられた。さらに全部位で急性投与群より反復投与群の方が

Table 1. Effects of acute and repeated ß-phenylethylamine on HVA, 5-HIAA and NE in individual rat brain areas.

Areas		HVA	5-HIAA	NE
A. Mesocortical dopaminergic terminals				
	C	0.16 ± 0.01	2.49 ± 0.10	2.84 ± 0.06
1. FCP	A	0.25 ± 0.04*	2.94 ± 0.15*	2.30 ± 0.13*
	R	0.31 ± 0.04*	3.26 ± 0.15*	1.94 ± 0.11*
	C	0.54 ± 0.05	2.60 ± 0.11	3.87 ± 0.13
2. FCM	A	0.62 ± 0.04	3.16 ± 0.15*	3.52 ± 0.20
	R	0.88 ± 0.07*	3.38 ± 0.12*	2.80 ± 0.17*
	C	0.22 ± 0.01	2.04 ± 0.06	2.62 ± 0.10
3. FCL	A	0.28 ± 0.02	2.37 ± 0.07*	2.00 ± 0.04*
	R	0.46 ± 0.04*	2.70 ± 0.13*	1.78 ± 0.04*
	C	0.57 ± 0.02	3.15 ± 0.13	4.81 ± 0.26
4. ACC	A	0.70 ± 0.06	3.88 ± 0.15*	4.14 ± 0.24
	R	0.95 ± 0.05*	4.50 ± 0.17*	3.66 ± 0.16*
B. Mesolimbic dopaminergic terminals				
	C	3.58 ± 0.17	3.45 ± 0.16	0.99 ± 0.11
1. TO	A	4.74 ± 0.26*	4.46 ± 0.19*	0.88 ± 0.09
	R	4.99 ± 0.18*	4.88 ± 0.25*	0.81 ± 0.06
	C	5.27 ± 0.29	3.57 ± 0.15	1.62 ± 0.16
2. AC	A	6.63 ± 0.39*	5.08 ± 0.27*	1.88 ± 0.12
	R	7.47 ± 0.17*	5.39 ± 0.23*	1.87 ± 0.11
	C	0.89 ± 0.07	3.63 ± 0.17	10.72 ± 0.35
3. SP	A	1.09 ± 0.08*	3.90 ± 0.15	9.55 ± 0.33
	R	1.19 ± 0.05*	4.19 ± 0.12*	9.64 ± 0.22
	C	0.38 ± 0.03	3.84 ± 0.12	5.72 ± 0.17
4. AM	A	0.43 ± 0.03	4.50 ± 0.15*	5.31 ± 0.20
	R	0.64 ± 0.07*	5.22 ± 0.26*	5.21 ± 0.33
C. Nigrostriatal dopaminergic terminals				
	C	7.82 ± 0.18	3.51 ± 0.27	n.d.
1. CP	A	9.71 ± 0.17*	3.66 ± 0.12	n.d.
	R	11.04 ± 0.22*	4.33 ± 0.09*	n.d.

*p<0.01 when compared with control by Scheffe's test.



○ DA, ● DOPAC, □ HVA, ■ 3-MT, △ 5-HT, ▲ 5-HIAA, ◉ NE

Fig. 2. Time response curves of monoamine levels (% of control) in FCM, TO and CP after ß-phenylethylamine.

有意ではないが増加率が高くなる傾向がみられた。NEは急性投与群ではFCPとFCLで対照群と比較して減少した。また反復投与群では中脳皮質系の4部位で減少が認められ、急性投与群に比較して更に減少率が大きい傾向であつた。DOPACと3-MTは全ての部位で変化はみられず、DA, 5-HTもほとんど変化はみられなかった。Fig. 2にFCM, TOおよびCPの3部位のPEA単回投与によるモノアミンとその代謝産物の経時変化を示す。15分時にDOPACは減少、3-MTは増加がみられ、それぞれ30分または60分時で対照とほぼ同値であった。HVAはDOPAC, 3-MTに遅れて時間経過とともに増加した。5-HIAAは60分時でほとんどの部位で増加がみられ、中脳辺縁系の部位とFCMでは15分時からの増加がみられた。NEでは中脳皮質系の4部位のみで15分時からの減少がみられた。DAと5-HTは特に変化はなかつた。

《考察》 今回PEA反復投与により常同行動に対するsensitizationが形成されることを明らかにした。Borisonら(1)はPEA(50 mg/kg)の5週間反復投与により常同行動増強、持続の延長および潜時の短縮化をみとめ、これを逆耐性とみなしており、中河原ら(7)も同様に3日投与でhead bibbingの増強と持続時間延長を観察している。今回の結果は、これらの報告と一致するものであり、PEAという内在性物質に対して過敏性が生じるという興味ある現象を確認したが、これが所謂アンフェタミン逆耐性現象と同一のものか否かは更に検討を要する。DAの主要代謝産物であるHVAはFCM, FCL, ACC, AMおよびCPで急性投与群に比較して反復投与群が増加したことから生化学的指標によってもsensitaizationが生じていることを明らかにした。特に、HVA増加率が線条体系より精神機能と関連の深い中脳皮質系でむしろ高い傾向であったのは注目される。他方、PEA反復投与によって、全ての部位で5-HIAAの増加及び中脳皮質領域のNEの減少がみられ、しかも投与期間依存的な傾向であった。したがつて、常同行動の過敏性形成に対応して、DAニューロン系以外にも5-HT及びNEニューロン系の活動性が変化している可能性も考えられる。

さて、PEA注射後60分時では他のモノアミンと代謝産物にほとんど変化がなかったため、PEA単回投与について経時変化を各部位別に検討した。常同行動が最も亢進する15分時でDOPACの減少、3-MTは増加し、HVAはそれに引き続いて増加した。これら3つのDA代謝産物の異なる経時変化から、PEAはDA放出促進作用とともにDA reuptake阻害作用をもつことが推測される。DOPACの経時変化について中河原ら(7)は注射後17分時で線条体では減少、60分時で中脳辺縁領域では増加をみているが、今回の注射では各DAニューロン系で大きな違いはみられなかった。他方、PEA注射後15分時からNEは中脳皮質系で減少し、5-HIAAは中脳辺縁系を中心として増加しており、経時変化の部位による違いがみられた。PEAはNEの強力なreleaserとして、又 5-HTアゴニストとしての作用(9)を有するといわれており、PEAによる常同行動変化と関連づける際、各モノアミン間の相互作用を考慮する必要があろう。今後、PEA反復投与群についても経時変化をみて、生化学的なsensitizationについてさらに検討したい。

《文献》(1) Borison, R.L., Havdala, H.S. and Diamond, B.I. (1977) Life Sci. 21,117-122. 2) Borison, R. L. and Diamond, B.I. (1978) Biol. Psychiat. 13,217-225. (3) Hallman, H., Sundström, E. and Jonsson, G. (1984) Neurochemical Studies on Central Monoamine Neurons. (4) König, J.F.R. and Klippel, R.A. (1963) The Rat Brain, Williams & Wilkins Co. Bartimore. (5) Moja, E.A., Stoff, D.M., Gillin, J.C. and Wyatt, R.J. (1978) Noncatecholic Phenythylamines. (6) Murphy, D.L., Belmakker, R.T.,Carpenter, W.T. and Wyatt, R.J. (1977) Brit. J. Psychiat., 130,151-158. (7)中河原通夫、仮屋哲彦、渡辺明子、金野滋、石井一平、本橋伸高、島薗安雄 (1983)精神薬療基金研究年報 14,68-74. (8) Potkin, S.G., Karoum, F., Chuang, L.-W., Cannon-Spoor, H.E., Phillips, I. and Wyatt, R.J. (1979) Science, 206,470-471. (9) Sloviter, R.S., Connor, J.D. and Drust, E.G. (1980) Neuropharmacology 19,1071-1074.

181. 長期強制回転ストレスによる中枢神経諸核のチロジン水酸化酵素活性の変化

小森照久・井上　桂・北山　功・野村純一
（三重大・医・精神神経）

〔要　約〕

成熟雌ラットを自動的に回転するドラム内に入れ，長期（平均12日）の強制運動ストレスに曝すと，約半数のラットは，身体疲労から回復した後にも，発情周期の消失を伴う持続的寡動状態を示したので，こうしたラットをうつ病モデル群とした。うつ病モデル群，短期（1日および3日）ストレス群，および正常対照群について，中枢神経諸核を切り出し，^{14}C-L-DOPA product法によりチロジン水酸化酵素(TH)活性を測定した。TH活性を測定する部位として，前頭葉内側部，側坐核，尾状核，旁室核，弓状核，正中隆起および青斑核を選んだ。正常対照群と比較すると，うつ病モデル群では，青斑核においてTH活性の有意な減少と，正中隆起においてTH活性の有意な増加が認められた。短期ストレス群では，青斑核，弓状核および正中隆起においてTH活性の有意な増加が認められた。短期のストレスでは青斑核におけるTH活性は適応して増加するが，長期のストレスの経過中のある臨界点においてノルアドレナリンの代謝に破綻を来たし，うつ病モデル群では青斑核におけるTH活性が低下するに至ったと考えられる。弓状核と正中隆起におけるTH活性の増加は，内分泌系，特に性腺系の機能異常に関係していると思われる。

Key word：Tyrosine hydroxylase, Forced running stress, Locus coeruleus

うつ病の発病過程をみると，ストレスが個体の許容力を超える場合に個体のホメオスターシスが破綻して，うつ病が発病すると考えることもできる。したがって，長期強制回転ストレスによるラットの持続的寡動状態は，人間のうつ病に類似しているように思われる。以下では，このようなラットを便宜的にうつ病モデルと呼ぶことにする。ここでは，うつ病モデルラットにおける中枢神経諸核のチロジン水酸化酵素(TH)活性の変化について報告する。

【方　法】

(1)実験動物

成熟雌ラットを回転ドラムケージ内で飼育すると，発情期に一致したピークをもつ規則的な活動周期を示すようになる。一部を正常対照群とし，他を自動的に回転するドラム内に移して，強制運動ストレスに曝した。さらに，一部を短期（1日および3日）ストレス群とし，他を長期（平均12日）のストレスに曝した。長期ストレスに曝したラットのうちの約半数は，ストレス負荷後2週間経って身体疲労から回復した後にも，なお自発活動の著しい低下と発情周期の消失を示したので，このようなラットをうつ病モデル群とした。

(2)諸核の切り出しと遠心分離

3群のラットから脳を摘出して－80℃で凍結後，クリオスタット（－12℃）で300μmの連続切片を作った。各切片を－20℃のプレート上におき，実体顕微鏡下でマイクロナイフと中空針を用いて，König & Klippel[5]とJakobowitz & Palkovits[3]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，前頭葉内側部，側坐核，尾状核，旁室

核，弓状核，正中隆起および青斑核である。切り出した諸核に20μℓのhomogenate medium (50mM Tris-acetate 0.2% Triton X)を加えて，氷冷しながら300rpm, 5strokesでhomogenizeした。2μℓを蛋白定量用に取り，残りを10000g，15分間冷却遠心分離して，上澄2μℓをTH活性測定用に取った。

(3) 蛋白定量

牛の血清albuminを標準物質として，Lowry[6]の方法を一部変更して行なった。2μℓのhomogenizeした組織に1N NaOHを100μℓ加え，さらに4% $NaCO_3$，0.04% $C_4H_4(K)NaO_6 \cdot 4H_2O$および0.5% $CuSO_4 \cdot 5H_2O$の混合液を1000μℓ加えて37℃，15分間incubateし，Folin-Ciocalteu氏phenol試薬を100μℓ加えて再度37℃，30分間incubateした後，光電比色計により750nmの波長で測定した。測定毎に標準物質で検量線を作製して，2μℓで2μg～8μgの範囲を使用した。

(4) TH活性の測定

Nagatsu ら[8] Coyle[1]の方法を一部変更した^{14}C-L-DOPA product法によった。Incubation mediumの内容は，143mM sodium phosphate buffer (pH 6.0)，0.7mM $FeSO_4$，3000 Units/μℓ catalase，4.6mM $6MPH_4$ (6-methyl-5,6,7,8-tetrahydropterine)，200μM L-〔^{14}C (U)〕tyrosine (Specific activity 212mCi/m mole)であった。2μℓの上澄に5μℓのIncubation mediumを加えて15分間incubateした後，氷水の中につけて冷却し，2.5mM L-DOPA，100μM L-tyrosine，35μM EDTA，25mM $NaHCO_3$，50mM KH_2PO_4 (pH 8.9)を加えて反応を止めた。40mgのaluminaを入れたmicroalumina columnに反応溶液を通し，1.4mlの水で4回洗った後，0.2N acetic acidでL-DOPAを溶出した。この溶液にToluene, Triton X-100およびOmnifluorの混合液であるScintillatorを10ml加えて，液体シンチレーションカウンターで^{14}C-L-DOPAのベータ線を測定した。

【結　果】

TABLE. TYROSINE HYDROXYLASE ACTIVITIES IN RAT BRAIN REGIONS

NUCLEUS AND AREA	CONTROL	1 DAY STRESS	3 DAYS STRESS	LONG-TERM (2 WEEKS) STRESS-INDUCED INACTIVE STATE
FRONTAL CORTEX (MEDIAL FIELD)	1.06±0.06 (9)	1.14±0.11 (10)	1.21±0.17 (8)	1.29±0.15 (9)
NUCLEUS ACCUMBENS	22.41±1.12 (10)	24.35±1.57 (9)	25.26±1.25 (10)	25.78±1.09 (9)
NUCLEUS CAUDATUS PUTAMEN	38.73±1.25 (10)	39.87±2.04 (10)	42.03±2.85 (9)	41.76±1.92 (9)
NUCLEUS PARAVENTRICULARIS	3.59±0.16 (10)	4.18±0.47 (7)	3.41±0.31 (9)	3.22±0.38 (8)
NUCLEUS ARCUATUS	8.87±1.02 (10)	14.59±1.22*** (9)	12.23±1.35* (8)	9.21±1.67 (8)
MEDIAN EMINENCE	27.15±1.61 (8)	37.88±3.25** (7)	43.18±5.39** (7)	35.02±4.11* (6)
LOCUS COERULEUS	23.76±1.65 (10)	47.08±6.35*** (8)	38.82±3.94*** (9)	12.36±2.79*** (7)

The results are expressed as mean values±S.E.M. (number of indivisual determinations) : n moles L-DOPA formed/mg protein/hr. *$p<0.05$, **$p<0.01$, ***$p<0.005$

表には，正常対照群と比較したTH活性の変化を示した。うつ病モデル群では，青斑核においてTH活性の有意な減少と，正中隆起においてTH活性の有意な増加が認められた。短期ストレス群では，青斑核，弓状核および正中隆起においてTH活性の有意な増加が認められた。

【考　察】

拘束，寒冷，電撃など種々のストレスをラットに負荷すると，青斑核や視床下部におけるTH活性が増加したという報告は数多くある[7]。今回の実験では，短期ストレス群の青斑核においてTH活性が増加していたが，うつ病モデル群の青斑核においてTH活性が減少するという，これまでに例のない所見が認められた。免疫組織化学法によっても，うつ病モデル群の青斑核においてTH特異蛍光の減弱を認めた[4]。このようなTH活性の変化については，短期ストレスでは青斑核におけるTH活性は適応して増加するが，長期ストレスの経過中のある臨界点においてノルアドレナリン代謝が破綻し，うつ病モデル群では青斑核におけるTH活性が低下するに至った，と考えられる。青斑核の他では，隆起漏斗路においてTH活性の変化が認められた。短期ストレス群の弓状核と正中隆起においてTH活性が増加し，うつ病モデル群では正中隆起にのみTH活性の増加が認められた。隆起漏斗路の変化は内分泌系，特に性腺系の機能異常に関係しているように思われる。以前に我々は[2]，拘束ストレスによる実験において，ストレスが短期から長期になるにつれて，隆起漏斗路におけるTH活性の増加が弓状核から正中隆起に移って行くことを認めており，今回の実験でもこのような傾向が認められた。しかし，青斑核に関する所見は一致せず，短期および長期のいずれの拘束ストレスでも青斑核におけるTH活性は増加していた[2]。青斑核に関する所見の相違については，強制回転は拘束に比べてストレスが強く，個体の適応の限界を超えることが理由として考えられ，したがって強制回転ストレスによる持続的寡動状態はうつ病モデルになる可能性があると思われる。以上の所見から，ストレスが生体のホメオスターシスを破綻させるような場合には，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重要な役割を果たすと考えられ，人間のうつ病の病態発生に関して示唆に富むと思われる。

【文　献】

(1) Coyle, J.T. (1972) Biochem. Pharmacology 21, 1935-1944
(2) 井上桂，鳩谷龍，内村英幸，中原辰雄 (1981) 神経化学 20, 460-463
(3) Jakobowitz, D.M. and Palkowits, M. (1974) J. Comp. Neur. 157, 13-42
(4) Koishizawa, M., Kitayama, I. and Nomura, J. (1984) Folia Psychiat. Neurol. Jap. 38, 355-356
(5) König, J.F.R. and Klippel, R.A. (1963) The Rat Brain, Williams & Wilkins Co., Baltimore
(6) Lowry, O.H., Rosenbrough, N.J., Farr, A.L. and Randall, R.J. (1951) J.Biol. Chem. 193, 265-275
(7) Masserano, J.M. and Weiner, N. (1983) Mol. Cell. Biochem. 53/54, 129-152
(8) Nagatsu, T., Sudo, Y. and Nagatsu, I. (1971) J. Neurochem. 18, 2179-2189

182. チロシン水酸化酵素の活性調節機構（Ⅱ）

奥野幸子・山内　卓・藤沢　仁　　（旭川医大・第一生化）

〔要　約〕

ラット線条体のチロシン水酸化酵素の活性の調節機構を検討し，以下の結果を得た。

(1)　チロシン水酸化酵素の活性を変動させる因子としてはポリアニオン，サイクリックAMP依存性蛋白質燐酸化酵素，カテコールアミン，カルモデュリン依存性蛋白質燐酸化酵素Ⅱの4種類のみが著明な効果を示した。

(2)　これらの4種類の因子による酵素の活性変動をそれぞれの組み合わせによって考えられる16通りについて検討した。

(3)　4種類の活性調節因子の作用によって得られる16通りの酵素の状態を生理的なpHでの活性変動に焦点を絞って比較すると，カテコールアミンによる酵素の不活性化と，サイクリックAMP依存性蛋白質燐酸化酵素による活性化が生理的に最も重要で基本的な調節機構であると思われた。

Key word : tyrosine 3-monooxygenase, catecholamine, cyclic AMP-dependent protein kinase

チロシン水酸化酵素はカテコールアミン生合成の律速酵素であり，酵素の活性調節機構は極めて重要である。これまでポリアニオン，塩，燐脂質，蛋白質分解酵素，蛋白質燐酸化酵素等が本酵素の活性化因子として報告され，複雑な活性調節機構の存在が推定されてきた。そこで我々はこれらの活性調節機構について検討し，チロシン水酸化酵素が生体内では不活性型酵素として存在しており，ポリアニオンや蛋白質燐酸化酵素によって活性化されること，および酵素は生理的pHでは酵素とほぼ当量のカテコールアミンによって不活性化され，不活性型酵素はサイクリックAMP依存性蛋白質燐酸化酵素（cAMP−PK）によって再び活性型に転換されることを見出し，一昨年および昨年の本大会で報告した（2，3）。チロシン水酸化酵素の活性調節機構をさらに検討し，酵素の示す様々な活性型の状態について生理的意義を考察した。

〔実験方法〕

ラット線条体のチロシン水酸化酵素の粗酵素およびpH処理等によってカテコールアミン等の活性抑制物質の除かれた部分精製酵素は既報（4）に従って調製した。ウシ心筋のcAMP−PKはSugdenらの方法（6）を用いて精製した（4）。カルモデュリン依存性蛋白質燐酸化酵素Ⅱ（CaM−PKⅡ）および活性化蛋白質はそれぞれラット大脳皮質から既報（7，8）に従って精製した。カルシウム，燐脂質依存性蛋白質燐酸化酵素（C−PK）はKitanoらの方法（1）により精製した。チロシン水酸化酵素活性は非酵素的脱炭酸法（4）により測定し，1ユニットは1分間にドーパ1nmolを生成する活性として示した。cAMP−PKによるチロシン水酸化酵素の活性化反応は，cAMP−PK 10.7ユニットを含む反応液（4）0.1 mℓ中で30℃ 5分間インキュベーションして行なった。

CaM-PKⅡによる活性化反応は，同じ反応液にさらに0.12mM $CaCl_2$，3.5μgカルモデュリン，4.5μg活性化蛋白質を添加し，CaM-PKⅡ1.05μgを用いて30℃で5分間行なった。反応液中のATP濃度は0.5mMとした。C-PKによる活性化はcAMP-PKの反応液に2μg/ml 1，2-ジオレイン，100μg/mlホスファチジルセリンを添加し，C-PK 3μgを用いて30℃5分間の反応を行なった。ポリアニオンによる活性化は100μg/mlデキストラン硫酸をチロシン水酸化反応液に添加して測定した。単クローン抗体によるチロシン水酸化酵素蛋白の定量は免疫滴定により（5）行なった。

〔結果および考察〕

ラット線条体の粗抽出液のチロシン水酸化酵素は至適pHを5，4に示し，中性付近のpHでは殆ど活性を示さない（図1A①）。この酵素を用いてこれまで活性を変動させると報告されてきた種々の因子の酵素活性への影響について検討した結果，ホスファチジルセリン，ホスファチジルイノシトール等の燐脂質やC-PKは殆ど酵素活性に影響せず，酵素活性を変動させる因子としては，(1)ポリアニオン，(2)cAMP-PK，(3)カテコールアミン，(4)CaM-PKⅡの4種類のみが顕著な効果を示すことが明らかになった。そこでこれらの4種類の因子による酵素活性の変動について検討した。図1はそれぞれの因子の組み合わせによって考えられる16通りの場合のチロシン水酸化酵素活性のpHパターンを示したものである。カテコールアミンによって中性領域の活性が抑制されている粗酵素（A①）はpH処理等の操作により活性抑制が解除され中性付近に巾広い至適pHを示すようになる（E①）。これらの酵素（A①，E①）にポリアニオンを作用させると酵素は活性化され至適pHを6.5付近に示すがpH 5.4付近では逆に活性が抑制された（A②，E②）。cAMP-PKによって燐酸化す

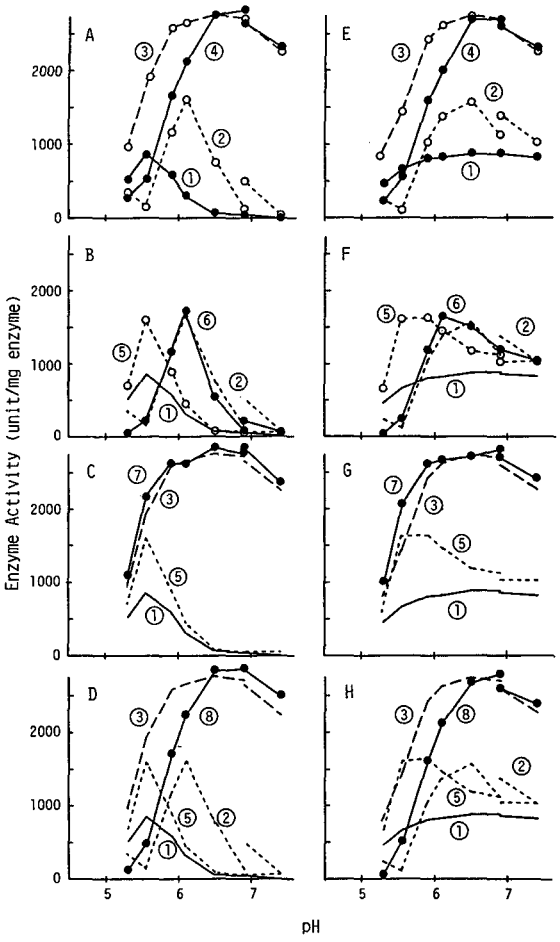


図1　チロシン水酸化酵素活性のpH依存性

A－D；粗酵素
E－H；pH処理酵素
① (－)
② ポリアニオン添加
③ cAMP－PKで活性化された酵素
④ ③にポリアニオンを添加
⑤ CaM－PKⅡで活性化された酵素
⑥ ⑤にポリアニオンを添加
⑦ cAMP－PKおよびCaM－PKⅡで活性化された酵素
⑧ ⑦にポリアニオンを添加

ると酵素は著しく活性化され，特に中性領域での活性の増加は大きく至適 pH となり，その比活性は 2800 にもなった（A③，E③）。CaM–PKⅡによっても活性化を受けるがこの場合の活性化は pH 5.4 付近で著明であった（B⑤，F⑤）。それぞれの因子を組み合わせた場合，例えばポリアニオンとcAMP–PKの組み合わせ（A，E）では，酸性領域ではポリアニオンによる酵素活性の抑制が優性であり，中性領域ではcAMP–PKによる活性化が優性であった（A④，E④）。その他の組み合わせについても酸性領域ではポリアニオンによる抑制が優性で，中性領域ではより活性型の状態が優性である傾向が認められた（⑥，⑧）。このように4種類の活性調節因子によって様々な状態にある酵素を，生理的 pH での活性の変動に注目して模式的に示したのが図2である。チロシン水酸化酵素に(1)ポリアニオン，(2) cAMP–PK，(3) カテコールアミン，(4) CaM–PKⅡがそれぞれ単独で，または複合して作用した場合の中性領域での酵素の比活性を示したが，この図から明らかなように酵素がとり得る16通りの活性型の中でカテコールアミンによる酵素の不活性化と，cAMP–PKによる不活性型酵素から活性型酵素への転換が最も生理的に重要で基本的な酵素の調節機構であるように思われる。

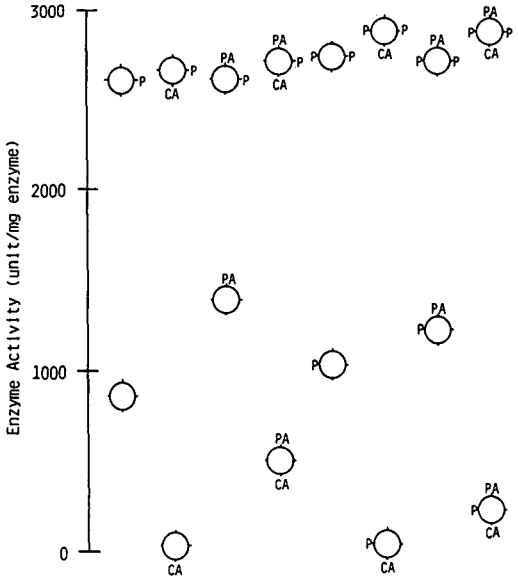
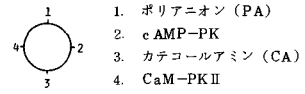


図2　生理的 pHにおけるチロシン水酸化酵素の活性変動



〔文献〕

1. Kitano, T., Go, M., Kikkawa, U. & Nishizuka, Y. Meth. in Enzymol. in press
2. 奥野幸子．藤沢　仁（1983）神経化学 22 375–377
3. 奥野幸子．藤沢　仁（1984）神経化学 23 469–471
4. Okuno, S. & Fujisawa, H.（1985）J. Biol. Chem. 260, 2633–2635
5. Okuno, S. & Fujisawa, H.（1985）J. Biochem.（Tokyo）97, 265–273
6. Sugden, P.H., Holladay, L.A., Reimann, E.M. & Corbin, J.D.（1976）Biochem. J. 159, 409–422
7. Yamauchi, T. & Fujisawa, H.（1983）Eur. J. Biochem. 132, 15–21
8. Yamauchi, T., Nakata, H. & Fujisawa, H.（1981）J. Biol. Chem. 256, 5404–5409

183. 生体 31-P NMR 法による脳内 ATP, Pcr の計測：マイクロウェーブ照射法との比較

湯浅龍彦・桑原武夫・関　耕治・宮武　正
（新潟大・脳研・神経内科）

〔要　約〕

低酸素状態に伴なう脳内ATPやクレアチンリン酸(Pcr)の変化をin vivo 31-P NMR法と従来の生化学的分析法とで計測し、それぞれの分析法の特色を明らかにした。

ラットに20%酸素、そして10%，5%の低酸素を負荷し、in vivo 31-P NMR法を施行した。NMR装置はJEOL FX270（6.3 T，サーフェイスコイル型）を用いた。一方、同様条件下にてラット頭部にマイクロウエーブを照射し(5KW, 1.7 sec)、脳を採取し、Lowry法によりATP, Pcrを定量した(MII-Lowry法)。またMII処理脳組織にてin vitro 31-P NMR スペクトロメトリーを施行した。

(1) in vivo 31-P NMR法では低酸素に従って脳内Pcr, ATPの変化する様子が同一個体で観測された(Fig. 2, 3)。 (2) MII-Lowry法で定量された脳内Pcr, ATPは20%酸素から10%酸素に変化するにつれて、Pcrは11%減じ、ATPは5%増加した(Table 1)。 (3) in vitro 31-P NMRとin vivo 31-P NMRを比較するとMII処理後の脳ではPcr／Pi比が有意に低下した(Fig. 4, Table 2)。

以上、in vivo 31-P NMR法は、脳内ATPやPcrなどを同一個体で経時的に観測するのに有用な方法と思われた。MII処理によりPcr低下，Pi増加が招来された。

Key word： in vivo 31-P NMR , microwave irradiation inactivation , ATP and Pcr in hypoxic rat brain

〔Ⅰ〕はじめに

核磁気共鳴法(NMR)技術の進歩により高エネルギーリン酸化合物であるPcrやATP、それに無機リン(Pi)などをin vivoで経時的に追跡することが可能となって来た〔1, 4, 5, 6, 10, 13, 15〕。in vivo NMR法は新技術法であるためにこれによって得られる結果については従来の既に確立された方法と対比検討されることが重要と思われる。本研究の目的は低酸素状態におけるラット脳内の高エネルギーリン酸化合物の変化をin vivo 31-P NMR法で計測すると共にマイクロウエーブを照射し酵素を失活させた脳でPcrやATPを定量し、両分析法の特色を明らかにすることである。

〔Ⅱ〕方法

in vivo 31-P NMR spectrometry

31-P NMRスペクトラはJEOL FX270 NMRスペクトロメーター(109.14 MHz, 6.3テスラ，サーフェイスコイル型)で記録された〔15〕。NMRシグナルはラットの頭部外表に固定されたサーフェイスコイルから得られた。90°パルス幅を20μsec，繰り返し時間を2sec，積算回数を200回とした。

High power microwave radiator

ラットを固定台にとりつけ、頭部に限って局所性のマイクロウエーブ照射を行なった(Toshiba TMW 6402A : 5KW, 1.7sec)。照射後直ちに脳を採取し、生化学分析のために−80°cに保存した。その後、Lowry法に従って脳内Pcr及びATP量を定量した(MII-Lowry法)。

in vitro 31-P NMR spectrometry

MII処理後のラット頭組織片について31-P NMRスペクトロメトリーを施行し、これによ

り得られたスペクトルと in vivo 31-P NMR スペクトルを比較検討した。

実験動物と実験のデザイン

ウイスター系ラット(体重 100—120 g, 雄) を用いた。3％ハロセンにて導入麻酔し、1.5％ハロセン麻酔下で実験した。酸素ガスと窒素ガスの混合により 20％酸素，10％酸素，5％酸素を調合し、ラットの顔面に被せたマスクよりハロセンと共に吸入させた。in vivo 31-P NMR スペクトロメトリーでは(n＝8) 20％，10％，5％の酸素を順次吸入させつつ、1 個体づつ大脳の ATP，Pcr，Pi 等の変化を観察した。MII-Lowry 法のためには 20％酸素吸入中(n＝12)と 10％酸素吸入中(n＝11)にそれぞれマイクロウエーブを照射し、大脳と小脳における ATP，Pcr 量をそれぞれ定量した。in vitro 31-P NMR 法のためには 20％酸素吸入中にマイクロウエーブ照射をうけた脳組織片を用いた。この in vitro のスペクトルより Pcr／ATP，Pcr／Pi 比を算出し in vivo スペクトルのものと比較した。

〔Ⅲ〕結果

(1)まず intact なラット脳より得られた典型的な 31-P NMR スペクトラムを Fig. 1 に示した。ピーク 1，2，3 はそれぞれ ATP の β—，α—，γ—位のリンからのシグナルである。ピーク 4 は Pcr，ピーク 5 は phosphodiesters，ピーク 6 は Pi，ピーク 7 は糖リンからのものである〔15〕。

(2) 20％，10％，5％酸素吸入のラット大脳の in vivo 31 P NMR スペクトラを Fig. 2 に示した。そして各ラット大脳における Pcr と ATP の低酸素に伴なう変化を Fig. 3 に示した。これによれば、ラット大脳の Pcr は、10％酸素吸入時には 20％酸素吸入時の 23.2％の減少、5％酸素吸入時には、42.5％の減少を呈した。ATP 量も 5％で低下するが、10％酸素吸入時にはむしろ増加傾向を示すものもみられた。

(3) MII Lowry 法で定量されたラット大脳の Pcr 値は、20％酸素吸入時 20.5 mmol／L，10％酸素下で 18.3 mmol／L(10.8％の減)，ATP 量は 20％酸素で 18.5 mmol／L，10％酸素で 19.5 mmol／L (5％増) であった(Table 1)。

(4) in vitro 31-P NMR スペクトルと in vivo 31-P NMR スペクトルを比較し Fig. 4 に示した。ここに示されるようにマイクロウエーブ照射後 Pcr ピークの減少と Pi の増加がみとめられる。Pcr／Pi 比について、in vivo 31-P NMR 法，MII-Lowry 法，in vitro 31-P NMR 法により得られた結果を Table 2 に示した。Pcr／Pi 比は MII 処理後有意に低下することが示された。

〔Ⅳ〕考察

脳内の種々の代謝物を定量するために酵素反応を止めるため種々の方法が採用されて来た〔9，14〕。MII 法も汎用されている方法である〔2，3，8，11，12〕。一方 in vivo 31-P NMR 法は新しい方法論でありその有用性については従来の確立された方法と対比検討されるべきである。ここに示したように in vivo 31-P NMR 法は変化率をみる限りに於ては従来の分析法に比肩出来る結果が得られ、しかも同一生体での変化を追跡出来る利点を有した。他方 MII 法を用いることにより Pcr／Pi 比は生体計測直のそれに比して減少し何らかのアーチファクトの混入することが明らかにされた。

Fig. 1

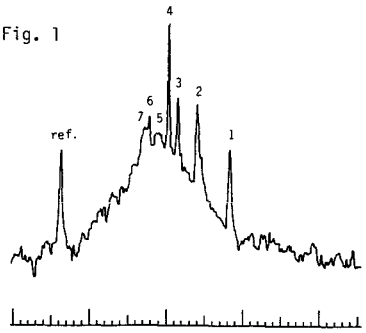


Fig. 3

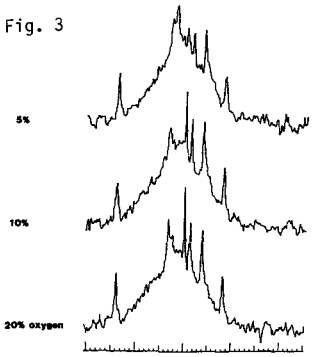


Fig. 2

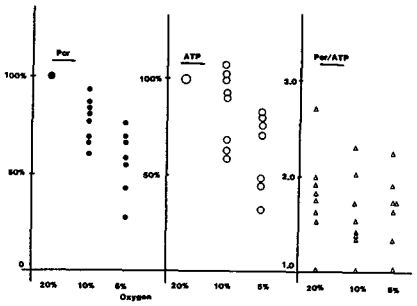


Table 1

	Cerebrum		Cerebellum	
	Pcr(mmol/L)	ATP(mmol/L)	Pcr(mmol/L)	ATP(mmol/L)
20% oxygen	20.5±0.4	18.5±0.3	24.6±0.6	16.4±0.4
10% oxygen	18.3±0.7	19.5±0.3	22.7±0.5	16.6±0.2

Fig. 4

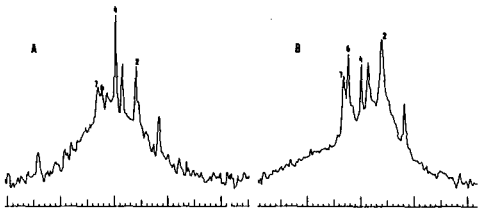


Table 2

		Pcr/ATP	Pcr/Pi	n=
in vivo 31-P NMR	20% oxygen	1.76±0.46	2.78±0.37	8
	10%	1.58±0.38	2.41±0.89	8
MI-Lowry	20%	1.11±0.04		12
	10%	0.94±0.10		11
MI in vitro 31-P NMR	20%	1.23±0.19	0.75±0.14	12

MI : Microwave irradiation inactivation

〔文献〕 1) Ackerman,J.J.H., et al., Nature 283 (1980) 167-170. 2) Balcom,G.J., Lenox,R.H. and Meyerhoff,J.L., J. Neurochem. 24 (1975) 609-613. 3) Balcom,G.J., Lenox,R.H. and Meyerhoff,J.L., J. Neurochem. 26 (1976) 423-425. 4) Chance,B., et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 75 (1978) 4925-4929. 5) Gordon,R.E., et al., Nature 287 (1980) 367-368. 6) Kuwabara, T., Yuasa,T., Miyatake,T., Muscle and Nerve (1985) in press. 7) Lowry,O.H., et al., J. Biol. Chem. 193 (1951) 265-275. 8) Medina,M.A., et al., J. Neurochem. 24 (1975) 223-227. 9) Pontén,U., et al., J. Neurochem. 21 (1973) 1127-1138. 10) Prichard,J.W., et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 80 (1983) 2738-2751. 11) Schmidt,D.E., et al., Brain Res. 38 (1972) 337-389. 12) Schneider,D.R., Felt,B.T. and Goldam,H., J. Neurochem. 38 (1982) 749-752. 13) Thulborn,K.R., et al. J. Cereb. Blood Flow Metabol. 2 (1982) 299-306. 14) Veech,R.L., et al. J. Neurochem. 20 (1973) 183-188. 15) Yuasa,T., et al. J. Physiol. Cehm. Phys and Medical NMR (1985) in press.

184. 中性スフィンゴミエリネースと酸性スフィンゴミエリネースは同一蛋白か？
―アミノ酸組成と免疫学的検討―

野口悦子　（国立武蔵療・神経センター・疾病2部）

〔要　約〕
ラット脳ミクロゾームの中性スフィンゴミエリネース(Sph´ase)およびP_2画分の酸性Sph´aseはトリトンによる可溶化、硫安分画、アセトンパウダーの作製、トリトンによる抽出、硫安分画、Sepharose CL-6B クロマトグラフィー、クロマトホーカシングによって精製された。中性 Sph´ase がポリバッファーのpH勾配によっては溶出されず 0.4 M NaClで溶出されるのに対し酸性 Sph´ase はポリバッファーのpH勾配によって pH 5.3 付近に溶出された。得られた精製中性 Sph´ase は 54,000 nmol/hr/mg 蛋白、収率 15%,ミクロゾームより 96.4 倍、酸性 Sph´ase は 25,700 nmol/hr/mg 蛋白、収率 6.3%,P_2 画分より 668 倍であった。ゲル濾過法による native な分子量は中性 Sph´ase が 430,000, 酸性 Sph´ase が 270,000 であった。両酵素は SDS-PAGE で共に 67,000 に 1 本のバンドを示した。これらはウサギで作った中性Sph´ase に対する抗体と FITC標識抗ウサギ IgG によりその抗原性が確かめられた。また Ouchterlony 法で両精製酵素は完全に融合する 1 本の沈降線を作った。アミノ酸組成比は Glu, Asp, Leu, Gly, Ala, Ser, Lys, Val, Thr, Arg, Ileu, Phe, Pro, Tyr, His, CysA, Met の順で相似係数は 0.99 であった。Polarity は中性 Sph´ase が 47%, 酸性Sph´ase が 48% であった。以上のことから両酵素は免疫学的にまたアミノ酸組成比において極めて類似していることがわかった。

Key Words: Neutral sphingomyelinase, Acid sphingomyelinase, Rat brain.

スフィンゴミエリン水解酵素としてライソゾームに存在する酸性 Sph´ase と脳で特に活性の高い中性 Sph´ase とがある。酸性 Sph´ase の活性低下を特徴とする Niemann-Pick 病においては各臓器にスフィンゴミエリンが異常蓄積する。Gatt らは脳に存在する中性 Sph´ase はこのスフィンゴミエリンの水解に働き、蓄積を軽減していると示唆した。そこで脳における中性 Sph´ase の役割を明確にし酸性 Sph´ase との関連性を酵素学的、蛋白的に明らかにすることを目指してきた。中性 Sph´ase は膜に結合した不安定な性質のため精製が困難であったが第 27 回本大会では中性 Sph´ase の精製標品を得て免疫学的性質を明らかにした（7）。酸性 Sph´ase についてはその精製の試みが多数あるがいまだその諸性質は確立されていない。昨年度ラット脳P_2 画分の両 Sph´ase の同時精製法を試みた（6）。今回ライソゾームの酸性 Sph´ase とミクロゾームの中性 Sph´ase の両精製標品を得てアミノ酸組成を分析し、更に免疫学的検討を行った。

〔実験方法〕

酵素活性の測定：　中性、酸性 Sph´ase 活性はすでに記載した方法に従った（7）。

精製標品の作製：　精製中性 Sph´ase は比活性 54,000 nmol/hr/mg 蛋白、収率 15%,ミクロゾームより 96 倍でその精製については昨年度報告した（7）。酸性 Sph´ase はラット脳を 0.32 M ショ糖でホモジナイズし粗ミトコンドリア画分を得、中性 Sph´ase の精製法にならって行った。クロマトホーカシングではポリバッファーの pH 勾配により溶出した。

ゲル濾過法による分子量：　SepharoseCL-6B(1.5 cm x 80 cm)を用いて0.1%トリトン、25% グリセロール、0.15 M NaCl を含むトリス緩衝液でゲル濾過した。

精製酵素の抗体作製および免疫学的性質：　精製中性 Sph'ase を用いて Freund Complete Adjuvantと1:1 に懸濁しウサギ皮下に毎週注射した。3週目より得られた血清を 50% 硫安で2回分画した。　Immunoblotting は Gershoni の方法(2)に従いSDS-ミニスラブ電気泳動後のゲルを用いてニトロセルロース膜上で抗体と反応させて2次抗体である FITC 標識抗ウサギ IgG を用いて染色した。　Ouchterlony テストは 0.1%トリトンを含む 1% アガロースを用いて二重拡散させた。

アミノ酸分析：　各サンプルに0.1% フェノールを含む 6 N HClを加えて減圧下で封管し 110°C，24 時間加水分解し、日立 835 型アミノ酸分析機を用いて測定した。Cys は CysA として過ギ酸酸化法によって測定した。　Trp は測定しなかった。

相似係数と Polarity Index：　相似係数は Manabe ら(4)に、Polarity Indexは Capardi ら(1)に従って算出した。

［結果と考察］

酸性 Sph'ase の精製：　酸性 Sph'ase は各臓器のライソゾームに局在するといわれている。　そこで P_2 画分より精製を行った。　Table 1 はラット脳 60 匹より得られた酸性 Sph'ase精製の概要である。前回報告の中性 Sph'ase の方法および注意点に従った。　Fig.1 はクロマトホーカシングのパターンである。pH 5.3 付近に酸性Sph'ase 活性のピークが得られた。ここでの溶出法が中性 Sph'ase と全く異なる点であった。このステップにより一挙に比活性が上がり有効な精製法であることがわかった。

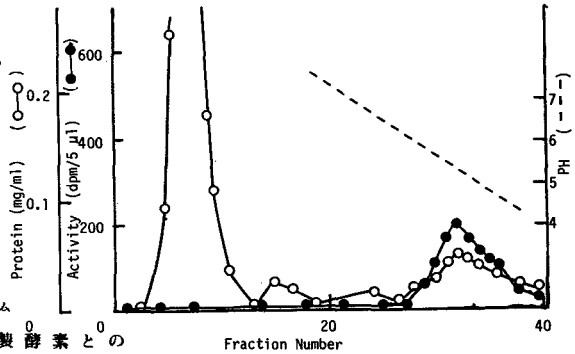
得られた精製標品は比活性 25,700 nmol/hr/mg 蛋白、P_2 画分より 668 倍、収率 6.3% であった。

Table 1
Purification of acid sphingomyelinase from rat brain P_2 fraction

Purification steps	Volume (ml)	Total protein (mg)	Specific activity (nmol/hr/mg protein)	Total activity (nmol/hr x10^{-3})	Recovery (%)	Purification (fold)
P_2 fraction	64.0	2450	38.5	94.3	100	1
30,000 x g sup. after 1% Triton X-100 extraction Acetone powder (1.7 g)	70.8	506	171	86.6	91.8	4.44
30,000 x g sup. after 1% Triton X-100 extraction	75.0	99.0	302	29.9	31.7	7.84
Ammonium sulfate	10.0	14.2	648	11.4	12.1	16.8
Sepharose CL-6B	6.50	8.96	857	9.60	10.2	27.8
Chromatofocusing	3.50	0.230	25700	5.92	6.28	668

両 Sph'ase の native な分子量：中性 Sph'ase が 430,000、酸性 Sph'ase が 270,000 と算出されたがトリトン存在下なのでその影響も考えられた。中性、酸性 Sph'ase のサブユニットとその抗原性：　両精製 Sph'ase の SDS-PAGE像よりサブユニットが共に 67,000、またその抗体蛍光染色により同一抗原性を有することがわかった (Fig. 2. A. B)。

Fig. 1. Chromatofocusing of acid sphingomyelinase



免疫拡散：　ラット脳ミクロゾーム中性 Sph'ase に対する抗血清と両精製酵素との

交叉性を調べた（Fig.3）。図のように完全に融合する一本の沈降線を生じた。ラット脳には種々の細胞下画分に中性 Sph'ase が存在する。また P_2 画分の酸性 Sph'aseと中性 Sph'aseとの比率は脳と肝臓で大きく異なっている。昨年度はこれらの点に着目し二次元免疫電気泳動により両酵素の抗原性が同一であることを推察したが今回両精製標品を得て免疫学的同一性が確かめられた。

アミノ酸分析：Table 2 は両精製酵素のアミノ酸組成比である。相似係数は 0.99であった。Polarity は中性 Sph'ase が 47%，酸性 Sph'ase が 48% であった。Jones ら(3)はヒト胎盤酸性 Sph'ase を精製しアミノ酸分析を行ったがフェノールを添加していないので Tyr の値が低い。しかし彼らの値と今回のラット脳 Sph'ase の組成比の値は非常に似ていた。

Fig. 2. SDS-PAGE of neutral and acid sphingomyelinases and immunoblotting test

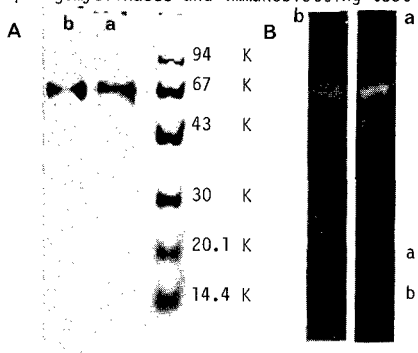
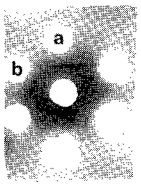


Fig. 3. Ouchterlony double diffusion analysis



a: Neutral sphingomyelinase

b: Acid sphingomyelinase

Jones らは精製酵素が等電点電気泳動や SDS-PAGE で多種のバンドを示すため、サブユニット決定のために精製酵素を更にアルキル化、還元した後アセトン処理をして SDS-PAGE を行い、初めて再現性のある結果を得ることができたと報告し、酵素自体の性質として、またトリトンの影響を考察した（3）。本研究の精製法においてその初期に行ったアセトン処理は酵素を失活させて低い比活性値の精製酵素をもたらした危険性もあるが一方ではまた均一な蛋白として得られやすくしたことも考えられる。

アミノ酸分析については先にラット脳 P_2 画分の中性 Sph'ase の電気泳動後のゲルバンドを切り出し抽出して、OPT 法による微量アミノ酸分析を報告した（5）。これらの結果からミクロゾームの中性 Sph'ase，P_2 画分の中性 Sph'ase，ライソゾームの酸性 Sph'ase のアミノ酸組成比の類似性が非常に高いことがわかった。今後これらアイソザイムの分子レベルでの詳しい比較が望まれる。

Table 2
Amino acid composition of neutral and acid sphingomyelinases

Amino acid	Content of neutral sphingomyelinase(%)	Content of acid sphingomyelinase(%)
Asx	9.4±0.2	9.6±0.8
Thr	5.9±0.5	5.7±0.3
Ser	7.3±0.9	7.0±0.1
Glx	10.6±0.9	10.4±0.3
Pro	4.8±0.5	4.3±0.5
Gly	8.5±1.5	8.9±0.3
Ala	7.7±0.1	7.7±0.4
CysA	1.7±0.2	2.1±0.5
Val	6.2±0.6	6.3±0.1
Met	2.0±0.6	1.6±0.6
Ile	5.4±0.3	4.7±0.3
Leu	9.1±1.0	9.2±0.1
Tyr	3.3±0.3	3.6±0.1
Phe	4.1±0.5	4.5±0.2
His	2.0±0.3	2.1±0.3
Trp	N.D.	N.D.
Lys	6.2±0.3	6.7±0.1
Arg	5.2±0.3	5.1±0.04
(GlcNAc)	0.3±0.02	0.3±0.1

References
1.Capaldi,R.A., and Vanderkooi,G. (1972) Proc.Nat.Acad.Sci.69,4,930-932
2.Gershoni,J.M., and Parade,G.E. (1982) Anal.Biochem.124,396-405
3.Jones.C.S., Shankaran,P.,and Davidson,V. (1983) Biochem.209,291-297
4,Manabe,T.,Oda,O.,and Okuyama,T.(1982) J.Chromatogr.241,361-370
5.野口悦子 (1983) 生化学 55.8. 983
6.野口悦子 (1984) 生化学 56.8. 884
7.野口悦子 (1984) 神経化学 23, 198-200

185. 髄液中の中性プロテアーゼによるミエリン塩基性蛋白の分解とFOY305 による抑制について

犬塚　貴・馬場広子・佐藤修三・宮武　正
(新潟大・脳研・神経内科)

〔要　約〕

加熱処理したヒト中枢ミエリンをヒト髄液と中性buffer中でincubateしたところ、ミエリン塩基性蛋白(mBP) が経時的に分解され、ゲル電気泳動上14K, 12K, に分解産物によるバンドが生じた。この髄液中のmBP に対する酵素の至適pHは 7.0であった。この酵素活性は合成セリンプロテアーゼ阻害剤であるFOY305 100μM によって85% 抑制されたが、チオールプロテアーゼ阻害剤E-64a 1mM やEGTA 1mMで全く抑制されなかった。

多発性硬化症(MS)患者の髄液で　この酵素活性は、心身症群に比して亢進している例があり、しかもMSの脱髄巣が脳室近傍に多いことから脱髄において髄液内酵素が関与する可能性が推察された。

FOY305は医薬品として開発され毒性が低く臨床的応用が示唆された。

Key word :
Myelin Basic Protein , Protease inhibitor , Multiple sclerosis

ヒト髄液中にはいくつかの酸性および中性プロテアーゼの存在が知られており、ミエリン塩基性蛋白(mBP) や各種人工基質への作用が調べられている[2),4)]。また各種神経疾患にてこれらのプロテアーゼ活性の変化が報告されており、とくに多発性硬化症(MS)などの脱髄疾患において病因との関連等において重要視されている[3),5)]。今回我々は生体に安全に用いることができるプロテアーゼ阻害剤にて、ミエリン中のmBP の分解を抑制することができたので報告する。

〔材料と方法〕

髄液は心身症(PSD)4例，多発性硬化症(MS)4 例から採取し遠心にて細胞成分を除去し、使用直前まで－70℃に凍結保存した。髄液の一部は酵素を失活させるため80℃, 5 分間加熱処理した。ヒト脳白質よりNortonらの方法によりミエリンを精製し、内在性プロテアーゼを失活させるため80℃,5分間加熱処理した。ミエリン蛋白 200μg に対してヒト髄液50μl を加え、各種プロテアーゼ阻害剤の存在もしくは非存在下で、10mM Tris-HCl,PH 7.5,5mM $CaCl_2$,0.25% Triton X-100 中にて25℃でincubationした。用いたプロテアーゼ阻害剤は各種濃度のFOY305,1mM E-64-a ,1mM EGTA である。Incubation後凍結乾燥し10μg ミエリン蛋白をSDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動した。Coomassie-blue染色後、mBP をdensitometric scanningにて測定した。Incubateしなかったサンプル中のmBP を 100として、incubate後残存するmBP を％で表示した。

〔結果〕　加熱ミエリン中のmBP はPSD 患者髄液とのincubationにより経時的に分解され、intact mBP 残存率は 6hrで47%,15hrで12% であった。(Fig 1,2) 髄液中酵素の至適pHは 7.0であった。(Fig 3) 髄液を予め80℃,5分間加熱することによって mBPの分解は全くおこらなかった。(Fig 4, Ln.3) FOY305を 1μM,10μM, 100μM,1mM 濃度で各々incubationに加えると10μM 以上でmBP の分解は抑制され，100μM では85% のintactmBP が残存した。1mM E-64-a,1mM EGTA では全く抑制できなかった。(Fig 4) 。MS患者髄液によるBPの分解はPSD 患者群に比して亢進している例がみられた。

〔考察〕ヒト中枢ミエリンにはmBP の分解、Myelin-Associated Glycoprotein(MAG) のd-MAG へ変換する内在性の中性プロテアーゼが存在し[6)]　CANP阻害剤であるE-64-aでその作用が抑制されることが報告されている[7)]。この酵素は80℃,5分間加熱で失活するので、今回示した加熱ミエリン中のmBP

分解は髄液中の酵素によると思われる。mBP 分解産物はゲル電気泳動上約14K に主バンド，約12K 副バンドを形成している。これは髄液中酵素のmBP への作用部位の特異性を示唆していると思われる。FOY305（一般名 メシル酸カモスタット． $C_{20}H_{22}N_4O_5 \cdot CH_3SO_3H$ MW494.52）は膵炎や播種性血管内凝固の治療剤として開発されたものでトリプシン，プラスミン，トロンビン，血漿カリクレインに強い阻害活性を有しており、ペプチドやエステルの塩基性アミノ酸（L-アルギニン，L－リジン）のカ

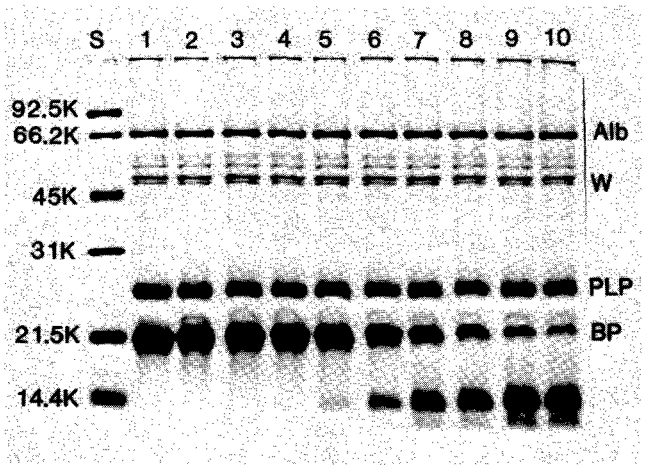


Fig.1 Degradation of mBP in human myelin as a function of incubation time. Sample in lane **1** was from myelin suspension frozen without incubation,whereas the incubation times for the samples in other lanes were **2**,0.5 **3**,1h **4**,2h **5**,4h **6**,6h **7**,8h **8**,10h **9**,12h **10**,15h. Each lane were loaded with 10μg *myelin protein*. Molecular weight standards indicated are in the left lane. Alb,Albmin W,Wolfgram protein PLP,Proteolipid protein BP,Basic protein

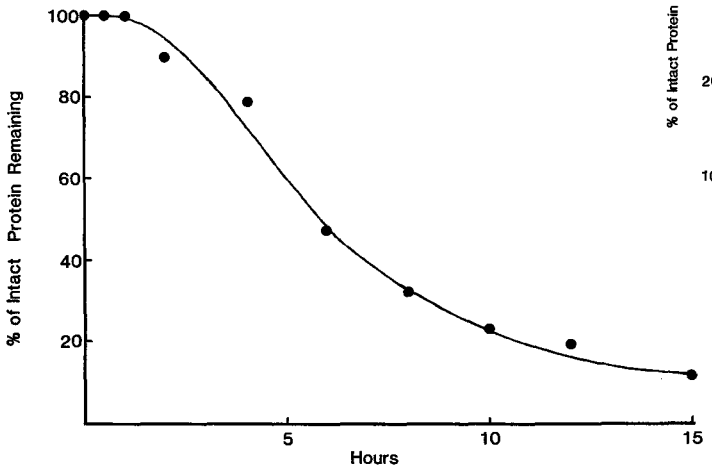


Fig.2 Time course of mBP degradation

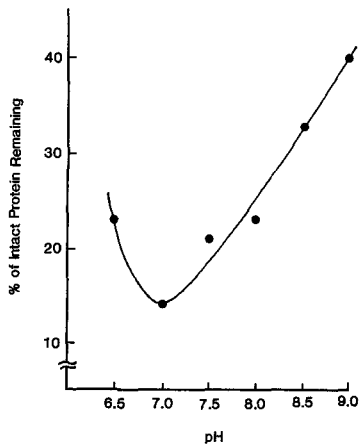


Fig.3 Effect of pH on degradation of mBP. Myelin suspension buffers were adjusted to pH from 6.5 to 9.0 and incubated for 8hrs.

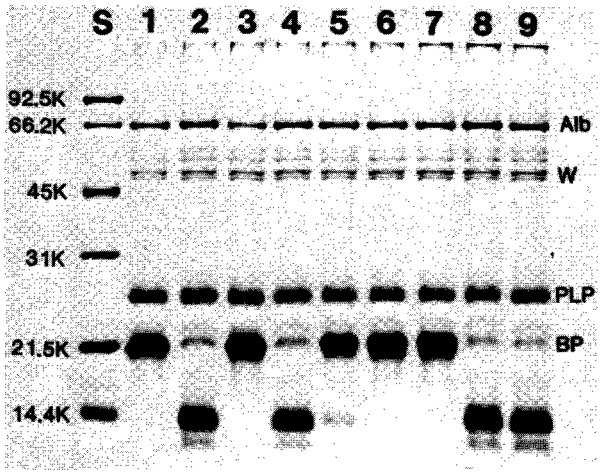


Fig.4 Effect of various concentration of FOY305,E64-a and EGTA on degradation of mBP. Heated human myelin was incubated for 15hrs. at 25℃ with cerebrospinal fluid in 10mM Tris-HCl buffer pH 7.5 containing 0.25%Triton X-100 and 5mM CaCl. Protease inhibitor was added to some incubations. Each lane was loaded with 10ug myelin protein. lane 1, Before incubation. lane 2, No protease inhibitor. lane 3, CSF was heated at 80℃ for 5min. No prote e inhibitor. lane 4,1μM FOY305. lane 5, 10μM FOY305. lane 6, 100μM FOY305. lane 7, 1mM FOY305. lane 8, 1mM E64-a. lane 9, 1mM EGTA Molecular weight standards indicated are in the left lane. Alb,Albmin: W,Wolfgram protein:PLP,Proteolipid protein:BP,Basic protein.

ルボキシル側を切断する酵素に対して特徴的に作用する[8]。E-64-aやEGTAがmBPの分解を抑制せず、FOY305が抑制したことは、既に知られているようにセリンプロテアーゼが髄液中に存在していることを示している。FOY305は10～100μMの濃度でmBPの分解を抑制しているが、この濃度は、通常投与量で少なくとも血中では到達できるものであり、また、毒性が低く安全であることより、in vivoでプロテアーゼ阻害剤として広く用いることができると思われる。

MSにおける脱髄巣は脳室近傍に多いため[1]、髄液中の因子が関わっている可能性が考えられている。MSの髄液において中性プロテアーゼ活性が高まっているとする報告もあるが[4]、我々のMS例でもmBP分解活性が亢進している例がみられ髄液中の酵素が脱髄に関与している可能性が示唆された。

〔文献〕

1)Adams CWM.(1977) Br.Med.Bull. 33,15-20
2)Alvord EC Jr. et al.(1979) Ann.Neurol. 6,474-482
3)Cuzner ML.et al.(1978) Ann.Neurol. 4,337-344
4)Riekkinen PJ. & Rinn UK.(1968) J.Neur.Sci. 7,97-106
5)Rinne UK. & Riekkinen P.(1968) Acta Neurol. Scand. 44,156-167
6)Sato S. et al.(1982) J.Neurochem. 39,97-105
7)Sato S. & Miyatake T.(1982) Biomed.Res. 3,461-464
8)Tamura Y. et al.(1977) Biochim.Biophys.Acta 484,417-422

186. DA および GABA 関連薬物によるラット視床下部－下垂体系 Prolyl endopeptidase 活性の変化

富山貴美・岡田正路・越谷和雄*・加藤　武
（東京工大・生命化学，金沢大・医・第二生理*）

〔要　約〕

Prolyl endopeptidase(Pro-EP)の生理的意義を解明する目的で、DAおよびGABA関連薬物の体性投与によりラット視床下部一下垂体系のPro-EP活性がどのように変化するかを調べた。

下垂体前葉におけるPro-EP活性は、視床下部のカテコールアミン量とは対照的に、レセルピンにより上昇し、パージリンにより減少した。またハロペリドールやスルピリドによっても活性の上昇がみられ、ハロペリドールの急性投与では用量依存的に上昇したが、長期投与では逆に減少傾向を示した。下垂体後葉および視床下部ではこれらの薬物による変化はみられなかった。

一方ピクロトキシンによるPro-EP活性の減少が下垂体後葉でみられ、この作用はジアゼパムの前処置によりブロックされた。下垂体前葉および視床下部では変化はなかった。

以上の結果から、下垂体におけるPro-EP活性は、前葉ではDAレセプター、後葉ではGABAレセプターを介した調節を受けていることが示唆される。

Key word：　Hypothalamo-hypophyseal system, Prolyl endopeptidase

視床下部一下垂体系には数多くのペプチドホルモンが存在し、それらは下垂体門脈を介して前葉に至る向下垂体前葉ホルモン(TRH, LHRH, somatostatinなど)と、神経性の下垂体後葉ホルモン(vasopressin, oxytocin)とに大別される。これらホルモンのほかに、視床下部には noradrenaline (NA)、DA、serotonin などのモノアミンやGABAなどが高濃度に存在しており、これらが下垂体前葉あるいは後葉ホルモンの分泌に関与している可能性が示されている(4,7)。また substance P, neurotensin, CCK, enkephalin などの神経ペプチドも視床下部や下垂体後葉においてその存在が報告されている(6)。これらの神経ペプチドやホルモンにはプロリンを含むものが比較的多く、その活性調節、代謝にPro-EPが関与していることは充分考えられる。またPro-EPはニューロン内に存在することが明らかとなっているので(2,5)、本研究ではPro-EPの生理的意義を解明する目的で、DAおよびGABA関連薬物の体性投与により、ラット視床下部一下垂体系のPro-EP活性がどのように変化するかを調べた。

【 実験方法 】

実験にはWistar系雌性ラット(150～220 g)を用いた。

薬物処理　レセルピン(2.5 mg/kg,s.c.)投与後6時間で、ハロペリドール(2 mg/kg,i.p.)またはスルピリド(200mg/kg,s.c.)投与後3時間でラットを断頭した。パージリン(80 mg/kg,i.p.)はレセルピン投与30分前に投与した。急性投与の実験ではいろいろの量(0.5, 1, 2 mg/kg,i.p.)のハロペリドールを投与して6時間後に断頭し、長期投与の実験では同様の量のハロペリドールを1日1回、3週間投与した。またハロペリドール投与後いろいろの時間(90,180,360分)でラットを断頭し、Pro-EP活

性の経時変化を調べた。ピクロトキシン(2.5 mg/kg,s.c.)は断頭の30分前に、ジアゼパム(10 mg/kg, i.p.)はピクロトキシン投与15分前に投与した。対照群ラットには相当量の生理食塩水を投与した。

断頭後、氷上で視床下部、下垂体前・後葉をすばやく取り出し、−80℃に保存した。これを10mM NaPB(pH7.2) 中でホモジナイズし、以下の測定に用いた。

カテコールアミンの定量　視床下部ホモジネートの一部を終濃度0.2Mの過塩素酸中に加え、2000×gで15分間遠心したのち、得られた上清を用いてHPLC−ECD法により定量した。カラムは μBondapak C18、移動相には5%アセトニトリル、400mg/ℓ ヘプタンスルホン酸ナトリウムを含む0.1Mクエン酸ナトリウム緩衝液(pH3.64) を用いた。

ペプチダーゼ活性の測定　Pro-EP, Leucyl aminopeptidase(Leu-AP), Arginyl endopeptidase(Arg-EP)活性の測定は、Koshiyaら(2)の方法に従った。

【 結果 】

カテコールアミン量の変化　視床下部のDAおよびNA量は、レセルピン投与によりそれぞれ89%、88%減少し、パージリン投与によりそれぞれ65%、68%上昇した。パージリンの前処置はレセルピンによる減少をDAは対照の51%まで、NAは73%まで回復させた。

Pro-EP活性の変化　下垂体前葉におけるPro-EP活性はレセルピンにより22%上昇し、パージリンにより11%減少した。パージリンの前処置はレセルピンによる上昇を抑えるばかりでなく、むしろパージリン単独投与と同様の減少(18%)をもたらした(Fig.1A)。またハロペリドールやスルピリドによっても活性の上昇(それぞれ35%、24%)がみられた。ハロペリドールの急性投与では用量依存的に上昇したが(Fig.1B)、長期投与では逆に減少傾向を示した。ハロペリドールによる活性の上昇は投与後90分ですでにみられ、その後360分までほぼ一定の活性を保っていることがわかった。下垂体後葉および視床下部ではこれらの薬物による変化はみられなかった。

一方ピクロトキシンによる活性の減少(25%)が下垂体後葉でみられ、この作用はジアゼパムの前処置によりブロックされた(Fig.2)。下垂体前葉および視床下部では変化はなかった。

他のペプチダーゼ(Leu-AP, Arg-EP)については、いずれの部位においてもハロペリドールによる有意な変化はみられなかった。

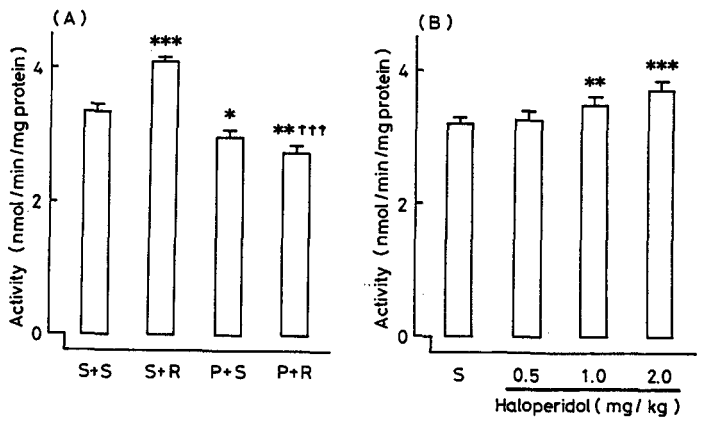


Fig.1. Effects of DA-drugs on Pro-EP activity in anterior pituitary lobe.
S:saline
R:reserpine
P:pargyline
means±S.E.M. (n=5)
* $p < 0.05$,
** $p < 0.01$,
*** $p < 0.001$ vs S+S
+++ $p < 0.001$ vs S+R

【 考察 】

以上の結果から、下垂体におけるPro-ＥＰ活性は、前葉ではＤＡレセプター、後葉ではＧＡＢＡレセプターを介した調節を受けていることが示唆される。

視床下部のＤＡは下垂体門脈を介して前葉での prolactin 分泌を抑制している可能性が示されている(7)。これに対しＴＲＨは prolactin 分泌を促進させるといわれている(1)。下垂体のPro-ＥＰはＴＲＨの代謝に関与していることが推定されており(3)、もしＤＡレセプターの刺激によるPro-ＥＰ活性の減少が分泌細胞からのPro-ＥＰの放出によるものだと考えるならば、ＤＡは prolactin 分泌細胞に直接作用してその分泌を抑えるとともに、Pro-ＥＰを放出させてＴＲＨの代謝を活発にすることにより間接的にその抑制作用を増強しているのかもしれない。あるいは別の可能性として、Pro-ＥＰ活性の減少がPro-ＥＰ合成の減少を意味しているとすれば、この活性の減少はＴＲＨ代謝の減少につながり、結果的にＤＡによる抑制とＴＲＨによる促進とを拮抗させることによって prolactin 分泌の微妙な調節が行なわれていると考えられる。

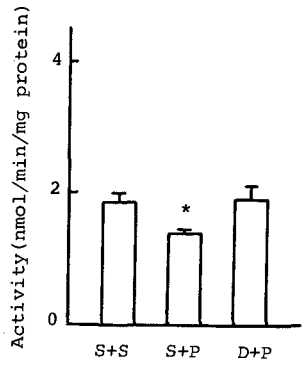


Fig.2. Effects of GABA-drugs on Pro-EP activity in posterior pituitary lobe.
S:saline
P:picrotoxin
D:diazepam
means±S.E.M. (n=5)
* $p < 0.05$ vs S+S

前葉におけるＤＡと同様、ＧＡＢＡは後葉においてホルモン分泌を調節している可能性があり(4)、一方Pro-ＥＰは後葉ホルモンの vasopressin や oxytocin、さらには後葉での存在が報告(6)されている substance Ｐや neurotensin などを in vitro で水解することが知られているので(8)、後葉でのPro-ＥＰはＧＡＢＡの刺激に応じてこれらの神経ペプチドやホルモンに作用しているのかもしれない。

視床下部一下垂体系におけるPro-ＥＰの生理的意義については現段階でははっきりしたことはいえないが、この酵素がニューロン内に存在することや(2,5)、他のペプチダーゼ活性が薬物により変化しなかったことから考えて、下垂体のPro-ＥＰはホルモンの調節に関与しているのであろうと思われる。

【 文献 】

1．Gersherngorn, M.C.(1982) Mol.Cell Biochem. 45, 163-179
2．Koshiya, K., Kato, T., Tanaka, R. and Kato, T.(1984) Brain Res. 324, 261-270
3．Kreider, M.S., Winokur, A. and Kreider, N.R.(1981) Neuropeptides 1, 455-463
4．Oertel, W.H., Kopin, I.J., et al.(1982) Proc.Natl.Acad.Sci.USA 79, 675-679
5．Okada, M. and Kato, T.(1985) Neurosci.Res. in press
6．塩谷 弥兵衛 編 (1985)「目で見る脳の構造と活性物質」厚生社 190-195
7．Weiner, R.I. and Ganong, W.F.(1978) Physiol.Rev. 58, 905-976
8．芳本 忠，鶴 大典 (1984) 蛋白質 核酸 酵素 29, 127-133

187. 牛大脳皮質のゴルジ体：分離と特性化

宇佐美美穂子・門田朋子*・門田　健
（東京都精神研・神経化学，千葉大・医・解剖*）

〔要　約〕

牛，大脳皮質よりゴルジ体の分離を試みた。大脳皮質を０．３２Ｍショ糖溶液でゆるくホモジナイズしたのち遠心して得たミトコンドリア後上清画分を１６，０００ｇ，３０分遠心して沈澱を採取した。この沈澱を軽く懸濁し，２０－４１％の連続ショ糖密度勾配遠心分離（６０，０００ｇ，２時間）にかけた。ゴルジ体の標識酵素である，galactosyl transferaseおよび，sialyl transferase活性を測定すると，ショ糖濃度２６－３４％の層に高かった。ホモジネートの比活性と比較すると各々５－６倍，９－１１倍濃縮されていた。この分画にゴルジ体が多く集まっていると思われたのでゴルジ分画とした（Ｇ分画）。Ｇ分画について他の細胞内小器官の標識酵素活性を測定し，各々ホモジネートの比活性と比較すると，cyt.c oxidase ０．０５倍，monoamine oxidase ０．２倍，Na,K-ATPase ０．３倍，acid phosphatase １．４倍，cyclic AMP phosphohydrolase ０．３倍，choline phosphotransferase ３．５倍，NADPH-cyt.c reductase ０．４倍であった。

Key word： Golgi apparatus, Bovine brain cortex, galactosyl transferase

ゴルジ体はゴルジ層板と，その周辺に存在するゴルジ小胞およびゴルジ空胞より成る複合体であり，外分泌細胞においては，分泌蛋白質，リソゾーム蛋白質，形質膜蛋白質などの細胞内移行の選別に重要な役割を果している。特に肝細胞においてよく研究されており(4,6,7)，ここで多くの蛋白質が糖鎖付加，燐酸化，硫酸化といった修飾を受けることが明かにされてきた。

一方，脳を含む神経組織もよく発達したゴルジ体をもつことが知られているが，神経組織のゴルジ体の役割については余り報告されていない(2)。そこで，私達はその機能を追究する目的で，脳よりゴルジ体の分離を試みた。

実験方法

１．ゴルジ体の分離

牛，大脳皮質をミンチした後，５倍量の０．３２Ｍショ糖－１％デキストランを加え，ゆる目のPotter-Elvehjem 型テフロンホモジナイザー（クリアランス，０．０２６inchs)を用いてホモジナイズする（９００rpm，３回）。この上清を１，０００ｇで１０分間遠心して上清を集め，この上清を１０，０００ｇで２０分間遠心する。得られた上清をさらに１６０，０００ｇで３０分間遠心して沈澱を集め，ゆるい手動ホモジナイザーを用いてホモジナイズして

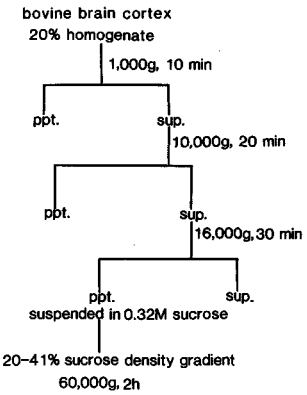


Fig. 1 Purification of Golgi membranes from bovine brain

０．３２Ｍショ等溶液に懸濁させる。次にこの懸濁液を２０％から４１％の連続密度勾配ショ糖に重積し，６０，０００gで２時間遠心する。遠心後，一定量ずつ採取し，OD 280の吸光度をモニターし，そのパターンにより７分画に分取する。各々の分画を遠心で濃縮した後，各細胞内小器官の標識酵素活性を測定した。（図 2）

２．標識酵素の活性測定法

（１）Galactosyl transferase：ovomucoid を基質にしてAndersson (1) の方法で測定した。（２）siaryl transferase：asialo- α_1-acid glycoprotein を基質として，Paulson ら (9) の方法で測定した。（３）Cerebroside sulfo-transferase: galactocerebrosideを基質にしてFleischer ら (5) の方法で測定した。（４）choline-phosphotransferase：Possmayer ら (10) の方法で測定した。

Markers	Homogenate	10,000g, sup.		16,000g, ppt.	
	SA	RSA	%	RSA	%
Galactosyl-transferase	1.04 nmol/mg/h	1.64	40.5	3.0	18.0
Sialyl-transferase	2.35 nmol/mg/h	1.8	41.2	3.3	15.7
Galactocerebroside sulfotransferase	1.0 nmol/mg/h	0.67	14.8	0.81	3.1
NADPH Cyt. c reductase	12.7 nmol/mg/min	0.9	15.2	0.3	3.1
Choline phosphotransferase	0.11 nmol/mg/min	1.7	36.3	1.2	7.2
Cyt. c oxidase	50.0 nmol/mg/min	0.4	9.2	0.7	5.2
Monoamine oxidase	94.1 u/mg	0.4	8.5	0.8	4.0
Na, K-ATPase	57.5 nmol/mg/min	0.5	26.3	1.3	5.4
Cyclic AMP phosphohydolase	4.42 μmol/mg/min	0.3	6.0	0.4	1.8
Acid phosphatse	1.06 nmol/mg/min	1.9	20.3	1.8	10.9
Protein			18.4		4.8

Table 1 Distribution of enzyme activities among the subcellular fractions obtained by differential centrifugation from bovine cerebral cortex
SA: specific activity, RSA: relative specific activity

結果および考察

はじめの三段階の遠心操作によって得られた画分について種々の細胞内器官の標識酵素活性を測定したのが表１である。ゴルジ体の標識酵素である galactosyl transferase活性および，sialyl transferase活性は共に１０，０００g，２０分と１６，０００，３０分の間の沈澱画分に各々３．０，３．３倍濃縮されてくる。もう一つのゴルジ体標識酵素であると言われているcerebroside sulfotransferase活性 (5) は上記二酵素と異なった分布を示している。最近，sulfotransferase活性がミクロゾーム分画にも存在している

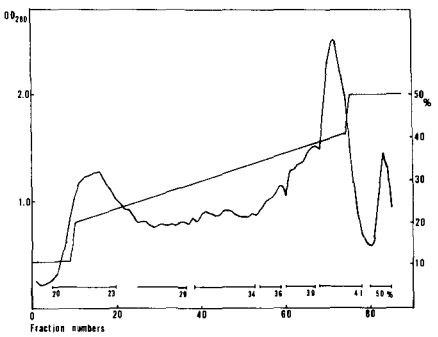


Fig. 2 Fractionation of 16,000g precipitate of bovine brain by contineous sucrose gradient centrifugation

Fractions	Markers			
	Galactosyl-transferase	Sialyl-transferase	Sulfo-transferase	Protein
Fr. I				
RSA	0.6	0.25	0.26	
%	1.8	1.8	0.8	4.6
Fr. II				
RSA	6.2	11.2	4.0	
%	43.4	42.0	39.3	14.7
Fr. III				
RSA	5.05	9.94	4.35	
%	23.2	24.6	28.0	9.3
Fr. IV				
RSA	1.02	2.38	0.9	
%	9.6	12.0	11.9	19.0
Fr. V				
RSA	1.06	1.16	0.60	
%	6.5	3.9	5.3	12.6
Fr. VI				
RSA	0.75	1.13	0.53	
%	12.6	10.2	12.4	33.8
Fr. VII				
RSA	0.86	1.86	0.48	
%	2.8	3.3	2.2	6.6

Table 2 Distribution of Golgi marker enzymes in the fractions purified by sucrase density gradient centrifugation
Fr. 1: 22-23%, Fr. 2: 26-29%, Fr. 3: 30-34%, Fr. 4: 35-36%, Fr. 5: 37-39%, Fr. 6: 40-41%, Fr. 7: 50%
%: percent of activity in all the fractions

との報告(8)もあるので，そのことによるかもしれない。一方，ミトコンドリアの標識酵素は０．７，０．８倍，ミエリンのそれは０．４倍，ミクロゾームのそれは０．３，１．２倍，リソゾームのそれは１．８倍であった。以上により，１６，０００ｇの沈澱画分を粗ゴルジ分画とし，シヨ糖連続密度勾配遠心分離にかけ純化を試みた。図２は密度勾配遠心分離をおこなったチューブから一定量ずつ分取し，２８０ｎｍの吸光度をモニターしたものである。吸光度のピークを参考に２２－２３％（Ｆｒ．１），２６－２９％（Ｆｒ．２），３０－３４％（Ｆｒ．３），３５－３６％（Ｆｒ４），３７－３９％（Ｆｒ．５），４０－４１％（Ｆｒ．６），５０％（Ｆｒ．７）の７分画に分け各細胞内小器官の標識酵素活性を測定した。表２は上記７分画のゴルジ体の標識酵素活性の分布を示している。galactosyl transferase, sialyl transferase 共，ほぼ同一の分布を示しており２６－２９％，および３０－３４％の両分画に粗ゴルジ分画の総活性のほぼ７０％が集まっている。またホモジネートに比べてgalactosyl transferaseでは約５－６倍，sialyl- transferase では約１０－１１倍の活性上昇がみられた。表３は他の器官の標識酵素活性について調べたものである。Ｇ分画に混入してくると思われる主な酵素は，acid phosphataseとcholine phosphotransferaseである。acid phosphataseについてはゴルジ体自体に含まれているとする報告 (3) もあり，すべてリソゾームの混入によるものとは判定できない。またcholine phosphotransferaseはミクロゾームの標識酵素であるとされているが，もう一つのミクロゾーム酵素であるNADPH-cyt.c reductase の分布よりもゴルジ分画への混入が高い。Ｇ分画へのミクロゾームの混入度についてはさらに検討が必要であると思われる。

Markers	Fractions													
	Fr. I		Fr. II		Fr. III		Fr. IV		Fr. V		Fr. VI		Fr. VII	
	RSA	%	RSA	%	RSA	%	RSA	%	RSA	%	RSA	%	RSA	%
NADPH Cyt. c reductase	0.2	0.2	0.2	0.8	0.4	1.1	0.5	0.9	0.2	0.3	0.2	0.6	0.3	0.4
Choline cranaferase	2.9	0.6	4.1	1.1	3.5	0.9	3.5	1.0	2.4	0.5	1.3	0.4	0.9	0.1
Cyt. c oxidase	-	0	-	0	0.05	0.1	0.3	0.5	0.5	0.7	1.0	3.6	0.3	0.4
Monoamine oxidase	0.07	0.02	0.1	0.3	0.2	0.4	0.4	0.7	0.5	0.7	1.3	4.2	0.9	0.9
Na, K-ATPase	0.5	0.2	0.5	0.6	0.3	0.3	0.5	0.3	0.5	0.3	0.9	1.1	0.4	0.2
CMPase	1.0	0.5	0.4	0.7	0.1	0.2	-	0	0.04	0.03	0.07	0.14	0.2	0.16
Acid phosphatase	0.8	0.3	1.1	1.7	1.7	2.2	0.9	0.8	1.4	1.0	0.8	4.5	0.7	0.4
Protein	0.24		0.71		0.66		0.95		0.63		1.7		0.33	

Table 3 Distribution of other subcellular markers in the fractions purified by sucrose density gradient centrifugation

%: percent of activity recovered in all the fractions from total homogenate

参考文献

1. Andersson, G.N., and Eriksson, L.C. (1981) J. Biol. Chem. 256, 9633-9639
2. Deshmukh, D.S., Bear, W.D., and Soifer, D. (1978) Biochim. Biophys. Acta 542, 284-295
3. Farquhar, M.G., Bergeron, J.J., and Palade, G.E. (1974) J. Cell Biol. 60, 8-25
4. Fleischer, B., Fleischer, S., and Ozawa, H. (1969) J. Cell Biol. 43, 59-79
5. Fleischer, B., and Zambrano, F. (1974) J. Biol. Chem. 249, 5995-6003
6. Ikehara, Y., Oda, K., and Kato, K. (1976) Biochem. Biophys. Res. Commun. 72, 319-326
7. Morre, D.J., Hamilton, R. L., Mollenhauer, H.H., Mahley, R.W., Cunningham, W.P., Cheetham, R.D., and LeQuire, V.S. (1970) J. Cell Biol. 44, 484-491
8. Munakata, H., Isemura, M., and Yoshizawa, Z. (1985) J. Biol. Chem. 260, 6851-6856
9. Paulson, J.C., Beranek, W.E., and Hill, R.L. (1977) J. Biol. Chem. 252, 2356-2362
10. Possmayer, F., Duwe, G., Hahn, M., and Buchnea, D. (1977) Can. J. Biochem. 55, 607-617

188. 神経切断縫合および交叉縫合に伴う長指伸筋，ヒラメ筋の β-エノラーゼ含量の変動

松下秀典・加藤兼房*・佐藤豊彦

（愛知学院大・歯・生理，愛知県コロニー研・生化*）

〔要　約〕

速筋である長指伸筋と遅筋であるヒラメ筋の筋特異型βエノラーゼ含量がラット坐骨神経切断縫合によってどう変るかを調べた。また、両筋を支配している神経を交叉縫合し、5ケ月後、自発運動の認められたラットについても同様の分析を行った。

結果；

(1)正常長指伸筋のβエノラーゼ平均含量は、760 pmol/mg protein で、ヒラメ筋（150 pmol/mg protein）の5倍であった。

(2)坐骨神経切断縫合後の長指伸筋では、対照の約53％まで低下した後回復し、20週で76％の値を示した。ヒラメ筋では、対照の70％まで低下した後上昇し、300 ％の高値を示した。坐骨神経完全切断群では、両筋中の含量は持続的に減少し、12週で、長指伸筋180 pmol/mg 、ヒラメ筋 80 pmol/mg であった。

(3)神経交叉縫合5ケ月後に、長指伸筋では、対照の約50％に減少し、ヒラメ筋では約 250％まで上昇し、神経切断縫合群と同様の傾向を示した。

(4)筋β型エノラーゼの濃度を決定する要因について考察を加える。

Key word：　Cross-innervation, Muscles, Enolase,

動物組織に分布するエノラーゼは、3種類のサブユニット（α、β、γ）よりなる2量体で、γエノラーゼ（αγとγγ）は、主に神経細胞と神経内分泌細胞に分布し、βエノラーゼ（αβとββ）は、心筋と骨格筋に局在する（1）。我々は、ラット坐骨神経切断による切断末梢側γエノラーゼ含量の減少（2，3）と、筋のβエノラーゼ含量の減少（4，5）について報告してきた。今回、坐骨神経切断縫合後における末梢側γエノラーゼ含量と、筋（長指伸筋とヒラメ筋）のβエノラーゼ含量の変動、及び、両筋を支配している神経を交叉縫合した後の筋βエノラーゼ含量の変動について報告する。

［　実験方法　］

(1)坐骨神経切断縫合：ウイスター系ラット（♂、体重約 250ｇ）の一側坐骨神経を大腿神経と腓骨神経の分岐間で完全に切断し、10-0ナイロン糸にて、3又は4糸神経上膜縫合を行った。2～20週経過後、縫合部中枢側約1cmの部位を双極電極で刺激し、同心針電極を用いて誘発筋電図を導出した。縫合部中枢及び末梢側坐骨神経と長指伸筋・ヒラメ筋を採取した。対照として反対側で同様の刺激・記録を行い、坐骨神経及び同名筋を採取した。各組織は、5 mM $MgSO_4$を含む10倍量の 0.05 Mリン酸ナトリウム（pH 7.0）中でホモジェナイズし、15000g・20分間遠沈上清を得て、すでに報告した高感度エンザイムイムノアッセイ系（5，6）を用いて、エノラーゼアイソザイムを分析した。(2)神経交叉縫合群：長指伸筋・ヒラメ筋の支配神経を筋より 2～5 mm中枢側で切断し、スポンジェル小片上にて神経断端を接触させ、絹糸を神経に添え、再

びスポンジェル小片で被い、フィブリン糊を用い固定した。5ケ月経過後、交叉縫合側下肢が指開扇反射と自発運動を示したラットのみを選び、坐骨神経刺激を行い、誘発筋電図を記録した。対照として反対側に同様の操作を行った。

［ 結果 ］

(1)神経切断縫合群：坐骨神経切断縫合側下肢の指開扇反射と自発運動は、20週経過後においても認められなかった。坐骨神経刺激による誘発筋電図は、6週目より記録され、その潜時は、各筋ともに次第に短縮し、外側腓腹筋では、6週の時点で3.15±0.82 msec、20週で2.05±0.14 msec、長指伸筋では、6週で4.23±0.54 msec、20週で2.15±0.053 msecであった。対側同名筋では、それぞれ、1.54±0.24、1.72±0.22、1.61±0.17 msec であつた。

坐骨神経の縫合中枢側、末梢側、対側のγエノラーゼ含量の経時的変化を図1に示す。切断縫合中枢側のγエノラーゼ含量は、対側の坐骨神経中のそれ（平均約27 pmol/mg protein）とほぼ同様の値を示した。切断縫合末梢側でのγエノラーゼ含量は、2週の時点で対側の約10%の値となったが、次第に上昇傾向を示し、20週では、対側の約52%程度まで回復した。類似の結果が神経圧迫損傷後の回復時にも既に観察されている（2，3）。神経切断縫合群と神経完全切断群における、長指伸筋とヒラメ筋のβエノラーゼ含量の変動を図2に示す。切断縫合群では、遅筋であるヒラメ筋は、2週で対照（平均約150 pmol/mg protein）の約70%まで低下した後、次第に上昇し、20週で約 300%の値を示した。速筋線維よりなる長指伸筋では、2週で対照（平均約

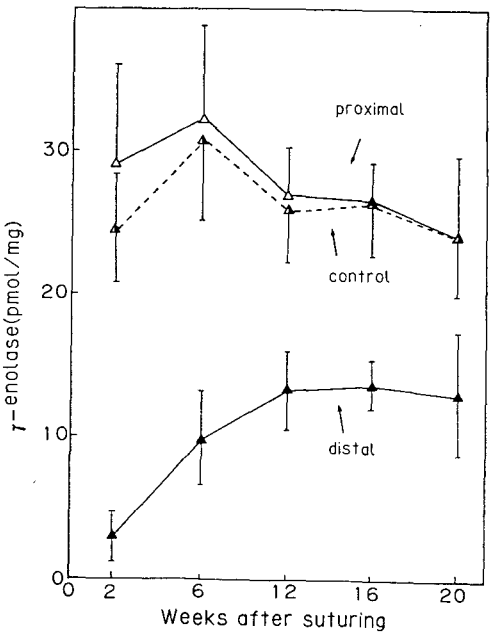


Fig. 1. Levels of γ-enolase in the sciatic nerves. Each point is the mean and SD of 5 or 6 animals.

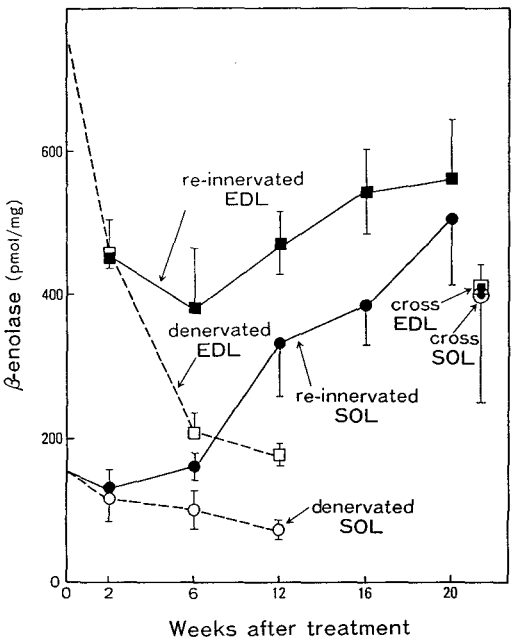


Fig. 2. Levels of β-enolase in extensor digitorum longus (EDL) and soleus (SOL). Each point is the mean ± SD of 5 - 6 rats.

760 pmol/mg protein）の約53％と大きく低下した後、徐々に回復し、20週で76％まで回復し、ほぼ停滞傾向を示した。神経切断群では両筋ともβエノラーゼ含量は持続的減少傾向を示したが、12週の長指伸筋では正常ヒラメ筋と同程度の濃度のβエノラーゼが存在した。⑵神経交叉縫合群：神経交叉縫合側下肢において、開扇反射・自発運動が対側と同程度まで回復したラットの誘発筋電図の潜時は、長指伸筋・ヒラメ筋ともに対側と同程度の値を示した。5ケ月後のβエノラーゼ含量は、ヒラメ筋では、対照（平均約 150 pmol/mg protein）の約2.5 倍の高値を示したが、長指伸筋では、対照（平均約 760 pmol/mg protien）の約½の低値で、神経切断縫合群と同様に、両筋中のβエノラーゼ含量は同一レベルに近づいた。

［ 考察 ］

神経切断縫合群において、縫合後、誘発筋電図が記録できるようになり、その潜時も次第に正常に近付く傾向が認められたが、自発運動が認められないため、機能的再生は、20週では、まだ不十分と思われる。また坐骨神経末梢側のγエノラーゼ含量も52％までの回復度であったことを考えると、γエノラーゼ含量は機能的再生と平行関係があることが示唆された。筋内βエノラーゼ含量が、長指伸筋とヒラメ筋で20週後に同一レベルになったが、縫合部で神経再生が無差別化し、ヒラメ筋が他の下肢筋支配の神経にも支配され、高値を示し、逆に長指伸筋では、ヒラメ筋など遅筋を支配していた神経にも支配されるようになり、低値を示し、結果的に同一レベルになったと考えられる。交叉縫合群において、交叉縫合側の下肢が機能的に対側とほぼ同様にまで回復したのは、ヒラメ筋・長指伸筋のmotoneuronが、高位中枢の支配を受け、新しい状況に適応したためと思われる。交叉縫合20週の時点では両筋のβエノラーゼ含量は切断縫合群と同様、同一レベルを示しているが、さらに長期にわたる観察を行えば、βエノラーゼ含量が逆転する可能性があり、βエノラーゼ含量の調節機構を含めて興味ある問題である。

［ 文献 ］

1） 加藤兼房、蛋白質・核酸・酵素 29、1101-1116 、1984
2） 加藤兼房、佐藤豊彦、神経化学 21、165-167 、1982
3） Kato, K. and Satoh, T. J. Neurochem., 40, 1076-1081, 1983
4） 加藤兼房、清水温子、仙波禮治、佐藤豊彦、神経化学 23, 442-444, 1984
5） Kato, K., Shimizu, A., Semba, R., and Satoh, T. Biochim. Biophys. Acta, in press.

189. ラット脳型クレアチンキナーゼ（CK-BB）の高感度イムノアッセイ系：単離プルキンエ神経細胞体での測定

加藤兼房・鈴木富士子・清水温子・篠原春夫*・仙波禮治**
（愛知県コロニー研・生化，島根医大・解剖*，愛知県コロニー研・周生期**）

〔要　約〕

A）ラット脳型CK-BBの高感度EIA系を作製した。(1)ラット脳からCK-BBを精製し，ウサギに免疫して抗血清を得た。抗血清の特異抗体をCK-BB結合セファローズカラムを用いて精製した。(2)抗体IgGをペプシンで処理して$F(ab')_2$フラグメントを調製し，$F(ab')_2$を結合させたポリスチレン球と，β－ガラクトシダーゼで標識したFab′よりなるサンドイッチEIA系を作製した。(3)測定系は高感度で0.1pg（1amol＝1×10^{-18}mol）の超微量のCK-BBが測定できた。測定系はCK-MM，ニューロン特異γγエノラーゼとは全く反応しなかったが，CK-MBとは約10%交叉反応し，Bサブユニット（CK-B）の測定系であった。

B）CK-Bは大脳（約13 μg／mg タンパク）より小脳（約22 μg／mg），脳幹（約17μg／mg）で高値を示した。しかし末梢組織にも広く検出測定され，とくに消化管，膀胱など平滑筋組織で脳と同程度の高値を示した。

C）免疫組織化学的検索で，中枢神経組織のCK-Bはおもにグリア細胞に検出されたがプルキンエ細胞を含む一部のニューロンも染色された。

D）ラット小脳をバルク分離した画分からプルキンエ細胞体を顕微鏡下で拾い上げ，CK-B量を測定すると細胞体一個の含量は平均1.64pgであった。

Key word：Immunoassay, Creatine kinase BB, Single neuron

〔序論〕細胞質に存在するクレアチンキナーゼ（CK）は分子量約4万の二種類のサブユニット（BとM）からなる二量体で，CK-BB，CK-MB，CK-MMの三種類のアイソザイムがある。MM型は骨格筋に，MB型は心筋に分布するのに対し中枢神経組織には酸性蛋白であるBB型が存在する。しかし脳における細胞種局在性については，astrocyteに局在しニューロン中には分布しないという報告[1]と，ニューロン，グリア両細胞種に広く分布しているとする報告[2]がある。一方末梢神経の軸索流中でCK-BBはγγエノラーゼなどと複合体を形成して移動していること[3]が観察されている。これら酸性蛋白の神経機能に果たす役割を明らかにすることを目標に，すでに完成したラットγγエノラーゼの高感度EIA系[4,5]と同様，単一細胞体中の含量が測定できるラットCK-BBの測定系を確立し，プルキンエ細胞体中の含量を測定すると同時に，種々の組織におけるCK-BBの分布を調べたので報告する。

〔実験方法〕CKの精製と抗体の作製：BBはラット脳よりGrace & Roberts[6]の方法に準じて精製した。MMは骨格筋からKeuteleら[7]の方法に準じて純化した。最終標品はいづれもSDS-PAGEで単一バンドを示した。MBは，精製したBBとMMを混ぜ，解離・再会合させて合成し，BB，MMと分離調製した[8]。精製したBBを完全アジュバントとともにウサギに注射して抗血清を得た。抗血清に含まれる抗体IgGは，CK-BBを不溶化したセファローズカラムを用いて吸着，溶離して精製した。抗血清100mlにつき約30mgの抗体IgGが得られた。EIA系の作製と測定操作：抗体$F(ab')_2$をポリスチレン球（φ3 mm）に結合させた固相[9]と抗体Fab′－ガラクトシダーゼ複合体[10]（Fab′-Gal）はすでに報告している方法にて調製した。抗体結合球一個と標準CKを含む反応液（0.1

mℓ）に加え，4°C で6時間振とう（第一反応）。球は洗った後，Fab′-Gal 1mU を含む 0.1 mℓの反応液中に移し，4 ℃で一夜振とうした（第二反応）。球上に結合した Gal 活性の測定は 4-methylumbelliferyl-β-D-galactoside を基質として使い，産生した 4-methylumbelliferone を蛍光光度計で測定した[4,5]。組織抽出液中の CK-BB の測定の際には，第一反応は液量 0.5 mℓ，30℃で5時間行い，第二反応は液量 0.2 mℓ(Fab′-Gal 2mU)で 4 ℃一夜静置した（conventional assay）。プルキンエ細胞体の単離採集と組織抽出液の調製：18日齢ラット小脳より Sellingerらの方法[11]でバルク分離した画分からナイロン糸ループで顕微鏡下で拾い出し，シリコンゴム円板（⌀3×1 mm）に移し，細胞数を確認後，シリコンゴム円板ごと Falcon culture plate 3041 の穴に入れ，−80℃で凍結保存した。細胞は室温で融解し，再び凍結・融解させてから各穴に100μℓのG液（10mMリン酸ナトリウム，pH 7.0，含，0.1％BSA，0.5％ゼラチン水解物，0.3 M NaCl，0.1％NaN_3）を，続いて抗体結合球を加えて CK-BB を測定した。各組織は10倍量の50mMリン酸ナトリウム，pH 7.0，含，5mM $MgSO_4$ 中でホモジナイズし，20000 g，20分間遠心上清を得て，これをG液で100～1000倍稀釈後，その10μℓを CK-BB 測定系に加えた。免疫組織化学的染色：精製抗体 IgG を用いて，間接法にて行った。

〔実験結果〕 図1に CK-BB 測定系の検量線と，MB，MM および γγエノラーゼとの交叉性を示した。測定系は B サブユニット（CK-B）に特異的で，BB 以外に MB とも約10％交叉反応した。しかし MM，γγエノラーゼとは全く交叉しなかった。測定系は高感度で，最小検出限度は 0.1 pg（1 amol）であった（$p<0.01$）。この測定系を使ってラット各組織における CK-B を定量した結果を表1に示した。中枢神経系では全可溶性蛋白

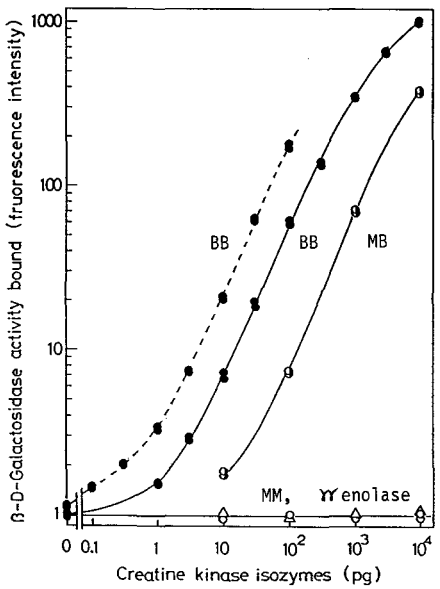


Fig. 1. Standard curves and cross-reactivity of CK-BB assay. ---●---, for single-cell assay; ——●——, for conventional assay

Table I. Concentrations of CK-B in rat CNS and peripheral tissues

Tissues	CK-B (μg*/mg soluble protein)
cerebral cortex	13.3 ± 0.8
cerebral white matter	12.0 ± 0.9
cerebellar cortex	18.4 ± 1.9
cerebellar white matter with nuclei	26.0 ± 2.0
brain stem	17.3 ± 3.1
urinary bladder	25.6 ± 3.2
stomach	12.4 ± 2.7
small intestine	7.47 ± 0.67
esophagus	1.15 ± 0.06
tongue	0.799 ± 0.077
diaphragm	0.119 ± 0.007
leg muscle	0.060 ± 0.020
heart	0.075 ± 0.077
liver	0.101 ± 0.010
lung	0.487 ± 0.168
kidney	0.873 ± 0.055
spleen	0.604 ± 0.066
testis	0.194 ± 0.036
adrenal	0.784 ± 0.251
thyroid	0.516 ± 0.098
xiphoid process	0.874 ± 0.184
epididymal adipose tissue	0.789 ± 0.233

Each value is the mean ± SD of 5 samples obtained from 5 male adult rats. *CK-BB-equivalent.

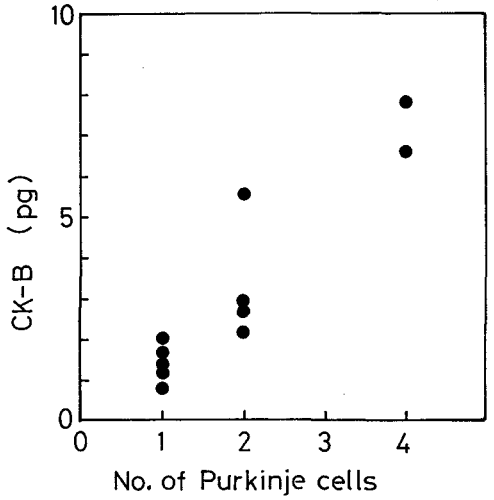
の1%以上を占め(>10 μg/mgタンパク),とくに小脳に多い傾向が認められた。末梢組織でも検出測定され,膀胱,消化管など平滑筋組織で高値を示した。中枢神経組織におけるCK-Bの細胞種局在を免疫組織化学的にしらべると,グリア細胞(astrocyte),一部の神経細胞,脈絡業上皮細胞にCK-Bが染色された。図2のように大部分のプルキンエ細胞細胞質も染色されたので,個々のプルキンエ細胞体中のCK-B量の測定を試みた。その測定結果を図3に示した。測定系に加えた細胞数に対して測定されたCK-B量をプロットすると,細胞数にほぼ比例してCK-B量が増加した。図3の測定結果から計算すると,プルキンエ細胞体一個あたり平均1.64 pgのCK-Bが存在した。

〔考察〕 単一細胞体レベルでの測定が可能なラットCK-Bの高感度EIA系について記したが,この系で標識酵素として使用しているGalの活性検出最小限度が測定条件下で約1 amolであること[12]から考えると,測定系は無駄なくほぼ理想的に機能していると云える。事実,同じ測定システムを利用したニューロン特異性γγエノラーゼのEIA系も最小検出限度が1 amolであった[4,5]。脳にはCK-MM,MBがほとんど存在しないことから,プルキンエ細胞体で測定された値はCK-BB量と考えられる。また細胞体1個あたり1.64 pgの値はγγエノラーゼ含量(0.53 pg)[5]の約3倍に相当するが,ラットの日齢,系統などが異なるため直接比較することはできない。免疫組織化学的実験結果もastrocyte以外にニューロンも一部CK-B陽性染色を示すことから,CK-BBがastrocyteの特異的マーカー抗原ではないことが明らかになった。また大部分のプルキンエ細胞はCK-BBをを含有するのに対し,海馬等の神経細胞はわずか一部の細胞だけがCK-BB陽性を示すことに興味を引かれた。

Fig. 2. Immunostaining of Purkinje cells.



Fig. 3. Assay of CK-B in the isolated Purkinje cells



REFERENCES: **(1)** Thompson RJ, Kynoch PAM & Sarjant J, Brain Res 201, 423-426, 1980. **(2)** Yoshimine T, Morimoto K, Homburger HA & Yanagihara T, Brain Res 265, 101-108, 1983. **(3)** Brady ST & Lasek RJ, Cell 23, 515-523, 1981. **(4)** Suzuki F, Semba R & Kato K, Biochem Int 3, 67-71, 1981. **(5)** Kato K, Suzuki F & Semba R, J Neurochem 37, 998-1005, 1981. **(6)** Grace A & Roberts R, Clin Chim Acta 123, 59-71, 1982. **(7)** Keutel HJ, Okabe K, Jakobs HK, Ziter F, Maland L & Kuby SA, Arch Biochem Biophys 150, 648-678, 1972. **(8)** Willson VJC, Jones HM & Thompson RJ, Clin Chim Acta 113, 153-163, 1981. **(9)** Kato K, Hamaguchi Y, Okawa S, Ishikawa E, Kobayashi K & Katunuma N, J. Biochem 81, 1557-1566, 1977. **(10)** Kato K, Methods Enzymol 92, 345-359, 1983. **(11)** Sellinger OZ, Legrand J, Clos J & Ohlsson WG, J Neurochem 23, 1137-1144. **(12)** Ishikawa E & Kato K, Scand J Immunol 8, Suppl No 7, 43-55, 1978.

190. 成熟ラットニューロン核におけるDNAトポイソメラーゼⅠ及びⅡの存在

筒井公子・桜井弘子・庄盛敏廉・筒井　研*・小田琢三*
（岡山大・医・脳研・病態生化，癌研・生化*）

〔要　約〕

ラット全脳から精製核（unfractionated nuclei）を得、これをさらに分画してglial nucleiとし、分画前後でトポイソメラーゼⅠ及びⅡの活性を調べたところ、unfractionated nuclei, glial nuclei ともに両酵素活性が認められた。活性の強さも分画前後で大きな変化はなかった。neuronal nuacleiにこれらの酵素が存在するかどうかを調べるため、granule neuron由来の核が全体の核の７０％を占めると報告されている小脳を用いて、neuronal及びglial nucleiを調製し、トポイソメラーゼⅠ及びⅡの活性を測定した。その結果、neuronal nuclei にはトポイソメラーゼⅠばかりでなくⅡも存在することが判明した。活性はglial nucleiの約1/2 - 1/4 であった。これらの活性がＤＮase によるものではなくトポイソメラーゼによるものであることは、Topo Ⅰにおいては、基質に用いたpBR322からlinking numberの異なるトポアイソマーが生じたことから、またTopo Ⅱ においては、キネトプラストＤＮＡのdecatenation反応がＡＴＰ依存性であることにより示された。

Key word : topoisomerases / nuclei / brain

成熟したneuronが非分裂性細胞であることは最近のＰ．Ｒａｋｉｃの研究によっても再確認された(1)。これを裏づける事実として、ＤＮＡ複製に関係するＤＮＡpolymeraαの活性がneuronでは出生前に高く、出生後急速に低下し、成熟後はほとんど消失することが知られている(2)。しかし個体の寿命に近い長期にわたって機能を続けるneuronには、ＤＮＡ修復に働く諸酵素が保持されている必要があると思われる。事実、ＤＮＡpolymeraseβ(2)、ＤＮase (3)、ＤＮＡ ligase (4)の活性がneuron核に見出されており、in vitroにおけるUV-induced repair ＤＮＡ合成の存在も報告されている(2)。

細胞ＤＮＡの複製、組み換え、転写の機構を考える上で、ＤＮＡの高次構造（スーパーコイル）の変化を無視することはできない。この過程に直接関与している酵素にＤＮＡトポイソメラーゼがある。この酵素はＤＮＡ鎖上に一過性の切断を入れ、再結合を行うことによってＤＮＡのlinking numberを変化させる。片方だけのＤＮＡ鎖を切断するトポイソメラーゼⅠと両ＤＮＡ鎖を切断するトポイソメラーゼⅡとが知られている。その生理機能に関しては明らかでない点が多いが、主として原核生物を用いた研究により、ＤＮＡの複製、転写、挿入、組み換えなどの反応に関与する可能性が示唆されている。真核細胞においても本酵素が見出され(5,6)、以後、種々の細胞に広くその存在が認められた。しかし脳ではトポイソメラーゼⅠの存在が報告されているのみで(7)、トポイソメラーゼⅡに関してはその存在さえ調べられていない。我々はラット脳、とくにneuronにおけるこれら酵素の活性の有無を調べ、興味ある結果を得た。

［方法］核の調製　６週齢のオスＳＤラット全脳を用い、組織を直接2.2 M sucrose 中で破壊し、70,000xg，１時間遠心後、精製核を得た。精製核標品をさらにsucrose のstep gradient にかけ高純度のglial nucleiを調製した(8)。neuronal nuclei は、ＳＤラットの小脳から、上記方法により精製核標品、step gradient を経て調製、同時に小脳　glial nucleiも得た。

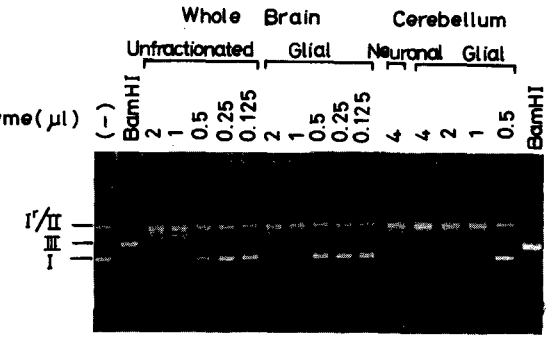


Fig.1　DNA topoisomerase I activity in NaCl extracts of rat brain nuclei.

トポイソメラーゼの抽出　各核標品を20 mM Tris-HCl (pH 7.5), 0.3 M NaCl, 400 mM β-mercaptoethanolで抽出し、13,000 x g で５分間遠心して上清を得た。

トポイソメラーゼ活性の測定　トポイソメラーゼＩ（Topo I）の活性はpBR322ＤＮＡとともに核抽出液を３０℃で４０分間incubateした後、１％アガロースゲル電気泳動にかけ、supercoiled ＤＮＡ（Ｉ型）のrelaxed ＤＮＡ（Ｉ' 型）への変換を観察することにより調べた。Topo II 活性はCrithidia fasciculata より調製したキネトプラストＤＮＡ（kDNA）を基質として0.5 mM ATP存在下でincubateし、ethidium bromide を含む１％アガロースゲルでdecatenationにより遊離されたminicircleを

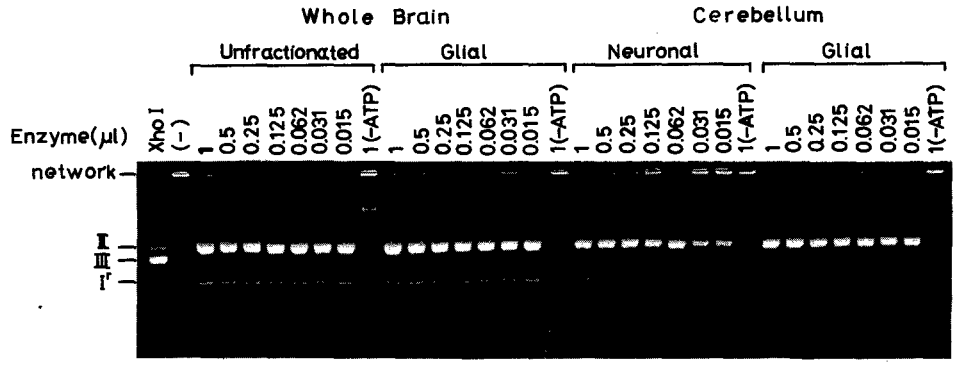


Fig.2　DNA topoisomerase II activity in NaCl extracts of rat brain nuclei.

検出することにより行った。

［結果］　トポイソメラーゼＩ　全脳よりの精製核（unfractionated nuclei）とglial nuclei，小脳のneuronal nuclei とglial nucleiにおける活性を比較した（図１）。核抽出液の２倍希釈列を作り一定量を反応系に加えた（以下加えた抽出液の絶対量で表現する）。Glial nucleiの抽出液では全脳、小脳ともに１μｌでほとんどすべてのＩ型をＩ' 型に変換した。Unfractionated nuclei では1/2 μｌでも弱い活性が認められた。Neuronal nuclei は他に比べ活性が低く、抽出液２μｌ添加では活性は認められず、Ｉ型の完全な消失に４μｌを要した。

トポイソメラーゼII　抽出液の希釈はTopo Iに準じて行った。すべての核標品でTopo II の活性が認められた（図2）。Unfractionated nuclei,glial nucleiのいずれの抽出液も、1/64μlですべてのkDNAのnetwork（ゲル上端に残る）をdecatenateした。Neuronal nuclei の抽出液は1/16μlまでは完全なdecatenationをおこしたが、1/32μl以下では部分的なdecatenationにとどまった。いずれの核分画でも、decatenation活性はＡＴＰdependentであった。Neuronalとglial nucleiの Topo II 活性をさらに比較するため、小脳より得た両核画分を抽出処理した後、希釈実験を行った（図３）。Neuronal nuclei 抽出液では1/4 μl で、glial nuclei抽出液では1/8 μl で活性が検出されなくなった。以上より、neuronal nuclei の抽出液にはglial nucleiの抽出液の1/2 - 1/4 のTopo II 活性が含まれていることが示唆された。

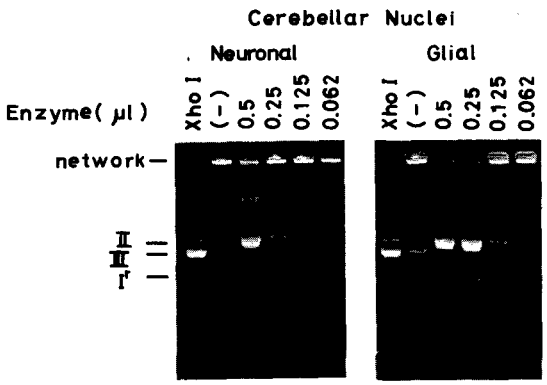


Fig.3 Comparison of DNA topoisomerase II activity in NaCl extracts of neuronal and glial nuclei isolated from rat cerebellum.

［考察］　脳の全核分画をsucrose 密度勾配遠心によりさらに分画する方法はいくつか考案されているが、いずれの方法を用いても精製度の高いneuronal nucleiを得ることは困難である。しかし、ラット小脳では７０％の核がgranule neuronの核で占められ、oligodendrocyte の核はわずかに８－９％を占めるに過ぎない(9) ところから、小脳より得られたneuronal nuclei 標品へのglial nucleiのcontaminationはわずかであると考えられる。従って、小脳のneuronal nuclei で検出されたTopo I及びII活性（glial nucleiの約1/2 -1/4）はneuronal nuclei 由来のものであることが示唆される。また、検出された活性がＤＮaseによるものではないことは、linking numberの異なる一連のtopoisomerがみられること（Topo I），反応が完全にＡＴＰdependent であること（Topo II ）により示されている。

この報告はneuronにおけるトポイソメラーゼIIの存在を示唆する最初のものである。この酵素は特にＤＮＡ複製に密接に関与していると考えられているので、非分裂細胞であるneuronの核に本酵素活性が保存されているという今回の結果は、Topo II のＤＮＡ複製以外での生理的機能を暗示する知見である。ＤＮＡ複製をおこなわないという意味でより単純な系であるneuronを用いることはTopo I及びIIの生理的役割を探る上で有用なアプローチであると思われる。

neuronal nuclei の調製法について有用な助言をいただいた桑野良三博士、高橋康夫教授（新がた大・脳研）及び山本博　博士（岡大・第一内科）に感謝いたします。

References 1)Rakic,P. (1985) Science 227,1054-1055. 2)Waser,J., Hubscher,U., Kuenzle,C.C., and Spadari,S. (1979) Eur.J.Biochem. 97, 361-368. 3)Inoue,N., Ono,T., Kato,T. (1979) Biochem.J., 180, 471-480 4)Inoue,N., and Kato,T. (1980) J.Neurochem. 34, 1574-1583. 5)Champoux,J.J., Dulbecco,R. (1972) Proc.Natl.Acad.Sci.USA, 69, 143-146. 6)Liu,L.F., Liu,C.C., Alberts,B.M. (1980) Cell, 19, 697-707. 7)Ivanov,V.A., and Melnikov,A.A. (1984) FEBS Lett., 177, 300-304. 8)Ozawa,H., Kushiya,E., and Tkahashi,Y. (1980) Neuroscience Lett. 18, 191-196. 9)Zagon,I., and McLaughlin,P. (1979) Brain Res., 170, 443-457.

191. 脳のミオシン重鎖上のカゼインキナーゼⅡに対する燐酸化部位の存在領域の同定

松村末夫・村上規子・安田誠治・田代裕子・公文　明
(佐賀医大・生化)

〔要　約〕

脳のミオシンをカゼインキナーゼⅡと〔γ－^{32}P〕ＡＴＰとを用いて燐酸化するとミオシンの重鎖成分に放射性燐酸が取込まれる。このミオシンをパパインやキモトリプシンで限定消化し、ミオシン分子の頭部や尾部などから生ずる幾種かの断片のどの断片中に放射性燐酸が含まれるかを分析することにより、ミオシン重鎖上の燐酸化部位の存在領域を決定した。その結果、燐酸化部位は、重鎖（200Kダルトン）の尾部側末端の約５Ｋダルトンの領域内に存在する事が判明した。また、この小領域とミオシン分子の他の部分との接合部は、高濃度の塩溶液（0.24Ｍ以上のＫＣｌ）中ではプロテアーゼによって消化され易く、低濃度の塩溶液（0.16Ｍ以下のＫＣｌ）中では消化されにくい。この接合部は、低濃度の塩溶液中に１０ｍＭ程度のMg^{2+}が存在すると、さらに、消化されにくくなる。これらの結果は、イオン強度やMg^{2+}の濃度の変化に伴ってこの接合部付近の立体構造が変化する事を示唆すると共に、さらに、尾部末端の小領域がその燐酸化・脱燐酸化反応を通じてミオシン分子の立体構造の決定に関与し得る可能性を示唆するものである。

Key word：

Brain Myosin Heavy Chain, Phosphorylation Site, Casein Kinase II

アメーバーや粘菌など、幾種かの微生物のミオシンでは、その生理活性が重鎖成分の燐酸化・脱燐酸化を通じて調節される事が知られている。さらに、Acanthamoeba のミオシンⅡでは、燐酸化部位が重鎖の尾部末端付近の特徴的な領域（Tail Piece）上に存在する事が示され、この領域とその燐酸化・脱燐酸化がミオシンのフィラメントの安定性や ATPase 活性の調節に重要な役割を担うことが明らかになってきた[1]。一方、幾種かの高等動物組織のミオシンの重鎖成分も燐酸化される事が知られているが、その役割や燐酸化酵素や燐酸化部位など、不明の点が多い。私共は、脳のミオシンの重鎖を燐酸化する酵素を分離精製し、この酵素が、既知のカゼインキナーゼⅡ（ＣＫⅡ）と同一の酵素である事を示した[6]。また、ＣＫⅡは、脳や副腎など一部の非筋肉組織のミオシンの重鎖を燐酸化し、骨格筋や心筋、平滑筋などのミオシンの重鎖を燐酸化しない事から、この燐酸化が脳組織を含むごく一部の非筋肉組織のミオシンの調節に関与する可能性が生じている[6]。さらに、一方で、脳のミオシンが筋肉組織のミオシンとは明らかに異なった構造と性質を備えたミオシンである事も明確になりつつある[4]。今回、脳のミオシンの重鎖上のＣＫⅡに対する燐酸化部位の存在領域の同定を行なったので報告する。

〔実　験　方　法〕

ミオシンとＣＫⅡを牛脳から以前に報告した方法で精製した[3,6]。このミオシンとＣＫⅡとを、２０ｍＭトリス－塩酸（ｐＨ8.0）、0.3ＭＫＣｌ、５ｍＭ$MgCl_2$、１ｍＭＥＧＴＡ、0.5ｍＭ〔γ－^{32}P〕ＡＴＰを含む溶液中で３０℃で３０分間インキュベートし、重鎖成分を燐酸化し、ＥＤＴＡを２０ｍＭになるように加えて反応を停止した。次に、このミオシンを0.1ＭＫＣｌと１ｍＭＥＤＴＡを含む２０ｍＭイミダゾール緩衝液（ｐＨ7.0）に透析し、ミオシンとＫＣｌおよび$MgCl_2$の濃度をそれぞれ１ｍｇ／ｍｌ、0.10～0.36Ｍ、０～３０ｍＭに調整した後、パパインあるいはキモトリプシンに

よる消化を30℃で0～60分間行なった。次いで、これらの消化物に対してSDS存在下のポリアクリルアミドゲル電気泳動（SDS－PAGE）[2]とオートラジオグラフィーを行なった。

〔実験結果〕

^{32}Pで標識した脳のミオシンを低濃度（1／5000）のパパインで消化すると、200K（ダルトン）の重鎖は、約155Kと約70Kのペプチドに分解した（Fig. 1）。155Kのペプチドは、さらに、150Kと5Kのペプチド、または、135Kと24Kのペプチド、あるいは130K、24K、5Kのペプチドへと分解した。24Kと5KのペプチドはDye Front（DF）の位置に含まれている。一方、200K重鎖中の放射性燐酸は、155Kのペプチド中に回収され、次いで135Kと5Kのペプチド中に移行した。脳のミオシンをキモトリプシン（1／5000）で消化すると200K重鎖は、約155Kと約70Kのペプチドに分解した。155Kのペプチドは、さらに150Kと5Kのペプチドに分解した。（Fig. 1）。放射性燐酸は、主として155Kのペプチドに見出され、次いで5Kのペプチドに回収された。

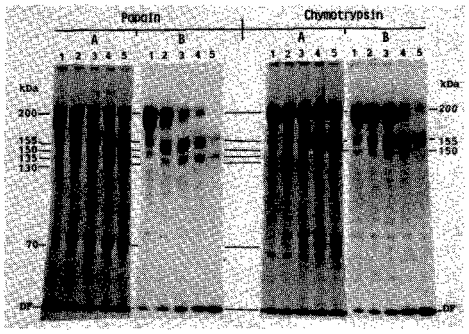


Fig. 1. Fragmentation of ^{32}P-labeled brain myosin heavy chain by papain and chymotrypsin as revealed by SDS-PAGE and autoradiography. A, Coomassie Blue-staining; B, autoradiogram. Incubation time: 1, 0 min; 2, 5 min; 3, 15 min; 4, 60 min; 5, 15 min. Myosin/protease: 5000/1 (1-4); 1000/1 (5). KCl concentration: 0.1 M (1-4); 0.6 M (5).

以前に報告した通り[5]、パパインやキモトリプシン消化で生じた150Kのペプチドは、ミオシン分子の頭部の一部と尾部の大部分とを構成しているペプチドであり、パパイン消化によりこのペプチドから頭部の一部に相当する24Kペプチドと尾部の大部分に相当する130Kペプチドが生じている。また、155Kと135Kのペプチドは、150Kや130Kのペプチドと同様0.1MKCl中では不溶性であったが、一方、5Kペプチドは可溶性であった。さらに、放射性燐酸を含んだ155Kと135Kのペプチドは、放射性の5Kペプチドと、それぞれ150Kと130Kの非放射性のペプチドとを生ずると共に、155Kペプチドは、放射性の135Kペプチドをも生じ得る事から、この放射性燐酸を含む5Kのペプチドは150Kや130Kのペプチドの C 末端側、即ち、ミオシンの尾部末端に由来するものであると推定した。

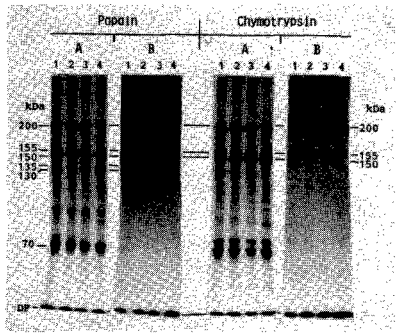


Fig. 2. Effect of KCl concentration on the formation of the phosphorylated 155- and 135-kDa peptides from the heavy chain by papain and chymotrypsin. A, Coomassie Blue-staining; B, autoradiogram. KCl concentration: 1, 0.10 M; 2, 0.16 M; 3, 0.24 M; 4, 0.36 M. Myosin/protease: 2000/1. Incubation time: 20 min.

脳のミオシンをそれぞれ0.10M、0.16M、0.24M、0.36MのKCl中でパパインにより消化すると、いずれの場合も、155K、150K、135K、130K、70Kなどのペプチドが生じたが、155Kと135Kのペプチドの相対的な生成量（または残存量）と放射性燐酸の含量は、0.10Mと0.16MのKCl中で消化を行なったもののほうが、0.24Mと0.36MのKCl中で消化を行なったものよりも多かった（Fig. 2）。キモトリプシン消化の場合も生じた155Kペプチドの量とその放射

性燐酸含量は、0.10Mと0.16MのKCl中で消化を行なったもののほうが、0.24Mと0.36MのKCl中で消化を行なったものよりも多かった。次に、ミオシンをそれぞれ5mM、15mMおよび30mMの$MgCl_2$を含む0.1MKCl中でパパインによって消化した場合、いずれの濃度の$MgCl_2$でも155K、150K、135K、130K、70Kのペプチドが生じたが、155Kと135Kのペプチドの相対的な生成量と放射性燐酸の含量は、5mMの$MgCl_2$存在下での消化物よりも15mMと30mMの$MgCl_2$存在下での消化物のほうが多かった（Fig. 3）。

〔 考 察 〕

脳のミオシン重鎖上のCKⅡに対する燐酸化部位とパパインやキモトリプシンによる切断部位（1, 2, 3）との関係および消化により生ずる各ペプチド断片とをFig. 4. に示している。脳のミオシンの燐酸化部位は尾部末端の約5K程度の領域内に存在する事が明らかになったが、この結果は、AcanthamoebaのミオシンⅡの結果とよく似ており[1]、脳のミオシンの尾部末端の5K領域は、AcanthamoebaミオシンⅡや Nematodeのミオシン[5]に見出された Tail Pieceに相当する領域であると予測される。また、この小領域のN末端付近の接合部（切断部位3）のプロテアーゼによる被消化性は、0.16Mと0.24MのKClの間で大巾に変化したが、この変化は、ミオシン分子の状態変化、即ち、フィラメントの形成と解離に関連したものであると予想される。さらに、この接合部の被消化性の変化は、Mg^{2+}の濃度の変化によっても生じたが、骨格筋のミオシンの接合部（HMM／LMM junction）でも同様の変化が認められており[7]、この脳のミオシンの接合部が骨格筋のミオシンの接合部と同様にミオシン分子の立体構造の決定に関与し得るものと予想される。

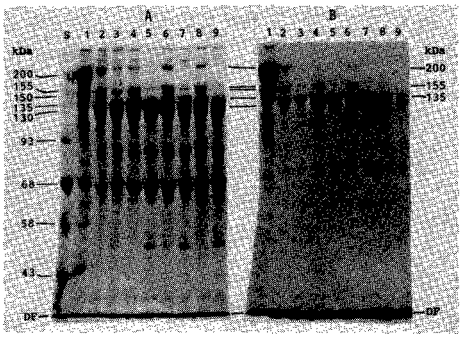


Fig. 3. Effect of Mg^{2+} concentration on the formation of the phosphorylated 155- and 135-kDa peptides from the heavy chain by papain. A, Coomassie Blue-staining; B, autoradiogram. KCl concentration; 0.1 M. $MgCl_2$ concentration: 5 mM (1-3,8,9); 15 mM (4,5); 30 mM (6,7). Time of digestion: 0 min (1); 15 min (2,4,6,8); 60 min (3,5,7,9). Myosin/protease: 1000/1 (1-7); 600/1 (8,9).

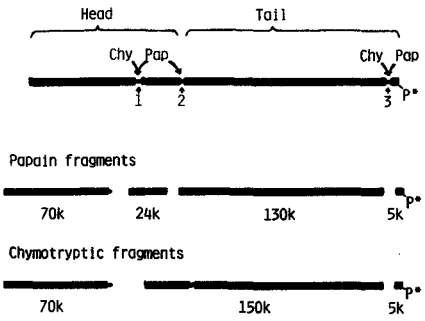


Fig. 4. Localizations of the phosphorylation site (P*) for CK II and cleavage sites by papain (Pap) and chymotrypsin (Chy) on the brain myosin heavy chain, and the proteolytic fragments generated.

〔 文 献 〕

1. Côté, G.P., Robinson, E.A., Appella, E., & Korn, E.D. (1984) J. Biol. Chem. 259, 12781-12787.
2. Laemmli, U.K. (1970) Nature (Lond.) 227, 680-685.
3. Matsumura, S., Murakami, N., Yasuda, S., & Kumon, A. (1982) Biochem. Biophys. Res. Commun. 109, 683-688.
4. Matsumura, S., Kumon, A., & Chiba, T. (1985) J. Biol. Chem. 260, 1959-1966.
5. McLachlan, A.D. & Karn, J. (1982) Nature (Lond.) 299, 226-231.
6. Murakami, N., Matsumura, S., & Kumon, A. (1984) J. Biochem. (Tokyo) 95, 651-660.
7. Persechini, A., & Rowe, A.J. (1984) J. Mol. Biol. 172, 23-39.

人名索引（ABC順）

［数字は掲載ページを示す］

（A）

阿部政則…… 325
阿部輝雄…… 427
Agoston, D. V. …… 151
相内敏弘…… 352
Alvord, E. C. Jr. …… 313
天野武彦…… 376・475
安藤正人…… 187・382
案納直子…… 484
安楽茂己…… 328・484
青木英子…… 199
青野幸子…… 364・553
Appel, S. H. …… 493
荒井裕一朗…… 166
朝倉幹雄…… 139・145
芦野伸彦…… 34
阿相皓晃…… 217・403

（B）

馬場広子…… 49・574
Bauer, S. …… 505

（C）

Cacabelos, R. …… 337

（E）

枝松礼…… 106・343

（F）

藤井敏弘…… 523
藤木嘉明…… 451
藤本昇…… 322
藤尾慈…… 496
藤沢仁…… 526・565
藤城正敏…… 79・232
藤田忍……43・274・301
藤原道弘…… 271
藤原豊…… 454・541
深谷公昭…… 340
福田賢司…… 541
福田尚久…… 532
福田美衛…… 280
福井裕行…… 148
福永浩司…… 529
福岡高宏……223・238・292・388
福島正登…… 343
船瀬広三…… 190
松津邦比古…… 409・412
古川宏…… 259・340
古田知久…… 238
不破野誠一…… 457

（G）

Giacobini, E. …… 370
Gorio, A. ……484
後藤恵…… 319

（H）

芳賀和子…… 247
芳賀信幸…… 508
羽賀誠一…… 235・367
芳賀達也…… 247
灰本元…… 40
浜口勝彦…… 373
原厚…… 55
原普二夫…… 397
原健二…… 160
原田俊樹…… 541
原田寧…… 217
播口之朗…… 31・337
長谷川和夫…… 139・145
長谷川武史…… 109
橋本泰道…… 109・460
橋本誠一…… 481
橋本規…… 502
橋本恒一…… 103
波多江靖之…… 466
畠中寛…… 385・487
畑中道代…… 70
早石修……70・322・376
林要喜知…… 472
林祐一…… 376
緋田芳樹…… 232
姫野明彦…… 463
平井基陽…… 460
平松緑…… 106・196・343
平野均…… 559
平野誠…… 559
平野修助…… 217・403
平田洋子…… 169
平山栄一…… 538
広瀬由起子…… 28・163・415・418・448
桧山隆司…… 268
Hogan, E. L. …… 373
本田千穂…… 223・292・388
Hong, J. S. ……436
堀真一郎…… 382
Hosobuchi, Y. …… 439
細川武…… 373
堀田和泉…… 154

（I）

市川宏伸…… 433
市村徹…… 37
井田修二…… 193
五十嵐道弘…… 64

飯島　節…… 160
伊島正次…… 451
猪狩伸比古…… 463
井川玄朗…… 460
池田正明…… 115・118・124
池田淑夫…… 451
今福　淳…… 139・145
今泉太郎…… 424
今澤正興…… 400
井村裕夫…… 358・442
稲永和豊……328・334・409・412・484
伊野美幸…… 139・145
井上　桂…… 562
井上信博…… 319
井上順雄…… 385
犬塚　貴…… 49・574
入江恵子…… 223・292・388
石橋賢治…… 559
石橋輝雄…… 244
石橋義広…… 484
石田裕一…… 310
石毛　敦…… 106
石原映子…… 391
石井　毅…… 235・367
石川和宏…… 259
石川敏三…… 325
礒辺俊明…… 37
伊藤　裕…… 358
伊藤仁一…… 394・397
伊藤和幸…… 496
岩森正男…… 391
岩田光良…… 382
岩田　悟…… 547

（J）

Jakobs, K. H. ……505
陣崎雅弘…… 232
Jonsson, G. ……484

（K）

加太英明…… 106・196・343
門田　健…… 580
門田朋子…… 580
門脇浩三…… 34
門屋利彦…… 37
梶田三郎…… 448・454・541
柿本泰男…… 25・514
垣内史朗…… 496
郭　哲輝…… 52
亀谷富由樹…… 367
亀山正邦…… 160・544
亀山　勉…… 259・340
上村　宏…… 109
神谷大雄…… 466
神田啓子…… 496
金子元久…… 262
金子武嗣…… 322
金松知幸…… 436
金本和男…… 217
金行孝雄…… 115
寒川賢治…… 556
仮家公夫…… 289
笠原正男…… 307
柏倹重夫……199・304・364・553
粕谷淳子…… 229
片岡泰文…… 271
片山禎夫…… 130・511
加藤兼房… 40・241・304・382・394・553・583・586
加藤　聖…… 220
加藤泰治…… 394・397・553
加藤尚彦…… 379
加藤　武…… 577
加藤智信…… 544
川端昌弘…… 91
川北幸男…… 538
川本立夫…… 514
河村則子…… 517
川崎博己…… 253
川田恵子…… 133
慶野宏臣…… 364
Kies, M. W. …… 313
吉川　潮…… 502
菊地哲朗…… 268
金　長寿…… 370
木村　宏…… 193・349
木村茂樹…… 40
杵鞭宏育…… 166
吉良潤一…… 313
岸本年史…… 460
北島哲子…… 517・520
北村邦男…… 295・346
北村佳久…… 133
北野達郎…… 502
北山　功…… 562
鬼頭ひろ志…… 499
鬼頭昭三…… 130・511
清田義弘…… 208
小林清史…… 91
小井田雅夫……172・175・277・280・421
小池達郎…… 94
小島秀樹…… 328・484
小嶋久子…… 73
児島伸彦…… 46・274
小松　博…… 73
小宮義璋…… 64・298
小森照久…… 562
小長谷初枝…… 181
小西　昭…… 322
紺野邦夫…… 352

越村邦夫…… 544
越谷和雄…… 178·577
胡谷和彦…… 25
好田裕史…… 103
河本純子…… 502
河野雅弘…… 106
高坂新一……79·469·490
工藤玄恵…… 535
工藤佳久…… 376
久我哲郎…… 286
熊谷博道…… 400
熊倉鴻之助…… 202
熊代永…… 262
雲井一夫…… 184
公文明…… 592
倉光正春…… 241
倉岡幸令…… 352
栗原悦雄…… 532
栗原堅三…… 226
栗原正…… 76
栗原照幸…… 556
栗山欣弥……103·193·283·349
黒田広生…… 439
黒田洋一郎…… 508
黒川正則…… 64·298
車地暁生…… 355
桑原武夫…… 568
葛谷博磁…… 481

(L)

李英培…… 289

(M)

前川剛志…… 325
真鍋敬…… 37
Marchalonis, J. J. …… 373
Martenson, R.E. …… 313
正岡昭…… 211·214
増子博文…… 262
増井晃…… 88
増井治憲…… 466
増元圭三…… 253
俣賀宣子…… 100·361
松林弘明…… 130·511
松田友宏…… 211·214
松井英男…… 385
松井宏晃…… 139·145
松角康彦…… 319
松倉茂…… 556
松本孝…… 559
松村末夫…… 592
松尾壽之…… 433·556
松岡一郎…… 226
松下秀典…… 583
松澤健夫…… 307
三原洋祐…… 319
三木直正…… 52·472
御子柴克彦…… 97·232
三野章呉…… 223·292·388
三田浩一…… 97
三ツ汐洋…… 361·433
三輪正人…… 382
三輪直人…… 376
三輪俊明…… 376
三宅正治…… 514
宮本篤…… 250
宮本英七…… 319·529
宮本侃治…… 400
宮村智子…… 139·145
宮下理…… 457
宮武正…… 49·301·568·574
宮崎正夫…… 349
三好理絵…… 130·511
溝部俊樹…… 349
水野昇…… 322
水島淳…… 424
桃井真里子…… 229
桃井隆…… 229
森昭胤…… 28·106·196·343
森浩一…… 538
森井成人…… 358·442
盛政忠臣…… 115·118·124
森野日出緒…… 514
森島義行…… 406
守屋芳夫…… 238
諸井佳代子…… 286
撫井弘二…… 538
村上規子…… 592
村島善也…… 379
武藤紀子…… 217·403
明神徹郎…… 85

(N)

鍋島俊隆…… 259·340
永井克孝…… 391
長池一博…… 79
長尾正嗣…… 154
永岡明伸…… 208
長崎信行…… 121·331·334
永島亮…… 466
永田豊……187·256·382·517
永津俊治…… 169
名川雄児…… 532
中川勇三…… 52
中原辰雄…… 559
中嶋照夫…… 109·460
中村薫…… 559
中村治…… 391
中村重信…… 160·544
中村豊紀…… 136
中村泰治…… 352

中牟田弘道……172·175·277·280·421
中野重行……118·124
中尾純治……109
中尾一和……358·442·451
仲田義啓……406
中里雅光……556
中澤恒幸……112·256·451
中島孝……37
難波経篤……256
難波洋一郎……115
成実重彦……208·532
根岸晃六……220
二本松伊都子……487
新川久義……31
西彰五郎……328·484
西塚泰美……502
西江弘……274
西島樹重……295·346
西川徹……100·265·433
西本詮……238
西村健……31·337
西山芳憲……325
西沢正豊……49
丹羽正美……463
野田行文……310
野田幸裕……259
野口悦子……571
野口鉄也……61·535
野路久仁子……316
野村純一……136·562
野村正彦……157·415
野村総一郎……256
野村靖幸……133
能登直……109·460
貫名至……418

(O)

小原嘉彦……307
小幡邦彦……43·46·274
小田琢三……589
小川篤子……100
小川一寿……196
小川紀雄……28·163·415·418·448·454
荻田喜代一……172·175·277·280·421
小口雅申……121·331
小原美佳……202
小原節子……163
小鹿幸生……493·547
岡部登志男……499
岡田文彦……127
岡田正路……577
岡田三津子……271
岡田尚志郎……115·118·124
岡村邦博……157
岡野栄之……232
奥田千恵子……349
奥田正英……457
奥野幸子……565
奥山真司……112
奥山典生……37
小野剛……163·448
大井健……85
大久保律子……112
大熊誠太郎……103
大本堯史……223·292·388
大西博……538
大沢弘吉……460
大鹿英世……250
大島章子……517·520
大杉武……424
太田尚……463
太田深雪……136
大谷光弘……232·469·490
大月三郎……454·541
王鳳翔……34
王乃平……148
尾崎正若……463

(S)

斎藤昌之……28
斎藤尚亮……184·502
斉藤典子……139·145
斉藤信太郎……73
斉藤寿仁……550
佐治美昭……532
坂部武史……325
坂井田四郎……451
坂本誠……358·442
坂本安……295
坂上元祥……184
迫昭子……205
桜井弘子……589
佐野輝……25
佐野護……517·520
更井啓介……154
佐武明……301·427
佐藤洋美……121·334
佐藤宏……529
佐藤浩……364·553
佐藤勇……61·535
佐藤光源……454·541
佐藤七枝……400
佐藤修三……49·574
佐藤豊彦……583
佐藤嗣道……226
佐和弘基……241
澤温……112
Seeman, P.……142
瀬川富朗……406
関耕治……568

関谷　真…… 205
仙波禮治……199·304·364·586
仙波りつ子…… 58
千丈雅徳…… 244
渋谷治男…… 355
島田明範…… 352
嶋津　孝…… 28
清水温子…… 40·586
篠田友孝…… 235·367
篠原春夫…… 304·586
塩野尚三…… 358
白尾一正…… 121·334
白尾智明…… 46·274
庄盛敏廉…… 91·115·118·124·589
下村千枝子…… 463
Skaper, S. D. …… 58
祖父江憲治……31·34·496·499
須田治彦…… 97
須田光明…… 442
須賀博文…… 160
菅原　照…… 358·442
杉野弘明…… 376
杉崎哲朗…… 61·535
鈴木富士子…… 40·586
鈴木英夫…… 31
鈴木成生…… 268
鈴木孝尚…… 451
鈴木龍雄…… 523
鈴木義徳…… 112

（T）

田平　武…… 400
田渕和雄……223·238·292·388
多田國利…… 31
多賀千明…… 82·88
高垣玄吉郎…… 181
高木博司…… 445
高濱和也…… 187·382
高橋克彦…… 499
高橋　守…… 283
高橋三郎…… 82·85·88
高橋康夫…… 76
高倉公明…… 391
高松　研…… 232
高向和宣…… 328
高野宏美…… 346
高野静子…… 262
高野行夫…… 466
高崎浩一朗…… 253
高島明彦…… 94
高嶋瑞夫……100·265·355·361·433
高山晴彦…… 418
竹田二美代…… 352
竹田　稔…… 352
竹中信夫…… 232
武下　浩…… 325
竹下正純…… 67·550
武富　保…… 55
竹内　宏…… 190
玉井洋一…… 73
田村明敬…… 37
田中千賀子…… 184·502
田中祥裕…… 406
田中恭子…… 397
田中正美…… 49
田中正敏…… 121·331·334
田中　修…… 304
田中　亮……316·394·397·493·523·553
田中敏彦…… 34·496·499
田代朋子…… 298
田代裕子…… 592
俵　哲…… 556
手嶋茂紀…… 409·412
富樫俊二…… 457
徳武　哲…… 235·367
冨田安信…… 193
富山貴美…… 577
融　道男……100·265·355·361·433
遠山育夫…… 544
戸谷重雄…… 232·469·490
豊島　至…… 301
津田　彰…… 121·331·334
都築紀宏…… 430
辻　元宏…… 82·85·88
辻丸秀策…… 121·331·334
辻村良太郎…… 136
塚田裕三……79·97·232·469·490
塚本　徹…… 139·145
津久井弘子…… 487
津島宏美…… 211·214
筒井　研…… 589
筒井公子…… 589
筒井正博…… 268
堤　哲之…… 328·484

（U）

内田修次…… 424
内村英幸…… 559
内富庸介…… 154
内薗耕二…… 274
植田弘師…… 445
植木昭和…… 271
植村慶一…… 295·346
上野隆司…… 376
植田清隆…… 223·292·388
裏出良博…… 322
宇佐美美穂子…… 580
内海　晃…… 352

（V）

Varon, S. …… 58

(W)

和知　学…… 457
和田　博…… 148・337
渡辺雅幸…… 142
渡辺建彦…… 148・337
渡辺恭良…… 70
渡辺康裕…… 505
渡辺洋子…… 163
Whittaker, V. P. …… 151

(Y)

藪内洋一…… 268
柳内　努…… 262
山田勝士…… 466
山田清文…… 268
山田茂人…… 328・484
山田敬行…… 358
山上　栄…… 538
山口和政…… 259
山口知子…… 151
山本彰夫…… 301
山本　純…… 211・214
山本正彦…… 547
山本亘彦…… 478
山岡巧一…… 256
山下　正…… 31
大和谷　厚…… 337
山内あい子…… 289
山内　卓…… 526・565
山脇成人…… 154
柳川耕作…… 154
柳川右千夫…… 427
安田誠治…… 592
保田好信…… 268
横尾秀康…… 328・484
米田幸雄……172・175・277・280・421
吉田　博…… 424
吉田一成…… 469・490
吉田　敏…… 67・550
吉田　茂…… 259
吉村和法…… 295
吉岡純二…… 223・292・388
湯浅龍彦…… 568
湯元　昇…… 70

神経科学 NEUROSCIENCE RESEARCH

The Official Journal of the Japan Neuroscience Society

Editor-in-Chief

M. Ito, Department of Physiology, Faculty of Medicine, University of Tokyo, 3-1, Hongo 7 – chome Bunkyo-ku, Tokyo 113, Japan.

Editorial Board

S. Amari, *Tokyo, Japan*
Y. Hotta, *Tokyo, Japan*
A. Kaneko, *Okazaki, Japan*
H. Kawamura, *Tokyo, Japan*
Y. Kidokoro, *San Diego, CA, U.S.A.*
K. Kubota, *Inuyama, Japan*
N. Mizuno, *Kyoto, Japan*
K. Obata, *Gunma, Japan*
M. Otsuka, *Tokyo, Japan*
K. Sasaki, *Kyoto, Japan*
M. Satake, *Niigata, Japan*
A. Sato, *Tokyo, Japan*
N. Tsukahara, *Osaka, Japan*
K. Yagi, *Tochigi, Japan*

Advisory Board

J.M. Brookhart, *Portland, OR, U.S.A.*
C. Edwards, *Albany, NY, U.S.A.*
K. Hama, *Okazaki, Japan*
S. Homma, *Chiba, Japan*
M. Kuno, *Kyoto, Japan*
J. Nakai, *Tsukuba, Japan*
K. Otani, *Chiba, Japan*
Y. Sano, *Kyoto, Japan*
R.F. Schmidt, *Wurzburg, F.R.G.*
T.A. Sears, *London, U.K.*
H. Shimazu, *Tokyo, Japan*
H. Takagi, *Kyoto, Japan*
Y. Tsukada, *Tokyo, Japan*
W.D. Willis, Jr., *Galveston, TX, U.S.A.*
T. Yonezawa, *Kyoto, Japan*

Neuroscience Researchは，日本神経科学協会機関誌で，Editor-in-Chief 伊藤正男教授ほか14名の編集委員と外国人6名を含む15名の編集顧問を迎え，本格的な国際雑誌として1984年2月に創刊されました．

本誌は神経科学の全分野を分子レベルから行動レベルまでカバーし，神経組織の活性物質から脳の発生，遺伝的側面，ニューロンにおける信号伝達の化学的，電気的またイオンの機構，神経回路の構造の機能，記憶と学習，生物時計，睡眠と覚醒，自律系の調節，感覚と認識，運動調節，動物の行動，高次神経機能一般といった広汎な問題を取り扱うことを意図しています．

投　稿　先

伊藤正男 教授
日本エルゼビア出版 編集部 気付
〒113 東京都文京区湯島 3 － 28 － 1
(Page Chargeにつきましては，日本神経科学協会へお問い合せ下さい．)

予約購読案内

Neuroscience Research 1986 Volume 3（年6冊）
個人価格　¥13,750（航空送料込み）
図書館価格　US$116.50（航空送料込み）

- 個人購読のご注文は，エルゼビア東京支社にてお受けいたします．（見本誌および郵便振替用紙は下記宛ご請求下さい．）
- 日本神経科学協会専門会員には本誌は別途頒布されます．
- 図書館購読のご注文につきましては，外国雑誌取り扱い書店へお申し込みください．



ELSEVIER

エルゼビア東京支社
〒113 東京都文京区湯島3－28－1

日本生化学会編

続 生化学実験講座

全8巻・12~15冊

第1回配本 ■ 10月3日

以降年間10冊内外配本の予定

A5判上製・箱入／各冊400ページ内外

予定価　各 4000 ~ 5500円

全巻一覧

第1巻　遺伝子研究法
- I　核酸の化学と分析技術
- II　組換えDNA技術
- III　細胞工学的技術

第2巻　タンパク質の化学

第3巻　膜脂質と血漿リポタンパク質

第4巻　複合糖質研究法
- I　糖タンパク質
- II　糖脂質とプロテオグリカン

第5巻　免疫生化学研究法

第6巻　細胞骨格の構造と機能（上，下）

第7巻　情報伝達と細胞応答

第8巻　血　液

第1回配本 ■ 第4巻

複合糖質研究法

I 糖タンパク質

編集担当：大沢利昭，木幡　陽，山科郁男

A5判上製・箱入／370ページ／定価 4300円

I．糖タンパク質の分離・精製
1．レクチンカラムによる糖ペプチドおよびオリゴ糖の分画
2．ゲルカラムによるオリゴ糖の同定
3．高速液体クロマトグラフィー
4．酵素的手法による糖鎖の切出し
5．化学的手法による糖鎖の切出し

II．糖タンパク質の構造決定法
6．アスパラギン結合糖鎖の構造決定例
7．リソソーム酵素のアスパラギン結合糖鎖の構造決定
8．ムチン型糖鎖の構造決定

III．糖タンパク質の代謝と機能
9．哺乳動物のエンド-β-N-アセチルグルコサミニダーゼ
10．シアリダーゼとシアリルトランスフェラーゼ
11．グリコシルトランスフェラーゼ
12．動物レクチン
13．代謝異常

第2回配本 ■ 第6巻

細胞骨格の構造と機能(上)

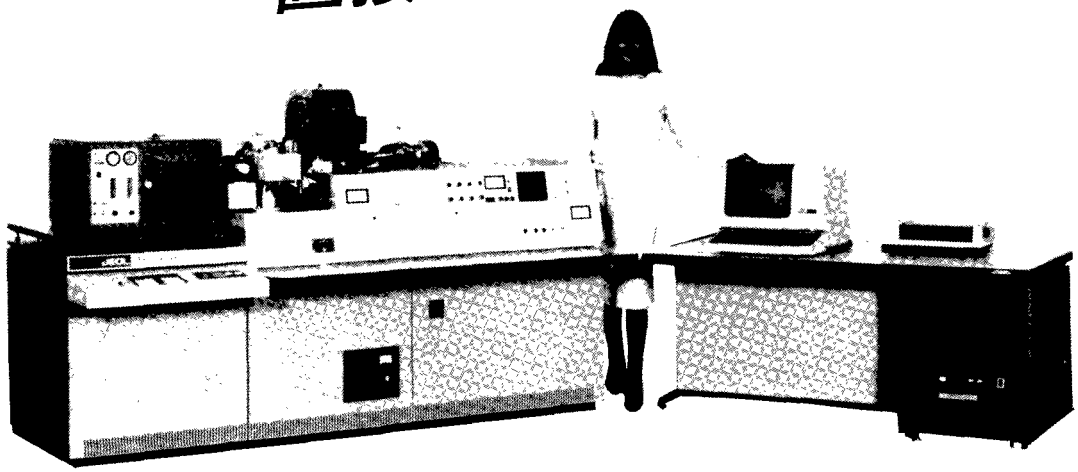
編集担当：丸山工作，矢原一郎

A5判上製・箱入／350ページ／定価 4200円

112 東京都文京区千石3丁目36-7　**東京化学同人**　振替東京3-84301：電話946-5311

JMS-DX303
ガスクロマトグラフ質量分析計

0.1秒超高速スキャン
高感度磁場スイッチングSIM
直接導入形LC/MS



JMS-DX303/JMA-DA5000　GC/MSシステム

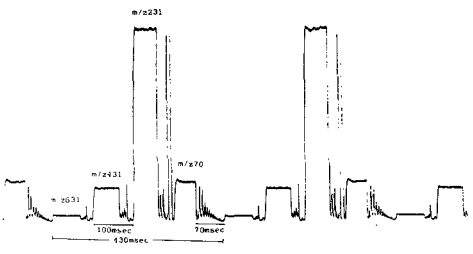
〈主な仕様〉

分 解 能：25,000（10%谷）

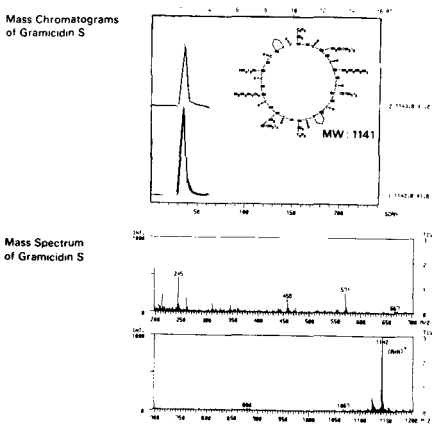
感　　度：0.05ng S/N≧10(メチルステアレートM$^+$298)

質量範囲：≧4,500

イオン源：EI, CI, DCI, FD, FAB



●高速磁場スイッチングの応用



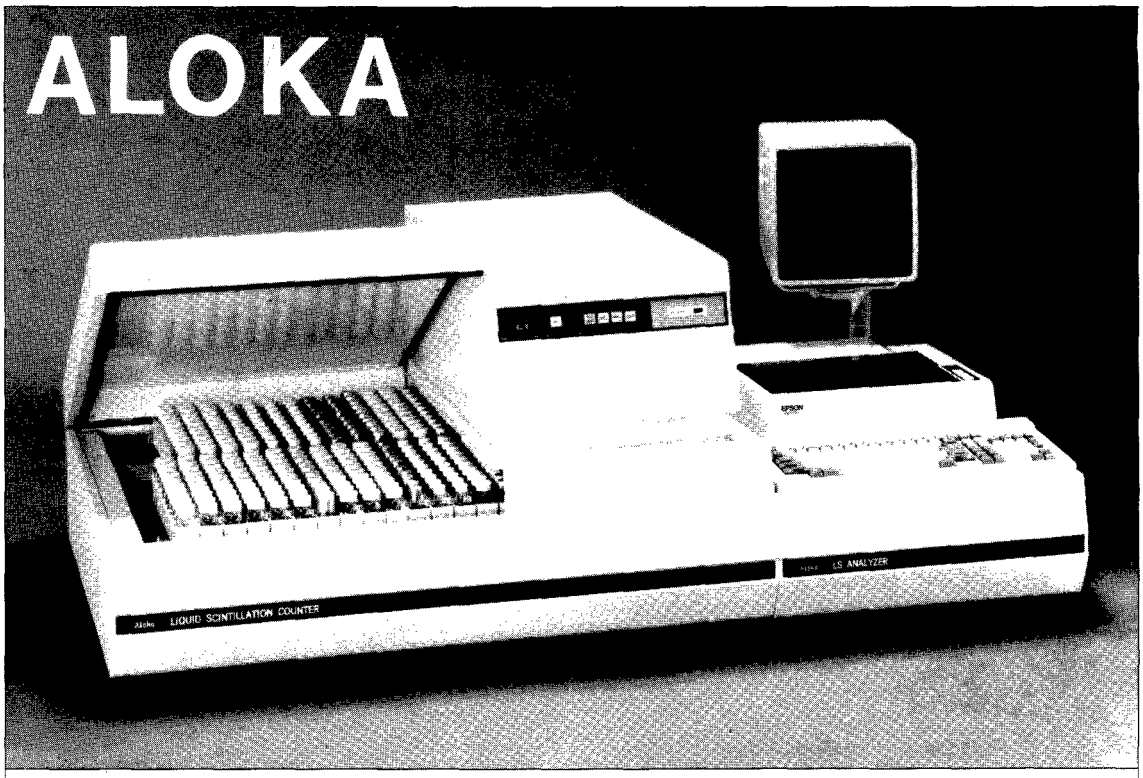
●LC/MSの応用

Serving Advanced Technology

JEOL 日本電子

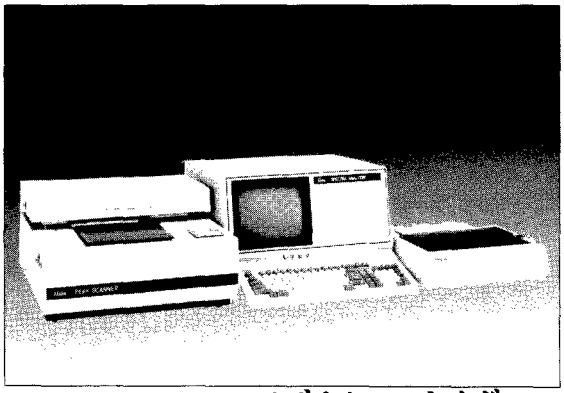
東京事務所　100 東京都千代田区丸の内3－3－1・新東京ビル☎(03)211－8611
本　社・昭島製作所　(0425)43－1111　　東京第二事務所　(03)348－6321
札　幌(011)726 9680　仙　台(0222)22 3324　筑　波(0298)24 1286　名古屋(052)581 1406
大　阪(06)304 3941　広　島(082)248 2831　高　松(0878)21 8487　福　岡(092)411 2381

ALOKA



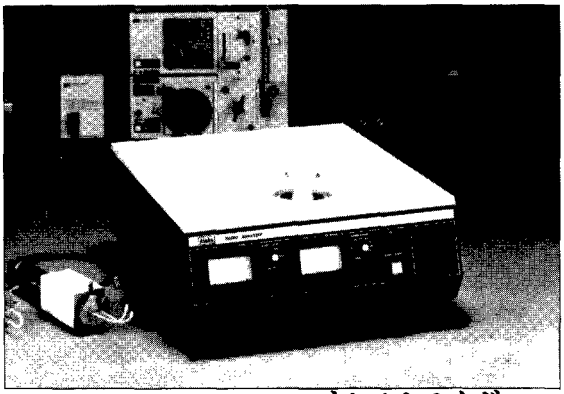
この装置は、アロカ独自の新しい測定方法により、特殊測定はもちろん、ライフサイエンス研究などの多様化する測定方法にも十分対応できるよう、設計されています。また、ラック方式を採用しているため、操作性はもとより省スペースでご使用いただけます。

液体シンチレーションシステム
LSC-1000 シリーズ



ラジオクロマナイザー
JTC-501

この装置はラジオ薄層クロマトグラム、ペーパクロマトグラムの放射能の分布を高感度、高分解能で測定記録し、データ処理を行うラジオクロマトグラムアナライザーです。



ラジオアナライザー
RLC-551

この装置は、高感度ガラスシンチレータを使用してカラム溶離液中の成分分析と同時に連続して流れる放射性成分の測定を行い、あらゆる液体試料の放射能分析ができ、測定後の試料分取も容易です。

Aloka **アロカ株式会社**

〒181 東京都三鷹市牟礼6丁目22番1号 ☎(0422)45−5111

札幌営業所 (011)726-6604　仙台営業所 (0222)62-7181　名古屋営業所 (052)203-0571　大阪営業所 (06)344-5391
高松営業所 (0878)22-5217　広島営業所 (082)292-0019　福岡営業所 (092)411-5735　熊本営業所 (096)366-9201

静注用人免疫グロブリン製剤

ベニロン®

乾燥スルホ化人免疫グロブリン

用法・用量

1.低又は無ガンマグロブリン血症
2.重症感染症における抗生物質との併用
3.特発性血小板減少性紫斑病（他剤が無効で著明な出血傾向があり、外科的処置又は出産など一時的止血管理を必要とする場合）

効能・効果

本剤は、添付の日局注射用蒸留水（500mg製剤では10ml、1,000mg製剤では20ml、2,500mg製剤では50ml）に溶解して点滴静注するか、又は徐々に直接静注する

低又は無ガンマグロブリン血症、重症感染症における抗生物質との併用に用いる場合は、通常、成人に対しては、1回にスルホ化人免疫グロブリン2,500mg（50ml）1～2本を、小児に対しては、1回にスルホ化人免疫グロブリン50～150mg（1～3ml）/kg体重を投与する。なお、年齢および症状に応じて適宜増減する

特発性血小板減少性紫斑病に用いる場合は、通常、1日にスルホ化人免疫グロブリン200～400mg（4～8ml）/kg体重を投与する。なお、5日間投与しても症状の改善が認められない場合は以降の投与を中止すること。年齢および症状に応じて適宜増減する

ベニロンの新しい適応

ITPに対して

Fcの薬効"血小板増加効果"



Venilon®

●効能・効果追加 他剤抵抗性の**特発性血小板減少性紫斑病**に！

製造元・販売
化血研
〒860 熊本市清水町大窪668

Amersham

Ca^{2+}/Cl^- チャンネル リガンド

Class I type (1,4-Dihydroprine type)

[^{3}H]**Azidopine**
40–60Ci/mmol — TRK.821

[^{125}I]**Iodipine**
>2000Ci/mmol — IM.251

(+)-[^{3}H]PN200-110
70–85Ci/mmol — TRK.787

	K_D(nM) to skeletal muscle
Azidopine	0.4
Iodipine	0.4
(+)-PN200-110	0.7
Nifedipine	4.0

Class II type (Phenylalkylamine type)

(−)-[*N-methyl*-^{3}H]Desmethoxyverapamil ((−)-D888)*
60–85Ci/mmol — TRK.834

	K_D(nM)	Specific binding (%)
(−)-D888	1.6	80 in Guinea-pig hippocampus
Verapamil	40	52 in Rat cerebral cortex

Class III type (Benzothiazepine type)

d-cis-[^{3}H]**Diltiazem hydrochloride***
120–170Ci/mmol — TRK.789

* with agreement of Knoll AG, Ludwigshafen, West Germany
* with agreement of Tanabe Seiyaku Co. Ltd., Osaka, Japan

GABA antagonist (Cl リガンド)

[^{3}H]**TBOB**
(1-[^{3}H]Phenyl-4-t-buthyl-2,6,7-trioxabicyclo[2.2.2]octane)
20–60Ci/mmol — TRK.849

詳しい資料を用意しています。アマシャム・ジャパン㈱までご請求下さい。

アマシャム・ジャパン株式会社
東京都文京区白山5丁目1番3 東京富山会館
〒112 TEL.03-816-6161(代表)

神経作用研究試薬



● 中枢神経系作用物質

バルビタール酸誘導体
抗痙攣物質
解熱性鎮痛・抗炎症物質
麻薬拮抗物質
精神抑制物質
中枢性骨格筋弛緩物質
中枢神経系興奮物質

● 末梢神経系作用物質

局所麻酔物質
副交感神経系作用物質
副交感神経遮断物質
神経節作用物質
交感神経様作用物質
交感神経遮断物質
神経筋接合部作用物質

和光純薬工業株式会社

本　社　大阪市東区道修町3丁目10番地
〒541　電話　大阪(06)203-3741(大代表)
東京支店　東京都中央区日本橋本町4丁目7番地
〒103　電話　東京(03)270-8571(大代表)
出張所　福岡・広島・名古屋・横浜・大宮・筑波・仙台・札幌



アイソトープの御注文は

社団法人 日本アイソトープ協会 業務課まで

東京都文京区本駒込2-28-45　電話 東京(03)946-7111(代表)

輸入販売元

室町化学工業株式会社

アイソトープ部

〒103 東京都中央区日本橋室町4-3 TEL.03-241-7191(代)

ドータイト試薬情報

膜蛋白溶解剤

○新しい膜蛋白溶解剤　*n*-Heptyl-β-D-thioglucoside, *n*-Octyl-β-D-thioglucoside (試作品)

●膜蛋白のノニオン性可溶化剤　*n*-Octyl-β-D-Glucoside

●膜蛋白溶解剤　CHAPS, CHAPSO

●膜蛋白のノニオン性可溶化剤　MEGA-10, MEGA-9, MEGA-8

細胞内の情報探知試薬

●細胞内カルシウムの選択的蛍光試薬　QuinⅡ-AM, QuinⅡ, BAPTA

●細胞内の粘度変化をつかまえる試薬　Azido-FDA

●疎水場蛍光プローブ　AO-10-Dodecyl bromide

蛍光ラベル化剤・蛍光基質

●アミノ酸，アミン類の蛍光試薬　NBD-F

●芳香族アルデヒドの蛍光試薬　DTAN

●SH基検出の新蛍光試薬　NAM, SBD-Cl, SBD-F

●ペルオキシダーゼの蛍光基質　HPPA

ドータイト試薬発売元

和光純薬工業株式会社

本　　社　大阪市東区道修町３丁目10
電話 06 (203) 3741 (代表)
東京支店　東京都中央区日本橋本町４丁目７
電話 03 (270) 8571 (代表)

ドータイト試薬製造元

株式会社同仁化学研究所

〒862　熊本市健軍町２８６１
電話 096 (368) 4141 (代表)
ファックス 096 (369) 0030

神経化学　第24巻　第1号

昭和60年9月30日発行
編集兼発行者　日本神経化学会
代　表　者　塚田　裕三
発　行　所　日本神経化学会
〒160 東京都新宿区信濃町35
慶応義塾大学医学部生理学教室内
印　刷　所　熊本県印刷センター